

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
CURSO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA**

**Eveline Nogueira Lima**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CLONES DE ACEROLEIRA E REAÇÃO À  
*Lasiodiplodia theobromae***

**FORTALEZA  
2012**

**EVELINE NOGUEIRA LIMA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CLONES DE ACEROLEIRA E REAÇÃO À**  
*Lasiodiplodia theobromae*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia.

Área de concentração: Melhoramento Vegetal

Orientador:

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cândida H. C. de Magalhães Bertini.

Co-orientador:

Dra. Patricia do Nascimento Bordallo

**FORTALEZA**

**2012**

**EVELINE NOGUEIRA LIMA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CLONES DE ACEROLEIRA E REAÇÃO À**  
*Lasiodiplodia theobromae*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Melhoramento Vegetal.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Cândida H. Campos de Magalhães Bertini.**  
(Orientadora)

---

**Dra. Patricia do Nascimento Bordallo**  
(Co-orientadora)

---

**Ph. D. José Emilson Cardoso**  
(Conselheiro)

---

**Dra. Maraisa Crestani**  
(Conselheira)

**FORTALEZA**  
**2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- L696d      Lima, Eveline Nogueira  
                Diversidade genética de clones de aceroleira e reação à *Lasiodiplodia theobromae* / Eveline  
                Nogueira Lima – 2012.  
                81 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,  
                Departamento de Fitotecnia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, 2012.  
                Área de Concentração: Melhoramento Vegetal.  
                Orientação: Profa. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini.  
                Coorientação: Dra. Patrícia do Nascimento Bordallo.
1. Melhoramento genético. 2. Marcadores ISSR. I. Título.

*A Deus, por tudo que vem fazendo em minha vida.*

*Aos meus Pais, Enilson Freitas e Maria das Graças Nogueira.*

*Aos meus irmãos, Elisângela, Enilton, Marta e Evilane.*

*As minhas sobrinhas queridas, Vitória, Sophia e Ana Clara.*

*E ao meu querido esposo José Filho!!!*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por que sem Ele, não consigo nada;

A Doutora Patricia do Nascimento Bordallo, pelo laboratório concedido para a realização do meu trabalho, pelo apoio, confiança, incentivo, sugestões e por toda sua ajuda;

A minha orientadora professora Cândida H. Campos de Magalhães Bertini, pelo apoio, incentivo e atenção. Obrigada pelos grandes ensinamentos transmitidos;

Ao Doutor Carlos Farley Herbster Moura, pela orientação oportuna, disponibilidade e ter me concedido este experimento;

Ao Doutor José Jaime Vasconcelos Cavalcanti, por fazer parte do início da minha vida acadêmica e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao pesquisador José Emilson Cardoso pela amizade e disposição na etapa final desse trabalho;

A Doutora Maraisa Crestani por ter aceitado participar da minha banca de defesa de dissertação, contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

A minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis de minha vida. Em especial a minha mãe, que sempre me deu forças e pelo grande amor que tem por mim, e ao meu esposo que sempre me incentiva a continuar mesmo quando quero desistir;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, Zirlane, Maria Emília, Fred e Ancelita, pela ajuda, companheirismo, amizade e carinho;

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia, em especial, Joílson, Edson e Glauber, pela disponibilidade e ajuda na condução do meu experimento;

As verdadeiras amigas, Ingrid Bernardo, Maria de Paula, Juliana Arrais, Natalia de Oliveira pela verdadeira amizade, por sempre me escutarem nos meus momentos difíceis;

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial ao Márcio, Karina e Magda pela convivência;

Ao Tiago Dias, que sempre me ajuda quando mais preciso;

A todos que colaboraram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho;

A Universidade Federal do Ceará- UFC pela oportunidade de cursar a graduação e este mestrado;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

À Empresa Agroindústria Tropical – CNPAT, pelo apoio e realização deste trabalho;

Ao Instituto nacional de Ciência e Tecnologia- (INCT): Frutos Tropicais.

*A grande conquista é o resultado de  
pequenas vitórias que passam  
despercebidas.*

*Paulo Coelho.*

## RESUMO

O conhecimento da variabilidade e da relação genética entre diferentes acessos de aceroleira é importante para maximizar o uso dos recursos genéticos nos programas de melhoramento. Neste trabalho têm-se como objetivos avaliar a diversidade genética de 56 genótipos de aceroleira pertencentes ao Jardim de Sementes e ao Jardim Clonal da Embrapa Agroindústria Tropical por meio de marcadores moleculares ISSR, e avaliar a reação de genótipos de aceroleira à *Lasiodiplodia theobromae*. Para a avaliação da relação genética entre os genótipos de aceroleira foi calculada a distância genética entre estes tomando-se como base os dados obtidos por meio dos marcadores moleculares ISSR. Uma matriz de distância foi obtida com base no complemento aritmético do índice de Jaccard, a qual foi usada para a formação de um dendrograma onde os diferentes genótipos foram agrupados. Esse agrupamento foi realizado utilizando-se o método hierárquico, UPGMA e o método de otimização de Tocher. Na identificação de genótipos resistentes/suscetíveis à *Lasiodiplodia theobromae*, foi utilizado o método de inoculação (Furadeira). A avaliação foi realizada em casa de vegetação, contemplando a avaliação de seis genótipos diferentes. Aos 15 dias após a inoculação (DAI) foi procedida a avaliação externa dos sintomas e a medição do comprimento da lesão. Na avaliação da divergência genética através de marcadores moleculares observou-se que os genótipos 36 (12/7/15), 47 (Barbados) e 46 (Okinawa) foram os mais divergentes entre os 56 genótipos avaliados. Os cruzamentos entre os genótipos 36 (12/7/15) e 32 (68/1/15), 36 (12/7/15) e 31 (68/1/14), 47 (Barbados) e 2 (8/4/8), 47 (Barbados) e 23 (79/10/9), 46 (Okinawa) e 32 (68/1/15) e entre 46 (Okinawa) e 36 (12/7/15) podem resultar em combinações gênicas favoráveis permitindo a seleção de genótipos transgressivos. Buscando identificar clones resistentes os clones 13 (47/5/2), 32 (68/1/15) e 36 (12/7/15) mostraram mais resistentes ao fungo em avaliação. Portanto, foi possível identificar variabilidade genética entre os 56 genótipos de aceroleira, assim como genótipos resistentes à *Lasiodiplodia theobromae*. Essas informações poderão ser utilizadas em futuros trabalhos de melhoramento genético da cultura da aceroleira.

**Palavras-Chave:** Variabilidade, Marcadores ISSR, Melhoramento genético, Inoculação e Matriz de distancia.



## ABSTRACT

The knowledge about genetic variability and relationship among Indian cherry accessions is an important issue to maximize the use of genetic resources in a breeding program. The objectives of this study were to estimate the genetic diversity of 56 Indian cherry genotypes from the seed garden and clone collection of Embrapa Agroindústria Tropical using ISSR as molecular markers and to evaluate their reaction to infection by *Lasiodiplodia theobromae*. In order to evaluate genetic relationship among Indian cherry genotypes the genetic distance was calculated based on ISSR data. A distance matrix was obtained based on the Jaccard index of arithmetic complement which was used to construct a phylogram tree with all 56 accessions. The tree was constructed using the hierarchical method, the unweight pair-grouped (UPGMA) generated tree and the optimizing Tocher method. To identify resistant/susceptible genotypes to *L. theobromae*, it was developed a drill method of inoculation the fungus into the woody tissue of the plant stem. The work was carried out under greenhouse conditions with six genotypes. Disease occurrence was observed 15 days after inoculation by observing lesion presence and measuring lesion length. Data on the genetic diversity showed that three genotypes, numbered 36, 46 (Okinawa) and 47 (Barbados) were the most divergent among all 56 studied. Crossings between 36 (12/7/15) x 32 (68/1/15), 36 (12/7/15) x 31 (68/1/14), 47 (Barbados) x 2 (8/4/8), 47 (Barbados) x 23 (79/10/9), 46 (Okinawa) x 32 (68/1/15) and 46 (Okinawa) x 36 (12/7/15) may yield favorable genetic combinations allowing a transgressive genotype selection. In the search to identify potentially resistant genotypes, the accessions 13 (47/5/2), 32 (68/1/15) and 36 (12/7/15) attained high level resistance. As a conclusion, it was possible to estimate genetic variability and resistant genotypes to *L. theobromae* in the Indian cherry population. These results may provide valuable information for the breeding program in the near future.

