



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL**

Pedro Henrique Dias Nascimento

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE  
ACESSOS DE ACEROLEIRA (*Malpighia emarginata* Sessé &  
Mociño ex DC.).**

Petrolina

2018

**PEDRO HENRIQUE DIAS NASCIMENTO**

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE  
ACESSOS DE ACEROLEIRA (*Malpighia emarginata* Sessé &  
Mociño ex DC.)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal do Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo

Petrolina

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Pedro Henrique Dias Nascimento

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE ACESSOS DE ACEROLEIRA (*Malpighia emarginata* Sessé & Mociño ex DC.).

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovado em: 24 de Julho de 2018.

**Banca Examinadora**



---

Dr. Nataniel Franklin de Melo  
Embrapa Semiárido



---

PhD. Francine Hiromi Ishikawa  
UNIVASF



---

Dr. Manoel Abilio Queiróz  
UNEB

D541c Dias Nascimento, Pedro Henrique  
Caracterização citogenética e molecular de acessos de aceroleira  
(*malpighia emarginata* sessé & mociño ex dc.) / Pedro Henrique Dias  
Nascimento. -- Petrolina, 2018.  
52 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) -  
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências  
Agrárias, Petrolina - PE, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo.

Referências.

1. Acerola. 2. Cromossomos. 3. Germoplasma. Título. II.  
Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 634.973214

## Dedicatória

A minha família por  
me apoiar em todos os  
momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me conceder inteligência, sabedoria e saúde necessárias para exercer este trabalho.

Aos meus pais Ademar Nunes do Nascimento e Sandra Maria Dias da Silva, por acreditarem na minha capacidade e confiarem em mim em todos os momentos.

Aos meus irmãos Sibebe Dias Nascimento, Samila Dias Nascimento, Lucas Maciel Dias Nascimento e Cicero Leandro Dias Nascimento por me apoiarem e por sonharem comigo por um futuro melhor.

A minha Falecida avó, Marieta Nunes do Nascimento pelas palavras de encorajamento, admiração e amor.

Aos meus colegas de mestrado, parceiros nas atividades acadêmicas e companheiros nas aflições e nos momentos de descontração.

A Elenício Gomes Coelho, Francisco Manoel de Souza e Angela Katiussia Nascimento dos Santos Coelho, funcionários da Embrapa Semiárido, por todo o auxílio e tempo disponibilizado para a realização da implantação do meu trabalho e execução das análises.

A todos os bolsistas e estagiários do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, em especial Simone Sales Souza por todo o auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Nataniel Franklin de Melo, em especial, por ser meu orientador e por desempenhar um ótimo papel como profissional. Transmitindo confiança, tranquilidade, compreensão e conhecimento.

A Facepe - Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco, pelo apoio financeiro disponibilizado.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, por disponibilizar o espaço e os materiais necessários à pesquisa.

A Universidade Federal do Vale do São Francisco, pela qualidade do programa de pós-graduação fornecido.

A todos que me ajudaram e contribuíram de alguma maneira na minha vida.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de acessos de *Malpighia emarginata* com a utilização de marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), caracterizar o padrão de heterocromatina e analisar a viabilidade de grãos de pólen. Foram utilizados 16 acessos para análise molecular com 25 primers ISSR, os quais produziram um total de 1066 bandas entre 100 e 2080 pb. Obteve-se 100% de bandas polimórficas entre os genótipos avaliados. Os valores de dissimilaridade genética (dg), calculados de acordo com o complemento do índice de Jaccard, variaram de 0,358 a 0,766. Por meio da análise de agrupamento pelo método das médias não ponderadas de grupos pareados UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetical Mean*) foi possível observar a formação de 12 grupos distintos. Os acessos 'Aco 10' e 'Smy' foram os mais dissimilares e 'Rubra' e 'Okinawa' os menos dissimilares. Os marcadores ISSR utilizados neste estudo demonstraram eficiência na detecção de polimorfismos moleculares, revelando variabilidade genética entre os acessos. Para as análises citogenéticas foram usados cinco acessos de *Malpighia*, por meio da coloração CMA/DAPI, e seis acessos para a viabilidade polínica utilizando a coloração com carmim acético. Foi observado  $2n=30$  cromossomos para a 'Rubra' e  $2n=20$  para os demais acessos. A coloração com fluorocromos CMA/DAPI revelou regiões heterocromáticas CMA+, cujo número de blocos variou de quatro a seis. Foi observado um potencial de viabilidade polínica alta nas cultivares 'Cabocla', 'Costa Rica' e 'Flor Branca' destacando-se a cultivar 'Cabocla' com maior valor (95,9%), podendo ser recomendada como genótipo doador de pólen em trabalhos de pesquisa com melhoramento genético. Por outro lado, as cultivares 'Rubra' e 'Okinawa' mostraram baixa viabilidade polínica, com valores médios de 20,6% e 5,5%, respectivamente. A cultivar 'Sertaneja' apresentou viabilidade considerada média, com valor de 78%. Houve também uma correlação positiva entre a viabilidade polínica e o tamanho das sementes.

**Palavras-chave:** Cromossomo. Fluorocromo. Meiose. Germoplasma.

## ABSTRACT

The present work aimed to evaluate the genetic diversity of *Malpighia emarginata* accessions using ISSR molecular markers (Inter Simple Sequence Repeat), to characterize the heterochromatin pattern and to analyze the viability of pollen grains. It was used 16 accessions for molecular analysis with 25 ISSR primers, which produced a total of 1066 bands between 100 and 2080 bp. 100% polymorphic bands were obtained among the evaluated genotypes. The genetic dissimilarity values (dg), calculated according to the complement of the Jaccard index, ranged from 0.358 to 0.766. By means of the grouping analysis by the Unweighted Pair Group Method Arithmetic Mean (UPGMA) method, it was possible to observe the formation of 12 different groups. The accesses 'Aco 10' and 'Smy' were the most dissimilar and 'Rubra' and 'Okinawa' were the least dissimilar. The ISSR markers used in this study demonstrated efficiency in the detection of molecular polymorphisms, revealing genetic variability among the accessions. Five accessions of *Malpighia* were used for cytogenetic analysis using CMA / DAPI staining and six accessions for pollen viability using acetic carmine. It was observed  $2n = 30$  chromosomes for the 'Rubra' and  $2n = 20$  for the other accessions. Coloration with CMA / DAPI fluorochromes revealed CMA + heterochromatic regions, whose block number ranged from four to six. A high pollen viability potential was observed in the 'Cabocla', 'Costa Rica' and 'Flor Branca' cultivars, with the highest value (95.9%) being the 'Cabocla' cultivar, which may be recommended as a pollen donor genotype in research work with genetic improvement. On the other hand, 'Rubra' and 'Okinawa' cultivars showed low pollen viability, with mean values of 20.6% and 5.5%, respectively. The cultivar 'Sertaneja' presented medium viability, with a value of 78%. There was also a positive correlation between pollen viability and seed size.

**Key-words:** Chromosome. Fluorochrome. Meiosis. Germplasm.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1 – Aspecto geral da quantificação do DNA genômico em 16 acessos de aceroleira ( <i>Malpighia emarginata</i> ) e DNA do fago lambda de 50 e 25ng.	21
Figura 2 – Teste preliminar de amplificação de DNA com 100 <i>primers</i> do tipo ISSR no acesso 'Flor' Branca de aceroleira, visando a seleção dos mais informativos e com melhor resolução. Marcador de peso molecular ladder de 1kb.	26
Figura 3 – Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre 16 acessos de <i>Malpighia emarginata</i> , do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido, obtido pelo método UPGMA, utilizando o complemento aritmétrico do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade, com base em marcadores ISSR.	28
Figura 4 – Coloração CMA (A, D, G, J e M), DAPI (B, E, H, K e N) e dupla coloração CMA/DAPI (C, F, I, L e O) em metáfases mitóticas com 2n=20 nos acessos BRS 'Sertaneja', 'Cabocla', 'Flor Branca' e 'Costa Rica', e com 2n=30 para a 'Rubra'. Setas indicam regiões de cromatina mais brilhantes com coloração CMA.	33
Figura 5 – Meiose e viabilidade polínica em acessos de aceroleira. Grãos de pólen corados com carmim acético (A, B, C, D, E e F), diplóteno com dez bivalentes, com dois cromossomos parcialmente pareados (G e H).	35
Figura 6 – Comparação do endocarpo e das sementes de seis cultivares de aceroleira.	36

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Identificação e nome comum de 15 acessos de <i>Malpighia</i> para a avaliação da diversidade genética utilizando marcadores ISSR.	19
Tabela 2 – Lista de <i>primers</i> ISSR e sua sequência (5'-3 ') utilizados para análise da diversidade genética em acessos de <i>Malpighia emarginata</i> do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.	22
Tabela 3 – Marcadores ISSR utilizados na amplificação dos 16 genótipos de <i>Malpighia emarginata</i> , número total de bandas (NTB), número de bandas por genótipo (NBG), número de bandas polimórficas (NBP), percentagem de polimorfismo P(%) e amplitude de fragmentos (AF) gerados.	27
Tabela 4 – Agrupamento dos 16 acessos de aceroleiras, pelo método UGPMA, com base na dissimilaridade expressa pelo índice de Jaccard.	29
Tabela 5 – Número de cromossomos (NC), Comprimento Médio dos Cromossomos (C); Comprimento do lote haploide (LHC); Número de cromossomos portadores de bandas CMA <sub>3</sub> <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup> (RH) em 5 acessos de <i>Malpighia emarginata</i> cultivados no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.	32
Tabela 6 – Percentual de viabilidade polínica e diâmetro médio de grãos de pólen de seis cultivares de aceroleira ( <i>Malpighia emarginata</i> Sessé & Mociño ex DC) cultivadas no Submédio do São Francisco.	35

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
2.1. Aspectos morfológicos, distribuição e recursos genéticos do gênero <i>Malpighia</i> .....	12
2.2. Caracterização Molecular.....	15
2.3. Caracterização citogenética.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5. CONCLUSÕES.....	36
6. REFERÊNCIAS.....	36

## 1. INTRODUÇÃO

A aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé & Mociño ex DC) possui frutos que se destacam pelo elevado teor de vitamina C, sendo também rica em outros nutrientes. Do ponto de vista econômico, sua importância está na comercialização de frutos *in natura*, produção de sucos, geleias, sorvetes, extração do ácido ascórbico como matéria-prima para indústria farmacêutica, e na elaboração de muitos outros subprodutos que se destinam ao mercado interno e externo (LIMA *et al.*, 2003).

Os marcadores morfológicos ainda são muito utilizados para caracterizar genótipos de várias espécies, embora estejam sendo substituídos pelos marcadores moleculares, devido a sua capacidade de acessar diretamente o genoma sem influência do efeito do ambiente, além de serem eficientes na identificação de genótipos, quantificação da variabilidade genética e estudos de diversidade. Portanto, têm sido utilizados frequentemente nos estudos de várias espécies (GOMES FILHO *et al.* 2010; DANTAS *et al.* 2012), dentre elas aquelas pertencentes ao gênero *Malpighia* (MACHADO *et al.* 2012).

Além do uso de marcadores moleculares, a análise citogenética nas células que se encontram em mitose e meiose possibilitam identificar o número de cromossomos, as diferentes formas estruturais entre os cariótipos, entre outras informações importantes, como alterações cromossômicas, taxa de fertilidade, problemas no reconhecimento dos homólogos, e identificação de anormalidades que dificultam a formação ou função do grão de pólen (NOLASCO 2011). Tais características podem indicar os parentais favoráveis a futuras hibridações.

No presente estudo foram analisados a segregação meiótica e a viabilidade polínica dos acessos mais promissores de aceroleira, bem como as respectivas composições genômicas mediante a coloração com cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), além do uso de marcadores moleculares do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), com o objetivo de acessar e compreender a variabilidade genética existente.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização citogenética e molecular de acessos da coleção de aceroleira (*M. emarginata*) do BAG da Embrapa Semiárido como instrumento para a valorização do

germoplasma, e gerar informações úteis que possibilitem o seu uso em programa de melhoramento genético.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Aspectos morfológicos, distribuição e recursos genéticos do gênero *Malpighia*

A aceroleira (*M. emarginata*) é uma planta da família Malpighiaceae, originária da América Central. Essa classificação botânica foi estabelecida em 1986 (INTERNATON BOARD OF PLANT GENETIC RESOURCES, 1986). No entanto, ela também é conhecida como *Malpighia glabra* L. e *M. puniceifolia* L., mas de acordo com o Herbário de Linnaeus esses nomes são dados para a mesma espécie.

A maioria das espécies do gênero *Malpighia* é diploide, com  $2n = 2x = 20$ , enquanto que algumas são tetraploides, com  $2n = 4x = 40$  (LOMBELLO & FORNI-MARTINES 2003). Mondim *et al.* (2010) caracterizando cariotipicamente a *M. emarginata* confirmou ser uma espécie diploide. Naturalmente, sua propagação ocorre por via sexuada; é uma planta alógama com alta taxa de autogamia, pois possui características que são comuns em espécies autógamas, tais como: flores hermafroditas, amadurecimento simultâneo do androceu e gineceu, ausência de barreiras físicas que impeçam ou dificultem o recebimento do pólen no estigma da mesma flor. Estudos realizados por Bosco *et al.* (1995) e Lopes *et al.* (2002) ao estimarem os sistemas de cruzamento desta espécie concluíram que a mesma é predominantemente alógama por apresentarem alta taxa de polinização cruzada, com variação entre famílias. Ritzinger & Ritzinger (2011) reforçaram essa teoria ao definir que os grãos de pólen da aceroleira são amarelos, pegajosos e não dissemináveis pelo vento, sendo a polinização dependente de insetos polinizadores.

