



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL



**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE VARIEDADES
DE PINHEIRA (*Annona squamosa* L.)**

Rio Largo
Alagoas-Brasil, 2016



GABRIEL DE LIMA FAUSTINO



**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE VARIEDADES
DE PINHEIRA (*Annona squamosa* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre em Agronomia: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos.

Rio Largo

Alagoas-Brasil, 2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

F268c Faustino, Gabriel de Lima.
Caracterização morfológica e molecular de variedades de pinheira (*Annona squamosa* L.) / Gabriel de Lima Faustino . – 2016.
53 f. : tabs., grafs.

Orientador: Eurico Eduardo Pinto de Lemos.
Dissertação (mestrado em Agronomia : Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2016.

Inclui bibliografia

1. Pinha – Cultivo. 2. Germoplasma. 3. *Annonaceae*. 4. Ata. 5. Fruta-do-conde.
I. Título.

CDU: 634.41

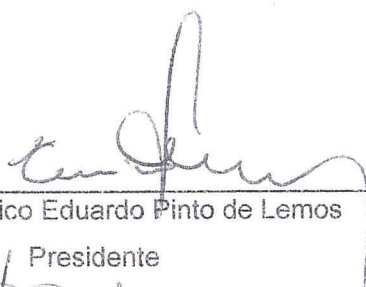
TERMO DE APROVAÇÃO

GABRIEL DE LIMA FAUSTINO

(Matrícula14130238)

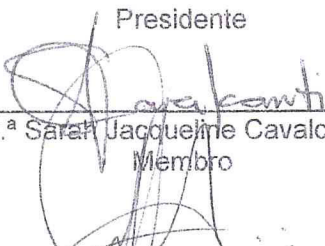
“CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE PINHEIRA
(ANNONA SQUAMOSA L.)”

Dissertação apresentada e avaliada pela banca examinadora em vinte e oito de junho de 2016, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal do Programa de Pós-Graduação em Agronomia “Produção Vegetal” da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias da UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS.



Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos

Presidente



Prof.ª Dr.ª Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva

Membro

Dr. Jorge Luiz Xavier Lins Cunha

Membro

RIO LARGO – AL
Junho/2016

A Deus, por sua infinita bondade e sua grandeza expressa a cada nascer do sol

A Luana Andrade, minha esposa, pela compreensão nas ausências e momentos importantes, e nas horas madrugada a dentro de dedicação ao trabalho.

A minha avó Nazaré Lima, (*in memoriam*), por tudo que me ensinou, e pela pessoa que sou hoje.

DEDICO

A todos os meus familiares e amigos, em especial as minha tias, Tânia Lima, pelo companheirismo em todas as batalhas ao longo da caminhada.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Alagoas, pela formação acadêmica desde a graduação;

Ao professor Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos, pela amizade, orientação e por ter confiado em mim para a realização do trabalho;

Ao professor Gildemberg Amorin Leal Júnior, pelo apoio e disponibilidade na resolução de diversos problemas, encontrados no caminho;

Ao professor Júlio Alves, pela amizade, e valorosa contribuição durante a pesquisa;

Ao Dr João Gomes da Costa, pelo apoio na análise dos resultados, com ensinamentos valoroso, que ficarão pra sempre.

À professora Dr^a Leila de Paula Rezende, pelos ensinamentos, amizade e incentivo;

Aos professores do corpo docente da Pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos;

Ao laboratório de microscopia e molecular, pela concessão do espaço para a realização dos trabalhos.

Ao laboratório de fitopatologia molecular, em especial aos professores Gaus Andrade, Iraídes Assunção, pela concessão de espaço, equipamentos e reagentes, que foram extremamente importantes para a realização das atividades,

À Embrapa Tabuleiros costeiros pela concessão do laboratório para a realização das análises.

Aos colegas de laboratório, Livoney, Paula, Élide, Tatiana, Taciana, Éverton, Khayke, Anderson, Ivanildo, Janine, e aos funcionários da chácara das anonáceas, João e Venceslau pelas boas horas de convivência no trabalho diário

A todos meus colegas de curso, pela dedicação e horas de esforço para atingirmos nosso objetivo, pelo apoio em todos os momentos, e também pela amizade gerada e que se estenderá ao longo dos anos.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação acadêmica, **MUITO OBRIGADO.**

RESUMO GERAL

A pinheira (*Annona squamosa* L.) é uma fruteira tropical da família Annonaceae que produz frutos muito delicados e doces, sendo considerados um dos melhores do gênero *Annona*. Por ser uma espécie muito precoce e ter uma população aparentemente homogênea, no Brasil a sua propagação tem sido feita por sementes. Todavia, considerando ser esta uma espécie preferencialmente alógama, por ter uma dicogamia protogínica e suas populações se entrecruzado naturalmente durante séculos, é de se esperar que tenham surgido neste período variações genotípicas interessantes que possam ser identificadas e posteriormente utilizadas em futuros programas de melhoramento da espécie. Acredita-se que o levantamento de marcadores morfológicos e moleculares possam identificar tais variações e sirvam de ferramentas auxiliares aos melhoristas. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar morfológica e molecularmente acessos de pinheira da coleção de germoplasma do CECA-UFAL utilizando como base um conjunto de descritores morfológicos desenvolvidos para *Annona cherimola* Mill. pelo International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) e marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR). Os resultados mostraram que os descritores morfológicos propostos conseguiram separar os acessos de pinheira estudados em 4 grupos distintos, estabelecendo assim informações novas acerca dos genótipos do banco. Já a caracterização molecular com os marcadores SSR não se mostrou eficiente para separar os genótipos estudados, requerendo assim um ajuste nos *primers* utilizados.

Palavras chave: Annonaceae, Pinha, Fruta-do-conde, Ata, Germoplasma.

GENERAL ABSTRACT

Sugar apple (*Annona squamosa* L.) is a tropical fruit tree of the Annonaceae family that produces soft and delicate fruits, being considered one of the best on *Annona* genus. In Brazil, sugar apple has an apparently homogeneous population and its propagation has been made by seeds. However, considering that this is a preferentially allogamous species, which has a protogynous dicogamy, and their populations are interbreeding naturally for centuries, it is expected that arose in this period interesting genotypic variations that can be identified and subsequently used in future breeding programs. It is believed that the identification of morphological and molecular markers to identify such variations can be used as auxiliar tools to plant breeders. This study aimed to characterize morphologically and molecularly sugar apple accessions from a germplasm collection of the CECA-UFAL using as a basis a set of morphological descriptors developed to *Annona cherimola* Mill. by the International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) and molecular markers type microsatellites (SSR). The results showed that the morphological descriptors were able to separate the sugar apple accessions studied in four different groups, thus establishing new information about the bank genotypes. On the other hand, the molecular characterization with the SSR markers was not efficient to separate the same genotypes, thus requiring an adjustment in the primers used.

Keywords: Annonaceae, Sugar apple, Custard apple, Germplasm.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Dendrograma de similaridade genética entre dezenove genótipos de pinha (*A.squamosa* L.) obtido pelo método do vizinho mais próximo, com base na matriz de dissimilaridade dos dados quantitativos. CECA-UFAL, AL 2016.....34
- Figura 2 Análise dos componentes principais (CP1 e CP2), com 52, 20% de variância acumulada, entre dezenove genótipos de pinha (*A. squamosa* L.), baseados em características quantitativas.....35
- Figura 3 Gel de Agarose 0,8% com a apresentação do resultado da extração de DNA de 15 genótipos utilizando o método Mogg e bond 2003. 1 Kb corresponde ao marcador padrão para tamanho de fragmentos, em relação ao padrão molecular de 1 kb DNA Ladder, Kasvi.....46
- Figura 4 Gel de Agarose 3,0 % com o resultado da PCR-teste com os primers LMCH, utilizando o mesmo DNA (genótipo 37) como DNA molde para os iniciadores, em relação ao padrão molecular de 1 kb DNA Ladder, Kasvi.....47
- Figura 5 Fragmentos amplificados utilizando-se o primer LMCH 5, onde os fragmentos de todos os acessos aparentemente apresentam o mesmo tamanho de aproximadamente 200 pb, em relação ao padrão molecular de 1 kb DNA Ladder, Kasvi.....47
- Figura 6 **Figura 6.** Gel de Agarose a 3,0% onde é possível visualizar a amplificação da região do primer LMCH5 com os genótipos: 01, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 12, 18, 19, 22, 23, 24, 27, 29, 37, 39, 41, 43, e branco, onde não é possível diferenciar os genótipos, devido ao mesmo padrão de intensidade dos fragmentos amplificados, com tamanho entre 155–160pb, em relação ao padrão molecular de 1 kb DNA Ladder, Kasvi.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela de médias de caracteres morfológicos quantitativos de 19 genótipos de pinha avaliados a campo, CECA, UFAL, 2016.....	28
Tabela 2	Tabela de médias de caracteres morfológicos quantitativos de 19 genótipos de pinha avaliados a campo, CECA, UFAL, 2016.....	29
Tabela 3	Contribuição relativa dos caracteres quantitativos para a divergência genética entre 19 genótipos de pinha (<i>A. squamosa</i> L) pelo método proposto por Singh (1981) CECA UFAL 2016.....	30
Tabela 4	Medidas de dissimilaridade entre 19 genótipos de pinha, com base na distância Euclidiana média. CECA-UFAL, AL, 2016.....	31
Tabela 5	Grupos de genótipos de pinha estabelecidos pelo método de Tocher com base na dissimilaridade expressa pela distância Euclidiana média a partir de 15 caracteres quantitativos. CECA UFAL, AL, 2016.....	33
Tabela 6	conjuntos de <i>primer's</i> utilizados no trabalho, suas respectivas sequências e tamanho em pares de base.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	A Família <i>Annonaceae</i>	15
2.2	A Cultura da Pinha no Brasil	15
2.3	Caracterização Morfológica	16
2.3.1	Uso de Descritores Morfológicos.....	17
2.4	Análise da Diversidade Genética	17
2.5	Importância da Caracterização Molecular	18
	REFERÊNCIAS	20
3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ACESSOS DE PINHA (<i>Annona squamosa</i> L.) NO BANCO DE GERMOPLASMA DO CECA-UFAL	23
3.1	Introdução	25
3.2	Material e Métodos	27
3.2.1	Caracterização Morfológica.....	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Descritores Quantitativos	28
4.2	Contribuição Relativa das Características Estudadas	29
4.3	Avaliação da Diversidade Genética	30
5	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37
6	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE PINHA (<i>Annona squamosa</i> L.) ATRAVÉS DE MARCADORES SSR	39
6.1	Introdução	41
6.2	Material e Métodos	44
6.2.1	Coleta das amostras.....	44
6.2.2	Extração de DNA.....	44
6.2.3	Amplificação com <i>primer's</i> SSR.....	44
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
7.1	Resultado da extração de DNA	46

7.2	Resultado da reação de PCR com <i>primer's</i> SSR	46
8	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

INTRODUÇÃO GERAL

A pinha pertence à família *Annonaceae*, gênero *Annona*, que inclui em torno de 120 gêneros e cerca de 2000 espécies (FECHINE et al., 2002). A espécie *Annona squamosa* produz frutos delicados, considerados dos melhores do gênero. A pinha é também conhecida como ata e fruta-do-conde no Brasil, anona blanca, sweetsop, anon, anona, rinon, atta del Brasil, srikaya, atis, etc. De acordo com Braga (1960), a pinheira é uma planta americana, talvez originária das Antilhas e regiões circunvizinhas, cuja introdução na África e na Ásia está claramente demonstrada (Leal, 1990).