**Key words:** genetic variability, ISSR marker, breeding, inoculation technique and distance matrix.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	10
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	12
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
3.1. Cultura da acerola e sua importância econômica .....	13
3.2. Melhoramento genético da aceroleira .....	15
3.3. Uso de marcadores moleculares .....	16
3.3.1 Marcadores ISSR.....	19
3.4. <i>Lasiodiplodia Theobromae</i> : ocorrência e sintomatologia .....	21
<b>4 REFERÊNCIAS</b> .....	23
<b>5 CAPÍTULO 2. Análise da diversidade genética de genótipos de aceroleira por meio de marcadores moleculares ISSR</b> .....	32
<b>5.1 INTRODUÇÃO</b> .....	34
<b>5.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
5.2.1 Origem dos genótipos.....	36
5.2.2 Extração de DNA .....	40
5.2.3 Integridade do DNA .....	41
5.2.4 Seleção dos Iniciadores.....	41
5.2.5 Condições de Amplificação .....	41
5.2.6 Análise Estatística dos Dados .....	42
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5.3.1 Extração de DNA .....	44
5.3.2 Análise da variabilidade genética.....	45
5.3.3 Análise de divergência genética .....	48
<b>5.4 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55
<b>6. CAPÍTULO 3. Variabilidade genética para à reação à <i>Lasiodiplodia theobromae</i></b> .....	59
<b>6.1 INTRODUÇÃO</b> .....	61
<b>6.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	63
6.2.1 Obtenção das mudas .....	63
6.2.2 Obtenção do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	64

6.2.3 Avaliação de diferentes métodos de inoculação .....	64
Método do Bisel .....	64
Método do Palito .....	65
Método da Furadeira .....	65
6.2.4 Caracterização Genética à reação a <i>Lasiodiplodia Theobromae</i> .....	65
<b>6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
6.3.1 Avaliação de diferentes métodos de inoculação .....	67
6.3.2 Avaliação a reação a <i>Lasiodiplodia Theobromae</i> pelo método da furadeira.....	67
<b>6.4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) é uma planta que se adapta aos mais diversos climas e pode ser encontrada em várias regiões do planeta, porém o seu cultivo comercial concentra-se em regiões tropicais e subtropicais (KONRAD, 2002).

No Brasil, a cultura da aceroleira distribui-se nas regiões Nordeste, Norte, Sul e Sudeste (RITZINGER & RITZINGER, 2004), e a produtividade média dos pomares brasileiros é de 29,65 toneladas de acerola por hectare ao ano, equivalente a  $59,3 \text{ kg.planta}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  (AGRIANUAL, 2010).

Dentre os principais Estados brasileiros produtores de acerola, Pernambuco representa 23,11% da produção nacional, seguido pelos Estados do Ceará, com 14,32%, e São Paulo, com 11,40%. Na região Sudeste, o Estado de São Paulo é que tem maior participação: 74,26%, seguida pelo Estado de Minas Gerais, com 19,32% (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012).

No Brasil a inexistência de cultivares definidas de acerola é um dos principais fatores que, aliados ao plantio de mudas obtidas por sementes, leva à grande desuniformidade na produção anual e qualidade de frutos por planta. Este fato tem causado sérias dificuldades para os produtores, gerando perdas na produtividade e na qualidade dos frutos. Em razão disso, a preservação da variabilidade genética da acerola, mediante a constituição de bancos de germoplasma, tem grande importância tanto do ponto de vista da conservação biológica como da aplicação no melhoramento genético (SALLA et al., 2002).

De acordo com Oliveira et al., (2009), a ocorrência desta variabilidade entre os genótipos cultivados nos pomares brasileiros pode ser explorada em programas de melhoramento vegetal, na seleção de indivíduos superiores ou como base para a geração de híbridos, com características de interesse para o mercado consumidor, bem como genótipos mais bem adaptados às diversas regiões produtoras do País.

Os programas de melhoramento da aceroleira têm voltado suas atenções também para porta-enxertos com resistência a pragas e doenças (MANICA et al., 2003). Estes fatores bióticos vêm se tornando limitantes para a cultura na região Nordeste (INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES, 1986).

Entre os fatores limitantes das áreas produtoras é a doença causada por *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.). Griffon, fitopatógeno altamente polífago, que possui mais de 500 hospedeiros (PUNITHALINGAM, 1976; PUNITHALINGAM, 1980). No Ceará, Freire et al., (2004) o detectaram em mais de 15 novos hospedeiros acometidos por

seca descendente, podridões, cancos e/ou lesões, podendo causar a morte das plantas (CEDEÑO et al., 1995; LIMA et al., 1997; PHIPPS & PORTER, 1998; ROUX et al., 2001; ANJOS et al., 2002; VIANA et al., 2002; FREIRE et al., 2004; CORREA & COSTA, 2005; FERREIRA et al., 2005).

Este fungo é altamente oportunista, infectando plantas submetidas a estresse, mostrando ser extremamente polífago e ocorrendo tanto em regiões tropicais como em regiões temperadas (PUNITHALINGAM, 1976; PUNITHALINGAM, 1980; NOGUEIRA, 2001; FREIRE et al., 2004).

Esse patógeno causa sintomas típicos de acordo com as plantas infectadas, podendo agir isolado ou associado a outros microorganismos patogênicos (SANTOS 1995; RONDÓN & GUEVARA, 1997; PHIPPS & PORTER, 1998; CARDOSO & FREIRE, 2002; FREIRE et al., 2004; FERREIRA et al., 2005).

Uma das medidas de controle consiste na utilização de clones resistentes. O processo de obtenção de clones resistentes requer programas de melhoramento demorados e onerosos, já que os primeiros sintomas são observados a partir do segundo ano após o plantio (PAIVA et al., 2002). A inoculação artificial, portanto, torna-se necessária para a superação desses problemas. Os primeiros testes visando definir uma metodologia de inoculação foram desenvolvidos recentemente, revelando aspectos preliminares para viabilização de uma metodologia padrão (COSTA, 2006).

Em consideração aos fatores aqui exposto e da grande importância da cultura da aceroleira para o país, destacando as regiões Sudeste e Nordeste, faz-se necessário estudos que visem à seleção de genótipos mais produtivos e adequados que possam ser recomendados ao produtor desta cultura.

## **2 OBJETIVOS**

a) Avaliar a diversidade genética entre 38 genótipos de aceroleira pertencentes ao Jardim de Sementes e 18 genótipos do Jardim Clonal da Embrapa Agroindústria Tropical por meio de marcadores ISSR; e,

b) Avaliar a reação de genótipos de aceroleira à *Lasiodiplodia theobromae*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Cultura da acerola e sua importância econômica

A aceroleira, cereja-das-antilhas ou cereja-de-barbados, é uma espécie frutífera possivelmente originária de regiões da América Central, América do Sul e Antilhas. É classificada botanicamente como pertencente ao Reino Vegetal; divisão Angiospermae; Família Malpighiaceae; gênero *Malpighia*; espécie *Malpighia emarginata* DC (ARAÚJO, 2010).