O método de propagação é fundamental para que se obtenha plantios uniformes de aceroleira (GOMES *et al.*, 2000). Segundo Lopes & Paiva (2002) o cultivo da aceroleira expandiu-se rapidamente pelo Brasil entre os anos 80 e 90, predominando a propagação via sementes, o que resultou em grande

variabilidade genética dos pomares. Porém, essa forma de propagação proporciona grande desuniformidade entre plantas, trazendo reflexos negativos em termos de qualidade e produtividade (RITZINGER & RITZINGER, 2011). Atualmente, os plantios em grandes escalas para essa modalidade de propagação só deve ser adotada se as sementes provierem de frutos colhidos em áreas formadas com plantas uniformes, portadoras das melhores características produtivas e comerciais, pois desse modo se reduz o risco da geração de matrizes geneticamente indesejáveis ao ponto de vista agrônomo (GONZAGA NETO, 1999).

Recentemente, têm-se constatado no Brasil, considerável expansão da área cultivada com acerola, principalmente, por suas qualidades nutricionais; cujos frutos se destacam pelo elevado teor de vitamina C, sendo também rica em outros nutrientes como carotenóides, tiamina, riboflavina e niacina (ASSIS *et al.*, 2001), além da facilidade de cultivo e ótima adaptação edafoclimática a diferentes regiões. Plantios comerciais são existentes em vários estados do Brasil, mas foi no Nordeste brasileiro onde a aceroleira melhor se adaptou. Para Junqueira *et al.* (2002) & Konrad (2002) o Submédio São Francisco é uma região de grande destaque para a cultura, por se desenvolver bem em cultivos irrigados nas regiões semiáridas. Uma das grandes vantagens do cultivo dessa espécie é o elevado número de safras por ano, geralmente são quatro, podendo chegar a sete safras, em cultivos irrigados. Na região do Submédio São Francisco, por exemplo, em pomares irrigados é possível ter produção o ano inteiro (JUNQUEIRA *et al.*, 1996).

Por outro lado, uma das ameaças ao cultivo da acerola é a sua susceptibilidade ao ataque de nematoides. Nos últimos anos, as lavouras vêm apresentando um decréscimo nas produções em razão da ocorrência desse patógeno (CASTRO *et al.*, 2009). Plantas atacadas exibem amarelecimento, redução do tamanho das folhas e nanismo, podendo resultar em declínio e morte das mesmas (CASTELLANO *et al.*, 2011). Os problemas com fitonematoides em áreas de produção de acerolas foram constatados pela primeira vez em 1989, quando foram verificados o parasitismo de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (FERRAZ *et al.*, 1989; FRANCO; PONTE, 1989; HOLANDA *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2006; BUENO *et al.*, 2007; ARIEIRA *et al.*, 2010).

Após a constatação da grande incidência do patógeno, estudos buscando a resistência de genótipos de aceroleira a estas espécies têm sido desenvolvidos, entretanto com pouco sucesso (CAVICHIOLI *et al.*, 2014). Nos últimos anos o ataque desse parasita em pomares comerciais vem reduzindo drasticamente a produção da aceroleira no país, o que representa um dos principais problemas que afetam o aumento da comercialização da fruta. Diversos programas de melhoramento genético de aceroleira existentes no Brasil têm somado esforços para tentar minimizar os danos causados pelos fitonematoides.

Os primeiros trabalhos de melhoramento genético em aceroleira, visando ao aumento da produtividade e à adequação das plantas e dos frutos ao cultivo comercial, tiveram início na década de 50 do século passado, em Porto Rico e nos Estados Unidos da América, especificamente na Flórida e no Havaí (ARÓSTEGUI *et al.*, 1955; JACKSON e PENNOCK, 1958; NAKASONE *et al.*, 1968). No Brasil, os trabalhos pioneiros de melhoramento desta espécie datam do ano de 1970, mas foi no início dos anos 1990, que os programas de melhoramento se multiplicaram pelo país, sendo realizados em diversas instituições, como: Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, que possui atualmente 42 acessos, os quais foram coletados em diferentes regiões produtoras do Brasil e no exterior (MORAIS FILHO, 2010). Embrapa Semiárido que conta com cerca de 60 acessos entre os quais, estão reunidos praticamente todos os clones comerciais cultivados no Brasil, além de acessos coletados nas principais regiões produtoras de acerola do Nordeste (SOUZA *et al.*, 2013). Assim como o BAG de aceroleira da Embrapa Mandioca e Fruticultura localizada em Cruz das Almas – BA, que teve início em 1992 e conta com 156 acessos, provenientes de coletas e intercâmbio de germoplasma. (RITZINGER, 2011).

De acordo com Salla (2002), a falta de variedades definidas de acerola gera desuniformidade na produção anual por planta, causando perdas na produtividade e qualidade dos frutos, evidenciando a necessidade de se preservar a variabilidade genética da aceroleira disponível, por meio de implantação de bancos ativos de germoplasma, para que essa variabilidade seja explorada em programas de melhoramento genético.

O programa de melhoramento genético da Embrapa Semiárido iniciou-se em 1992, com a introdução de 43 acessos a partir de coletas realizadas em

plantios comerciais dos Estados de Pernambuco, Ceará, Bahia e Rio Grande do Norte (GONZAGA NETO, 1999). A partir de 2012, as atividades com recursos genéticos e melhoramento de aceroleira foram retomadas na Embrapa Semiárido. Com a crescente demanda pela fruta tanto no mercado interno como no externo, é necessário o aumento do plantio, assim como a condução de um cultivo sustentável com boas características agrônomicas para o consumo *in natura* e para procedimentos com bases comerciais.

Assim, inúmeras cultivares como Flor Branca, Okinawa e BRS Sertaneja têm sido indicadas para o plantio no Submédio do São Francisco, nos estados da Bahia, Minas Gerais, Pernambuco e Sergipe. A BRS Sertaneja foi lançada pela Embrapa Semiárido em 1998, sendo gerada através da seleção de acessos superiores para regiões irrigadas do Nordeste. Em 2002 e 2004, as cultivares Cabocla e Rubra foram lançadas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (RITZINGER; RITZINGER, 2011).

## **2.2. Caracterização molecular**

Os descritores morfológicos exercem papel fundamental tanto na caracterização de germoplasma vegetal como na divulgação das características agrônomicas de novos materiais genéticos, podendo influenciar decisivamente na escolha de cultivares por parte de agricultores e outros interessados (SMITH & SMITH, 1992; PECCHIONI *et al.*, 1996). Contudo, alguns pontos restringem a caracterização de genótipos ou estudo de variabilidade por meio desses descritores, principalmente devido à necessidade de um maior tempo de avaliação, resultando em aumento dos custos, além de serem dependentes da influência do ambiente, podendo ainda variar de acordo com a percepção dos avaliadores (FRANZON *et al.*, 2010).

Segundo Cavalcante (2015) a caracterização pode ser morfológica, fenotípica, reprodutiva, bioquímica, citogenética ou molecular. Nos últimos anos, houve um aumento na utilização de marcadores moleculares no mundo, principalmente, por ser um método seguro, uma vez que não é afetado pelo ambiente e permite descrever as diferenças entre os acessos, reunindo informações úteis ao melhoramento genético, além de servir como

complementação a técnicas morfológicas, bioquímicas e citológicas (WEISING *et al.*, 2005). Os marcadores moleculares são uma ferramenta rápida e eficaz para estudos genômicos, uma vez que detectam o polimorfismo diretamente ao nível do DNA sem influência ambiental (SOUZA, 2001). Estudos de divergência genética fornecem parâmetros para identificação de genitores favoráveis a obtenção de populações segregantes, em programas de hibridação, favorecendo a seleção de genótipos superiores e, como consequência, a obtenção de populações geneticamente melhoradas.

Dentre as diversas técnicas moleculares, os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) têm sido bastante utilizados para identificar o polimorfismo em várias culturas, por apresentarem uma rápida distinção entre indivíduos aparentados, devido ao elevado grau de reprodutibilidade e polimorfismo, permitindo a identificação de variabilidades intra e interespecíficas (DANTAS *et al.*, 2012). Em aceroleira poucos trabalhos foram realizados com o uso desse tipo de marcador. Os ISSR são fragmentos de DNA de 100 a 3.000 pb onde o procedimento de obtenção é um método baseado em microssatélite (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994). O *primer*, composto por uma sequência do microssatélite usualmente de 16-25bp de comprimento, é utilizado para amplificar principalmente as sequências de diferentes tamanhos (FALEIRO, 2007).

Uma das técnicas de amplificações mais utilizada é a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que, de acordo com Barros *et al.* (2008), baseia-se nos princípios da replicação do DNA fita dupla e na síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e de *primers* específicos ou não. Tais *primers* delimitam a sequência de DNA de fita dupla a ser amplificado, cujos resultados são milhões de cópias idênticas (MULLIS & FALOONA, 1987; WHITE *et al.*, 1989). Estes *primers* podem estar desancorados ou usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3' por 1 a 4 bases degeneradas. Os alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma esteja faltando à sequência repetida ou têm uma deleção ou uma inserção que modifica a distância entre as repetições (GOULÃO & OLIVEIRA, 2001). O método fornece resultados altamente reprodutíveis e gera abundante polimorfismo em muitos sistemas. Para que essas amplificações apresentem-se de forma nítida após a PCR é necessário que o DNA esteja integro (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

### 2.3. Caracterização citogenética

A citogenética tem sido utilizada em bancos de germoplasma para caracterizar o material genético das células, em especial número e morfologia de cromossomos, durante a fase reprodutiva específica de células de tecidos em crescimento, que sejam favoráveis à visualização, em geral ápices radiculares (GUERRA, 1988; PEREIRA, 2010). Essas análises têm um papel importante em programas de melhoramento genético de plantas, pois, através dos estudos citogenéticos é possível determinar o número cromossômico, nível de ploidia, comportamento cromossômico na meiose e na mitose, fertilidade do grão de pólen, auxiliando na identificação de materiais que possam ser utilizados em cruzamentos dirigidos (SYBENGA, 1993; 1998). Dentre os métodos citogenéticos utilizados, a análise cariotípica em células mitóticas e/ou meióticas, associadas à observação de caracteres fenotípicos e distribuição geográfica, pode contribuir para taxonomia e para o melhoramento genético (SILVA, 2007).

A meiose é um tipo de divisão reducional onde uma célula diploide ( $2n$ ) da origem a quatro células haploides ( $n$ ). Em organismos de reprodução sexuada, esse tipo de divisão é responsável por elevar a variabilidade genética. De acordo com Vargas *et al.* (2004) o estudo da estabilidade meiótica e a análise da viabilidade do grão de pólen permitem indicar o potencial dos acessos em possíveis cruzamentos, fornecendo informações importantes para uso futuro em programas de melhoramento. Nesse caso, para que seja possível a seleção de materiais genéticos e fazer inferências sobre a eficiência dos cruzamentos, é necessária a realização de correlações com anormalidades meióticas.

Biondo & Battistin (2001) relataram que o estudo da viabilidade polínica é uma das técnicas que mais contribuem para o melhoramento genético, pois é possível verificar a potencialidade do gameta masculino na eficiência da fecundação e sua posterior fertilização. Na citogenética, é utilizada no monitoramento de pólen em armazenamento, garantindo a fertilidade, e com isso, a seleção de acessos mais estáveis em cruzamentos que poderão gerar novas cultivares de importância econômica (SOUZA *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2006).

A eficácia desses cruzamentos depende diretamente da viabilidade dos grãos de pólen e receptividade estigmática (LIMA *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2016). Essa técnica permite também analisar o potencial de reprodução de uma espécie, cultivar ou população. Desse modo, o sucesso da fertilização está altamente relacionado com a viabilidade polínica, pois quanto maior for a viabilidade maior será a probabilidade da fecundação (MARTINS *et al.*, 2012). Conforme Horner & Palmer (1995) o surgimento de grãos de pólen anormais, ou inviáveis, pode ser resultado de aberrações estruturais e numéricas, que decorrem de anormalidades que podem ocorrer durante a pré-meiose, meiose e pós-meiose. De acordo com Ritzinger & Ritzinger (2011) a viabilidade do pólen de aceroleira pode variar de 10% a 90%, a depender do genótipo. Para essa cultura poucos estudos nessa área relataram a existência de algumas cultivares com diferentes valores de viabilidade polínica. SIQUEIRA *et al.* (2011) comparando os percentuais de viabilidade dos grãos de pólen de três cultivares de aceroleira (Sertaneja, Flor Branca e Okinawa), obtiveram valores de 83%, 92% e 14,8%, respectivamente, indicando a existência de uma possível instabilidade genotípica na cultura.

Após determinar o momento da maturidade do grão de pólen, sua viabilidade pode ser estimada através de métodos colorimétricos ou germinativos (DAFNI, 1992; KEARNS & INOUE 1993; MULUGETA *et al.*, 1994; SOUZA *et al.*, 2002). O carmim acético, é um corante utilizado como indicativo de viabilidade polínica (MULUGETA *et al.*, 1994; DOMINGUES *et al.*, 1999; RIGAMOTO & TYAGI 2002), e, para Báez *et al.* (2002), esse teste colorimétrico reflete a integridade de estruturas celulares, como núcleo e membrana plasmática.

Algumas técnicas de bandeamento cromossômico vêm sendo utilizadas, dentre elas está coloração por meio de fluorocromos que informa a constituição da heterocromatina detalhando o padrão de distribuição das bases pelo uso de fluorocromo cromomicina A3 (CMA), que se liga as regiões ricas em CG emitindo fluorescência amarela brilhante, e o 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que produz fluorescência azul brilhante em regiões cromossômicas ricas em AT (BAGULEY, 1982; GUERRA, 2000). A coloração simultânea com CMA/DAPI tem permitido caracterizar regiões heterocromáticas em diversos genótipos de plantas (GUERRA, 1993; GUERRA 2000; FEITOZA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012). A heterocromatina é considerada um dos fatores mais importantes no

processo de evolução (EDELMAN & LIN, 1995), uma vez que pode interferir muitos outros mecanismos, como a replicação do DNA, cromossômica estrutura, expressão gênica e ciclo celular (REDI *et al.*, 2001, STACE, 2000).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral:

Promover a caracterização citogenética e molecular da coleção de acessos de aceroleira (*Malpighia emarginata*) da Embrapa Semiárido como instrumento para a valoração do germoplasma, e gerar informações sobre os acessos para possibilitar o seu uso em programa de melhoramento genético.