Segundo Mosca (2006) a pinheira (*Annona squamosa* L.) é uma fruteira de importância econômica originária das terras baixas da América Central e México

A rápida e extensa disseminação da pinheira no Brasil foi facilitada pela capacidade dos frutos em produzir muitas sementes (KILL; COSTA, 2003). Embora as sementes sejam resultantes da polinização cruzada por insetos, o que favorece a heterozigose, a propagação seminal de uma limitada população inicialmente introduzida provavelmente favoreceu a manutenção da baixa variabilidade genética na espécie no Brasil. Todavia, séculos depois, se constata nas áreas de produção pomares heterogêneos de pinheira, sobretudo na capacidade produtiva das plantas que pode ter ocorrido devido à deriva e fixação de alelos nas diferentes áreas de cultivo.

Por ter-se originado de um conjunto inicial de sementes bastante restrito, no Brasil, a pinheira tem uma população aparentemente homogênea. Porém, considerando ser uma espécie preferencialmente alógama, por apresentar nas suas flores o fenômeno da dicogamia protogínica, as populações de pinheira e de outras espécies de anonáceas nativas e compatíveis tem se entrecruzado naturalmente durante séculos, influenciando assim o surgimento de algumas variações genotípicas interessantes (LEMOS et al., 2010).

De acordo com Lemos, (2010) mutações ocorreram ao longo dos séculos, e genótipos incomuns como frutos sem sementes, de coloração variando do verde ao roxo, exocarpo liso ou pontiagudo, plantas anãs ou desprovidas de cutícula cerosa, distinções na sua textura, entre outros aspectos podem ser visto entre as pinheiras cultivadas no Brasil. A caracterização morfológica através de descritores botânicos visíveis e mensuráveis é um dos métodos mais utilizados para distinguir cultivares de diversas espécies vegetais. Na família *Anonaceae*, a caracterização morfológica de cultivares foi proposta apenas para a cherimóia (*Annona cherimola* L.) pela sua grande variabilidade

natural e obtida através de programas de melhoramento em todo o mundo (CHERLA, 2008). No estado de Alagoas, no município de Palmeira dos Índios, observou-se uma planta com características morfológicas diferentes da cultivar mais plantada conhecida por Crioula. A caracterização dos materiais existentes no banco de germoplasma, permite diferenciar os acessos mais promissores dos menos produtivos, que hoje são classificados como pertencentes ao mesmo grupo de plantas.

Segundo Rodrigues (2010), a caracterização morfológica tem a finalidade de descrever os atributos fenotípicos relacionados à espécie e faz uso de descritores para facilitar a identificação da divergência genética entre espécies.

Técnicas da biologia molecular são empregadas para obtenção de informações sobre aspectos genéticos das espécies vegetais, uma vez que os marcadores moleculares são uma importante ferramenta para descrever padrões de variabilidade genética de uma população natural ou entre populações naturais. Existem vários tipos de marcadores moleculares, que se diferenciam em função da metodologia empregada com a finalidade de se detectar a variabilidade genética das espécies, tais como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e as baseadas na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), os microssatélites, também conhecida como SSR (*Simple Sequence Repeats*) além do ISRR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

Para que se viabilize um programa de melhoramento é necessário caracterizar a diversidade genética existente em um banco de germoplasma e desenvolver ferramentas que auxiliem os cruzamentos assistidos. A ferramenta mais conhecida que possa assessorar um programa de melhoramento, além da estatística, são os marcadores moleculares, e os marcadores de amplo uso são os microssatélites.

O marcador microssatélites, tornou-se mais comum por avaliar todo o genoma, ser específico, mais informativo, e confiável. A aplicação do marcador já foi registrada para outros membros da família das anonáceas como *A. cherimola* e *A. crassiflora*. As marcas produzidas foram também identificadas nas demais espécies da família como também para *A. squamosa* (Escribano, 2004)

O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização morfológica e molecular de acessos de pinha *A. squamosa*, do banco de germoplasma pertencente Universidade Federal de Alagoas - UFAL.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Família *Annonaceae*

A família botânica *Annonaceae* possui importância evolutiva, ecológica e econômica. Em número de espécies, a família *Annonaceae* é a que mais sobressai dentro da ordem das *Magnoliales*, uma das mais primitivas entre as angiospermas. As *Annonaceae* estão distribuídas entre as áreas tropicais da América, África e Ásia. (SCALOPPI-JÚNIOR 2007).

As anonas representam um nome genérico para designar as plantas da família *Annonaceae* constituída por cerca de 120 gêneros e 2.300 espécies. No Brasil, estão registrados 29 gêneros, dentro dos quais cerca de 260 espécies sendo algumas de importância econômica. Entre as espécies de maior importância comercial destacam-se a graviola (*Annona muricata* L.), pinha (*Annona squamosa* L.), cherimóia (*Annona cherimoia*, Mill.) e a atemóia, híbrido a *A. cherimoia* e *A. squamosa*. (KAVATI, 1997).

A maioria das espécies dessa família é considerada subutilizada e informações sobre elas são escassas e amplamente dispersas. Todavia, as áreas cultivadas com algumas dessas espécies tem crescido mais rapidamente do que a contribuição da ciência e tecnologia (PINTO et al, 2005).

2.2. A Cultura da Pinha no Brasil

No Brasil, a pinheira se adaptou muito bem principalmente nos estados do Nordeste como a Bahia, Alagoas, Pernambuco e Ceará, e no Sudeste nos estados de São Paulo e Minas Gerais .A pinheira (*Annona squamosa* L.) também conhecida como ateira ou fruta-do-conde, é uma fruteira pertencente à família das Anonáceas, a qual tem se destacado no mercado de frutas frescas tropicais. Acredita-se que sua introdução no Brasil ocorreu a partir da América Central, seu provável centro de dispersão, em 1626 e foi introduzida na bahia pelo Conde de Miranda, onde propagou-se para todo o território brasileiro. (PINTO et al, 2005).

São cultivados cerca de 10.500 ha de pinheira, com uma média de 21.000[1] toneladas de frutos/ano (IBGE,2010), o que é considerada uma produção pequena. Entre as causas possíveis para essa baixa produtividade destaca-se a baixa tecnologia utilizada ao cultivo pela maioria dos produtores. Agricultores mais tecnificados que fazem uso de

tecnologia associadas a uma densidade de plantio (2 x 4) podem atingir uma produção de 15 ton/ha/ano ou 12 kg/planta de frutas de alta qualidade sendo bem aceitas nos melhores mercados brasileiros. Nestas condições os preços obtidos pelos produtores pode variar entre 2 e 3 US\$ o quilo, sendo ainda mais compensadores em épocas de entressafra (DIAS et al., 2004).

Com destaque para a região Nordeste sendo a principal produtora de pinha com mais de 94% de toda a área cultivada no Brasil. Em 2012 os principais estados produtores de pinha no Brasil foram, por ordem de importância, Bahia, Alagoas, Pernambuco, São Paulo e Ceará, sendo a Bahia o maior produtor brasileiro de pinha com área total de mais de 3.500 ha cultivados e produção de 20,8 mil toneladas. Na região Sudeste, os estados de São Paulo e Minas Gerais também apresentam produção significativa de pinha (LEMOS, 2010).

2.3. Caracterização Morfológica

De acordo com Lemos (2010) o cultivo de pinheira no Brasil surgiu de um grupo restrito de sementes, a pinheira apresenta uma população homogênea, porém devido a pinha ser uma espécie alógama, e apresentar fenômeno da dicogamia protogínica em suas flores, e provavelmente a compatibilidade com outras espécies nativas do gênero *Annona*, pode ter ocorrido cruzamentos naturais entre esses indivíduos, durante séculos de exploração, contribuindo para o surgimento de variações fenotípicas.

Lemos (2010) acredita que mutações também podem ter ocorrido ao longo dos séculos e genótipos incomuns como frutos sem sementes, de coloração variando do verde ao roxo, exocarpo liso ou pontiagudo, plantas anãs ou desprovidas de cutícula serosa, distinções na sua textura, entre outros aspectos podem ser visto entre as pinheiras cultivadas no Brasil.

Essas diferenças encontrada em genótipos morfológicamente deferentes, podem ser utilizadas em programas de melhoramento afim de se obter cultivares com melhores características agrônômicas, além de passibilidade de se identificar e caracterizar esses novos genótipos, cultivares, assegurando a identidade genética do material genotípico, e a qualidade do material vegetal, direitos intelectuais aos obtentores e possibilita que órgãos e empresas públicas e privadas possam se beneficiar com a soma de recursos decorrentes dos direitos autorais obtidos. (CARVALHO et al., 2009).

2.3.1 Uso de Descritores Morfológicos

A caracterização morfológica pode ser definida como a coleta de dados qualitativos ou quantitativos de um vegetal com a finalidade de descrever os atributos que permitem diferenciar os acessos mantidos em um banco de germoplasma. A caracterização morfológica é a coleta dos dados relacionados ao fenótipo do indivíduo e faz uso de descritores morfológicos (RODRIGUES et al., 2010). Os descritores morfológicos são definidos como uma característica passível de ser mensurada ou reconhecida, capazes de diferenciar os fenótipos de forma rápida e fácil (RODRIGUES et al., 2010).

Segundo Rodrigues et al., (2010), a caracterização morfológica apresenta algumas vantagens como a praticidade, o baixo custo, a facilidade no manejo dos dados e, ainda, é eficiente em quantificar a divergência genética entre acessos.

2.4 Análise da Diversidade Genética

De acordo com Ferreira (1998), os dados coletados por meio dos descritores morfológicos podem ser qualitativos ou quantitativos, sendo possível se estudar a diversidade genética entre acessos através do uso de análises de estatística multivariada. A estatística multivariada é um conjunto de métodos que permite a análise simultânea de medidas múltiplas para cada indivíduo. Entre as análises multivariadas, os métodos de agrupamentos são responsáveis por encontrar e agrupar as sub-amostras a partir de algum critério (GENEROSO, 2014). Os grupos são obtidos a partir da matriz de similaridade ou dissimilaridade entre os elementos observados para estimar a distância entre os dados (VICINI, 2005). A Distância Euclidiana Média é uma medida de dissimilaridade utilizada em análises de agrupamento, que é obtida pela média dos valores, pode-se utilizar também Distância Euclidiana e a Distância de Mahalanobis (VICINI, 2005). Cruz e Carneiro (2003) apresentaram o método de Tocher, sendo um método de otimização, que permite a formação de grupos exclusivos simultaneamente e separando os indivíduos de uma só vez. O método de Tocher é, normalmente, utilizado juntamente com o UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), este utiliza a média das distâncias entre todos os pares de indivíduos para a formação de cada grupo (GENEROSO, 2014).