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) é um arbusto caracterizado por possuir haste única, ramificações densas, de crescimento longitudinal e/ou lateral. As flores são dispostas em cimeiras axilares e pedunculadas com 2 – 8 flores de coloração variável desde o rosa esbranquiçado até o vermelho, conforme o genótipo; o cálice possui de 6 a 10 sépalas, com 6 a 10 glândulas circundando suas faces externas, característica determinante das Malpighiaceae a corola possui cinco pétalas franjadas ou irregularmente dentadas com garras finas, sendo quatro de mesmo tamanho, e a quinta maior em relação às demais. Apresentam ainda dez estames perfeitos com filamentos unidos na parte inferior, gineceu tricarpelar, ovário globular, súpero, fusionado com três lóculos e três pistilos que se apresentam ereto, de mesmo tamanho, em forma de anzol e com a superfície estigmática no ângulo interno (ARAÚJO & MINAMI, 1994; SIMÃO, 1971).

Segundo Simão (1971), foram realizados estudos sobre a receptividade do estigma e sobre a deiscência da antera. Nestes estudos ficou caracterizado a não ocorrência de dicogamia e a ocorrência de dicogamia, bem como a ocorrência tanto de autopolinização quanto de polinização cruzada. Para esse autor, tudo indica que a polinização cruzada responde, em alguns casos, pelo maior tamanho do fruto.

Na observação de áreas de plantio comercial tem-se constatado a presença persistente e contínua de abelhas sobre as flores abertas, o que pode ser um indicativo de que este inseto seja um polinizador eficiente para a acerola. Algumas espécies de *Malpighia* polinizadas por abelhas, entre as quais a *M. emarginata*, respondem com uma alta taxa de frutificação efetiva (INTERNATIONAL BOARD PLANT GENETIC RESOURCES, 1986).

O fruto da aceroleira é uma baga drupácea que apresenta três sementes, cada uma envolvida por um endocarpo reticulado e trilobado. As sementes são pequenas, proporcionais ao tamanho do fruto e, conseqüentemente ao “caroço” (COSTA et al., 2003).

É bastante comum que algumas sementes sejam inviáveis, em virtude do abortamento do embrião, que responde pelo baixo índice de germinação constatado (SIMÃO, 1971).

Estes frutos, quando de cor vermelha brilhante são semelhantes à cereja européia (*Prunus cerasus* L.) e desperta grande interesse e importância econômica face ao seu alto teor de ácido ascórbico (vitamina C) (SILVA, 2008).

Segundo Batista et al., (1989) e Simão (1971), a acerola, ou cereja das Antilhas, produz de três a quatro safras por ano. A observação direta de pomares irrigados da região do Submédio do São Francisco confirma, entretanto, a possibilidade de produção contínua durante quase todo o ano. De acordo com Almeida & Araújo (1992), recebendo irrigação e tratos culturais adequados, a aceroleira pode produzir quatro a seis floradas por ano. Esse comportamento se deve basicamente às condições de clima associadas à prática da irrigação, que ao favorecerem vários surtos de crescimento propiciam também a floração e frutificação quase contínua. É importante que a planta seja adequadamente suprida de nutrientes essenciais, sobretudo nitrogênio, e de água após uma floração, pois é comum o abortamento de flores, em resposta às condições adversas de ambiente.

De acordo com Lucas (1993), o cultivo da acerola vem se acentuando de forma persistente e tem despertado interesse entre os produtores e consumidores brasileiros e estrangeiros, tanto como o consumo *in natura* quando o uso de outros subprodutos industriais. A importância econômica da acerola nas estatísticas é prejudicada pelo fato de que a exploração em escala é recente e, há pouca informação a seu respeito. É fácil compreender, a sua grande importância econômica real e potencial, em termos de exportação, uma vez que conquistou os europeus, japoneses e norte-americanos a acerola, tem potencial de constituir um produto de peso na pauta da exportação.

O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador de acerola no mundo. Existem plantios comerciais em praticamente todos os Estados brasileiros. Contudo, é na região nordestina, por suas condições de solo e clima, onde a acerola melhor se adapta (FREITAS et al., 2006b). A acerola é uma fruta de bastante importância no mercado mundial para preparo de sucos, geléias, compotas e licores, bem como para o consumo “*in natura*”. A maior parte de sua produção é comercializada em forma de polpa, que tem sido largamente utilizada no enriquecimento vitamínico do suco de outras frutas, e o pó de seus frutos verdes como matéria-prima para a fabricação de cápsulas de vitaminas (MENEZES et al., 2009). As exportações acontecem especialmente para mercados como França, Alemanha e Japão, com demanda crescente. Em várias regiões tradicionais também se registram vendas em feira, não para consumo *in natura*, mais para o preparo doméstico de



suco (ANUÁRIO, 2005). Segundo dados do CEASA-CE (2012), os preços de acerola no atacado, para o mês de maio de 2012, variaram entre 2,17 a 3,00 reais por quilo.

### **3.2. Melhoramento genético da aceroleira**

A geração de novos cultivares mais produtivos e com características qualitativas superiores como cor do fruto, sabor, odor, textura e coloração da polpa, teor de açúcares, acidez, resistência ao transporte, entre outros, tem sido grande desafio do melhoramento genético da aceroleira (PAIVA et al., 1999). Ainda o mesmo autor, o melhoramento vegetal visa explorar a variabilidade genética existente na obtenção de clones ou populações com maior uniformidade genética, que propiciem frutos que satisfaçam aos mais diferentes mercados das regiões mais desenvolvidas e economicamente mais prósperas do Brasil e do mundo.

Os pomares comerciais brasileiros, em razão do emprego de mudas propagadas por sementes, apresentam uma ampla variabilidade entre indivíduos, sendo comum a ocorrência de expressivas variações entre plantas, compreendendo diversos caracteres, como: arquitetura da copa, vigor da planta, produtividade, qualidade de frutos, entre outros (SILVA et al., 1994; GONZAGA NETO, 1995). Essa variabilidade genética, por outro lado, pode permitir a seleção de genótipos agronomicamente promissores, os quais, mediante o emprego de técnicas já conhecidas de propagação vegetativa, como a estaquia, garfagem e borbúlia, também poderão ser introduzidos como novas cultivares no sistema de produção, contribuindo com a elevação dos níveis de produtividade e qualidade de frutos.

Paiva (2003) seguiu duas linhas de melhoramento: o melhoramento clonal e populacional. O mesmo autor diz que a seleção de clones é a maneira mais eficiente para suprir a demanda imediata de genótipos superiores. O resultado pode ser visualizado em curto prazo, razão pela qual tem sido a principal metodologia adotada nos programas de melhoramento de aceroleira. Por ser uma espécie que pode ser propagada vegetativamente, o genótipo de cada planta pode ser transmitido integralmente ao longo das gerações.

Diversos trabalhos isolados foram conduzidos em algumas instituições, onde foram desenvolvidos estudos básicos de suporte ao melhoramento da aceroleira, como os relacionados à resistência a nematóides (ROSSITER, 2007), ao controle genético das características do fruto (LOPES, 2001).

No Ceará, a Embrapa Agroindústria Tropical iniciou estudos de melhoramento genético para a obtenção de clones de aceroleiras em 1996. O resultado desse trabalho

permitiu o lançamento de quatro cultivares para o plantio comercial no Estado: Apodi (BRS 235); Cereja (BRS 236); Roxinha (BRS 237) e Frutacor (BRS 238) (PAIVA et al., 2003). No Estado de Pernambuco, a Universidade Federal Rural de Pernambuco implantou em 1999 o Banco de Germoplasma com 42 acessos via estaquia, na Estação Experimental de Cana de Açúcar do Carpina (EECAC/ Carpina-PE) os quais estão sendo caracterizados para caracteres de interesse relacionados com melhoramento de copa e de porta-enxertos (MUSSER, 2001).

De acordo com Donadio (2000), no Paraná, em 1998, através de seleção massal em pomares comerciais do Norte do Estado, foram lançadas pela Universidade Estadual de Londrina (UEL), as cultivares Dominga (UEL-3), Ligia (UEL-5), recomendadas para plantio na naquela região ou em regiões de clima semelhante.