#### 3.2. Objetivos específicos:

Realizar a caracterização citogenética nos diferentes acessos de aceroleira por meio da coloração por CMA/DAPI

Caracterizar e analisar a diversidade genética usando marcadores moleculares ISSR.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### Material vegetal

O material estudado no presente trabalho foi proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de Aceroleira (*M. emarginata*) da Embrapa Semiárido, localizado na Estação Experimental de Bebedouro, em Petrolina-PE.

#### **Caracterização molecular**

Avaliou-se, por meio do uso de marcadores microssatélites ISSR (inter simple sequence repeat), a variabilidade molecular de 16 acessos de *Malpighia emarginata* (Tabela 1) oriundos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. As Folhas jovens presentes em diferentes ramos foram coletadas no período da manhã no campo experimental de Bebedouro pertencente a Embrapa Semiárido, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e levadas ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal onde foram armazenadas em freezer -80 °C até a etapa de extração de DNA.

**Tabela 1** – Identificação e nome comum de 16 acessos de *Malpighia* para a avaliação da diversidade genética utilizando marcadores ISSR.

<b>Sigla</b>	<b>Acessos</b>
A10	ACO 10
A18	ACO 18
A31	ACO 31
A34	ACO 34
CM	CAMTA
CP	COOPAMA
IP	IAPAR 01
LG	LIGIA
NR	NRUSA
SY	SMMY
CB	CABOCLA
CR	COSTA RICA
ST	SERTANEJA
FB	FLOR BRANCA
RB	RUBRA
OK	OKINAWA

### Extração de DNA

Para extração do DNA, foi utilizado o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990) com algumas modificações. Para cada acesso, o DNA foi extraído utilizando 2 g de folhas jovens. O material foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para *ependorff* de 2mL contendo 700 µL de tampão de extração CTAB 2% e β-Mercaptaenol. As amostras foram levadas a banho maria a 60 °C durante 45 min com leves inversões a cada 15 min. Após o resfriamento das amostras em temperatura ambiente por aproximadamente 5 min, foram adicionados 950 µL de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1 com leves inversões, sendo em seguida realizada uma centrifugação a 12.000 rpm durante 10 min. Em capela de exaustão foi transferido 700 µL do sobrenadante para outro *ependorff* de 1,5 mL e adicionado 470 µL de clorofórmio-álcool isopropílico. Aproximadamente 360 µL do sobrenadante foi retirado, sendo adicionado a esse volume 240 µL de álcool isopropílico gelado para a precipitação dos ácidos nucleicos. Em seguida, os microtubos foram colocados em gelo por 20 min e, posteriormente, centrifugados a 12.000 rpm durante 10 min. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado, observando se houve a formação de pellet. O DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70%. O

precipitado foi seco em temperatura ambiente de um dia para o outro e ressuspendido em 15  $\mu\text{L}$  de TE (Tris base e EDTA). Após 1 hora, adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de RNase (10 mg/ml), mantendo à temperatura de 37 °C em estufa durante 1 hora.

A quantificação do DNA genômico foi realizada por meio do comparativo da intensidade visual das bandas com o DNA de fago  $\lambda$  (100, 50 e 25 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) por eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) corado com brometo de etídio submetidos à voltagem constante de 100 V por 1 h (Figura 1). A visualização foi realizada por meio de luz ultravioleta e registrada em fotodocumentador modelo LPix Image (Loccus Biotecnologia). Em seguida a concentração das amostras foram ajustadas para 25ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

### Análises de amplificação por PCR

As reações de amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram realizadas em termociclador Gene Amp 9600 (Applied Biosystems), onde cada amostra apresentou um volume final de 12  $\mu\text{L}$  contendo: 1  $\mu\text{L}$  de DNA genômico numa concentração de 25ng/L; 1,88  $\mu\text{L}$  de primer (4%); 2,5  $\mu\text{L}$  de solução tampão (5X); 1,0  $\mu\text{L}$  de DNTp'S (2,5 mM de cada um dos desoxiribonucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,1  $\mu\text{L}$  de TaqPolimerase (5U); 1,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25mM) e 4,52  $\mu\text{L}$  de água Ultrapura para completar o volume final.

A programação do termociclador consistiu de 94 °C por 3 minutos, seguido de 39 ciclos de 94 °C por 45s, 50 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto. Para finalizar, foi realizada uma extensão a 72 °C por 7 minutos, deixando os produtos das reações a 4 °C. Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 2% (p/v) submetidos à voltagem constante de 100 V por 3 h, e corados com brometo de etídio. A visualização dos amplicons foi realizada sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador Labbda de peso molecular 1 kb (Norgen). Foi realizado um teste preliminar com 100 iniciadores ISSR em um dos acessos, sendo escolhidos 25 iniciadores para aplicação nos demais acessos em função da sua nitidez, quantidade e polimorfismos das bandas geradas (Tabela 2).

**Tabela 2** – Lista de *primers* ISSR e sua sequência (5'-3') utilizados para análise da diversidade genética em acessos de *Malpighia emarginata* do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.

Primer	Sequência (5'-3')*
1-DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC
2-DiGT5'CR	CRGTYGTGTGTGTGTGTGT
3-DiGT5'CY	CYGTGTGTGTGTGTGTGT
4-TriCAG3'YC	CACCACCACCACCACYC
5-TriCAC5'CR	CRCACCACCACCACCAC
6-TriCAC5'CY	CYCACCACCACCACCAC
7-TriCAG	CAGCAGCAGCAGCAG
8-TriCAG3'RC	CAGCAGCAGCAGCAGRC
9-TriCAG3'YC	CAGCAGCAGCAGCAGYC
10-TriGTG3'RC	GTGGTGGTGGTGGTGR
11-TriTGT	TGTTGTTGTTGTTGT
12-TriAAC3'RC	AACAACAACAACAACRC
13-TriACA3'RC	ACAACAACAACAACARC
14-TriACT3'RC	ACTACTACTACTACTRC
15-TriACG3'RC	ACGACGACGACGACGRC
16-TriTCG3'RC	TCGTCGTCGTCGTCGRC
17-DiGA5'CR	CRGAGAGAGAGAGAGAGA
18-TriAGT3'RC	AGTAGTAGTAGTAGTRC
19-TriGTA3'RC	GTAGTAGTAGTAGTARC
20-TriGCA3'RC	GCAGCAGCAGCAGCARC
21-DiCA	CACACACACACACACA
22-DiCA3'RG	CACACACACACACACARG
23-DiCA3'YG	CACACACACACACACAYG
24-DiCA5'CY	CYCACACACACACACACA
25-DiCA5'G	GCACACACACACACACA

### Análise dos dados

Os marcadores ISSR foram convertidos em dados binários, onde foi atribuído 1 para presença e 0 para ausência de bandas. Os marcadores que se mostraram polimórficos foram submetidos à análise de diversidade genética, utilizando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e coeficiente de Jaccard. O ajuste entre a matriz de distâncias e o dendrograma foi realizado por meio de correlação cofenética (CCC) utilizando o software Genes (CRUZ, 2013). Para obtenção do dendrograma com a divergência dos acessos foi utilizado o programa NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*), versão 2.02. O ponto de corte para o dendrograma obtido foi estabelecido pelo método

proposto por Mojema (1977), cuja fórmula é descrita como ponto de corte =  $m + kdp$ . Onde  $k$  é uma constante = 1,25 e DP refere-se ao desvio padrão.

## **Citogenética Vegetal**

### Local de condução e Material vegetal

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Foram utilizados os acessos de aceroleiras das cultivares Cabocla, Costa Rica, Flor Branca, Okinawa, Rubra e BRS Sertaneja provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Aceroleira da Embrapa Semiárido. Para as análises citogenéticas, botões florais foram coletados em plantas cultivadas na estação experimental da Embrapa Semiárido, localizada no distrito de irrigação de Bebedouro, em Petrolina, PE, nas coordenadas 09°7'59,33" S e 40°17'57,02" O; 9°8'0,76" S e 40°17'57,63" O; 09°7'58,67" S e 40°17'58" O; e 09°8'0,02" S e 40°17'59,46", enquanto as raízes foram coletadas em plantas cultivadas em vasos em casa de vegetação. As imagens dos grãos de pólen e das células meióticas foram capturadas com o auxílio de uma câmera digital DinoEye e do software Dinocapture 2.0. Já as lâminas com fluorocromos foram analisadas em microscópio de epifluorescência Leica DMLB.

### **Viabilidade polínica**

Para estimar a viabilidade polínica, foram coletados 20 botões florais em pré-antese de cada variedade entre 8 h e 10 h da manhã e fixados diretamente em solução Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1) por 24 h a temperatura ambiente e estocados a -20 °C. Para preparação das lâminas, os botões florais foram lavados duas vezes em água destilada por 5 min e hidrolisados em HCl 5N por 10-20 min. Em seguida, as anteras foram maceradas separadamente na lâmina contendo ácido acético 45%, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido, secas ao ar, coradas com carmim acético a 2% (GUERRA & SOUZA, 2002). Foram preparadas pelo menos cinco lâminas por acesso para observação em microscópio óptico em ambos os trabalhos. O percentual de viabilidade polínica e as medições do diâmetro equatorial foram realizados em 540 grãos de pólen por cultivar. Além da contagem dos grãos de pólen e do

cálculo da porcentagem de viabilidade, frutos foram despolidos e lavados manualmente, com auxílio de uma peneira em água corrente, os endocarpos foram submetidos a cortes transversais na extremidade oposta à região de emissão da radícula para visualizar a presença ou ausência de sementes (Costa et al., 2003). Foram feitas as medições do diâmetro equatorial, tamanho do endocarpo e das sementes de cada cultivar.

### **Análise meiótica**

Para a análise meiótica, botões florais jovens foram coletados, fixados diretamente em solução Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1) por 24 h a temperatura ambiente e estocados a -20 °C. Para preparação das lâminas, os botões florais foram lavados duas vezes em água destilada por 5 min e hidrolisados em HCl 5N por 10-20 min. Em seguida, as anteras foram maceradas separadamente na lâmina contendo ácido acético 45%, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido, secas ao ar, coradas com Giemsa 2% e montadas com Entellan (GUERRA 1983).

### **Mitose com uso de fluorocromos**

O meristema apical caulinar das raízes foi coletado pela manhã e pré-tratado com 8-hidroxiquinoleína 0,002 M por 20-24 horas à aproximadamente 6-8°C, e posteriormente fixadas em solução Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial, v/v), sendo o fixador preparado e homogeneizado minutos antes do uso. Após a fixação, as raízes foram mantidas por 2-24 horas à temperatura ambiente, em seguida, estocadas no freezer em -20 °C para utilização nas análises conforme o protocolo escrito por Guerra e Souza (2002) com algumas modificações. As raízes foram digeridas em solução enzimática (2% celulase - 20% pectinase) por 2 h a 37 °C em estufa, esmagadas em uma gota de ácido acético 45% e cobertas por uma lamínula 22x22 mm, que posteriormente foi retirada após congelamento em nitrogênio líquido.

Para seleção das melhores lâminas, foi feita uma coloração com DAPI-glicerol (1 µg mL<sup>-1</sup>) e análise em microscópio de epifluorescência. Posteriormente as lâminas selecionadas foram descoradas em Carnoy 3:1

durante 30 minutos, sendo em seguida desidratadas em álcool 70% e álcool 90% durante um minuto cada. As lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias, e quando necessário, antes do envelhecimento foram armazenadas no *freezer*.

Posteriormente as lâminas foram coradas com CMA (cromomicina 0,5 mg mL<sup>-1</sup>) por 1 h, contra coradas com DAPI (2 µg mL<sup>-1</sup>) por 30 min, montadas em meio de montagem MacIlvaine e guardadas por mais três dias no escuro à temperatura ambiente (GUERRA & SOUZA, 2002). As melhores células foram capturadas em microscópio de epifluorescência Leica DMLB, utilizando uma câmera digital FX350 por meio do Software Leica QFISH. Para a identificação do número de cromossomos e bandeamento, 3-10 metáfases foram examinadas por acesso, utilizando as melhores células para a contagem de cromossomos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização molecular

Inicialmente, foram utilizadas amostras de DNA de um acesso com o objetivo de selecionar os *primers* mais informativos. De 100 *primers* testados, 25 forneceram produtos nítidos de amplificação e boa repetibilidade (Figura 2). Foi observado um nível de polimorfismo elevado, uma vez que, nos marcadores selecionados amplificaram 1066 bandas com tamanhos variando entre 250 e 2500 pb (Tabela 3). O número total de bandas variou de 5 a 86, com uma média de 42,64 bandas por iniciador (Tabela 2), obtendo-se 100% de polimorfismo entre os acessos avaliados.

Alguns estudos têm demonstrado a variabilidade genética entre acessos no gênero *Malpighia*. Salla *et al.* (2002), analisando 24 acessos de aceroleiras provenientes do banco ativo de germoplasma da Universidade Estadual de Londrina, detectaram alto polimorfismo entre os acessos. Os resultados mostraram que apesar de a aceroleira possuir base genética estreita, a variabilidade genética existente é relativamente alta.