2.5. Importância da Caracterização Molecular

Inicialmente para viabilizar um programa de melhoramento de plantas é necessário caracterizar a diversidade genética presente num dado banco de germoplasma e desenvolver ferramentas que auxiliem cruzamentos assistidos. Entre as ferramentas moleculares mais conhecidas que podem auxiliar um programa de melhoramento genético de plantas estão os marcadores moleculares de amplo uso chamados microssatélites (ESCRIBANO et al., 2004).

O marcador baseado em microssatélites tornou-se mais comum por avaliar todo o genoma, ser específicos, mais informativo, robusto e confiável. A aplicação do marcador já foi registrada para a espécie cultivável *Annona cherimola* e a silvestre *Annona crassiflora*, membros da família das anonáceas. As marcas produzidas foram também identificadas nas demais espécies da família com as quais foram testadas, entre elas *A. squamosa*.

Os marcadores moleculares são conhecidos por utilizarem regiões identificáveis do DNA como marcar para avaliarem o polimorfismo na população, auxiliar na construção de mapas genéticos e associar as marcas com características de interesse ou regiões genômicas. Os marcadores moleculares podem ser divididos em duas classes: os baseados na reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e os não baseados em PCR conhecidos como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (JONES et al., 2009).

O primeiro marcador molecular desenvolvido baseado na amplificação de DNA por PCR foi o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Neste caso, a sequência de nucleotídeos dos iniciadores é aleatória permitindo amplificar fragmentos de DNA ao caso e em qualquer espécie (WILLIAMS et al., 1993).

O RAPD é de fácil execução, com rápida obtenção de marcadores e requer pequenas quantidades de DNA genômico (10 a 100 ng), tem baixo custo, descarta a hibridação e não utiliza radioisótopos. O polimorfismo detectado concentra em regiões altamente repetitivas e tem um nível elevado de polimorfismo quando se compara com outros marcadores moleculares. A inespecificidade dos iniciadores tornou a técnica amplamente utilizada em várias espécies de plantas (WILLIAMS et al., 1993), sendo útil no auxílio à pesquisa de caracterização de recursos biológicos e variedades (FAIRBANKS et al., 1993; AUKAR et al., 2002).

O RAPD pode ser utilizado para avaliação de segregação de cruzamentos e análise

de fingerprint (WEEDEN et al., 1994; BIANCHI et al. 2003), relação genética entre cultivares e determinação de marcadores específicos para grupos de cultivares (OLIVEIRA et al. 1999) As desvantagens do marcador relacionam-se à reprodutibilidade dos resultados, ambiguidade na interpretação das bandas, co-migração de fragmentos de igual ou tamanho muito próximo e ao caráter dominante da maioria dos marcadores obtidos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Alguns microssatélites já foram desenvolvidos para espécies de anonáceas. O uso de microssatélites foi relatado para a espécie agrônômica *A. cherimola* (ESCRIBANO et al., 2008) e a silvestre *Annona crassiflora* (PEREIRA et al., 2008). Utilizando a abordagem de bibliotecas foram desenvolvidas 66 marcas para *A. squamosa*, havendo inúmeras a serem sequenciadas. Os marcadores desenvolvidos identificados foram polimórficos sendo alguns selecionados como padrão para detecção de polimorfismo entre laboratórios. Com *A. squamosa* os marcadores de microssatélites apenas foram utilizados para demonstrar a transferência dos marcadores de *A. cherimola*.

Escribano et al., (2007) conseguiram confirmar o sucesso dos microssatélites para identificação de diversidade genética e origem geográfica em *A. cherimola* podendo também obter o mesmo sucesso para *A. squamosa*.

Os tipos de marcadores moleculares são inúmeros sendo que sua aplicação depende do objetivo do trabalho, informação que se deseja resgatar e as condições de estrutura do laboratório.

No entanto, os microssatélites tem se destacado com várias espécies e o mesmo está acontecendo com as anonáceas em todo o mundo devido a precisão das informações obtidas neste método, apesar dos variantes morfológicos de pinheira ter sua origem derivada de poucas sementes restringindo a amostra de alelos da população. Esta base genética restrita provavelmente levou à fixação de alelos nas populações cultivadas criando populações locais diferenciadas para alguma característica e que de alguma forma influencia a produção.

REFERÊNCIAS

AUKAR, A.P. de A.; LEMOS, E.G. de M.; OLIVEIRA, J.C. Genetic variations among passion fruit species using RAPD markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v.24, n.3, p. 738-740, 2002.

BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C.; SCHUCH, M.W. RAPDs na caracterização genético-molecular e no estudo da variabilidade genética de cultivares de ameixeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v.25, n.2, p. 272-274, 2003.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2a ed. Fortaleza: Imprensa Oficial. 274p. 1960.

CARVALHO SIC; BIANCHETTI LB; REIFSCHEIDER FJB. 2009. Registro e proteção de cultivares pelo setor público: a experiência do programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, p.135-138, abr.-jun. 2009.

CHERLA. Bioversity International and. Descriptors for Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). Bioversity International, Rome, Italy; CHERLA Project, Malaga, Spain. 2008.

CRUZ, C. D., CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, v.2. 2003.

DIAS, N. O.; SOUZA I. V. B.; SILVA, J. C. G.; SILVA, K. S.; BOMFIM, M. P.; ALVES, J. F.T.; REBOUÇAS, T. N. H.; VIANA, A. E. S.; SÃO JOSÉ, A.R. Desempenho vegetativo e reprodutivo da pinheira (*Annona squamosa* L.) em função de diferentes comprimentos de ramos podados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 3, p. 389-391, Dezembro 2004.

ESCRIBANO, P.; VIRUEL, M.A.; HORMAZA, J.I. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 4 (4), p. 746-748, 2004.

ESCRIBANO, P.; VIRUEL, M.A.; HORMAZA, J.I. Development of 52 new polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): transferability to related taxa and selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 8 (2), p. 317-321, 2008.

FAIRBANKS, D.J. et al. Efficient characterization of biological diversity using field DNA extraction and random amplified polymorphic DNA markers. **Revista Brasileira de Genética, Campinas**, v.16, n.1, p. 11-22, 1993.

FECHINE, I. M. et al. Alcalóides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.12, p.17-19, 2002.

FERREIRA; M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FERREIRA, M.F.M. **Análises genéticas de *Annona crassiflora* L. (Annonaceae): implicações para a conservação da espécie**. Dissertação, (Mestrado). UFLA, 2011.

GENEROSO, A. L. **Caracterização morfológica e cultivo in vitro de espécies de bambu**. Dissertação (mestrado em genética e melhoramento de plantas) UENF, Campos dos Goytacazes, 71 p. 2014.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Sidra: sistema IBGE de recuperação automática** – Banco de dados agregados, 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>>. Acesso em fev. 2016

JONES, N.; OUGHAM, H.; THOMAS, H.; PAŠAKINSKIENĖ, I. Markers and mapping revisited: finding your gene **New Phytologist**, v. 183, p. 935–966, 2009

KAVATI, R. Melhoramento em Fruta-do-conde. In: SÃO JOSÉ, A. R., SOUZA, I.V.B., MORAIS, O.M., REBOUÇAS, T.N.H. Eds. **Anonáceas, produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia)**. Vitória da Conquista (BA). DFZ/UESB, 1997. p.47-54.

KIILL, L.H. P.; COSTA, J.G. Biologia floral e sistema de reprodução de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n. 5, p. 851-856, 2003.

LEAL, F. Sugar apple. In: NAGY, S., SHAW, P. E., WARDOWSKI, W.F. **Fruits of tropical and subtropical origin**. Composition, properties and uses. Lake Alfred: FSS, 1990. p. 149-158.

LEMOS, E. E. P. BARROS, P. G. ; CAMPOS, R. S. ; SALVADOR, T. L. ; SANTOS, M. Q. C. . Essential Descriptors for Sugar Apple (*Annona squamosa* L.) cultivars. In: 28th: **International Society for Horticultural Science**. Lisboa v. 2. p. 175-175. 2010.

LEMOS, E. E. P. A produção de anonáceas no Brasil. 2013. Palestra, **V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene a exportação** Botucatu-SP. (19 a 23 de Agosto de 2013).

MOSCA, J. L.; CAVALCANTE, C. E. B.; DANTAS, T. M. **Características botânicas**

das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006.

OLIVEIRA, C.M.; MOTA, M.; MONTE-CORVO, L.; GOULÃO, A.; SILVA, D.M. Molecular typing of *Pyrus* base don RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.79, p.163-174, 1999.

PEREIRA, M. F.; BANDEIRA, L. F.; BLANCO A. J.V.; CIAMPI, A.Y.; COELHO A.S.G. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian Cerrado fruit tree species. **Molecular Ecology Resources**, v.8, 1329–1331, 2008.

PINTO, A.C.de Q.; CORDEIRO, M.C.R.; ANDRADE, S.R.M; FERREIRA, F.H.; FILGUEIRAS, H.A.DE C.; ALVES, R.E.; KIMPARA, D.J. *Annona* species. Fruits for the future, **5. International Centre for Underutilised Crops**, University of Southampton, Southampto, UK. 263p. 2005.

RODRIGUES, R., Bento, C. S., Silva, M. G. M., Sudré, C. P. Atividades de Caracterização e avaliação em bancos de germoplasma. In: Pereira, T. N. S. Germoplasma: Conservação, manejo e uso no Melhoramento de Plantas. Viçosa, MG, **Arca**, 115-140. 2010.

SCALOPPI JUNIOR, E.J. **Propagação de espécies de Annonaceae com estacas caulinares.** Tese (Doutorado em Produção Vegetal) UNESP/FCAV, Jabotical, 87p. 2007.

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, 215 p. 2005.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; van de LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v.23, n.21, p.4.407-4.414, 1995.

WEEDEN, N.F.; HEMMAT, M.; LAWSON, D.M.; LODHI, M.; BELL, R.L.; MANGANARIS, A.G.; REISCH, B.I.; BROWN, S.K.; G. – NYE. Development and application of molecular marker linkage maps in woody fruit crops. **Euphytica**, **Dochechat**, 1994, v.77, p.71-75, 1994.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford. V.18, p.6531-6535, 1993

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ACESSOS DE PINHA
(*Annona squamosa* L.) NO BANCO DE GERMOPLASMA DO CECA-UFAL**

RESUMO

A pinha, (*Annona squamosa* L.), é uma cultura de fundamental importância para a economia alagoana e que bem representa a região do agreste do estado. Apesar de ser uma cultura com considerável valor econômico o seu cultivo ainda apresenta nível tecnológico e desempenho reduzidos, sendo necessário o estabelecimento de um programa de melhoramento genético para a seleção de genótipos mais produtivos. Os cruzamentos e mutações naturais estabeleceram ao longo do tempo vários tipos diferentes do tipo crioulo comum. Assim, tipos variantes com frutos sem sementes, a coloração dos frutos, variando do verde ao roxo, com frutos de casca lisa ou pontiaguda, plantas de porte baixo ou alto, plantas com folhas desprovidas de cutícula cerosa ou com variações de textura, entre outros, podem ser vistos entre as pinheiras cultivadas no Brasil. A caracterização morfológica é importante uma vez que facilita na identificação dos diversos variantes morfológicos, além de abrir a possibilidade de registro das cultivares gerando assim ganhos econômicos para os obtentores, e suas respectivas entidades. O presente trabalho teve como objetivo utilizar alguns descritores morfológicos propostos pelo International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) para caracterizar genótipos de cherimóia (*Annona cherimola* Mill) e verificar sua eficiência para caracterizar dezenove genótipos de pinha pertencentes ao banco de germoplasma de anonáceas da Universidade Federal de Alagoas. As análises de diversidade genética foram realizadas utilizando-se do programa computacional GENES. O resultado das análises resultou na separação de 4 grupos distintos, apresentando as devidas distâncias genéticas entre os acessos.