Na quase totalidade dos pomares de aceroleira do Brasil, observa-se uma mistura bastante acentuada de tipos e formas de aceroleira, sendo comum encontrar em um mesmo pomar plantas com hábito de crescimento distinto e frutos com formatos, coloração e tamanho diferentes (OLIVEIRA, 2008). Sendo assim, os melhoristas tem observado a importância de realizar pesquisas no sentido de caracterizar, selecionar e propagar genótipos que apresentem maior produção de frutos com maior aceitação no mercado consumidor.

### **3.3. Uso de marcadores moleculares**

As pesquisas genéticas com acerola baseiam-se em caracteres agronômicos e marcadores morfológicos (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2000b; GOMES et al., 2000). No entanto, estes marcadores existem em número limitado, e sua expressão gênica pode estar sujeita às variações do ambiente.

Marcadores moleculares têm sido usados com sucesso na análise genética de plantas e na caracterização da variabilidade genética contida em bancos de germoplasma. Freitas et al., (1995) realizaram pesquisas contemplando a caracterização de clones de acerola com os sistemas isoenzimáticos peroxidase-esterase. Esses autores demonstraram que, por esta metodologia, é possível identificá-los e diferenciá-los. Porém, segundo Ferreira e Grattapaglia (1995), quando a investigação requer uma cobertura mais ampla do genoma, o uso de marcadores isoenzimáticos é limitado, uma vez que poucos sistemas isoenzimáticos polimórficos, geralmente entre 10 e 20, podem ser identificados em cada espécie.

Salla et al., (2002), analisando 24 acessos de aceroleira pertencente ao banco de germoplasma da Universidade Estadual de Londrina com base em marcadores moleculares tipo RAPD, detectaram alto polimorfismo entre os acessos. De acordo com seus resultados, apesar da base genética estreita, comum nas coleções de aceroleira encontradas no Brasil, a variabilidade genética é relativamente alta.

Nos últimos dez anos, técnicas que permitem fazer distinção diretamente em nível de DNA têm permitido acessar a variabilidade genética dentro do pool gênico de espécies cultivadas, assim como identificar a diversidade existente em bancos de germoplasma. Os marcadores de DNA apresentam vantagens em relação aos marcadores isoenzimáticos, uma vez que podem ser obtidos em grande número e não sofrem influência de fatores ambientais (BORÉM, 1998). Welsh e McClelland (1990) e Williams et al., (1990) introduziram uma técnica que se baseia na detecção de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso RAPD (DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AO ACASO), usando oligonucleotídeos de dez bases. Esta técnica tem se mostrado eficiente na identificação da variabilidade genética em diversos grupos de plantas e pode ser usada como uma ferramenta auxiliar em programas de melhoramento, encontrando também aplicação na obtenção de mapas genéticos (WILLIAMS et al., 1990; REITER et al., 1992; PHILIPP et al., 1994) e identificação de marcadores moleculares úteis para seleção assistida (MICHELMORE et al., 1991; OHMORI et al., 1996; TARTARINI, 1996) entre outras. Marcadores RAPD foram usados para acessar a variabilidade genética contida em coleções de milho (WELSH et al., 1991), rosa (GALLEGO & MARTINEZ, 1996), centeio (HUFF, 1997), sorgo (MENKIR et al., 1997) e arroz (FUENTES et al., 1999). Poucos exemplos do uso de RAPD têm sido mostrados na literatura em frutíferas. Usando marcadores RAPD, foi possível distinguir entre populações de cacau (*Theobroma cacao* L.) (RUSSELL et al., 1993) e entre aceroleira (SALLA et al., 2002). Dunemann et al., (1994), aplicando marcadores RAPD no gênero *Malus* sp, para avaliar as relações genéticas entre 18 espécies e 27 cultivares de maçã, consideraram que a técnica tem potencial para complementar estudos taxonômicos clássicos no gênero.

Segundo Zimmer et al., (2005), várias técnicas envolvendo marcadores moleculares têm sido empregadas no estudo dos recursos genéticos vegetais. Dentre essas técnicas está o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP); o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD); polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP); polimorfismo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos detectados por meio de marcadores

microsatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat), e polimorfismos obtidos a partir do sequenciamento de regiões do DNA ribossômico nuclear (nrDNA). Os marcadores moleculares ideais são aqueles que possuem elevado polimorfismo entre dois genótipos, herança codominante, distribuídos uniformemente por todo o genoma, facilmente visualizados e estáveis no decorrer das gerações.

O RFLP foi o primeiro tipo de marcador de DNA utilizado no melhoramento de plantas (HELENTJARIS et al., 1986). As dificuldades inerentes à técnica, o grande número de etapas e o uso, em muitos casos, de sondas radioativas, impedem que o RFLP seja extensivamente utilizado no melhoramento (ALZATE-MARIN, 2005).

O RAPD é uma técnica que utiliza a reação de PCR para detectar fragmentos específicos de DNA (WILLIAMS et al., 1990). Ao contrário do PCR (REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA) convencional, o RAPD utiliza apenas um “primer” curto (cerca de dez nucleotídeos) que, devido ao seu pequeno tamanho, pode parear em diversos pontos do genoma. Caso duas cópias desses iniciadores se liguem às fitas opostas do DNA, a uma distância entre 200 e cerca de 2.000 pares de nucleotídeos, pela reação de PCR, a região flanqueada pelos iniciadores pode ser amplificada. Portanto, é uma técnica que não exige o conhecimento prévio da sequência que está sendo amplificada, ao contrário do PCR convencional, é rápida e de custo relativamente baixo, porém com potencial informativo. Têm sido empregados para estudos de diversidade genética de algumas frutíferas como aceroleira (SALLA et al., 2002), bananeira (SOUZA, 2006), açaizeiro (OLIVEIRA et al., 2007) e maracujazeiro (VIANA et al., 2003).

“Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados” (AFLP) é uma técnica que combina a clivagem de fragmentos de DNA com enzimas de restrição e a amplificação desses fragmentos por PCR (VOS et al., 1995). Resumidamente, nessa técnica, o DNA de um indivíduo é clivado com enzimas de restrição, às suas extremidades são ligados adaptadores, os quais servem de sítios de ligação para “primers” numa reação de PCR. Apesar de ser um tipo de marcador bastante útil para a realização de “fingerprints” de DNA, principalmente quando existem poucas informações disponíveis a respeito do genoma de interesse, o seu uso no melhoramento de plantas tem sido limitado devido a dificuldades metodológicas inerentes à técnica e ao seu elevado custo (ALZATE-MARIN, 2005).

Uma das técnicas mais indicadas para estudar polimorfismos entre sequências de DNA é SSR (“Sequência Simples Repetida”) ou microsatélites (LITT & LUTY, 1989). Esta técnica baseia-se no uso de pares de primers na reação de PCR para detectar variações

em locos de sequências repetitivas. Estas são constituídas de 1 a 6 nucleotídeos que se repetem lado a lado no genoma de eucariotos. A técnica de SSR revela polimorfismo em um loco devido a diferenças no número de vezes (n) em que, por exemplo, um dinucleotídeo (AG)<sub>n</sub> se repete naquele loco (BUSO et al., 2003).

De acordo com Zietkiewicz et al., (1994) desde 1994 os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) têm sido utilizados, apresentando alto grau de polimorfismo, baixo custo e reprodutibilidade, sendo empregado em estudos de diversidade genética, correlações filogenéticas, prospecção de genes, dentre outros.

A partir dos resultados dos trabalhos citados anteriormente observa-se que é possível encontrar variabilidade genética entre as plantas de aceroleira de alguns pomares instalados no Brasil. Dessa forma, a partir dos trabalhos de caracterização molecular os melhoristas de aceroleira poderão identificar e selecionar genótipos promissores para o desenvolvimento de novos clones.