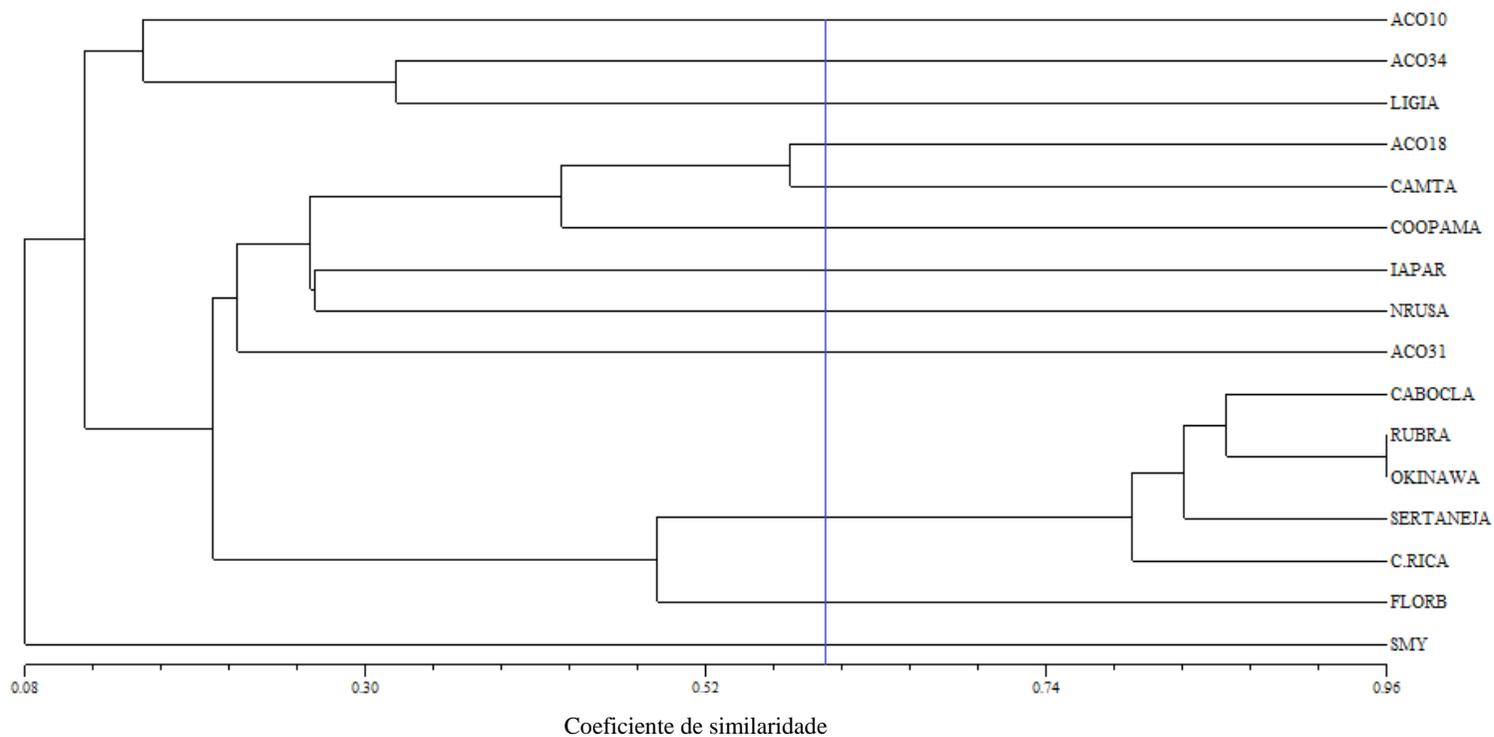
Oliveira *et al.* (2009), por exemplo, avaliando divergência genética entre 48 acessos de uma população de aceroleiras, oriundos do centro de produções de mudas da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, localizado em

São Bento do Sapucaí – SP, por meio de marcadores moleculares RAPD (Random amplified Polymorphic DNA) obtiveram 85,5% de bandas polimórficas. Da mesma forma, Moraes Filho (2010), testando 42 acessos do BAG de aceroleira da Universidade Federal Rural de Pernambuco, que foram coletados de diferentes regiões do Brasil e do exterior, usou 15 marcadores do tipo RAPD detectaram 91,2% de polimorfismo nas bandas geradas. Lima *et al.* (2015) testando 20 oligonucleotídeos ISSR em 56 clones de aceroleira, coletadas em Pacajus-CE, entre eles os acessos Flor branca, Camta e Okinawa, obtiveram 79,57% de bandas polimórficas.

**Tabela 3** – Marcadores ISSR utilizados na amplificação dos 16 acessos de *Malpighia emarginata*, número total de bandas (NTB), número de bandas por acesso (NBA), número de bandas polimórficas (NBP), percentagem de polimorfismo P(%) e amplitude de fragmentos (AF) gerados.

Primer	NTB	NBP	P(%)	NBA																AF (pb)
				<i>Malpighia emarginata</i>																
				A10	A18	A31	A34	CM	CP	IP	LG	NR	SY	CB	CR	ST	FB	RB	OK	
1-DiGA3'C*	49	49		0	6	3	1	6	6	2	2	4	2	3	3	3	1	3	4	300-2080
2-DiGT5'CR	65	65		2	8	8	0	6	7	7	0	5	0	4	3	3	6	3	3	400-2,080
3-DiGT5'CY	26	26		0	6	0	0	0	6	3	4	0	0	0	0	0	7	0	0	400-1000
4-TriCAG3'YC	21	21		0	5	0	0	1	3	0	0	0	0	1	1	1	7	1	1	400-1500
5-TriCAC5'CR	30	30		0	5	0	0	6	4	0	0	4	0	1	1	1	6	1	1	100-1000
6-TriCAC5'CY	56	56		0	3	0	5	6	0	0	4	0	0	7	7	6	6	6	6	300-1000
7-TriCAG	45	45		5	0	2	4	5	1	1	4	3	0	4	4	4	0	4	4	200-1500
8-TriCAG3'RC	66	66		0	5	0	0	6	3	0	0	0	0	10	10	10	2	10	10	300-500
9-TriCAG3'YC	83	83		0	4	0	0	5	6	4	0	0	0	11	9	11	11	11	11	200-900
10-TriGTG3'RC	66	66		3	0	7	5	0	7	5	3	6	4	2	6	5	1	6	6	100-900
11-TriTGT	35	35		0	0	0	0	0	0	4	0	0	4	5	5	3	4	5	5	200-1500
12-TriAAC3'RC	67	67		0	0	5	0	0	0	6	3	1	0	11	3	8	8	11	11	200-1000
13-TriACA3'RC	50	50		0	0	1	0	0	0	0	0	0	6	6	8	10	5	7	7	200-1500
14-TriACT3'RC	12	12		5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	300-1000
15-TriACG3'RC	62	62		0	0	6	0	0	3	0	0	0	1	9	9	9	7	9	9	200-1000
16-TriTCG3'RC	28	28		0	0	0	0	3	0	0	0	0	5	4	4	4	0	4	4	400-1000
17-DiGA5'CR	68	68		0	5	0	0	1	5	6	1	0	0	7	7	8	10	10	8	200-1000
18-TriAGT3'RC	5	5		0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	700
19-TriGTA3'RC	9	9		0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	7	0	0	300-1500
20-TriGCA3'RC	16	16		0	2	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	9	0	0	400-1000
21-DiCA	15	15		4	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	0	0	6	0	0	300-2080
22-DiCA3'RG	34	34		1	0	0	0	0	0	1	0	5	0	5	4	5	5	4	4	200-2080
23-DiCA3'YG	14	14		0	0	0	0	0	0	5	0	3	0	3	3	0	0	0	0	300-2080
24-DiCA5'CY	86	86		3	0	0	3	1	0	6	0	5	2	11	11	11	11	11	11	100-2080
25-DiCA5'G	58	58		5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	8	8	8	8	300-1500
Total	1066			28	55	32	18	48	51	58	23	37	24	113	107	110	135	114	113	
P(%)				2,6	5,2	3	1,6	4,5	4,8	5,5	2,2	3,5	2,3	10,6	10	10,3	12,6	10,7	10,6	
Média	42,64	42,64	100	1,12	2,2	1,3	0,72	1,92	2,04	2,32	0,9	1,48	0,96	4,52	4,28	4,4	5,4	4,56	4,52	

R = A+G; Y = C+T; A10 = ACO 10; A18 = ACO 18; A31 = ACO 31; A34 = ACO 34; CT = Camta; CP = Coopama; IP = Iapar 01; LG = Ligia; NR = Nrusa; SY = SMMY; CB= Cabocla; CR = Costa Rica; ST = Sertaneja; FB = Flor Branca; RB = Rubra e OK = Okinawa



**Figura 3** – Dendrograma representativo da similaridade genética entre 16 acessos de *Malpighia emarginata*, do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido, obtido pelo método UPGMA, utilizando o complemento aritmétrico do índice de Jaccard como medida de similaridade, com base em marcadores ISSR. Correlação cofenética ( $r \geq 0,98$ ).

\* IAPAR = IAPAR 01; SMY = SMMY; C. RICA = COSTA RICA E FLORB = FLOR BRANCA.

A partir do polimorfismo identificado foi possível determinar a estimativa da dissimilaridade genética e a formação de grupos entre os acessos avaliados. As distâncias genéticas entre os 16 acessos variaram entre 0,420 e 0,976. A menor distância genética (0,420) foi obtida entre as cultivares Rubra e Okinawa. A maior distância genética (0,976) foi observada entre os acessos Aco 10 e SMMY (Figura 3).

Oliveira *et al.* (2009) estimaram a diversidade genética de 48 acessos de *Malpighia* de uma população de acerolas produzidas em São Paulo e semeadas no Rio de Janeiro, através de marcadores do tipo RAPD e características morfoagronômicas, constataram similaridade genética com valores de 0,180 a 0,588 pelo coeficiente de Jaccard formando 13 grupos diferentes. Lima *et al.* (2015), utilizando marcadores moleculares microsátélites em 56 clones de aceroleira, sendo 38 provenientes do jardim de sementes e 18 do jardim clonal observaram valores de similaridade variando entre 0,358 a 0,766, formado por 28 grupos. As cultivares Flor branca, Okinawa e Camta avaliadas em ambos também ficaram em grupos distintos, indicando elevada variabilidade dos materiais utilizados.

Na Figura 3 observa-se uma grande distribuição dos acessos em grupos distintos, indicando uma ampla diversidade entre os acessos avaliados. Porém, o grupo que apresentou menor distância genética é composto por cinco cultivares que estão entre as mais plantadas no Submédio São Francisco, sendo elas Costa Rica, Sertaneja, Okinawa, Rubra e Cabocla, fazendo-se necessário a ampliação da variabilidade genética dos materiais. Os demais grupos foram compostos por apenas uma cultivar. De acordo com Vieira *et al.* (2008) os grupos que possuem apenas um indivíduo são naturalmente os mais divergentes. Para obter acessos superiores é preciso aliar o bom desempenho fenotípico com a divergência genética dos genitores (FONSECA *et al.*, 2006).

Provavelmente, esse resultado é atribuído à característica predominantemente alogamia da aceroleira, associada ao intenso processo de propagação por sementes, ocorrido no início da expansão dos cultivos da espécie no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Lopes *et al.* (2012), sugerem que essa elevada variabilidade na aceroleira seja um indicativo de taxa de cruzamento, confirmando a predominância da fecundação cruzada na cultura.

Outro fator que pode explicar essa alta variabilidade é que os acessos do BAG de aceroleira da Embrapa Semiárido foram introduzidos por meio de

mudas propagadas vegetativamente (enxerto ou estaca) e outros por mudas propagadas por semente. Apesar de se obter maior variabilidade genética quando se tem introdução por via sexual (semente), é importante, também, a introdução através de mudas propagadas vegetativamente, a fim de possibilitar ganho de tempo no programa, uma vez que oportuniza a introdução de genótipos com características agrônômicas ou comerciais desejáveis (GONZAGA NETO, 1999). Os resultados obtidos com a caracterização molecular poderão ser utilizados em programas de melhoramento genético visando propiciar o desenvolvimento de novas cultivares. Nesse caso, os marcadores obtidos poderão ser úteis na seleção de genitores para cruzamentos que visem a transferência de características fenotípicas entre os acessos mais divergentes, sendo necessário análises morfológicas para que seja verificadas características qualitativas.

Alguns acessos que foram caracterizados no presente trabalho apresentaram características de alto desempenho agrônômico. Carpentieri-Pípolo *et al.* (2002) avaliando precocidade, produtividade, conteúdo de vitamina C nos frutos, tolerância a pragas e doenças, tamanho e aparência dos frutos em três acessos destacaram o acesso Lígia pela precocidade e produtividade que possui. Costa *et al.* (2011) avaliando as propriedades físico-químicas de frutos in natura de cinco cultivares de aceroleira Flor Branca, Costa Rica, Okinawa, Junco e Sertaneja cedidos pela Niagro - Nichirei do Brasil Agrícola Ltda, afirmam que dentre esses acessos, Okinawa e Junco possuem maior peso, altos teores de sólidos solúveis, alto valor de vitamina C e alta resistência à compressão. Andrade Neto *et al.* (2017) caracterizando atributos físicos e a composição química da polpa dos frutos maduros dos acessos Monami, Mineira, ACO 14, CARP 05, BRS Cabocla, Lígia, UEL 03 e BRS Sertaneja do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Semiárido concluem que os acessos ACO 14 e BRS Cabocla se diferenciaram pelo maior número de características de frutos alinhadas aos requerimentos do mercado para consumo in natura, particularmente maiores massa e diâmetro, bem como baixa acidez titulável, além de teores de sólidos solúveis superiores a 8 °Brix.