Palavras-chave: Annonaceae, Ata, Fruta-do-conde, Germoplasma.

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SUGAR APPLE (*Annona squamosa* L.) ACCESSES OF THE CECA-UFAL GERMPLASM BANK

ABSTRACT

Sugar apple (*Annona squamosa* L.), is an important crop to the economy and culture of Alagoas, Brazil. Despite being a crop of considerable economic value its production has been made in a low technological basis and reduced performance, requiring the establishment of a breeding program for selection of more productive genotypes. The crosses and natural mutations have set over time several different types of common 'creole' type. Thus, variants types like seedless fruits, different fruit colors ranging from green to purple, different exocarp textures, short or tall plants, leaves devoid of waxy cuticle or texture variations, among others, can be seen among sugar apple plants cultivated in Brazil. Morphological characterization is an important tool as it facilitates the identification of the various morphological variants and open the possibility to registration of cultivars generating economic gains for breeders and their respective entities. This study aimed to use some morphological descriptors proposed by International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) to characterize cherimoya genotypes (*Annona cherimola* Mill) and check its efficiency to characterize nineteen sugar apple genotypes from the Annonaceae germplasm bank of the Federal University of Alagoas. The genetic diversity analyzes were performed using the GENES software. The results of the analysis resulted in the separation of 4 distinct groups, with the necessary genetic distances between accessions.

Keywords: Annonaceae, Custard apple, Morphology, Germplasm.

3.1 INTRODUÇÃO

A cultura da pinha no Brasil esteja aparentemente baseada em uma estreita base genética, a partir de poucas sementes introduzidas da América Central na Bahia em 1624 pelo Conde Diogo de Miranda (POPENOE, 1974), os cruzamentos e mutações naturais estabeleceram ao longo do tempo vários genótipos. Assim, a diversidade de frutos sem semente e coloração variando do verde ao roxo, com casca lisa ou pontiaguda, porte baixo ou alto, e com folhas desprovidas de cutícula cerosa ou com variações na textura, entre outros, podem ser vistos entre as pinheiras cultivadas no Brasil

A região Nordeste contribui com aproximadamente 85% de toda a produção nacional de pinha sendo a região semiárida do estado da Bahia a maior produtora do país com cerca de 2000 ha irrigados e 4000 ha de sequeiro (IBGE, 2010) .

Em 2005 o estado de Alagoas possuía cerca de 2000 hectares de pinha garantindo renda para cerca de 3000 pequenos produtores familiares. Mais recentemente essa área diminuiu consideravelmente em decorrência das frequentes secas, baixa produtividade e, conseqüentemente, a redução nos ganhos financeiros obtidos com a cultura (LEMOS, 2013).

A pinha, *Annona squamosa*, é uma cultura de fundamental importância para a economia alagoana e que bem representa a região Agreste do estado. Apesar de ser uma cultura com considerável valor econômico o seu cultivo ainda apresenta baixo nível tecnológico o que acarreta produtividade bem inferior ao que seria possível, sendo necessário o estabelecimento de programas de melhoramento genético para a seleção de variedades mais produtivas.

Para se caracterizar uma população de plantas existem vários marcadores morfológicos que são tradicionalmente usados na caracterização de variedades de plantas e têm sua importância reconhecida em todo o mundo (CHERLA, 2005) Ainda, marcadores morfológicos em plantas possuem limitações principalmente devido ao efeito do ambiente, fazendo com que nem sempre sejam estáveis, além do que alguns marcadores só podem ser avaliados em plantas adultas, o que requer tempo e espaço (VIEIRA, 2004).

Porém, Amorim (1996), relata que o conhecimento das estruturas morfológicas das plantas são importantes para diversos fins tais como: identificação e diferenciação espécies e variedades, no reconhecimento da planta no campo, nos laboratórios de análise

de sementes, na taxonomia e na silvicultura, havendo necessidade de estímulos a esses estudos básicos.

Para, Ramalho *et al.*, 2004, um marcador morfológico é um fenótipo que deve ser de fácil identificação, normalmente determinado por um único alelo e deve ser herdável. Outro ponto fundamental para um marcador ser eficiente na seleção é estar intimamente ligado ao alelo que se deseja selecionar, ou seja, eles tendem a ficar juntos e sempre que um indivíduo expressar o fenótipo do marcador ele deverá também ser portador do alelo de interesse.

A caracterização morfológica é importante uma vez que facilita na identificação dos diversos variantes morfológicos, além de abrir a possibilidade de registro das cultivares gerando assim ganhos econômicos para os obtentores, e suas respectivas entidades.

Acredita-se que o levantamento de marcadores, visando à identificação de cultivares, assim como a certificação da pureza genética dessas espécies seja importante em futuros programas de melhoramento genético da espécie estudada.

O presente trabalho teve como objetivo utilizar alguns descritores morfológicos já em uso para caracterizar genótipos de cherimóia (*Annona cherimola* Mill) (CHERLA, 2005) e verificar sua eficiência para caracterizar genótipos de pinha (*Annona squamosa* L.) pertencentes ao banco de germoplasma de anonáceas da Universidade Federal de Alagoas.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Caracterização Morfológica dos Acessos de Pinheira

O experimento foi realizado no banco de germoplasma, localizados na chácara das anonáceas, em Maceió – AL (09° 32' 38,6" S, 35° 44' 43,8" W e 82 m de altitude), que apresenta um solo Podzólico Vermelho-Amarelo Distrófico, onde identificou-se 19 genótipos com características distintas entre si. Todas as plantas tiveram o mesmo manejo de poda de frutificação, em meados de outubro de 2014, onde todas ficaram com uma altura de aproximadamente 1,60 m, adubação seguindo as recomendações da análise do solo e irrigação com microaspersores, para que as mesmas tivessem condições iguais de brotação dos ramos e folhas.

Diversas características avaliadas foram baseadas nos descritores morfológicos proposta pelo International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) para cherimóia (*Annona cherimola* Mill.) (CHERLA, 2005), no intuito de observar se esses caracteres possuem a capacidade de diferenciar genótipos contrastantes em pinha (*A. squamosa* L.).

Os órgãos vegetais foram coletados, identificados em sacos de papel e levados para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas em Rio Largo - AL (9° 27' 57" S, 34° 50' 1" W e 127 m de altitude), onde foram analisados.

As características morfológicas avaliadas consistiram em: Comprimento do fruto, Diâmetro do fruto, Peso médio dos frutos, Largura do exocarpo, Brix, Peso de todas as sementes por fruto, Numero de sementes, Peso de uma semente, Comprimento da semente, Largura da semente, Comprimento do limbo foliar, Largura do limbo foliar, Espessura do limbo foliar, Comprimento do pecíolo, Espessura do pecíolo, sendo utilizado paquímetro digital e balança de precisão para uma melhor precisão nos resultados obtidos.

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise multivariada, e a divergência genética entre as espécies foi determinada pelo método de agrupamento de Tocher (Rao, 1952), com o emprego da distância Euclidiana média como medida de dissimilaridade, a partir da avaliação de variáveis quantitativas, utilizando as médias entre os vizinhos mais próximos. A contribuição relativa de cada descritor para indicar a diversidade genética entre as espécies foi proposta por Singh (1981), e as análises foram realizadas utilizando-se o programa computacional GENES (Cruz, 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Descritores Quantitativos

Para os caracteres quantitativos, várias medidas como peso e dimensões do fruto, número e peso das sementes por fruto etc, apresentaram variabilidade, podendo contribuir significativamente para diferenciar os acessos (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Tabela de médias de caracteres morfológicos quantitativos de 19 genótipos de pinha avaliados a campo, CECA, UFAL, 2016

Genótipos	LF (mm)	DF (mm)	PFM (g)	LE (mm)	Brix ^o	PTSF (g)	NS	PUS (g)
01	76,764	77,014	198,686	4,970	23,30	19,600	62,500	0,33
03	76,776	76,690	203,160	5,958	16,76	13,484	37,400	0,32
04	74,706	66,934	192,438	4,112	20,50	30,610	100,40	0,39
05	70,606	71,822	182,980	6,295	18,05	23,235	27,800	0,47
06	69,492	72,438	215,124	6,815	18,42	15,470	40,333	0,38
07	46,250	48,880	98,3250	2,060	22,90	14,400	30,000	0,34
08	66,330	73,728	200,614	6,622	22,16	21,846	62,600	0,37
09	59,420	59,304	118,632	3,850	22,06	18,972	67,800	0,27
10	77,388	73,092	259,308	7,112	20,30	20,242	52,500	0,43
12	58,232	61,512	121,426	5,020	18,30	13,960	54,000	0,32
18	63,250	65,610	143,447	3,200	19,50	15,530	35,400	0,29
19	72,388	71,098	221,884	6,284	21,48	18,250	42,600	0,44
22	63,270	63,934	144,880	5,516	15,40	12,005	35,500	0,19
23	58,310	60,672	90,0640	2,115	22,10	15,263	52,666	0,33
24	77,815	78,060	194,910	7,060	24,30	16,340	35,000	0,32
27	66,030	71,796	162,970	5,065	20,80	19,115	49,500	0,43
37	70,388	76,294	193,332	5,320	23,80	15,300	41,000	0,47
43	71,130	68,476	185,098	4,515	22,75	20,820	67,000	0,34
44	71,210	73,625	166,227	6,585	16,10	14,420	51,000	0,20

Longitude do fruto (LF) (mm), diâmetro do fruto (DF) (mm), peso do fruto maduro (PFM) (g), largura do exocarpo (LE) (mm), Brix °, peso de todas as sementes por fruto (PTSF) (g), número de sementes (NS), peso de uma semente (PUS) (g).

Tabela 2. Tabela de médias de caracteres morfológicos quantitativos de 19 genótipos de pinha avaliados a campo, CECA, UFAL, 2016.