### **3.3.1 Marcadores ISSR**

Os marcadores moleculares de DNA são sequências genômicas localizadas num mesmo loco; são definidos como elementos capazes de prever, mapear e caracterizar um fenótipo molecular. Com o advento das técnicas de biologia molecular, na década de 80, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA. São várias as classes de marcadores moleculares dentre elas os marcadores moleculares ISSR, representam uma das classes mais recentes, tendo sido desenvolvida a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA (ZIETKIEWICZ et al., 1994; CAIXETA et al., 2006).

ISSR é uma técnica simples rápida e eficiente. Os produtos amplificáveis são geralmente de 200-2000 pb de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade possivelmente devido ao uso de iniciadores longos na qual permite um subsequente uso de alta temperatura de anelamento (BORNET & BRANCHARD, 2001; REDY et al., 2002).

De acordo com Souframanien & Gopalakrishna (2004), os marcadores ISSR envolvem a PCR para amplificar regiões entre microssatélites idênticos orientados em direções opostas, ou seja, inversamente orientados. Os iniciadores são construídos a partir das próprias sequências simples repetidas (SSR) proporcionando amplo arranjo de possíveis produtos amplificáveis. Essa metodologia foi inicialmente proposta por Zietkiewicz et al., (1994), não sendo necessário nenhum conhecimento a priori do genoma para a sua utilização. As repetições usadas como iniciadores podem ser di nucleotídeos, tri

nucleotídeos, tetra nucleotídeos ou penta nucleotídeos. Os iniciadores ISSR podem ou não serem ancorados, sendo geralmente ancorados em um seguimento de bases arbitrárias e/ou degeneradas, localizado em uma das extremidades (3' ou 5') da sequência repetitiva (ZIETKIEWICZ et al., 1994; REDDY et al., 2002).

Vários estudos têm apresentado alto conteúdo de informação genética revelado por estes marcadores, que parecem ser especialmente apropriados para estudos filogenéticos, de avaliação da diversidade genética e identificação de cultivares (RAKOCZY-TROJANOWSKA & BOLIBOK, 2004). Exemplos destes estudos foi realizado por Almeida et al., (2009), que avaliaram cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR e de Santana et al., (2011) que utilizaram marcadores ISSR em estudos de variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira.

Os marcadores ISSR não requerem informações prévias de sequencias de DNA da espécie-alvo, produzem fragmentos com grande reprodutibilidade, quando comparados a outros marcadores com base em PCR não específico como RAPD (WOLFE & LISTON, 1998), por exemplo, e requerem pouca infraestrutura em termos de equipamento de laboratório para execução dos experimentos.

Dentre algumas das vantagens dos marcadores ISSR quando comparado a outros marcadores, como por exemplo, o marcador SSR, (SOUSA et al., 2007), é que os marcadores ISSR apresentam um sistema de marcadores multilocos útil para “fingerprint” genômico, diversidade genética, filogenia molecular, mapeamento genético, determinação da frequência de microssatélites no genoma, seleção assistida por marcadores e biologia evolutiva (REDDY et al., 2002). Em relação aos marcadores RAPD e AFLP, esses apresentaram desvantagens em relação ao ISSR, como a as vantagens são baixa reprodutibilidade dos marcadores RAPD, e alto custo do AFLP (GUPTA; VARSHNEY, 2000). Segundo Reddy et al., (2002), os marcadores ISSR superam a maioria dessas limitações. Assim sendo, ISSRs têm provado serem úteis dentro de populações de estudos genéticos, especialmente em detecção clonal e diversidade (SALIMATH et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1996).

### 3.4. *Lasiodiplodia Theobromae*: ocorrência e sintomatologia

Em relação à cultura de aceroleira são relatadas diversas doenças fúngicas, destacando-se a antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. e *C. dematium* (Pers. ex Fr.) Grove que, segundo Alves et al. (1995), é a doença mais difundida no Brasil. No Nordeste, em pomares de acerola situados em áreas irrigadas do vale do São Francisco, foram constatados os fungos *Fusarium oxysporum* Schlecht, causando seca rápida de toda planta e levando à morte, e *Botryodiplodia theobromae* Pat., que reduz o vigor, e provoca secamento descendente (TAVARES, 1995). Na Ilha de São Luís, estado do Maranhão, Silva et al. (1997) isolaram da folhagem de acerola e comprovaram a patogenicidade de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. No estado do Ceará, Holanda et al. (1997) realizaram o mapeamento das doenças da aceroleira nas zonas fisiográficas do Sertão, Litoral e Serras Úmidas, sendo constatado a podridão dos frutos e a podridão seca das hastes causadas, respectivamente, por *Rhizopus nigricans* Ehr. e *Lasiodiplodia theobromae* (Pat) Griff. & Maubl. (= *Botryodiplodia theobromae* Pat.).

Segundo Holliday (1980), *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. (syn. *Botryodiplodia theobromae* Pat.) é considerado um patógeno pouco ofensivo, mas nos últimos anos vem se tornando importante para diversas culturas. Atualmente, *L. theobromae* é responsável por doenças importantes em mangueira (*Mangifera indica* L.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), *Spondias* spp., dentre outras (FREIRE & CARDOSO, 2003). Levantou-se a hipótese que *L. theobromae* tenha evoluído em patogenicidade em consequência das pressões ambientais, especialmente nas regiões semiáridas, onde as condições climáticas lhes são muito favoráveis (TAVARES, 2002). Nestes ecossistemas, o fungo infecta várias culturas, causando doenças importantes, como a morte descendente do cajueiro (FREIRE & CARDOSO, 2003), do cacaueteiro (*Theobromae cacao* L.), do guaranazeiro (*Paullinia cupana* Ducke), da mamoneira (*Ricinus communis* L.), da gravioleira (*Annona muricata* L.) e da ateira (*Annona squamosa* L.) (PONTE, 1985). Outros sintomas apresentados são murcha, podridão basal de frutos, cancro de tronco e de ramos da mangueira (TAVARES, 2002). Levantamentos mais recentes, conduzidos pela Embrapa Agroindústria Tropical, revelaram um aumento no número de hospedeiros e na severidade do ataque desse patógeno (FREIRE et al., 2004).

Como este fungo apresenta um comportamento endofítico (SOUSA et al., 2006) para a obtenção de um controle viável é necessário o uso de clones resistentes (PAIVA et al., 2002; CARDOSO et al., 2006), e bem adaptado à região semiárida.

Visando simular a interação patógeno-hospedeiro em ambientes controlados, diversos métodos de inoculação podem ser utilizados, como: inserção de pedaços e discos de micélio do patógeno em frutos, ramos e troncos de plantas (FAWCETT, 1923; KLOTZ & FAWCETT, 1930; ROSSETTI, 1947); inserção de disco de micélio do patógeno sob a casca de plantas, semelhante ao processo de enxertia por borbulhia com gemas (GRIMM e HUTCHSON, 1973; AFEK & SZTEJNBERG, 1990); injeção de suspensão de esporos em incisões realizadas nas bases das plantas (WHITESIDE, 1974; SMITH et al., 1991); inserção de palito de dente infestado com patógeno (AGUILAR-VILDOSO & POMPEU JÚNIOR, 1997) e inserção de agulha infestada com o patógeno in vitro e em plântulas (SIVIERO, 2002). Dessa forma, para se caracterizar um bom método, ele deve obedecer aos seguintes critérios: boa discriminação entre genótipos envolvidos, repetibilidade, rapidez e uniformidade nos resultados, e fácil execução (PASTOR-CORRALES et al., 1981; OPIO et al., 1994), não permitindo o escape e eficiente no sentido de permitir que a reação à infecção seja avaliada quantitativamente (ANDRUS, 1948).



## REFERÊNCIAS

AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. A rapid method for evaluating citrus seedlings for resistance to foot rot caused by *Phytophthora citrophthora*. **Plant Disease**, v. 74, p. 66-68. 1990.

AGUILAR-VILDOSO, C.I.; POMPEU JÚNIOR, J. Inoculação de *Phytophthora* parasítica em caules de variedades cítricas pelo método do palito. Resumo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 240. 1997.

AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2010. 520 p.