## Caracterização citogenética

### Mitose

Para os acessos Cabloca, Costa Rica, Flor Branca e Sertaneja foram observados  $2n=20$  cromossomos, enquanto que para a Rubra observou-se  $2n=30$ . Esse é o primeiro registro de um acesso triploide em aceroleira. A poliploidia refere-se ao número de cromossomos presentes na célula, que podem ser classificadas com base nas origens e níveis de ploidia, células poliploides podem surgir pela duplicação de células ou pela fusão de gametas citologicamente não reduzidos, na maioria das vezes ocorre entre células diplóides nos tecidos vegetativos das plantas (CHEN, 2010; CHEN *et al.*, 2006; DE WET, 1971). De acordo com Tamayo-Ordones (2016), as adaptações fisiológicas e morfológicas da ploidia, podem conferir uma maior resistência a stresses bióticos e abióticos em comparação com os seus diploides antepassados, assim como reduzir perdas econômicas e produzir frutos maiores.

Os tamanhos dos cromossomos variaram entre 2,68 a 3,21  $\mu\text{m}$ . Os menores valores de medidas cromossômicas foram observados para o acesso Costa Rica com comprimento cromossômico médio de 2,68  $\mu\text{m}$  e comprimento do lote haploide de 53,6  $\mu\text{m}$ . Por outro lado, o acesso Rubra apresentou o maior valor para comprimento cromossômico médio (3,21  $\mu\text{m}$ ) e de comprimento do lote haploide (96,3  $\mu\text{m}$ ) (Tabela 5). Tais diferenças podem estar relacionadas a alguns fatores, a exemplo dos níveis de condensação das células, divergências entre os materiais analisados e/ou, possíveis alterações estruturais intraespecíficas.

Valores morfométricos dos cromossomos semelhantes aos do presente trabalho têm sido relatados para a espécie como sinonímia de *Malpighia glabra* L. ou *M. puniceifolia*, e para outras espécies do gênero. Lombello (2000), por exemplo, estudou 23 espécies de 12 gêneros de Malpighiaceae brasileiras, onde a maioria das espécies mostrou cromossomos relativamente pequenos, com comprimentos entre 1,1 e 3,9  $\mu\text{m}$ . Mondin *et al.* (2010), caracterizando cariotipicamente *M. emarginata*, encontraram  $2n=20$  cromossomos com tamanhos variando entre 1,71 a 2,56  $\mu\text{m}$  e conjunto haploide com 21,05  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 5.** Número de cromossomos (NC), Comprimento Médio dos Cromossomos (C); Comprimento do lote haploide (LHC); Número de cromossomos portadores de bandas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (RH) em cinco acessos de *Malpighia emarginata* cultivados no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.

ACESSOS	NC (2n)	C (µm)	LHC (µm)	RH (2n)
Cabocla	20	2,89 ± 0,33	57,8	4
Costa Rica	20	2,68 ± 0,3	53,6	4
Flor Branca	20	2,92 ± 0,29	58,4	4
BRS Sertaneja	20	2,78 ± 0,31	55,6	4
Rubra	30	3,21 ± 0,41	96,3	6

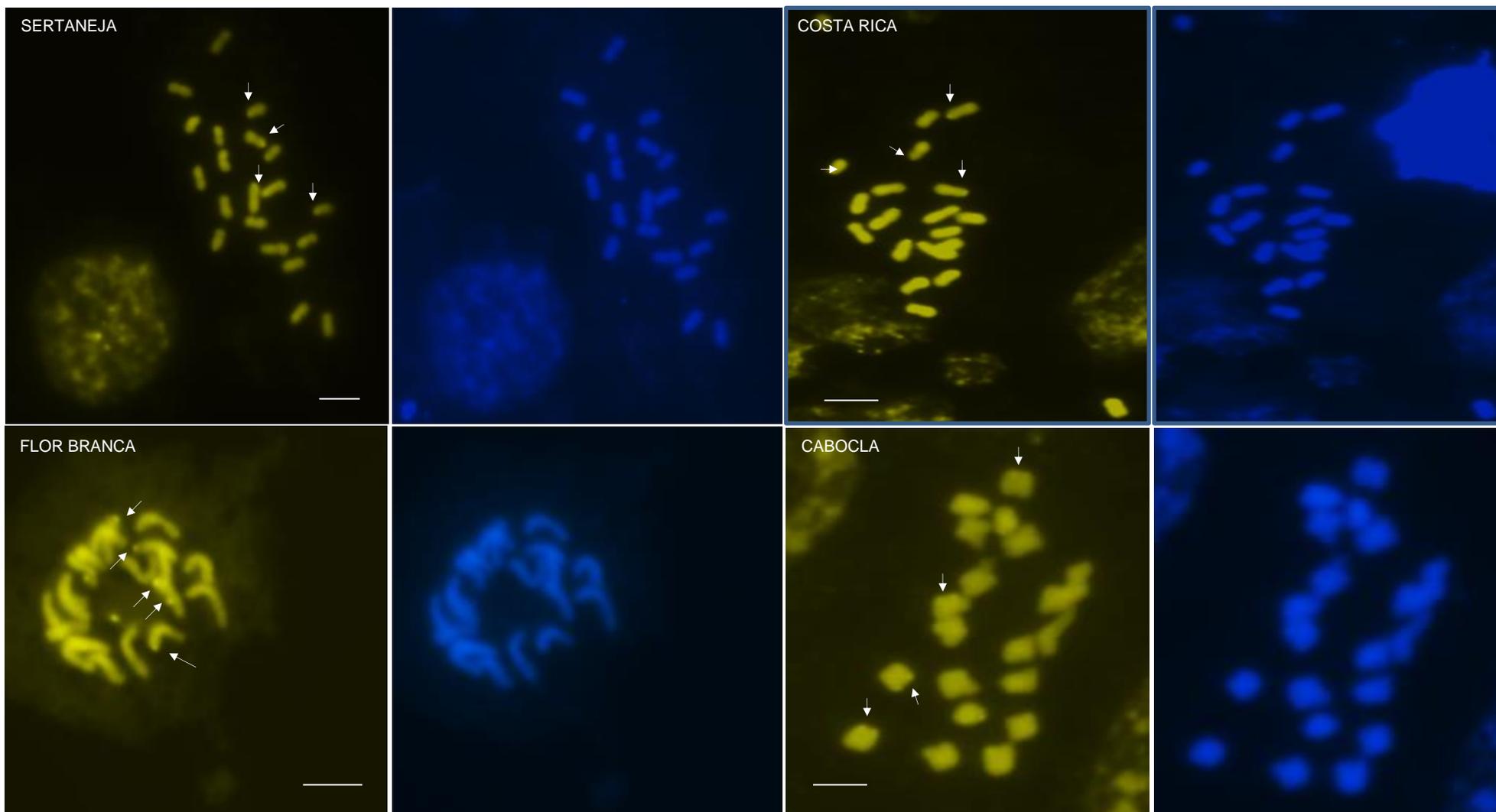
Por outro lado, não há relatos sobre análises da heterocromatina em aceroleira, sendo essa a primeira vez que o estudo é realizado. Na maioria dos acessos à dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI permitiu visualizar quatro blocos CMA<sup>+</sup> nas regiões terminais dos cromossomos, possivelmente relacionados à região organizadora dos nucléolos (RONs). Na cultivar ‘Rubra’ foi encontrado seis bandas de CMA<sup>+</sup> (Figura 4). Sousa *et al.* (2010) descrevendo os padrões heterocromáticos em *Heteropterys*, gênero que pertence a família Malpighiaceae, observaram apenas dois blocos CMA<sup>+</sup> em regiões subterminais dos cromossomos.

Os pequenos blocos mais brilhantes com coloração CMA confirmam a existência de uma pequena porção de cromatina com coloração diferencial rica em pares de base GC (Figura 4). A constância no padrão de condensação sugere que a maioria dos acessos de *Malpighia* compartilham um cariótipo comum e estável. Entretanto, as diferenças do número de blocos CMA<sup>+</sup> e do número de cromossomos (triploidia) sugere divergência entre os acessos avaliados.

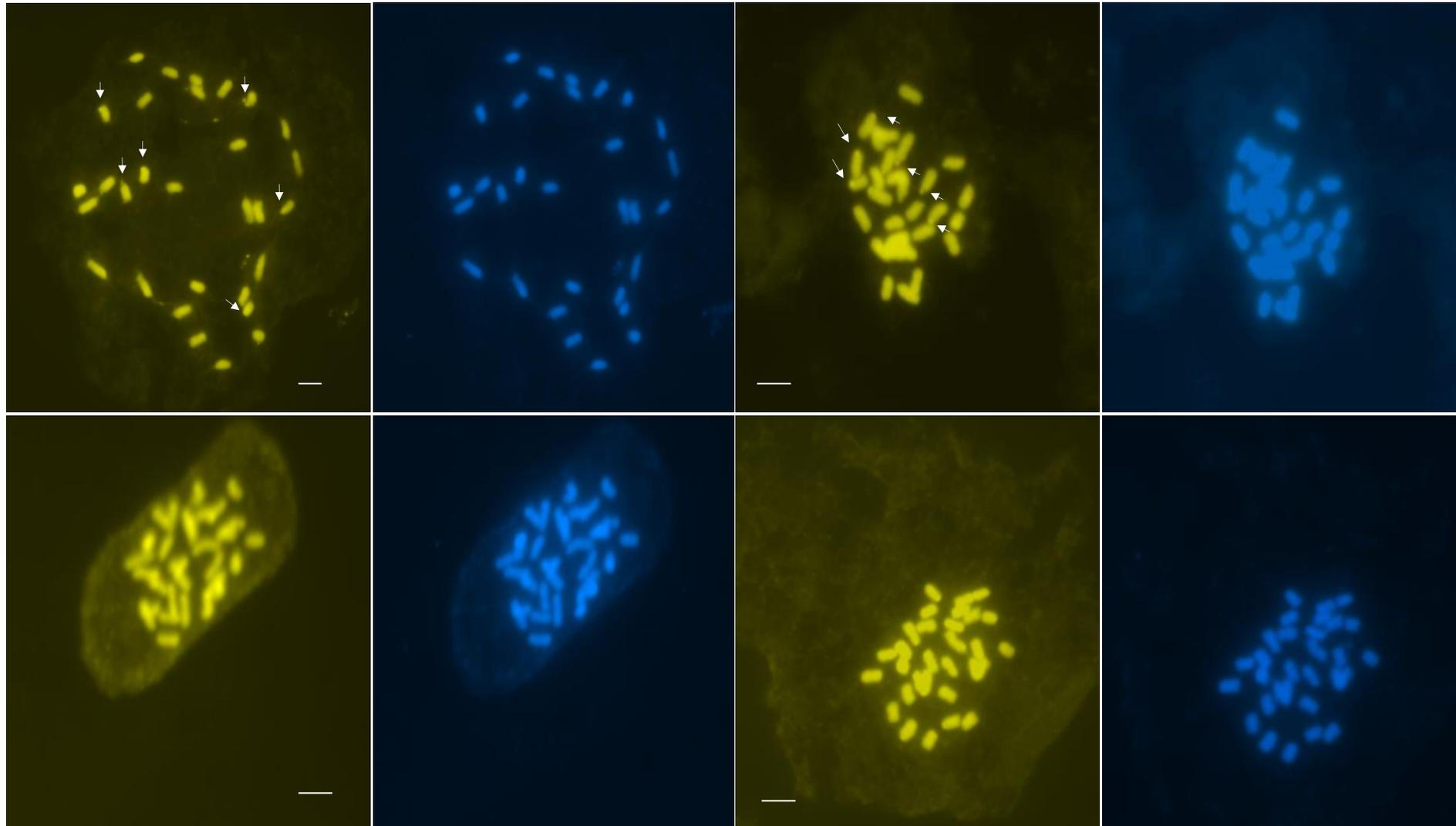
Padrões, localização e distribuição de heterocromatina são bastante variáveis em vegetais, podendo haver para uma mesma espécie polimorfismo para número e tamanho de bandas, sendo, mais frequente ocorrências de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (GUERRA, 2000).

No presente estudo, os acessos analisados foram provenientes de diferentes localidades e provavelmente estejam sujeitos a diferentes processos evolutivos, resultando no acúmulo de pequenas diferenças estruturais nos cromossomos. Nesse caso, o heteromorfismo no número de bandas observado com os fluorocromos poderá ser utilizado como marcadores citológicos na identificação e comparação de diferentes acessos. Entretanto, essas

observações são muito iniciais e outras técnicas, como a FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) e a imunocoloração de proteínas, deverão ser utilizadas para uma compreensão mais segura dos principais eventos citológicos ocorrentes nos acessos de aceroleira.



**Figura 3.** Coloração CMA e DAPI em metáfases mitóticas com  $2n=20$  em acessos de aceroleira com  $2n=20$ . Setas indicam regiões de cromatina mais brilhantes com coloração CMA. Barras equivalem a  $5\ \mu\text{m}$ .



**Figura 4.** Coloração CMA e DAPI em metáfases mitóticas com  $2n=30$  para a cultivar 'Rubra'. Setas indicam regiões de cromatina mais brilhantes com coloração CMA. Barras equivalem a 5  $\mu\text{m}$ .

## Viabilidade polínica e análise Meiótica

Os resultados obtidos para a estimativa de viabilidade dos grãos de pólen e seus respectivos diâmetros médios (Tabela 6). As cultivares 'Cabocla', 'Costa Rica' e 'Flor Branca' apresentaram um potencial de viabilidade polínica alto, destacando-se a cultivar 'Cabocla' com maior valor (95,9%) entre as cultivares. A coloração mais intensa e o maior diâmetro indicam grãos de pólen viáveis, enquanto que coloração clara e menor diâmetro estão relacionados a grãos de pólen inviáveis. As medições foram feitas em micrômetros (Figura 7).