Genótipos	CS (mm)	LS (mm)	CLF (mm)	LLF (mm)	ELF (mm)	CP (mm)	EP (mm)
01	13,819	7,533	171,772	57,050	1,488	19,081	3,060
03	14,440	8,161	158,535	50,877	1,606	14,996	2,660
04	14,620	7,370	115,662	45,612	1,575	16,366	2,689
05	15,280	7,230	148,643	54,218	1,476	17,381	2,985
06	15,541	7,470	155,880	51,991	1,741	17,701	2,496
07	13,806	8,186	99,4230	44,656	1,281	11,659	2,306
08	14,687	7,837	164,151	55,797	1,568	19,663	2,995
09	13,360	6,790	132,963	58,446	1,128	14,654	2,636
10	14,958	7,794	166,790	54,357	1,415	17,957	2,660
12	13,170	6,110	144,269	52,562	1,524	16,583	2,591
18	13,930	6,860	157,558	59,107	2,111	17,662	3,176
19	14,810	7,640	142,528	53,476	1,033	19,302	2,672
22	14,997	7,570	142,829	47,364	1,605	17,512	2,661
23	12,840	6,610	138,464	49,703	1,163	16,754	2,763
24	14,834	7,416	152,107	50,154	1,441	14,842	2,621
27	15,080	7,407	144,269	52,562	1,524	16,583	2,591
37	15,546	8,164	142,609	48,584	1,598	17,611	2,580
43	15,678	6,951	142,542	46,955	1,527	18,145	2,453
44	13,510	6,910	136,050	48,120	1,356	16,525	2,380

Comprimento da semente (CS) (mm), largura da semente (LS) (mm), comprimento do limbo foliar (CLF) (mm), largura do limbo foliar (LLF) (mm), espessura do limbo foliar, (ELF) (mm), comprimento do pecíolo (CP) (mm), espessura do pecíolo (EP) (mm).

4.2 Contribuição Relativa das características estudadas

O descritor quantitativo que menos contribuiu para a divergência genética entre as espécies foi o peso das sementes (0,0002 %) e o que mais contribuiu foi o peso do fruto maduro (71,7754%), seguido do número de sementes (11,0067%), e pelo comprimento do limbo foliar (10, 7852) (Tabela 3).

Tabela 3. Contribuição relativa dos caracteres quantitativos para a divergência genética entre 19 genótipos de pinha (*A. squamosa* L) pelo método proposto por Singh (1981) CECA UFAL 2016

Característica	Valor %	Acumulado %
Longitude do fruto	2,4872	2,4872
Diâmetro do fruto	2,0656	4,5528
Peso do fruto maduro	71,7754	76,3282
Largura do exocarpo	0,0887	76,4169
Brix	0,2606	76,6775
Peso de todas as sementes do fruto	0,7046	77,3821
Número de sementes	11,0067	88,3888
Peso de uma semente	0,0002	88,3890
Comprimento da semente	0,0270	88,4160
Largura da semente	0,0115	88,4275
Comprimento do limbo foliar	10,7852	99,2127
Largura do limbo foliar	0,6529	99,8656
Espessura do limbo foliar	0,0021	99,8677
Comprimento do pecíolo	0,1303	99,9980
Espessura do pecíolo	0,0020	100,0000

4.3 Avaliação da Diversidade Genética

Avaliando divergência genética, de acordo com os valores de dissimilaridade obtidos, a maior distância genética ocorreu entre os genótipos 01 e 07 (Tabela 4), esses valores mostram que esses indivíduos são mais diferentes geneticamente, e dependendo das características deles são os mais indicados para cruzamentos entre indivíduos dessa população estudada, já a menor distância entre os acessos foi entre os genótipos 01 e 08 que teoricamente seriam os indivíduos mais parecidos geneticamente.

Tabela 4. Medidas de dissimilaridade entre 19 genótipos de pinha, com base na distância Euclidiana média. CECA-UFAL, AL, 2016.

Genótipos	03	04	05	06	07	08	09	10	12	18	19	22	23	24	27	37	43	44
01	164,709	2.538,596	1.491,283	1.739,831	6.311,664	0,430354	2.121,227	1.039,958	2.410,139	1.503,871	1.150,248	2.881,769	2.556,584	1.331,778	1.262,901	1.758,408	1.805,929	261,148
03		2.757,361	1.288,625	0,636211	4.649,525	1.503,201	2.909,132	0,969463	2.246,448	2.301,096	134,156	1.070,906	3.274,005	0,979887	0,998066	1.325,894	1.853,268	1.129,296
04			2.310,644	2.481,662	4.379,259	2.197,133	2.645,559	2.311,413	2.880,938	3.762,538	2.203,183	3.140,721	2.891,482	2.556,843	1.493,919	2.218,605	1.059,565	2.732,934
05				0,790967	5.440,634	0,889548	277,403	0,801184	2.218,639	1.935,805	0,762128	2.087,195	3.142,942	1.443,911	0,594561	1.297,369	1.623,242	2.450,241
06					5.011,598	1.028,761	2.965,473	0,548987	2.014,722	2.288,004	0,840167	1.203,749	348,689	0,919808	0,511447	0,81865	0,99919	1.495,149
07						590,804	2.750,936	6.267,959	3.345,766	5.138,684	4.786,865	3.570,858	2.219,212	4.605,532	3.366,859	3.994,771	3.857,118	4.308,998
08							2.405,516	0,603921	2.442,995	1.799,207	0,758991	2.364,312	3.072,634	127,037	0,825378	1.214,592	1.453,608	2.578,893
09								3.161,419	0,877794	1.937,845	2.342,423	2.557,377	0,783092	2.524,001	1.605,303	3.308,431	218,091	208,135
10									2.893,579	2.940,309	0,432866	253,398	3.995,419	0,947397	0,823138	0,99492	1.412,747	2.294,877
12										150,202	2.326,322	1.523,339	0,823368	2.430,863	1.402,694	3.072,614	1.958,012	1.107,881
18											2.884,131	2.120,464	2.027,974	2.855,437	1.787,755	3.088,467	2.755,046	2.941,721
19												2.276,016	2.744,419	0,98031	0,596587	0,78173	116,102	2.078,122
22													251,084	209,633	1.548,103	2.376,935	1.779,704	0,864089
23														3.034,672	1.892,899	3.217,332	2.249,728	2.338,333
24															0,849594	0,84273	1.116,554	166,951
27																0,52494	0,59283	1.693,369

37	0,93222	2.807,398
43		1.858,304
44		

O método de Tocher permitiu a formação de grupos com base na dissimilaridade expressa pela distância Euclidiana média. Desse modo, para os caracteres quantitativos (Tabela 5), observou-se a formação de 4 grupos, que distinguem os acessos estudados. O grupo 1 foi composto pelos genótipos: 01, 08, 10, 19, 27, 05, 06, 37, 24, 03, 43, 22, 44, e 12.

Já o grupo 2, foi composto pelos genótipos: 09, 23, e 18; o grupo 3 foi caracterizado apenas com o genótipo 04, e o grupo 4 que apresentou a maior distância entre os acessos foi caracterizado pelo genótipo 07.

Tabela 5. Grupos de genótipos de pinha estabelecidos pelo método de Tocher com base na dissimilaridade expressa pela distância Euclidiana média a partir de 15 caracteres quantitativos. CECA UFAL, AL, 2016.

Grupos	Genótipos
1	01, 08, 10, 19, 27, 05, 06, 37, 24, 03, 43, 22, 44,12
2	09, 23, 18
3	04
4	07

O dendrograma de similaridade genética entre os dezenove acessos de pinha (*A. squamosa* L) obtidos pelo método de agrupamento do vizinho mais próximo, com base na matriz de similaridade dos dados quantitativos, foram necessários mais de 80% para formar quatro grupos distintos entre os acessos.

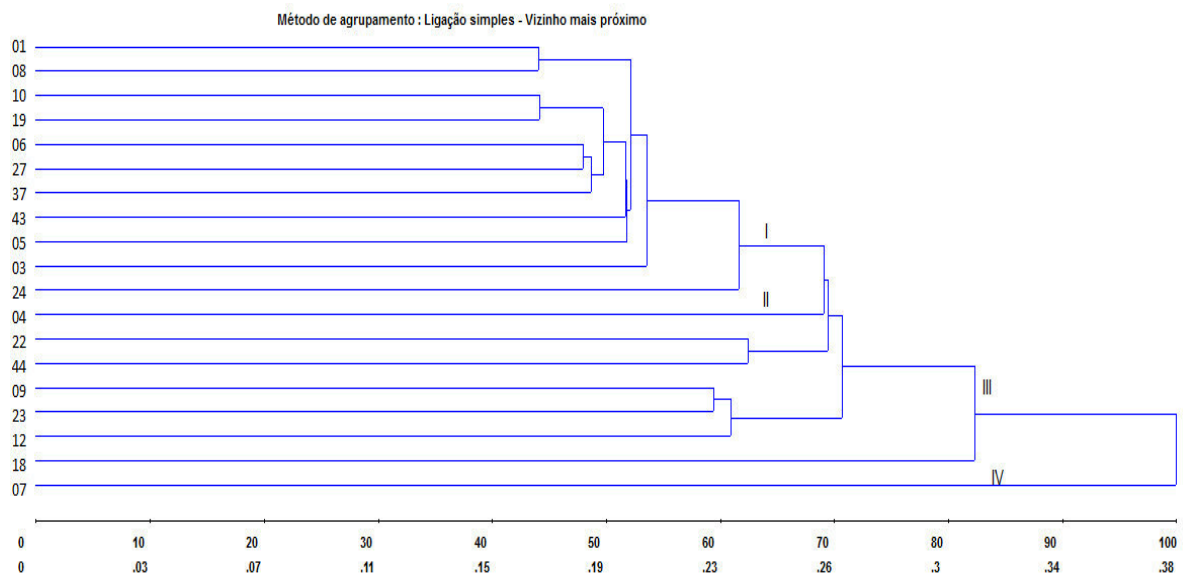


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética entre dezoito genótipos de pinha (*A.squamosa* L.) obtido pelo método do vizinho mais próximo, com base na matriz de dissimilaridade dos dados quantitativos. CECA-UFAL, AL 2016.

A análise dos componentes transformou os quinze caracteres em dois componentes principais (CP1 e CP2), que explicaram aproximadamente 52, 20 % da variância total entre os dezoito genótipos. Essa análise apresentou uma aproximação entre os genótipos 04, 37, 43, 24, 19, 10, 06, 03, 27, 05, também aproximou os genótipos 12, 22 e 44, e outra região os genótipos 01 e 08, e evidenciou um maior distanciamento do genótipo 07 (Figura 2).

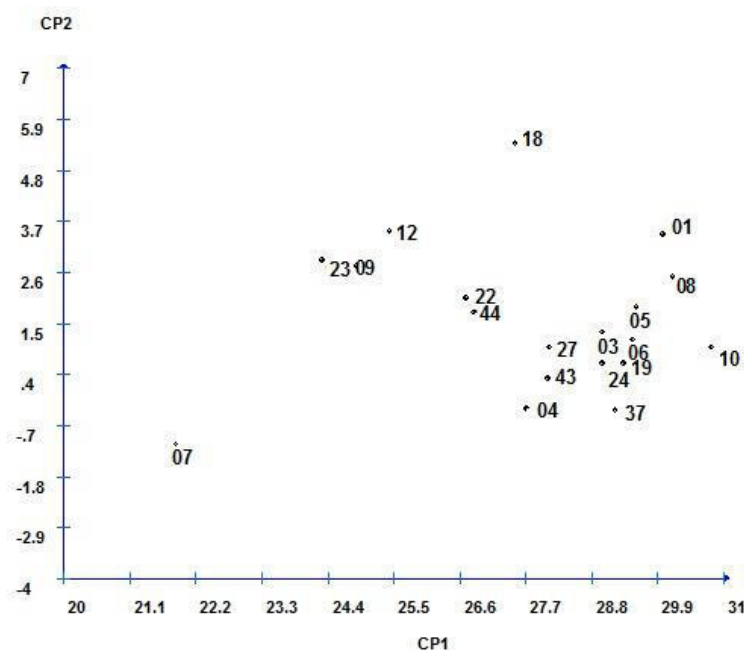


Figura 2. Análise dos componentes principais (CP1 e CP2), com 52, 20% de variância acumulada, entre dezenove genótipos de pinha (*A. squamosa* L.), baseados em características quantitativas.