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. FNP - Consultoria & Comércio. São Paulo, Editora Argos Comunicação, 2005. 521p.

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. FNP - Consultoria & Comércio. São Paulo, Editora Argos Comunicação, 2002. 521p.

ALMEIDA, C.M.A. de; LIMA, S. E. N de.; LIMA, G. S. de A.; BRITO, J. Z. de; DONATO, V. M. T. S.; Silva, M.V. da.; Caracterização Molecular De Cultivares De Cana-De-Açúcar Utilizando Marcadores ISSR. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1771 -1776, 2009.

ALMEIDA, J.I.L. de.; ARAUJO, F.E. de. **A acerola Instruções preliminares de cultivo**. Fortaleza, CE: EPACE, 1992. 6p. (EPACE. Pesquisa em Andamento, 21).

ALVES, R.E. **Acerola no Brasil: produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1995. p. 107-23.

ANDRUS, C.F. A methods of testing for resistance to bacterial blight. **Phytopathology**, v. 38, p. 757-759, 1948.

ANJOS, J.R.N.; CHARCHAR, M.J.A.; AKIMOTO, A.K. Ocorrência de Antracnose causada por *Colletotrichum acutatum* em pequiheiro no distrito federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 96-98. 2002

ARAÚJO. D.F.D. **Biologia floral e potenciais agentes polinizadores da cultura da acerola (*Malpighia emarginata* DC) no Município de Anadia – estado de Alagoas**. 2010. 34p. Monografia – Faculdade de Engenharia Agrônoma, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2010.

ARAÚJO, P.S.R. de.; MINAMI, K. **Acerola**. Campinas: Fundação Cargill, 1994. 8 p.

BATISTA, F.A.S.; MUGRUET, B.R.R.; BELTRÃO, A.E.S. Comportamento, da aceroleira na Paraíba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 10, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza, SBF/BNB, 1989. p.26-32.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2. editora. Universidade Federal de Viçosa, 453p. 1998.

BORNET, B; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat ISSR Markers; reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**. v 19. p 209-215, 2001.

BUSO, G. S.C.; CIANPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. editora. 30. 2003.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Editora). **Marcadores moleculares**. Viçosa, Editora Folha de Viçosa. 2006. p. 9-78.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V. C.; DESTRO, D.; PRETE, C.E.C.; GONZÁLES, M. G. N.; POPPER, I. O.; ZANATA, S.; SILVA, F. A. M. Seleção de genótipos parentais de acerola baseada na divergência genética multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 341-345, 2000b.

CARDOSO, J.E.; PAIVA, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; SANTOS, A.A.; VIDAL, J.C. Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brasil. **Crop Protection**, v. 25, p. 855-859. 2006.

CARDOSO, J. E. ; FREIRE, F.das. C.O. . Identificação e manejo das principais doenças. In: Q. M. S. Melo. (Org.). **Caju-Fitossanidade**. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 41-51. 2002.

CEDENÕ, L.; CARRERO, C.; MOHALI, S.; PALACIOS-PRÜ, E.; QUINTERO, K. Muerte regresiva em parchita causada por *Lasiodiplodia theobromae* em Venezuela. **Fitopatologia Venezuelana**, v. 8, n. 1, p. 11-14. 1995.

CEASA-CE. Central de Abastecimento do Ceará. <http://www.ceasa-ce.com.br/janelas/boletim-diario>. 09 de maio de 2012.

CORREA, M.S.; COSTA, J.L.S. Dispersão anemófila do fungo *Lasiodiplodia theobromae* em plantações de coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 150-154. 2005.

COSTA, J.V.T.A. **Metodologia de avaliação de clones de cajueiro para resistência à resinose**. Fortaleza: UFC, monografia de graduação. 2006. 40p.

DONADIO, L.C. Novas variedades brasileira de frutas. Jaboticabal: **Sociedade Brasileira de Fruticultura**, 2000. 205p.

DUNEMANN, F.; KAHNAU, R.; SCHMIDT, H. Genetic relationship in *Malus* evaluated by RAPD fingerprinting of cultivars and wild species. **Plant Breeding**, v. 113, p. 150-159. 1994.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Senso Agropecuário 2000**. Disponível:<<http://www.ibge.gov.br> >. Acesso em: 14 julho 2012.

IBGPR-INTERNACIONAL BOARD PLANT GENETIC RESOURCES, 1986, Rome, Italy. *Malpighia emarginata* (Acerola). In: **International Board Plant Genetic Resources**, 1986, Rome, Italy. Genetic resources of tropical and subtropical fruits and nuts (excluding musa). Rome, 1986, p.52-54.

FAWCETT, H.S. Gummosis on citrus. **Journal of Agricultural Research**, v. 24, p. 235-255.1923.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética**. Embrapa, Cenargem, Brasília, DF. 220 p. 1995.

FERREIRA, F.A.; MAFFIA, L.A.; FERREIRA, E.A. Detecção rápida de *Ceratocystis fimbriata* em lenho infectado de eucalipto, mangueira e outros hospedeiros lenhosos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 5. p. 543-545, 2005.

FREIRE, F.C.O.; VIANA, F.M.P.; CARDOSO, J.E.; SANTOS, A.A. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2004 (Série Embrapa - Comunicado Técnico 91).

FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E. Doenças do coqueiro. In: FREIRE, F.C. O. CARDOSO, J.E.; VIANA, F.M.P. (Ed.) **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília. Embrapa Informações Tecnológica. 2003. p. 191 - 226.

FREITAS, N.S.A.; BURITY, H.A.; BEZERRA, J.E.F.; SILVA, M.V. Caracterização de clones de acerola (*Malpighia glabra* L.) através dos sistemas isoenzimáticos peroxidase-esterase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, p. 1453-1457. 1995.

FREITAS, C.A.S. de; MAIA, G.A.; COSTA, J.M.C. da; FIGUEIREDO, R.W. de; SOUSA, P.H. M.de. Acerola: Produção, Composição, Aspectos Nutricionais e Produtos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 395-400, 2006b.

FUENTES, J.L.; ESCOBAR, F.; ALVAREZ, A.; GALLEGU, G.; DUQUE, M.C.; FERRER, M.; DEUS, J. E.; TOHME, J. M. Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isoenzyme, RAPD and AFLP markers. **Euphytica**, v. 109, p. 107- 115. 1999.

GALLEGU, F.J.; MARTINEZ, I. Molecular typing of rose cultivars using RAPDs. **Journal of Horticultural Science**, v. 71, n. 6, p. 901-908. 1996.

GOMES, J.E.; PERECIN, D.; MARTINS, A.B.G.; FERRAUDO, A.S. Análise de agrupamentos e de componentes principais no processo seletivo em genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D. C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 22, n. 1, p. 36-39. 2000.

GONZAGA NETO, L. Melhoramento genético da aceroleira. In: SÃO JOSÉ, A.R.; ALVES, R.E. editoras. **Acerola no Brasil, produção e mercado**. Vitória da Conquista, BA: UESB, 1995. p. 15-21.

GRIMM, G.R.; HUTCHISON, D.J. A procedure for evaluating resistance of citrus seedlings to *Phytophthora parasitica*. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 669-672. 1973.

GUPTA, P.K.; VARSHNEY, R.K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, Wageningen, v. 113, p. 163-185, 2000.

HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A.; NIENHUIS J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics** 72:761-769. 1986.

HOLANDA, Y.C.A.; PONTES, J.J. da.; SILVEIRA FILHO, J. Doenças da acerola (*Malpighia glabra* L.) no Estado do Ceará, Brasil. **Fitopatologia Brasileira** v22. p453. 1997.

HOLLIDAY, P. **Fungus diseases of tropical crops**. Cambridge. Cambridge University Press. 1980.

HUFF, D. R. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. **Crop Science**, v. 37, p. 557-564. 1997.

INTERNATIONAL BOARD PLANT GENETIC RESOURCES (Rome, Italy). *Malpighia emarginata* (Acerola). In: **INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES (Rome, Italy)**. Genetic resources of tropical and subtropical fruits and nuts (excluding musa). Rome, 1986. p. 52-54.