A cultivar 'Sertaneja' apresentou viabilidade considerada média, com valor de 78%. Valores semelhantes também foram obtidos por Siqueira *et al.* (2011), estudando a viabilidade polínica e eficiência de polinização de três acessos de aceroleiras cultivadas no município de Petrolina-PE, onde a cultivar Sertaneja apresentou 83%, Flor Branca 92% e Okinawa 14,6%, e por Carneiro Neto (2017) testando a viabilidade polínica das cultivares BRS Sertaneja e Junko em diferentes horários e áreas, observaram uma redução ao longo da manhã diferindo de 90,7% as 6 h para 74,4% as 12 h na área 1, porém, na área 2 não houve diferença estatística entre os tratamentos.

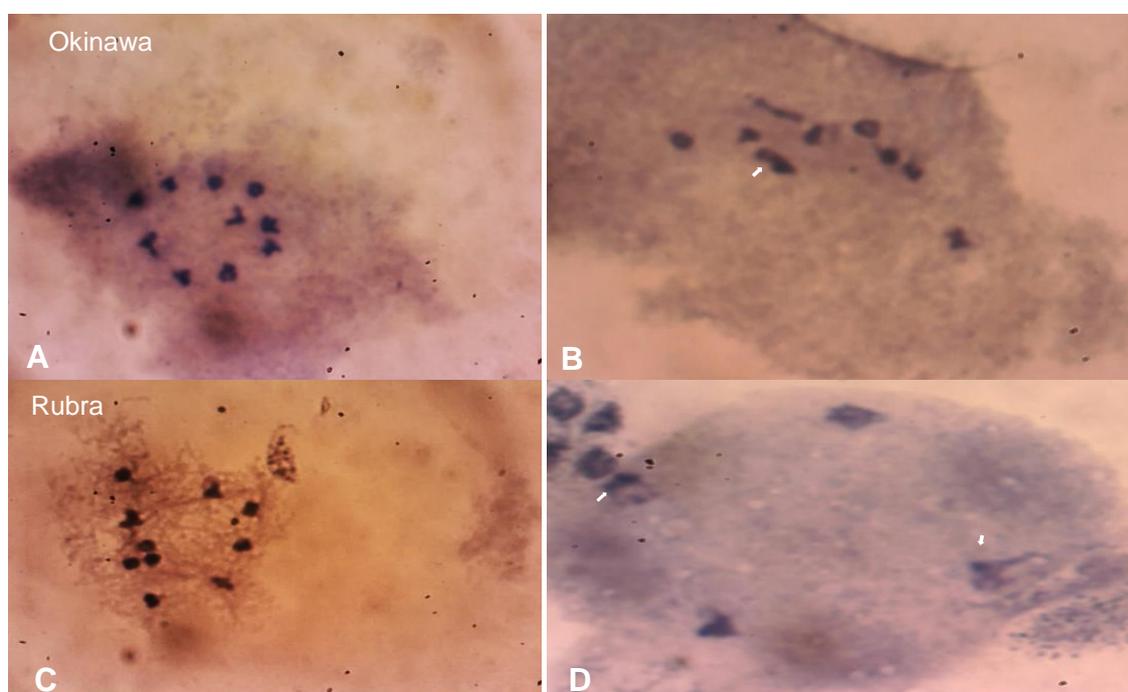
Os acessos 'Rubra' e 'Okinawa' que obtiveram valores médios de viabilidade polínica de 20,6% e 5,5%, respectivamente, apresentaram possíveis quadrivalentes (Figura 5B) e cromossomos retardatários em telófase II (Figura 5D), por outro lado em algumas células, foi observado comportamento meiótico regular, sendo notada a presença de dez bivalentes em diplóteno e/ou diacinese (Figuras A e C). Estudos da meiose e da viabilidade do pólen também foram realizados por BARBOSA *et al.* (2006), com os híbridos entre *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *P. cincinnata*, revelando uma meiose normal e uma alta estabilidade, a maioria das células híbridas apresentaram 18 bivalentes. Contudo, algumas instabilidades, também foram encontradas, tais como um quadrivalente resultante de uma translocação entre os progenitores, presença de retardatários e formação de micronúcleos. Devido às poucas anormalidades encontradas, os valores de viabilidade do pólen foram >70% tanto nos parentais diplóides como nas plantas híbridas.

Com relação ao diâmetro dos grãos de pólen e considerando-se o desvio padrão, observa-se que não houve diferença de tamanho entre as

cultivares, cujos valores variaram de 31,5 a 38  $\mu\text{m}$  para os viáveis, e de 23,5 a 30  $\mu\text{m}$  no caso dos inviáveis (Tabela 6).

**Tabela 6.** Percentual de viabilidade polínica e diâmetro médio de grãos de pólen de seis cultivares de aceroleira cultivadas no Submédio do São Francisco.

Cultivares	Grãos de pólen viáveis (%)	Grãos de pólen inviáveis (%)	Grãos de pólen viáveis (Diâmetro $\pm$ DP $\mu\text{m}$ )	Grãos de pólen inviáveis (Diâmetro $\pm$ DP $\mu\text{m}$ )
Cabocla	95,9	4,1	35,55 $\pm$ 2,23	23,53 $\pm$ 3,76
Costa Rica	93,1	6,9	37,18 $\pm$ 3,09	28,04 $\pm$ 2,52
Flor Branca	89,1	10,9	36,95 $\pm$ 3,34	28,06 $\pm$ 1,90
Okinawa	5,5	94,5	31,51 $\pm$ 6,13	27,38 $\pm$ 3,05
Rubra	20,6	79,4	37,30 $\pm$ 4,64	30,28 $\pm$ 2,46
Sertaneja	78,0	22,0	38,09 $\pm$ 3,13	27,94 $\pm$ 3,28

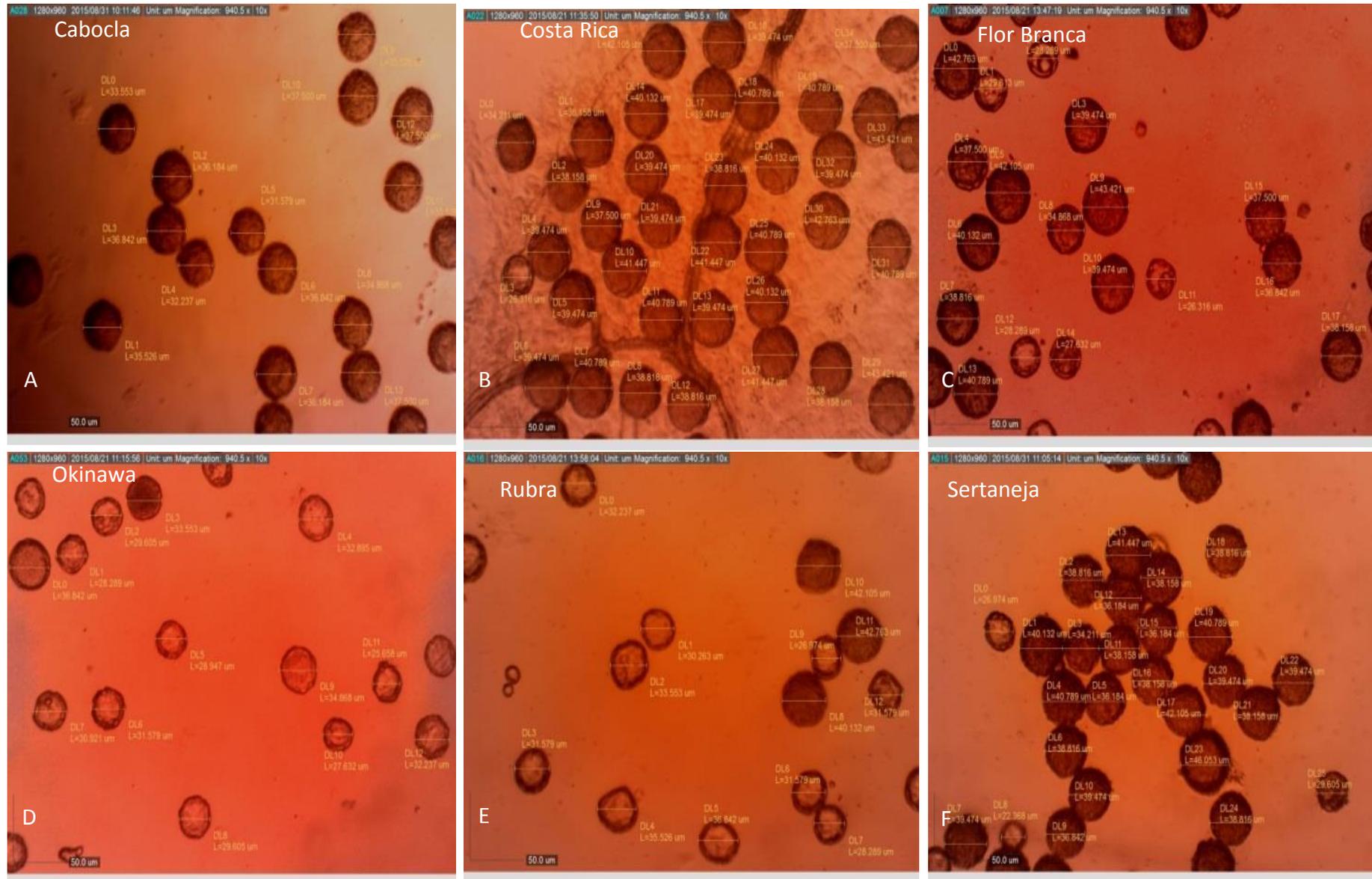


**Figura 5.** cromossomos meióticos, corados com Giemsa, em dois acessos de aceroleira. setas indicam possível quadrivalente (B) e cromossomos retardatários (D)

Na Figura 6 observamos os tamanhos médios do endocarpo e das sementes dos materiais estudados. Nesse caso, verifica-se que os acessos que apresentaram viabilidade polínica alta possuem sementes maiores, enquanto cultivares com viabilidade polínica baixa possuem sementes menores (como Okinawa e Rubra). No entanto, este fato não ocorre em relação ao tamanho do endocarpo. Há relatos que tanto o endocarpo quanto as sementes de aceroleira apresentam tamanhos variados assim como baixa germinação, sendo comum a ocorrência de sementes inviáveis, como também a ausência de sementes nos endocarpos (COSTA *et al.*, 2003). De acordo com Paiva *et al.* (1999) a falta de embrião está associada a possíveis problemas de incompatibilidade, agravada quando a planta se autofecunda e minimizada quando ocorre cruzamento entre variedades diferentes.



**Figura 6.** Comparação do endocarpo e das sementes de seis cultivares de aceroleira.



**Figura 7.** Viabilidade polínica em acessos de aceroleira. Grãos de pólen corados com carmim acético.

## 6. CONCLUSÕES

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

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

A cultivar 'Rubra' apresentou um número de cromossomos ainda desconhecido pela literatura podendo ser recomendado para futuros cruzamentos visando uma cultivar poliplóide.

## 7. REFERÊNCIAS

- ANDRADE NETO, E. R.; BONFIM, W. M. D.; SOUSA, R. F. de.; SOUZA, F. de T., LIMA, M. A. C. **Características Físicas e Composição Química de Frutos de Acessos de Aceroleira em Condições Semiáridas**. Anais... Petrolina, PE: XII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido, 2017.
- ARIEIRA, C. R.; FURLANETTO, C.; SANTANA S. DE M.; OLIVEIRA B. D. A.; FERREIRA R. R. G.; FORMENTINI, H. M. **Fitonematoides associados a frutíferas na região noroeste do Paraná, Brasil**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal v. 4, 293 p.1064-1071, 2010.
- AROSTEGUI, F.; ASENJO, C. F.; MUÑIZ, A. I.; ALEMAÑY, L. **Studies on the West Indian Cherry, *Malpighia puniceifolia* L.; observations on a promising selection**. Horticultural Society, Florida, v.67, p.250-255, 1955.
- ASSIS, S. A.; LIMA, D. C.; OLIVEIRA, O. M. M. F. **Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development**. Food Chemistry, Araraguara, v.74, p.133-137, 2001.
- BAÉZ, P., RIVEROS, M. & LEHNEBACH, C. **Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in south Chile**. New Zealand Journal of Botany. 40:671- 678. 2002.
- BAGULEY, B. C. **Nonintercalative DNA-Binding Antitumor Compounds**. Molecular and Cellular Biochemistry. 43: 167-181. 1982.
- BARBOSA, L.V.; MONDIN, M.; OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. P.; VIEIRA, M. L. C. *et al.* **Cytological behavior of the somatic hybrids *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*+*P.cincinnata***. Plant Breeding, Berlini, p.1-6, 2006.
- BARROS, N. E. F.; OLIVEIRA, E. M. M.; MARIN, V. A. **Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos**. Revista de Nutrição. Campinas, 21(1):85-92, 2008.
- BIONDO, E.; BATTISTIN, A. **Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) G.Don e *Rhynchosia* Lour (Leguminosae – Faboideae), nativas na Região Sul do Brasil**. Bioikos, v.15, n.1, p.39-44, 2001.
- BOSCO, J.; BARRETO NETO, M. B.; AGUIAR FILHO, S. P. de; MELO, A. S. de; BAROS, R. V.; MAIA NETO, J. S.; SILVA, J. E. da; NASCIMENTO, R. G. Pesquisa e extensão com acerola na Paraíba. In: SÃO JOSÉ, A. R.; ALVES, R. E. (Ed.). **Acerola no Brasil: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1995. p. 124-129.

BUENO, P. R. R.; GUERREIRO, J. C.; BRASS, F. E. B.; CERVIGNI, G. **Primeiro relato de ocorrência do nematóide *Meloidogyne mayaguensis* em acerola, na região de Garça SP.** Revista Científica Eletônica de Agronomia, Graça, v.12, n.12, dez. 2007. Disponível em: Acesso em: 12 mar. 2018.

CALGARO, M.; BRAGA, M. B. **A Cultura da acerola.** 3. ed. Revista e ampliada. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 144 p.