Segundo Oliveira (1993), os estudos sobre as características morfológicas de plantas tem como principal objetivo ampliar o conhecimento e identificação das plantas de determinada região.

Salvador (2011), propôs uma lista de descritores mínimos para caracterizar genótipos de pinha (*A. squamosa* L.), e obteve sucesso na diferenciação entre dois genótipos morfológicamente discrepantes, e definiu a possibilidade da utilização desses descritores mínimos para a seleção de genótipos.

Em outras culturas agrícolas apenas a caracterização morfológica não é suficiente para caracterizar genótipos. Bonow et al (2007) trabalhando com genótipos de arroz, concluiu que seria necessário outros marcadores para auxiliar na caracterização dos acessos estudados.

Já Vieira (2009) trabalhando com soja, concluiu que os marcadores moleculares juntamente com marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas, são úteis na caracterização de cultivares, e recomendando seu uso em estudos de caracterização de soja.

CONCLUSÃO

Os descritores quantitativos propostos foram eficientes para diferenciar os genótipos de pinha. Foi possível formar grupos diferentes entre os acessos. O descritor peso médio dos frutos foi o que mais contribuiu para diferenciar os genótipos. O genótipo 07, apresenta maior distância genética entre os acessos estudados.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, I.L. **Morfologia de frutos, sementes, germinação, plântulas e mudas de espécies florestais da região de Lavras - MG**. 1996. 127f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Departamento de Silvicultura, Universidade Federal de Lavras. Lavras, 1996
- BONOW, S et al., Caracterização morfológica de cultivares de arroz visando a certificação da pureza varietal. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v, 31, n. 3, p. 619-627, maio/jun, 2007.
- CRUZ, C. D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. 35(3): 271-276.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Sidra: sistema IBGE de recuperação automática – Banco de dados agregados**, 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>>. Acesso em fev. 2016
- LEMOS, E. E. P. **A produção de anonáceas no Brasil**. 2013. Palestra, V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene a Botucatu-SP. exportação (19 a 23 de Agosto de 2013).
- OLIVEIRA, E.C. Morfologia de plântulas florestais. In: AGUIAR, I. B.; PIÑARODRIGUEZ, F.C.M. & FIGLIOLA, M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p.175-214.
- POPENOE, W. 1974. Manual of Tropical and Subtropical Fruits. **Hafner Press**, a Division of Macmillan Publishing Co, Inc., New York, Chapter 5: 161-189.
- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 3.ed. São Paulo: UFLA, 2004. 472 p.
- RAO, R.C. (1952) Advanced statistical methods in **biometric research**. New York: J. Wiley, p. 330.
- SALVADOR, T. L. **Caracterização morfológica de genótipos e formação de raízes em estacas caulinares de pinheira** (*Annona squamosa* L.), Dissertação de mestrado em agronomia – Produção Vegetal, UFAL CECA. Rio Largo 2011
- SINGH, D. (1981) The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, 41(2): 237-245.

VIEIRA, E. S. N. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café.** 2004. 137p. Tese (Doutorado Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, E. S. N. et al,. Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 1, p , 086-094, 2009.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE PINHA (*Annona squamosa* L.) ATRAVÉS DE MARCADORES SSR

RESUMO

A pinheira (*Annona squamosa*, L.), também chamada de fruta-do-conde ou ata, é uma espécie da família *Annonaceae* nativa da América Central e Ilhas Caribenhas e foi introduzida no Brasil no século XVII. Para viabilizar um programa de melhoramento é necessário caracterizar a diversidade genética existente e desenvolver ferramentas que auxiliem os cruzamentos entre diferentes acessos. Os marcadores moleculares constituem-se em pontos de referência do cromossomo, nos quais é possível verificar o polimorfismo genético ao nível de DNA. Apresentam, em geral, algumas vantagens em relação aos marcadores morfológicos, como o grande número de *locos* com alto nível de polimorfismo, a utilização em qualquer estágio de desenvolvimento das plantas, além de serem praticamente ilimitados em número de análise. De todos os marcadores disponíveis, os microssatélites correspondem a um dos marcadores de maior uso na atualidade. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de 12 conjuntos de *primer's* de microssatélites desenvolvidos para separar acessos de *A. cherimola* na caracterização de acessos de *A. squamosa* do banco de germoplasma do CECA-UFAL que apresentaram variações morfológicas. Os resultados mostraram que a caracterização molecular com os marcadores SSR não foi eficiente para separar os genótipos estudados, requerendo assim um ajuste nos *primer's* utilizados.

Palavras-chave: Annonaceae, Fruta-do-conde, Germoplasma.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SUGAR APPLE (*Annona squamosa* L.) GENOTYPES USING SSR MARKERS

ABSTRACT

Sugar apple (*Annona squamosa* L.), also called fruta-do-conde or ata, is a native fruit tree of the Annonaceae family native to Central America and the Caribbean Islands which was introduced in Brazil in the seventeenth century. To make a plant breeding program is necessary to characterize the genetic diversity and develop tools to assist crosses between different plant accesses. Molecular markers are among the tools most requested in modern plant breeding programs for genetic improvement. Molecular markers are chromosome landmarks for which you can check genetic polymorphism at the DNA level. In general, molecular markers present some advantages compared to the morphologic markers as the great number of loci with a high level of polymorphism, the use of the plant at any developmental stage, and are nearly unlimited in number of analysis. Of all the available markers, microsatellite correspond to one of the largest use today markers. The aim of this work was to verify the efficiency of 12 sets of microsatellite primers developed to separate accessions of *A. cherimola* to characterize *A. squamosa* accesses that have shown morphological variations in the Annonaceae germplasm bank of CECA-UFAL. The results showed that the molecular characterization with the SSR markers was not efficient to separate the genotypes, thus requiring an adjustment in the primers used.

Keywords: Annonaceae, Custard apple, Germplasm.

5.1 INTRODUÇÃO

A pinha, também chamada de fruta-do-conde ou ata (*Annona squamosa*, L.), é uma das frutas mais conhecidas da família Annonaceae cuja importância comercial tem crescido a cada ano. Somente no Brasil são cultivados cerca de 8000 ha de pinheiras sendo que 80% do total está na zona semiárida do Nordeste e Sudeste (LEMOS, 2013). Nestas regiões, praticamente todo o cultivo da pinheira está baseado em plantas originárias de sementes de um tipo conhecido como ‘Crioulo’. Por serem bastante precoces e aparentemente homogêneas, os produtores fazem uso da propagação sexuada sem atentarem para variações genótípicas existentes entre as plantas. Dessa forma, as iniciativas de melhoramento varietal dessa espécie frutífera ainda é incipiente no Brasil.

Inicialmente para viabilizar um programa de melhoramento genético de uma espécie é necessário caracterizar a sua diversidade genética *in situ* ou *ex situ* em coleções de germoplasma e estabelecer ferramentas que auxiliem os cruzamentos assistidos. No estágio atual do desenvolvimento científico, uma das ferramentas mais importantes que pode assessorar um programa de melhoramento, além da estatística, são os marcadores moleculares e, entre estes, os de mais amplo uso são os microssatélites. O uso de marcadores moleculares representa uma ferramenta adicional em programas de melhoramento genético em frutíferas, oferecendo novas possibilidades no manejo de uma coleção, permitindo a comparação entre indivíduos e identificando duplicatas (ENGELBORGHES et al., 1998), além de possibilitar a classificação do germoplasma em grupos de interesse para os diferentes programas de melhoramento. Permite, também, determinar a presença ou ausência de gene(s) ligado(s) a características específicas para fins de melhoramento, com a vantagem de se fazer as análises antes do material ir para o campo. Com isso, diminui-se o volume de material que necessitaria de cuidados como tratos culturais, havendo redução no número de gerações de melhoramento necessárias no desenvolvimento de variedades.

Os marcadores moleculares constituem-se em pontos de referência do cromossomo, nos quais é possível verificar o polimorfismo genético ao nível de DNA. Apresentam, em geral algumas vantagens em relação aos marcadores morfológicos, como o grande número de *locos* com alto nível de polimorfismo, a utilização em qualquer estágio de desenvolvimento das plantas, além de serem praticamente ilimitados em número de análise (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998;)

O marcador molecular baseado em microssatélites tornou-se mais comum por avaliar todo o genoma, ser específico, mais informativo, robusto e confiável. A aplicação desse tipo de marcador já foi utilizada para a espécie cultivada *Annona cherimola* e a espécie silvestre *Annona crassiflora*, membros da família das anonáceas. As marcas produzidas nestes casos foram também identificadas nas demais espécies da família com as quais foram testadas, entre elas *A. squamosa*.

De todos os marcadores disponíveis, os microssatélites correspondem a um dos marcadores de maior uso na atualidade.

Também referidos como *short tandem repeats* (STRs) ou *simple sequence repeats* (SSRs), são compostos por unidades repetitivas denominadas motivos, os quais apresentam sequências repetidas de um a seis nucleotídeos repetidos em ‘*tandem*’ ou linha. São classificados com relação ao motivo (mononucleotídeo, dinucleotídeo, trinucleotídeo, pentanucleotídeo, e hexanucleotídeo), e também conforme a composição

das sequencias repetidas: repetições perfeitas, que não apresentam nenhuma interrupção, como por exemplo CACACACACACA; repetições imperfeitas, interrompidas, por bases que não correspondem ao motivo, como CACACACACAGTCACACACA; por repetições interrompidas, quando há uma sequência de bases dentro da sequência repetida que não pertence ao motivo, como por exemplo CACACACATGCACACACA, repetições compostas, quando dois ou mais motivos distintos são dispostos adjacentes, como por exemplo CACACACACACAGTGTGTGTGTGT (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998 ELLEGREN, 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

Em anonáceas o marcador mostrou-se mais informativo revelando a filogenia das cultivares de pinha (RAHMAN et al., 1998). O avanço nos projetos de sequenciamento e acessibilidade da técnica para inúmeros laboratórios viabilizou o uso de PCR específico para desenvolvimento de marcas.

Entre as regiões alvos para o PCR específico estão os microssatélites que são regiões de DNA repetitivos espalhadas por todo o genoma (KALIA et al., 2011). As características de co-dominância, reprodutibilidade e resolução tem contribuído para a ampla adoção destes marcadores nos estudos genéticos.