JUNQUEIRA, K.P.; PIO, R.; VALE, M.R.; RAMOS, J.D. **cultura da acerola**. Lavras: UFLA, 2002, 31p. (UFLA, Boletim Técnico, 96).

LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; AZEVEDO, D.M.P. Podridão-do-caule e podridão-dos-ramos da mamoneira causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Pesquisa agropecuária tropical**, v.32, n.2. 1997. Disponível em: <[http://atlas.sct.embrapa.br/pab/pab.nsf/0/f4c0655ab00ece03032565fa0076fc1c/\\$FILE/pab108\\_95.doc](http://atlas.sct.embrapa.br/pab/pab.nsf/0/f4c0655ab00ece03032565fa0076fc1c/$FILE/pab108_95.doc)>. Acesso em: 15 Fev. 2012.

LITT, S.M.; LUTY, J.A. **Ahypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene**. American Journal of Human Genetic, v. 44, p. 397-401, 1989.

LOPES, R.; BRUCKNER, C.H.; CRUZ, C.D.; LOPES, M.T.G.; Freitas, G.B.de.; **Repetibilidade de características do fruto de aceroleira**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 36, n. 3, p. 507-513, mar. 2001.

LUCAS, A.P. Acerola: suco da saúde conquista o mundo inteiro. **Manchete Rural**, Rio de Janeiro, v.5, n. 69, jan.1993. p.10-13.

KONRAD, M. **Efeito de sistemas de irrigação localizada sobre a produção e qualidade da acerola (*Malpighiaspp*) na região da Nova Alta Paulista**. 2002. 119 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2002.

KLOTZ, L.J.; FAWCETT, H.S. **The relative resistance of varieties and species of citrus to *Pythiacystis gummosis* and other bark diseases.** *Journal of Agricultural Research*, v. 2, p. 415-425. 1930.

MANICA, I.; ICUMA, I.M.; FIORAVANÇO, J.C.; PAIVA, J.R.; PAIVA, M.C.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Acerola- Tecnologia de produção, pós-colheita, congelamento, exportação, mercado.** Porto Alegre: Editora Cinco Continentes, 2003, 394p.

MARINO NETTO, L. **Acerola: a cereja tropical.** São Paulo: Nobel, 1986. 94p

MENEZES, A.R.V.de.; SILVA JÚNIOR, A.; CRUZ, H.L.L.; ARAUJO, D.R.de.; SAMPAIO, D.D. Estudo comparativo do pó da Acerola Verde (*Malpighia emarginata* D.C) obtido em estufa por circulação de ar e por liofilização. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.1, p.1-8, 2009.

MENKIR, A.; GIELDSBROUGH, P.; EJETA, G. RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated races of sorghum. **Crop Science**, v.37, p. 564-569, 1997.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Science**. USA. v. 88, p. 9828-9832. 1991.

MUSSER, R.S. **Caracterização de acessos de aceroleira (*Malpighia emarginata*) do Banco Ativo de Germoplasma da UFRPE em Pernambuco**, Recife, 2001.

NOGUEIRA, E.M.C.; FERRARI, J.T.; LOUZEIRO, I.M. Ocorrência de *Lasiodiplodia theobromae* causando perdas severas de frutos em mangueira no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68 (suplemento), p. 1-131, 2001.

OHMORI, T.; MURATA, M.; MOTOYOSHI, F. Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the *Tm-1* locus in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 92, p. 151- 156. 1996.

OLIVEIRA, M.G; OLIVEIRA, J.G; FILHO, A.G; PEREIRA, M.G; VIANA, A,P; FILHO,G. A S.; LOPES, G.E. M; Diversidade genética de aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.), utilizando marcadores moleculares RAPD e características morfoagronômicas. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 1, p. 162-170, Março 2009.

OLIVEIRA, M.G. **Diversidade genética por meio de características morfológicas e marcadores RAPD em aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.)**. 2008. 84p. Dissertação de Mestrado. Genética e melhoramento de plantas, Universidade estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro. 2008.

OLIVEIRA, M.S.P.; AMORIM, E.P.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, D.F. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. **Ciências Agrotécnicas**. Lavras, v. 31, n. 6, p. 1645- 1653, 2007.

OLIVEIRA, A.C.de. T.; RICHTER. J.L.; BENNETZEN. 1996. **Regional and racial specificities in sorghum germplasm assessed with DNA markers**. Genome 39: 579-58.

OPIO, A.F., ALLEN, D.J.; TERI, J.M. Evaluation of inoculation methods and inoculum concentration for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 37, p. 223-224, 1994.

PAIVA, J.R.; ALVES, R.E.; CORREA, M.P.F.; FREIRE, F. C. O.; BRAGA S. R. **Seleção massal de acerola em plantio comercial**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.34, n.3, p.505- 511, 1999.

PAIVA, J.R.; CARDOSO, J.E.; CRISÓSTOMO, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; ALENCAR, E.S. Clone de Cajueiro-Anão Precoce BRS 226 ou Planalto: Nova Alternativa para o Plantio na Região Semi-árida do Nordeste. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2002. 4p. (Embrapa Agroindústria Tropical. **Comunicado Técnico, 78**).

PAIVA, J.R.; ALVES, R.E.; BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J.R.; MOURA, C.F.H.; ALMEIDA, A. S.; NORÕES, N.P. Clones de aceroleira: BRS 235 ou Apodi, BRS 236 ou Cereja, BRS 237 ou Roxinha e BRS 238 ou Frutacor. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 3p. (Embrapa Agroindústria Tropical. **Comunicado Técnico, 87**).

PASTOR-CORRALES, M.A.; BEEBE, S.E.; CORREA, F.J. Comparing two inoculation techniques for evaluating resistance in beans to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. In: Internacional conference on plant pathogenic bacteria, 5, Cali, 1981. **Proceedings...** Cali: CIAT, p. 493-503. 1981.

PHIPPS, P.M.; PORTER, D.M. Collar rot of peanut caused by *Lasiodiplodia theobromae*. **Plant Disease**, v. 82, p. 1205-1209. 1998.

PHILIPP, U.; WEHLING, P.; WRICKE, G. A linkage map of rye. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 88, p. 243-238. 1994.

PONTE, I. I. **Uma doença da ateira (*Annona aquomosa*) e da gravioleira (*A. muricata*) causada por *Botryodiplodia theobromae***. Fitopatologia Brasileira 10:689-690. 1985.

PUNITHALINGAM, E. *Botryodiplodia theobromae*. CMI. Description of Pathogenic Fungi and bacteria No. 519. Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lane, Kew, Surrey, England, 3p, 1976.

PUNITHALINGAM, E. **Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae***. Vaduz: Pat. J. Cramer, p. 123, 1980.

RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Celular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 9, p. 221-238, 2004.

REDDY, M.P.; SARLA, N. & REDDY, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, n. 128, p. 9-17, 2002.