CARNEIRO NETO, T. F.; SANTOS, M. V. L.; SILVA, R. C. S.; KIILL, L. H. P. **Viabilidade Polínica e Receptividade Estigmática de Duas Variedades de Aceroleira.** Anais... Petrolina, PE: XII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido, 2017.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V., CASSIO EGÍDIO CAVENAGHI PRETE, C. E. C., GONZALEZ, M. G. N., POPPER, I. O. **Novas cultivares de acerola (*Malpighia emarginata* DC): UEL 3 – DOMINGA, UEL 4 – LÍGIA E UEL 5 – NATÁLIA.** Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal - SP, v. 24, n. 1, p. 124-126, abril 2002.

CASTELLANO, G.; QUIJADA, O.; JIMÉNEZ, N.; CROZZOLI, R.; HERNÁNDEZ, V.; MARIN, R.C. **Reacción de cultivares de cerecita (*Malpighia glabra*) a *Meloidogyne enterolobii* (nematoda: *Meloidogynidae*).** Fitopatologia Venezuelana, Aragua. v.24, 302 n.1, p. 25-27, 2011.

CASTRO, J. M. C. ; SANTANA, M. L. M. P. DE; BARBOSA, N. M. L. **Nematoides das galhas (*Meloidogyne spp.*) em Aceroleira e recomendações de manejo.** Instruções técnicas da Embrapa Semi-árido on line, Petrolina, n. 87, 2009. Disponível em: <  
[http://www.cpatia.embrapa.br:8080/public\\_eletronica/downloads/INT87.pdf](http://www.cpatia.embrapa.br:8080/public_eletronica/downloads/INT87.pdf)>  
Acessado em: 6 janeiro 2013.

CAVALCANTE, T. B. Coleta de germoplasma vegetal, atualização e o impacto de novas tecnologias. In: VEIGA, R. F. de A.; QUEIRÓZ, M. A. de. (Org.). **Recursos fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil.** 631ed. Viçosa: UFV, 2015, v., p. 77-85.

CAVICHIOLO, J. M.; GARCIA, M. J. M.; BRIDA, A. L.; WILCKEN, S. R. S.; **Reação de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.).** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, vol.36 n.1, p.156-160, 2014.

CHEN, L. P.; WANG, Y. J.; ZHAO M. **In vitro induction and characterization of tetraploid *Lychnis senno* Siebold et Zucc.** HortScience 41:759–761. (2006).

CHEN, Z. **Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor.** Trends Plant Science 15:57–71, 2010.

COSTA, A. C. S., LIMA, M.A.C. & ALVES, R.E. 2011. **Caracterização físico-química de acerola e dos resíduos do processamento em dois estádios de maturação.** Embrapa Semiárido Artigo em anais de congresso. Simpósio brasileiro de pós-colheita de frutas, hortaliças e flores, 2011, Nova Friburgo. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria Tropical.

COSTA, L. C., PAVANI, M. C. M. D., MORO, F. V., PERECIN, D. **Viabilidade de sementes de acerola (*Malpighia emarginata* DC.):** avaliação da vitalidade dos tecidos. Revista Brasileira de Fruticultura 25: 532-534. 2003.

CRUZ, C. D. **Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics.** Acta Scientiarum. Agronomy Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, July-Sept., 2013

DAFNI, A. 1992. **Pollination ecology:** a practical approach (the practical approach series). New York, Oxford: University press. 1992. 250p.

DANTAS, A.C.A.; NUNES, G.H.S.; ARAÚJO, S.I.; ALBUQUERQUE, L.B.; **Caracterização molecular de acessos de melão coletados no Nordeste brasileiro.** Revista Brasileira de Fruticultura, 34: 183-189. 2012.

DE WET, J.M.J. **Polyploidy and evolution in plants.** Taxon, v.20, n.1, p.29-35, 1971.

DOMINGUES, E.T., NETO, A.T. & SOBRINHO, J.T. 1999. **Viabilidade do pólen em variedades de laranja doce.** Scientia Agricola 56:265-272.

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

EDELMAN J. R.; LIN Y. J. **Repetitive DNA heterochromatin:** can it be the “driving force” of evolution and speciation? Cytobios 83: 117–127. 1995.

ELOI, I. B. B. **Marcadores microssatélites para a análise da variabilidade genética e da estrutura de populações de milho pipoca (*Zea Mays* L.)** 2010. 76f. (Dissertação de Mestrado)- Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. 2010.

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

FEDOROV, A. A. (ed). **Chromosome numbers of flowering plants.** Academy of Sciences of USSR. Leningrad. 1969.

FEITOZA, L. L.; MARTINS, M. I. G.; CASTRO, A.; FELIX, L.P.; CARVALHO, R. **Cytogenetics of Alismataceae and Limnocharitaceae: CMA/ DAPI banding and 45S rDNA sites.** Plant Syst Evol 286: 199–208. 2010.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A.R.; INOMOTO, M. M. **Hospedabilidade da acerola em relação a sete espécies de nematoides.** Nematologia Brasileira, Piracicaba, v.13, p.39-49, 1989.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 220p. 1998.

FONSECA, A. F. A., SEDIYAMA, T., CRUZ, C. D., NEY SUSSUMU SAKAIYAMA, N. S., FERRÃO, M. A. G., FERRÃO, R. G., BRAGANÇA, S. M. **Genetic divergence in conilon coffee.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 41, n. 4, p. 599-605, abr. 2006.

FRANCO, A. E. DA; PONTE, J. J. Acerola, *Malpighia glabra* L. Um novo hospedeiro de nematoides das galhas. Nematologia Brasileira, Brasília, v. 13, p.181-183, 1989.

FRANZON, R.C.; CASTRO, C.M.; RASEIRA, M. C. B. **Variabilidade genética em populações de pitangueira oriundas de autopolinização e polinização livre, acessada por AFLP.** Revista Brasileira Fruticultura 32: 240-250. 2010.

GOMES, J. E.; PERECIN, D.; MARTINS, A. B. G.; IGNÁCIO, N. **Enraizamento de estacas herbáceas de genótipos de acerola em câmara de nebulização intermitente tratadas com ácido indolbutírico em duas épocas.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 407-412, 2000.

GOMES FILHO, A., OLIVEIRA, J. G., VIANA, A. O., SIQUEIRA, A. P. O., OLIVEIRA, M. G., PEREIRA, M. G. **Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.).** Acta Scientiarum. Agronomy Maringá, v. 32, n. 4, p. 627-633, 2010

GONZAGA NETO, L. **Melhoramento genético da aceroleira na Embrapa Semi-Arido.** In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. **Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers.** Euphytica 122: 81-89. 2001.

GUERRA, M. **Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining.** Heredity 71: 234–241. 1993.

\_\_\_\_\_, (1983) **O uso de Giemsa na citogenética vegetal** – comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura* 35: 190-193.

GUERRA, M dos S.; SOUZA, M. J. **Como Observar os Cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal. Animal e Humana.** FUNPEC. São Paulo. pp.23-38. 2002.

\_\_\_\_\_. **Chromosome number variation and evolution in monocots.** In: *Monocots II: Systematics and Evolution* (WILSON, K.L. AND MORRISON, D.A.; eds.). CSIRO Publ., Melbourne, pp. 127-136. 2000.

\_\_\_\_\_. **Introdução à Citogenética Geral.** Ed. Guanabara Koogan. 1988. 142 p.

HOLANDA, Y. C. A. DA; PONTE, J. J.; SILVEIRA, F. J. **Disease of the Barbados cherry plant (*Malpighia glabra*) in the State of Ceara, Brazil.** *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 22, p.453, 1997

HORNER, H. T.; PALMER, R. G. **Mechanisms of genetic male sterility.** *Crop Science*, Madison, v. 35, n. 6, p. 1527-1535, 1995.

INTERNATON BOARD OF PLANT GENETIC RESOURCES. *Malpighia emarginata* (acerola). In: \_\_\_\_\_. **Genetic resources of tropical and subtropical fruits and nuts: excluding musa.** Rome, 1986. P.52-54.

JACKSON, J.C.; PENNOCK, W. **Fruit and vitamin C production of five and six years old acerola trees.** *Journal of Agricultural University of Puerto Rico*, v.42, p.196-199, 1958.

JUNQUEIRA, K. P. **Cultura da Aceroleira (*Malpighia glabra* L.).** Universidade Federal de Lavras: Lavras, 1996. 31p

JUNQUEIRA, K. P.; PIO, R.; VALE, M. R.; RAMOS, J. D. **Cultura da Aceroleira.** Universidade Federal de Lavras: Lavras, 2002 (Boletim de Extensão).

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologist.** University of Colorado, Niwot. 1993.

KONRAD, M. **Efeitos de sistemas de irrigação localizada sobre a produção e qualidade da acerola (*Malpighia* spp) na região da Nova Alta Paulista.** Universidade Estadual “Júlio Mesquita Filho” 2002. 119f. (Dissertação de Mestrado).

LIMA, C. S. M.; RUFATO, A. R.; FACHINELLO, J. C.; ANDRADE, S. B; GAUTÉRIO, G. R. **Caracterização dos aspectos florais de cultivares de pereira (*Pyrus* sp.) e marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill).** *Revista Inova Ciência & Tecnologia*, Uberaba, n. 3, p. 20-27, 2016.

LIMA, E. N.; ARAUJO, M. E. B.; BERTINI, C. H. C. M.; MOURA, C. F. H.; HAWERROTH, M. C. **Diversidade genética de clones de aceroleira avaliada**

**por meio de marcadores moleculares ISSR.** *Comunicata Scientiae*. v.6, n.2, p.174-180. 2015.

LIMA, J. S.; ROCHA, V. D.; TIAGO, A. V.; SANTOS, T. A.; ROSSI, A. A. B. **influência do horário de coleta sobre a viabilidade de grãos de pólen em acerola (*Malpighia emarginata* DC.).** enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.21; p. 3216. 2015.

LIMA, V.L.A. G.; MELO, E. A.; MACIEL, M.L.S.; LIMA, D.E.S. **Avaliação de teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 1, p. 101-103, 2003.

LOMBELLO, R. A. **Estudos cromossômicos em Malpighiaceae A. Jussieu.** 2000. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

\_\_\_\_\_.; FORNI-MARTINS, E.R. **Malpighiaceae: correlations between habit, fruit type and basic chromosome number.** *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, v.17, n.2, p.171-178, 2003.

LOPES, R.; BRUCKNER, C.H.; FINGER, F.L.; LOPES, M.T.G. **Avaliação de características do fruto de acessos de aceroleira.** *Revista Ceres*, Viçosa, v.47, n.274, p.627-638, 2000.

LOPES, R.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, M.T.G. **Estimação da taxa de cruzamento da aceroleira com base em dados isoenzimáticos.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.37, n.3, p.321-327, 2002.

\_\_\_\_\_.; PAIVA, J. R. **Aceroleira.** In: BRUCKNER, C. H. (Org.). **Melhoramento de fruteiras tropicais.** Viçosa, v.1, p.63-99, 2002.

MACHADO, C. de F., JESUS, F. N de., PASSOS, A. O., NEVES, L. Q. S., SILVA, J. de S., RITZINGER, R. **Caracterização de acessos de aceroleira com base em descritores do fruto.** XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Bento Gonçalves, 2012.

MARTINS, L. A. R; LAVIOLA, B. G.; PRAÇA-FONTES, M. M. **Viabilidade polínica de *Jatropha curcas* L.:** uma comparação metodológica. In: Congresso Brasileiro de Mamona, 5; Simpósio Internacional de Oleaginosas energéticas 2. Fórum Capixaba de Pinhão Manso, 1. 2012, Guarapari. Desafios e oportunidades: Anais... Campina Grande: Embrapa Algodão, 2012.

MOJEMA R. **Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation.** *The Computer Journal* 20: 359-363. 1977.

MONDIN, M.; OLIVEIRA, C. A.; VIEIRA, M. L. C. **Karyotype characterization of *Malpighia emarginata* (Malpighiaceae).** *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 2, p. 369-374, Junho 2010.

MORAES FILHO, R. M. **Marcadores moleculares no estudo de diversidade de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) e do gênero *Citrus***. Dissertação (Mestrado em agronomia). Recife- PE. 2010.

MULLIS, K.; FALOONA, F. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction**. *Methods in Enzymology*, v.55, p.335-350, 1987.

MULUGETA, D.; MAXWELL, B.D.; FAY, P.K. & DYER, W.E. ***Kochia (Kochia scoparia) pollen dispersion, viability and germination***. *Weed Science* 42:548-552. 1994.

NAKASONE, N.Y.; YAMANTE, G.M.; MIYASHITA, R.K. **Selection, evaluation and naming of acerola (*Malpighia glabra* L.) cultivars**. Hawaii Agricultural Experiment Station, Honolulu, v.65, p.1-19, 1968.

NETO, O. D. S.; KARSBURG, I. V.; YOSHITOME M. y.; **Viabilidade e germinabilidade polínica de populações de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.)**. *Revista de Ciências Agro-Ambientais, Alta Floresta*, v.4, n.1, p.67-74, 2006.

NEVES, S. M. N.. GUEDES, R. M. C. **Flourescent in situ hybridization: basic princiles and perspectives for diagnosing infectious diseases in veterinary medicine**. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 79, n. 4, p. 627-632. 2012.

NOLASCO, C. A. **Caracterização citogenética e morfológica de híbridos de mandioca (*Manihot esculenta*)**. Dissertação (Mestrado em agronomia), UESB, Bahia. 2011.

OLIVEIRA, J. R. P. de; SOARES FILHO, W. dos S. Situação da cultura da acerola no Brasil e ações da Embrapa Mandioca e Fruticultura em recursos genéticos e melhoramento. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/acerolabrasil.pdf>>. Acesso em: 25 Janeiro 2018.