A técnica tem sido aplicada em espécies agrônômicas pouco estudadas ou silvestres por dois motivos. Um dos motivos é a transferência de marcar entre espécies do mesmo gênero ou família. O outro é e acessibilidade ao sequenciamento e a viabilização da construção de bibliotecas genômicas enriquecidas para regiões repetitivas (SQUIRRELL et al., 2003). Neste contexto alguns microssatélites já foram desenvolvidos para espécies de anonáceas. O uso de microssatélites foi relatado para a espécie agrônômica *A. cherimola* (ESCRIBANO et al., 2004; ESCRIBANO et al., 2008) e a silvestre *Annona crassiflora* (PEREIRA et al., 2008). Utilizando a abordagem de bibliotecas foram desenvolvidas 66 marcas para *A. squamosa*, havendo inúmera a ser sequenciadas.

Os marcadores desenvolvidos identificados foram polimórficos sendo alguns selecionados como padrão para detecção de polimorfismo entre laboratórios. Com *A. squamosa* os marcadores de microssatélites apenas foram utilizados para demonstrar a transferência dos marcadores de *A. cherimola*. A transferência e a funcionalidade destes marcadores permitem o estudo de diversidade nas demais espécies de anonáceas como *Annona senegalenseis* (KWAPATA et al., 2004). Os trabalhos confirmam o sucesso dos microssatélites para identificação de diversidade genética e origem geográfica da cherimoya (ESCRIBANO et al., 2007) podendo também obter o mesmo sucesso para *A. squamosa*. Os dados obtidos servirão adoção de estratégias para conservação ex-situ dos recursos genéticos da *A. squamosa*. O estudo com anonáceas tem passado pelos marcadores morfológicos (MAGDALITA & VALENCIA, 2004), enzimáticos (PERFECTTI & PASCUAL, 2004;) e o principais moleculares (RAHMAN et al.; 1997).

A pinha apesar dos variantes morfológicos tem sua origem derivada de poucas sementes restringindo a amostra de alelos da população. Esta base genética restrita provavelmente levou a fixação de alelos nas populações cultivadas criando populações locais diferenciadas para alguma característica e que de alguma forma influencia a produção.

Existe também a possibilidade de que os variantes morfológicos seja fruto de mutações espontânea pois a diferença entre materiais é de apenas uma característica. Como exemplo, cita-se a pinha sem sementes (LORA et al., 2001). Os variantes

morfológicos identificados são importantes para melhoramento sendo fonte de genes para obtenção de variedades com características fundamentais para melhoramento

Escibano (2008) desenvolveu 52 marcadores SSR adicionais aos que já existiam para *A. cherimola*, afim de resolver problemas de hipóteses conflitantes sobre origem das espécies ou estruturas das populações selvagens, consequentemente estendendo esse estudo para outras espécies da família, chegando a utilizar com sucesso essas marcas em *A. squamosa*, e em outras espécies de Anonáceas.

O Objetivo desse trabalho foi verificar a eficiência de 12 conjuntos de *primer's* de microssatélites desenvolvidos em *A. cherimola*, para verificar sua eficiência em *A. squamosa*, além de diferenciar e caracterizar genótipos com variações morfológicas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Coleta das amostras

O experimento foi realizado no banco de germoplasma, localizados na chácara das anonáceas, em Maceió – AL (09° 32' 38,6'' S, 35° 44' 43,8'' W e 82 m de altitude), que apresenta um solo Podzólico Vermelho-Amarelo Distrófico, onde coletou-se folhas jovens dos genótipos de pinha, que foram identificadas e posteriormente estocadas a temperatura de -20 °C, para evitar a oxidação até o momento de extração de DNA.

5.2.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico, foi utilizado o protocolo de extração descrito por Mogg e Bond (2003), com adaptações devido a viscosidade do material vegetal, sendo utilizado 50 mg de material foliar, macerado em 1,2 mL de tampão de extração e PVP (polivinilporrolidona), em um almofariz. O tampão de extração constituiu de 100mM de Tris pH 8,0; 50mM de EDTA 0,5M pH 8,0; 500mM de NaCl 5M; 0,7% de SDS 7%; 50µg/mL de Proteinase K (10mg/mL) e 50µg/mL de RNase (10mg/mL). O material macerado foi colocado em tubos de 2,0mL, incubados em estufa a uma temperatura de 37 °C e deixados por aproximadamente 12 horas. Em seguida os tubos foram retirados da estufa e adicionou-se 320µL de NaCl 5M. Após serem agitados (vortex), centrifugou-se por 5 minutos a 12000 rpm e pipetou-se a fase superior (aquosa) para um novo tubo. Para precipitação do DNA, adicionou-se 800µL de isopropanol e as amostras foram deixadas a -20°C por 2 horas. Foi feita uma centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. A este material acrescentou-se 500µL de etanol 70% e centrifugou-se a 400 rpm por 10 minutos, sendo que este procedimento foi realizado por duas vezes. Efetuou-se então uma última lavagem, utilizando-se 500µL de etanol 100%. O pellet foi deixado em temperatura ambiente para secar e, finalmente, o DNA foi solubilizado com tampão 200µL de TE (1mM de Tris e 0,1mM EDTA).

5.2.3 Amplificação com *primer's* SSR

As amplificações foram conduzidas em um termociclador Rotor-gene Q (Qiagen) com um volume total de 25µL, contendo 5µL DNA genômico diluído 1:10, 100 µM de cada dNTP; 1,0 µL de cada iniciador; tampão da enzima; 1,5 mM MgCl₂ e 5U/µL de *Taq DNA polymerase*. Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 6. A ciclagem da reação iniciou-se com uma denaturação inicial a 94°C, seguido de 35 ciclos com 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final por 5 minutos a 72°C. Os produtos amplificados aplicados em gel de Agarose a 3% de concentração, e submetidos a eletroforese 3V/cm², e posteriormente os fragmentos amplificados foram visualizados e fotografados em transiluminador UV.

Tabela 6: conjuntos de *primer's* utilizados no trabalho, suas respectivas sequências e tamanho em pares de base.

Loco	Sequência	Tamanho (pb)
LMCH1	F: CTCTTCAAAGGTACGACTTC R: TTGAGAAAAGGATAAGGATT	291–312
LMCH2	F: CATTAACAGAGCATCAAAT R: AGATTGAGAAGTCGTACCTT	166–170
LMCH3	F: TCTGTGAAAATACTCTCGTA R: TCTCCACTGAATAATCTTTAAT	225–248
LMCH4	F: ATTAGAACAAGGACGAGAAT R: CCTGTGTCTTTCATGGAC	112–128
LMCH5	F: CCCACTCTTCTACCCTCAAC R: CAAGTCCCTGTAAGAATCAGA	155–160
LMCH6	F: GGCATCCTATATTCAGGTTT R: TTAAACATTTTGGACAGACC	220–254
LMCH7	F: ATCACCAACACTGAATCTTA R: AATTTTACCTGTAGACGTG	206–212
LMCH8	F: AATTACGCAGATCACAGTAGC R: CATCTTGCCTTGCTCTCTAC	247–251
LMCH9	F: TCAAACACGTATAGAAAACC R: TATGTGAAAGATCAAAAAGAG	170–172
LMCH11	F: TACCTCTCGCTTCTCTTCCT R: GATGATTAGACACAAGTGGATG	173–176
LMCH14	F: GCTAAGTTCTAGTTTGCAGGTT R: CTCCCTCGACACTCTCTCTT	98–116
LMCH16	F: TGAAAAATAACAAGAATGTAA R: GGATAAACAAAGCAGTAAATC	216–230

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trabalhar com recursos genéticos em programas de melhoramento requer um pleno conhecimento da diversidade genética existente dos genótipos existentes. Em um banco de germoplasma, informações precisas sobre alguns parâmetros como: a) identidade: a certeza de que um acesso está catalogado corretamente e corresponde ao tipo verdadeiro ; b) parentesco: o grau de relação entre os genótipos de um acesso ou entre acessos de uma coleção; c) estrutura: a quantidade de variação genética presente e como ela está fracionada entre indivíduos, acessos e coleções; d) localização: a presença de um gene desejado ou complexo gênico em um acesso específico bem como a existência de uma sequência de uma sequência de DNA mapeada em um cromossomo particular de um indivíduo (KRESOVICH et al., 1995).

6.1 Resultado da extração de DNA

O protocolo de extração de DNA adaptado se mostrou eficiente para a obtenção de DNA de folhas jovens de pinheira (*A. squamosa* L) como pode ser observado na figura 3 com protocolo semelhante utilizado com sucesso por, Ferreira (2011) na extração de DNA de *A. crassiflora*.

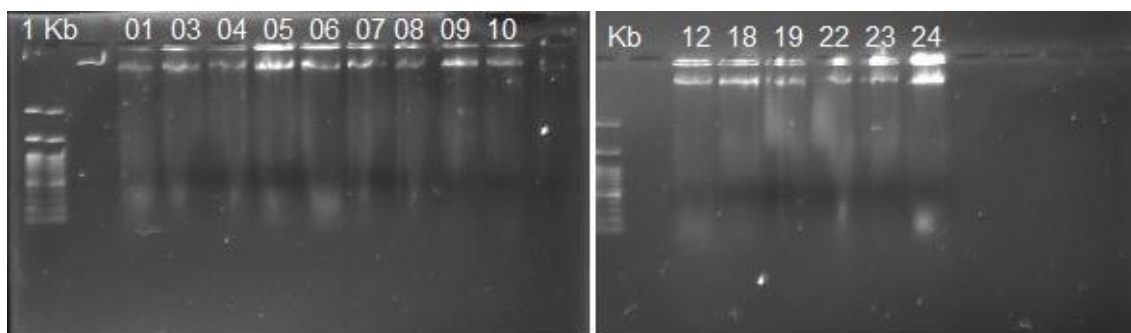


Figura 3. Gel de Agarose 0,8% com a apresentação do resultado da extração de DNA de 15 genótipos utilizando o método Mogg e bond 2003. 1 Kb corresponde ao marcador padrão para tamanho de fragmentos, em relação ao padrão molecular de 1 kb DNA Ladder, Kasvi.

6.2 Resultado da reação de PCR com *primer's* SSR

A transferência dos 12 iniciadores de *A. cherimola* para *A. squamosa* foi confirmada para os iniciadores LMCH 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 14, 16. Os iniciadores para o locus LMCH 2, e 7 não funcionaram nas condições avaliadas não amplificando os fragmentos com os tamanhos esperados de 166–170 pb e 206–212pb respectivamente. Os iniciadores LMCH 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, e 14, amplificaram os *locus* alvos com os tamanhos esperados de 291–312 pb, 225–248 pb, 112–128 pb, 155–160 pb, 220–254 pb, 247–251 pb, 170–172 pb, 173–176 pb, 98–116 pb, respectivamente (Figura 4).

O primer LMCH 16 apresentou um fragmento com tamanho molecular de aproximadamente 800 pb, muito superior ao esperado de 216–230 diferente do que está descrito na tabela 6). sendo descartados para as análise de caracterização e diferenciação entre os genótipos de pinheira.