OLIVEIRA, M. G.; OLIVEIRA, J. G.; PEREIRA, M. G.; VIANA, A. P.; FILHO, A. G.; FILHO, G. A. S.; LOPES, G. E. M. **Diversidade genética de aceroleiras (*Malpighia emarginata* d.c.), utilizando marcadores moleculares rapd e características morfoagronômicas**. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 1, p. 162-170, Março 2009.

PAIVA, J. R. de ; SABRY NETO, H. ; SOUSA, F. H. L. ; FREITAS, A. S. M. . **Germinação de sementes de acerola originadas de plantas sexuadas e**

**assexuadas.** In: encontro de genética do Nordeste, 1999, REcife. XIV ENGENE. Recife: SBG/UFPE, 1999. p. 79

PECCHIONI, N.; FACCIOLI, P.; MONETTI, A.; STANCA, A.M.; TERZI, V. **Molecular markers for genotype identification in small grain cereals.** J. Genet. Breed., 50:203-219. 1996.

PENHA, H. A. **Construção de uma biblioteca genômica de *Passiflora edulis* f. *flaviacarpa* inserida em BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) e mapeamento cromossômico usando hibridação in situ fluorescente.** 2012. f129. Tese (Doutorado em Agronomia - Universidade de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Piracicaba, 2012.

PEREIRA, T. N. S. **Germoplasma:** conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas. 1ª edição. Viçosa, MG: editora. Arca. 250p. 2010.

REDI C. A.; GARAGNA S.; ZACHARIAS H.; ZUCCOTTI, M.; CAPANNA, E. **The other chromatin.** *Chromosoma.* 110: 136–147. 2001.

RIGAMOTO, R.R. & TYAGI, A.P. 2002. **Pollen fertility status in coastal plant species of Rotuma Island.** *The South Pacific Journal Natural Science* 20:30-33.

RITZINGER, R. **Banco ativo de germoplasma de aceroleira.** In: workshop de curadores de germoplasma do Brasil, 2011, Campinas. Anais [e] resumos dos trabalhos. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. p. 194.

RITZINGER, R.; RITZINGER, C. H. S. P. **Acerola.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.32, n.264, p. 17-25, 2011.

ROSA, S.P.; CORRÊA, M.G.S.; NASCIMENTO JUNIOR, A.; BRAMMER, S.P.; VIÉGAS, J. **Análise de tétrades e grãos de pólen em triticale hexaplóide.** 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/aib/v83/1808-1657-aib-83-e0802014.pdf>. Acesso em: 8 ago. 2017.

SALLA, M.F.S., RUAS, P.M.M., PÍPOLO, V.C. **Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C).** *Revista Brasileira de Fruticultura.* 24:015-022. 2002.

SILVA, J. T. **Caracterização citogenética de espécies e variedades de bambu com potencial econômico no Nordeste Brasileiro.** 2007. n.60. Mestrado em Ciências Florestais, área de concentração: Silvicultura - Universidade Rural de Pernambuco, UFRPE, 2007.

SIQUEIRA, K. M. M.; MARTINS, C. F.; KIILL, L. H. P.; Silva, L.T. **Estudo comparativo da polinização em variedades de aceroleiras (*Malpighia***

**emarginata DC, Malpighiaceae).** Revista Caatinga. UFRSA, v. 24, p. 18-25, 2011.

SMITH, J.S.C.; SMITTH, O.S. **Fingerprinting crop varieties.** Advances in Agronomy, 47:85-140. 1992.

SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A. **Viability of pollen grains of tetraploid banana.** Bragantia, Campinas, v. 75, p. 30, 2016.

SOUZA, S. M.; REIS, A. C.; GOMES, S. S. L.; SALIMENA, F. G. **Botanical aspects of *Heteropterys umbellata* (Malpighiaceae): a cytological and palynological approach.** . Anais da Academia Brasileira de Ciências. 82(4): 869-879. 2010.

SOUZA L. G. R.; CROSA, O.; SPERANZA P.; GUERRA, M. **Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae).** Annals Botany 109:987–999. 2012.

SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. **Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa degener*).** Ciência Agrotécnica. Lavras. V.26, n.6, p.1209-1217, nov./dez., 2002.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELLO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas.** Rondonópolis: Fundação, 2001. p.939-965.

SOUZA, F.F.; DEON, M. D.; CASTRO, J. M. C.; LIMA, M. A. C.; RYBKA, A.C.P.; FREITAS, S. T. **Principais variedades de aceroleiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco.** Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. 21 p.

SOUZA, M.M., PEREIRA, T.N.S. & MARTINS, E.R. **Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa Degener*).** Ciência e Agrotecnologia. Lavras 26:1209-1217. 2002.

SOUZA, R. M.; NOGUEIRA, M. S.; LIMA, I. M.; MELARATO, M.; DOLINSKI, C. M. **Manejo do nematóide das galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novo hospedeiro.** Nematologia Brasileira, Brasília, v. 30, p.165-169, 2006.

STACE, C. A. **Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries.** Taxon 49: 451–477. 2000.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in Plant Breeding.** Springer, Berlin, p. 469, 1993.

\_\_\_\_\_. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. In: LELLEY, T. (Ed.). **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna: Universitäts Verlag, 1998. p.22-32.

TAMAYO-ORDONEZ, M. C.; BARRERA, L. A.; SANCHEZ-TEYER, L. F. **Advances and perspectives in the generation of polyploidy plant species**. Reynosa, Mexico. 2016.

VARGAS, S. M.; GALVINO, S. B. F.; SOBRINHO, F. S.; PEREIRA, A.V.; DAVIDE, L. C.; TORRES, G. A. **Caracterização meiótica de *Cratylia argentea* (Desv.) O. Kuntze (Fabaceae)**. Resumo do 50º Congresso Brasileiro de Genética. Florianópolis, Santa Catarina – Brasil. Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras. ISBN 85-89109-04-6. 2004.

VIEIRA, E. A. FIALHO, J. F. SILVA, M. S. FUKUDA, W. M. G. FALEIRO, F.G. **Variabilidade genética do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Cerrados acessada por meio de descritores morfológicos**. Científica 36: 56-67. 2008.

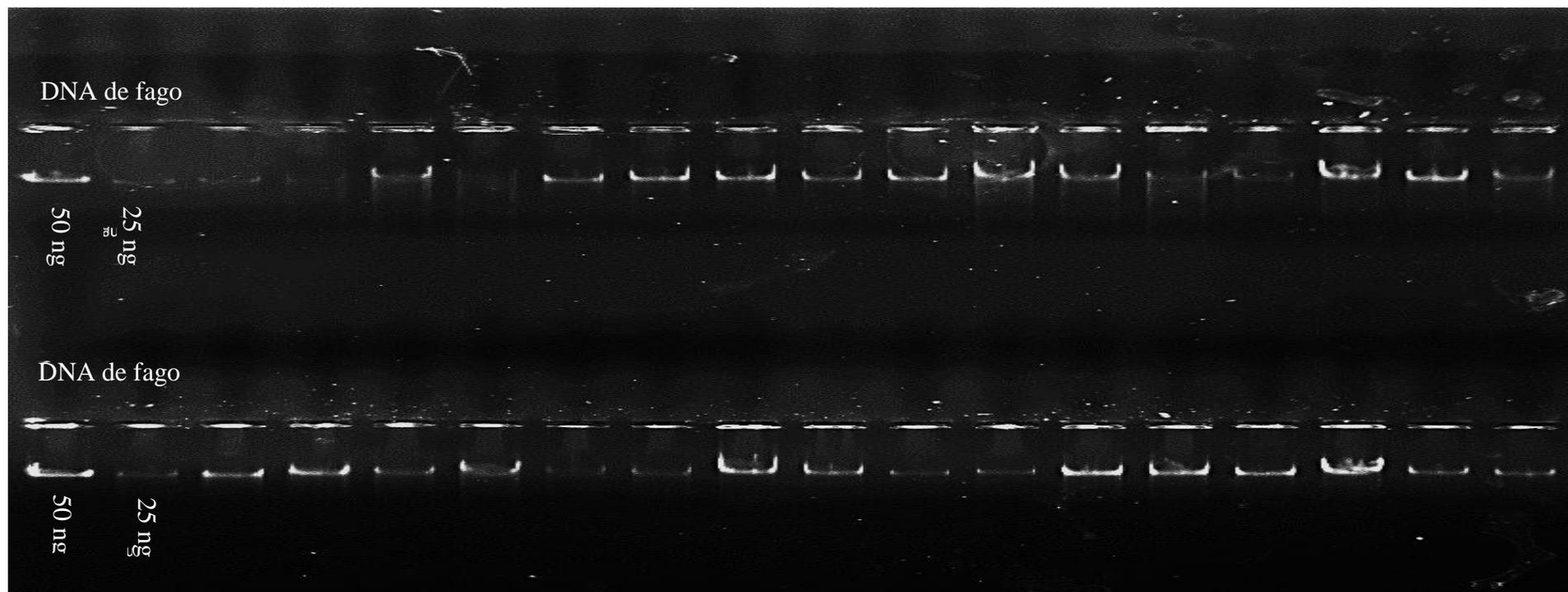
VIEIRA, E. S. N., PINHO, E. V. de R., CARVALHO, M. das G. G., SILVA, P. A da. **Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas** Revista Brasileira de Sementes, vol. 31, nº 1, p.086-094, 2009

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLF, K., KAHL, G. **DNA finger printing in plants: Principles, Methods, and Applications**. 2ed. CRC Press, Taylor & Francis, 2005. 444p.

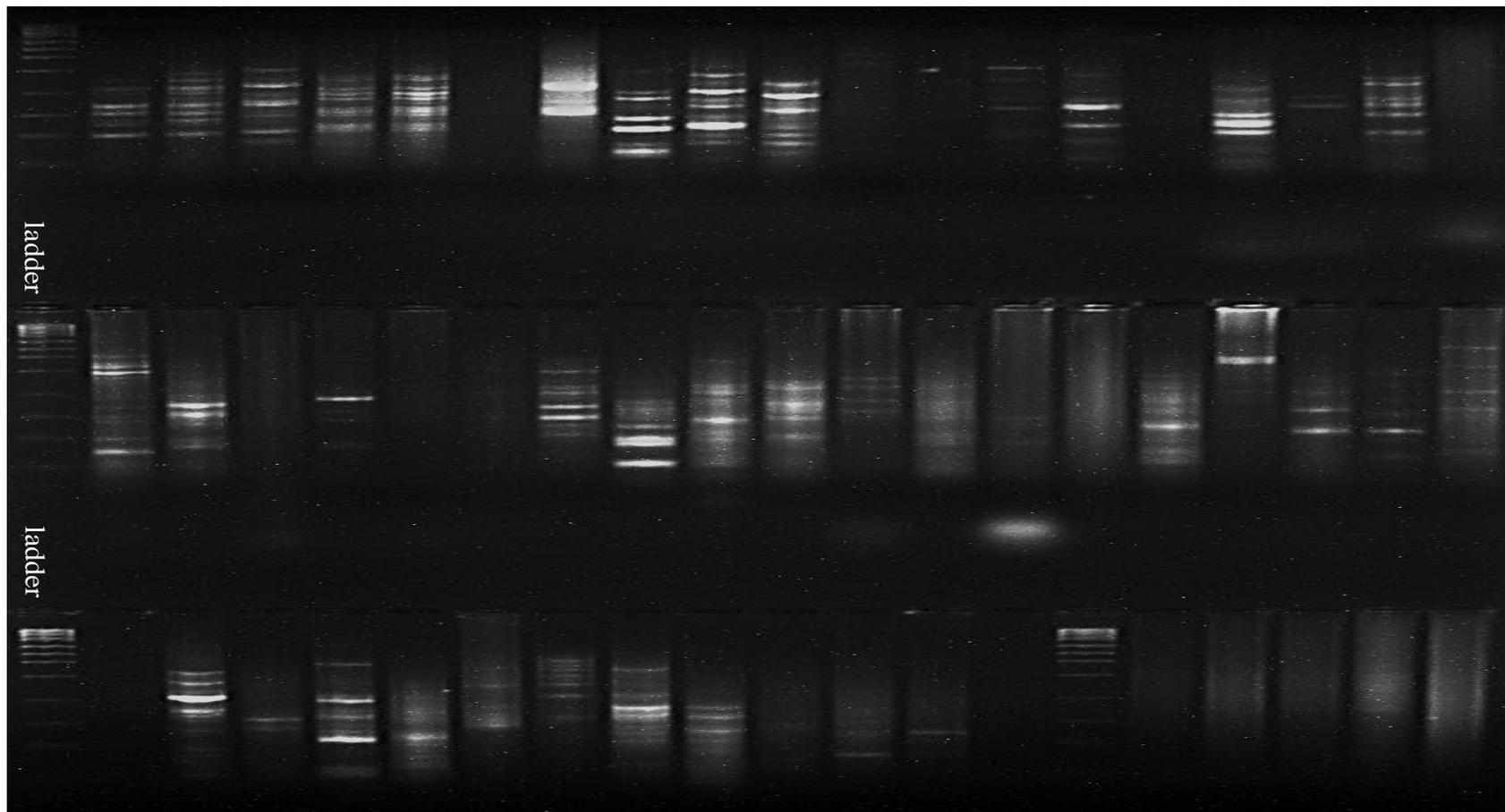
WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. **The polymerase chain reaction**. **Trends in Genetics**, v.5, p.185-189, 1989.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALKI, A.; LABUDA, D. **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification**. *Genomics* 20: 176-183. 1994.

## 8. APENDICES



**Figura 1** – Quantificação do DNA genômico dos 16 acessos de aceroleira (*Malpighia emarginata*) e DNA do fago lambda de 50 e 25ng.



**Figura 2** - Teste preliminar de amplificação de DNA com 100 *primers* do tipo ISSR no acesso 'Flor' Branca de aceroleira, visando a seleção dos mais informativos e com melhor resolução. Marcador de peso molecular ladder de 1kb.