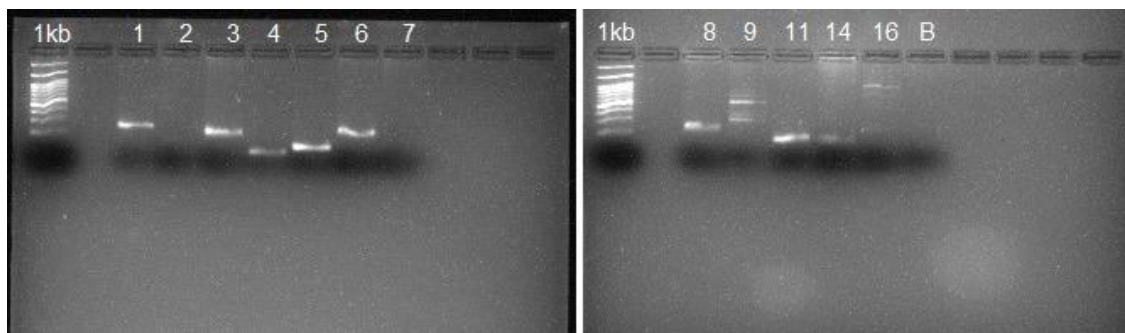


Figura 4. Gel de Agarose 3,0 % com o resultado da PCR-teste com os primers LMCH, utilizando o mesmo DNA (genótipo 37) como DNA molde para os iniciadores, em relação ao padrão molecular de 1 kb DNA Ladder, Kasvi.

Na avaliação das reações de PCR escolheu-se de se trabalhar com gel de Agarose 3,0% foi devido a utilização dessa técnica por Escribano (2004), que fez uso para caracterizar e diferenciar acessos de *A. cherimola*, e também no trabalho realizado por Priori (2012), trabalhando com variedades crioulas de abóbora *Cucurbita pepo*, cultivadas no Rio Grande do Sul, fez uso dessa técnica, e tendo êxito na caracterização do material genético estudado, além da facilidade de obtenção do material e da facilidade de manipulação a nível de bancada no laboratório.

Os fragmentos amplificados utilizando o *primer* LMCH 5 apresentaram bandas aparentemente com o mesmo peso molecular (Figura 5).

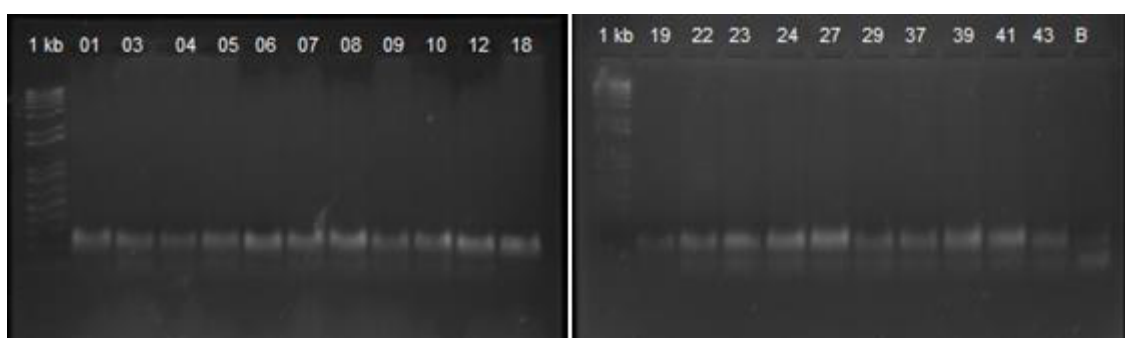


Figura 5. Fragmentos amplificados utilizando-se o primer LMCH 5, onde os fragmentos de todos os acessos aparentemente apresentam o mesmo tamanho de aproximadamente 200 pb, em relação ao padrão molecular de 1 kb DNA Ladder, Kasvi.

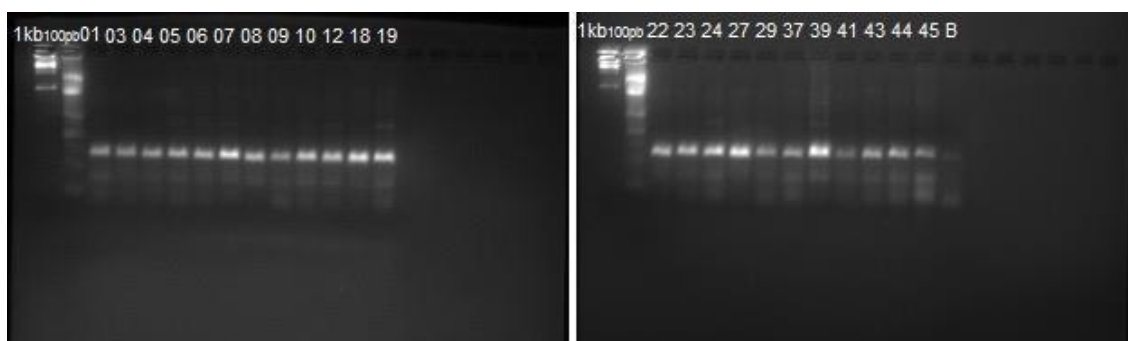


Figura 6. Gel de Agarose a 3,0% onde é possível visualizar a amplificação da região do primer LMCH5 com os genótipos: 01, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 12, 18, 19, 22, 23, 24, 27, 29, 37, 39, 41, 43, e branco, onde não é possível diferenciar os genótipos, devido ao mesmo padrão de intensidade dos fragmentos amplificados, com tamanho entre 155–160pb, em relação ao padrão molecular de 1 kb DNA Ladder, Kasvi.

O número de fragmentos encontrados foi muito abaixo da expectativa, que para os primer's utilizados no trabalho seriam de 44 fragmentos segundo Escribano (2004), além de apresentarem marcas monomórficas, o que não torna possível a caracterização do material genético estudado. O baixo polimorfismo observado com os marcadores SSR, difere do que é normalmente encontrado no estudo com outras espécies, pois devido a forma de introdução da espécie no Brasil, e a disseminação do seu cultivo, esperava-se uma clara diversidade entre os acessos estudados, visto que morfologicamente esses acessos apresentam distinção em sua forma em diversas características, como foi estudada e apresentada no capítulo anterior.

Souza (2002), obteve 67 alelos polimórficos em 11 *primer's*, trabalhando com *Musa spp*, distinguindo com precisão homozigotos de heterozigotos, distribuindo bem os indivíduos dentro desse gênero.

Em persegueiro e nectarineira, Bianchi et., al (2004), amplificaram 56 alelos sendo 55 deles polimórficos, e que permitiram a diferenciação de 32 do 36 genótipos estudados, em grupos para o consumo in natura e cultivares para indústria.

CONCLUSÃO

A caracterização molecular utilizando-se dos primers LMCH, não se mostrou eficiente para diferenciar os genótipos estudados de pinheira (*A. squamosa*), sendo necessário repetir análises utilizando-se kits de extração específicos para folhas, afim de se obter um ácido nucléico limpo em gel de poliacrilamida.

REFERÊNCIAS

- BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C.; SCHUCH, M.W. RAPDs na caracterização molecular de cultivares de pessegueiro e nectarineira com microssatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v.26, n.3, p. 490-493, 2004.
- ELLEGREN, H. Microsatélites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, New York, v. 5, p. 435-444, 2004.
- ENGELBORGHIS, I., SWENNEN, R., VAN CAMPENHOUT, S. Capacidad del AFLP para detectar diferencias genéticas y variantes somaclonales en *Musa* spp. **Infomusa**, Montpellier, v. 76, n. 2, p. 3-6, 1998.
- ESCRIBANO, P.; VIRUEL, M.A.; HORMAZA, J.I. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 4 (4), p. 746-748, 2004.
- ESCRIBANO, P.; VIRUEL, M.A.; HORMAZA, J.I. Molecular analysis of genetic diversity and geographic origin within an ex situ germplasm collection of cherimoya by using SSRs. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 132 (3), p. 357-367, 2007
- ESCRIBANO, P.; VIRUEL, M.A.; HORMAZA, J.I. Development of 52 new polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): transferability to related taxa and selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 8 (2), p. 317-321, 2008.
- FERREIRA; M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FERREIRA, M.F.M. **Análises genéticas de *Annona crassiflora* L. (Annonaceae): implicações para a conservação da espécie**. Dissertação, Mestrado. UFLA, 2011.
- KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA,S.; SINGH, R.; DHAWAN,A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, p. 309–334, 2011.
- KRESOVICH, S.; SZEWC-MCFADDEN, A.K.; BLINCK, S. Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapessed). **Theoretical and applied Genetics**, v.91, p.206-211, 1995.

KWAPATA, K.; MWASE, W.F.; BOKOSI, J.; KWAPATA, M. M. B.; MUNYENYEMBE, P. Genetic diversity of *Annona senegalensis* Pers. populations as revealed by simple sequence repeats (SSRs) **African Journal of Biotechnology** Vol.6 (10), pg. 1239-1247,2007

LEMOS, E. E. P. **A produção de anonáceas no Brasil**. 2013.Palestra, V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene a exportação Botucatu-SP. (19 a 23 de Agosto de 2013).

LORA, J.; HORMAZA, J. I.; HERRERO M.; GASSER, C. S. Seedless fruits and the disruption of a conserved genetic pathway in angiosperm ovule development. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 108, 5461-5465, 2011.

MAGDALITA, P.M.; VALENCIA, L.D. Fruit variability and correlation analysis of some phenotypic characters in avocado (*Persea americana* Mill.) rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) and sweetsop (*Annona squamosa* L.). **Philippine Agricultural Scientist**, v.87(4).p.463-467,2004.

MOGG, R. J.; BOND, J.M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, Dordrecht, v. 3, n. 4, p. 666-668, out.2003.

OLIVEIRA, E.J; PÁDUA, J.G., ZUCCHI, M.I. VENCOVSKY, R.: VIEIRA, M.L.C Origin, evolution and genome distribution of microsatélites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29 (2), p. 294-307, 2006.

PEREIRA, M. F.; BANDEIRA, L . F.; BLANCO A .J.V.; CIAMPI, A.Y.; COELHO A.S.G. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian Cerrado fruit tree species. **Molecular Ecology Resources**, v.8, 1329–1331, 2008.

PERFECTTI, F.; PASCUAL, L. Geographic variation for isozymes in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51(8), p. 837-843, 2004.

PRIORI. D; BARBIERI. RL; CASTRO. CM; OLIVEIRA AC; VILELLA. JCB; MISTURA CC. 2012. Caracterização molecular de variedades crioulas de abóboras com marcadores microssatélites. **Horticultura Brasileira** 30: 499-506.

RAHMAN, M.; YAMADA, M.; YOSHIDA, M. Relationship of *Annona* species as revealed by PCR-RFLP analysis. **Breeding Science**, v. 47 (4), p. 335-339, 1997.

RAHMAN, M.; SHIMADA, T.; YAMAMOTO, T.; YONEMOTO, J.Y.; YOSHIDA, M.; Genetical diversity of cherimoya cultivars revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) analysis. **Breeding Science**, v. 48 (1), p. 5-10, 1998.

SQUIRRELL, J.; HOLLINGSWORTH, P. M.; WOODHEAD, M.; RUSSELL, J.; LOWE, A .J.; GIBBY, M.; POWELL, W. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1339–1348, 2003.

SOUZA, S. A. C. D, de. **Avaliação da variabilidade genética em *Musa spp.* utilizando marcadores microssatélites**, Tese (Doutorado) – Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba, 2002,86p.