- REITER, R.S.; WILLIAMS, J.K.G.; FELDMAN, K.A.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S. V.; SKILNIK, P.A. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. **Proceedings of the National Academy of Science**. USA. v. 89, p. 1477-1481. 1992.
- RITZINGER, R.; RITZINGER, C.H.S.P. **Acerola: aspectos gerais da cultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2004. 2p. (Boletim Técnico)
- RONDÓN, A.; GUEVARA, Y. Algunos aspectos relacionados com la muerte regresiva del aguacate (*Persea americana* Mill). **Agronomia Tropical**, v. 34, n. 1-3, p. 119-129. 1997.
- ROSSITER, J.G.de A. **Potencial de genótipos de aceroleira (*Malpighias emarginata* D.C) quanto ao enraizamento e resistência a nematoide visando à obtenção de porta-enxerto**. 2007. 65p. Dissertação (Mestrado) – Melhoramento genético de Plantas, Universidade federal Rural, Pernambuco-RE. 2007.
- ROSSETTI, V. Estudos sobre a gomose de *Phytophthora* dos citros I – Suscetibilidade de diversas espécies cítricas a algumas espécies de *Phytophthora*. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 18, p. 97-124. 1947.
- ROUX, J.; COUTINHO, T.A.; BYABASHAIJA, D.M.; WINGFIELD, M.J. Diseases of plantation Eucalyptus in Uganda. **South African Journal of Science**, v. 97, n. 1-2, p. 16-18. 2001.
- RUSSELL, J.R.; HOSEIN, F.; JOHNSON, E.; WAUGH, R.; POWELL, W. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. **Molecular Ecology**, v. 2, p. 89-97. 1993.
- SALIMATH, S.S.; OLIVEIRA A.C. de.; GODWIN, I.D.; BENNETZEN, J.L. 1995. **Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers**. *Genome* 38: 757-763.
- 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**, Jaboticabal v.24, n.1, p.015-0022, 2002.
- SANTANA, I.B.B.; OLIVEIRA, E.J.de.; FILHO, W.S.S; RITZINGER, R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M.A.P.C.; MOREIRA, R.F.C.; Variabilidade Genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Rev. Bras. Frutic.** Jaboticabal. v 33 n 3 2011.
- SANTOS, J.M. dos. *Meloidogyne exigua* e *Botryodiplodia theobromae*, principais componentes bióticos de uma doença complexa da seringueira em Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.341, 1995.
- SILVA, G.S. da; RODRIGUES, A.A.C.; SOARES JUNIOR, A.C. Mancha de *Corynespora* em acerola (*Malpighia glabra* L.). *Fitopatologia Brasileira* v22. p 452. 1997 (**Resumo**).
- SILVA, M.V.; SILVA, W.J.L.; MAIA, M.M.D.; BEZERRA, J.E.F.; BURITY, H.A. Perfil isoenzimático da peroxidase em acerola (*Malpighia glabra*). In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13, 1994, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador, BA: SBF, 1994. v 1, p. 94-95.

SILVA, W. SANTANA. da. **Qualidade e atividade antioxidante em frutos de variedade de aceroleira.** 2008. 137p. Dissertação (Mestrado) – tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.

SIMÃO, S. Cereja das Antilhas. In: SIMÃO, S. **Manual de Fruticultura.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1971. cap.15, p. 477-485.

SIVIERO, A.; FURTADO, E.L.; BOAVA, L.P.; BARBOSSO, D.V.; MACHADO, M.A. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasítica* em plântulas e plantas jovens de citros. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 574-580. 2002.

SOUFRAMANIEM, J.; GOPALAKRISHNA, T. **A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers.** Theor Appl Genet, 109:1687-1693.2004.

SOUSA, T.R. de; CARDOSO, J. E.; SOUZA, R. N. M.; CYSNE, A. Q. Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro. In: IV Encontro de iniciação científica da EMBRAPA Agroindústria tropical, **Resumos...**, 2006.

SOUZA, C.M.P. DNA “**Fingerprint**” via marcadores RAPD e avaliação da **divergência genética em genótipos de bananeira (Musa spp.).** 2006. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2006.

SMITH, G.S.; HUTCHISON, D.J.; HENDERSON, T. Comparative use of soil infested with chlamydospores to screen for relative susceptibility to *Phytophthora* foot rot in citrus cultivars. **Plant disease**, v. 75, p. 402-405, 1991.

TARTARINI, S. RAPD markers linked to the *Vf* gene for scab resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetic.** v. 92, p. 803-810. 1996.

TAVARES, S.C.H. **Doenças da acerola no Brasil. Petrolina – PE.** EMBRAPA/CPATSA. 1995.

TAVARES, S.C.C.H. **Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* – situação atual no Brasil e no mundo.** Fitopatologia Brasileira v 27. p 46-52. 2002.

VIANA, F.M.P.; FREIRE, F.C.O.; BARGUIL, B.M.; ALVES, R.E.; CARDOSO, J.E.; VIDAL, J.C. Podridão basal pós-colheita do coco (*Cocos nucífera* L.) no estado do Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p.545. 2002.

VIANA, A.P; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G; SOUZA, M. M. DE; MALDONADO, J.F.M.; JÚNIOR, A.T. DO A: Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro amarelo (*Passiflora Edulis f. Flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD. **REV. BRAS. FRUTIC.**, JABOTICABAL - SP, v. 25, n. 3, p. 489-493, 2003.



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* 23:4407-4414. 1995.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.

WELSH, J.; HONEYCUTT, R.J.; McCLELLAND, M.; SOBRAL, B.W.S. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP PCR). **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, p.473-476. 1991.

WILLIAMS, J.K.G.; KUBELI, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. v. 18, p. 6531-6535. 1990.

WHITESIDE, J.O. Zoospore-inoculation techniques for determining the relative susceptibility of citrus rootstocks to foot rot. **Plant Disease Reporter**, v. 58, p. 713-717. 1974.

WOLFE, A. D.; LISTON, A. **Contributions of PCR- based methods to plant systematics and evolutionary biology**. In: "plant Molecular Systematics II" (D.E. Soltis, P.S. Soltis, and J.J. Doyle, eds.), p.43-46. Kluwer, Boston. 1998.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**. v 20. p173-183, 1994.

ZIMMER, P. D.; OLIVEIRA, A.C.; MALONE, G. **Ferramentas da biotecnologia: no melhoramento genético vegetal**. Pelotas: UFPEL, 2005. 158p.

## **5 CAPÍTULO 2. Análise da diversidade genética de genótipos de aceroleira por meio de marcadores moleculares ISSR**

**Resumo:** A aceroleira (*Malpighia emarginata*) é uma frutífera tropical nativa da América Central e do Norte da América do Sul, sendo de grande importância econômica e social devido ao seu alto teor de vitamina C (ácido ascórbico). Nos pomares brasileiros, observa-se alta variabilidade entre os genótipos cultivados no que se refere a importantes características como cor, sabor, e tamanho do fruto, além do rendimento de polpa, entre outras, resultado da propagação seminal. Esta alta variabilidade tem acarretando sérios problemas ao sistema de produção. No entanto, essa alta variabilidade na cultura permite a identificação de genótipos que venham ao encontro dos interesses agrônômicos. Neste sentido, objetivou-se avaliar a variabilidade genética entre 56 genótipos de aceroleira por meio de iniciadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Amostras de folhas foram coletadas em genótipos pertencentes ao jardim de sementes e jardim clonal cultivadas Pacajus-CE e a extração de DNA e uso de iniciadores foram realizados no laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza-CE. Foram utilizados 20 iniciadores ISSR, que promoveram a formação de 148 bandas polimórficas (79,57%), obtendo-se com média de 9,3 marcadores por iniciador, as quais possibilitaram diferenciações entre os genótipos em estudo. A análise de agrupamento permitiu a divisão dos 56 genótipos de aceroleira em onze grupos de similaridade genética, a uma distância de 0,98, mostrando que os iniciadores ISSR foram eficientes para avaliar e diferenciar os genótipos de aceroleira. Uma estimativa da variabilidade genética entre e dentro das populações foi obtida pela AMOVA. A análise de AMOVA mostrou uma percentagem de variabilidade genética entre populações de 7,87%, e dentro de populações de 92,14%, evidenciando uma alta variação dentro das populações. Portanto, estas informações devem ser utilizadas em futuros trabalhos de melhoramento genético visando obter as melhores combinações entre os acessos estudados.

**Palavras-chave:** *Malpighia emarginata*, melhoramento genético, ISSR, variabilidade, biologia molecular.

**Abstract:** Indian cherry (*Malpighia emarginata*) is a tropical fruit originated from American continent. Its great social and economic importance is mainly due to the high level of ascorbic acid contents. In Brazilian orchards, a high variability in fruit color taste, size, and pulp yield among cultivated varieties is found as a result of seed propagated plants. This variability has posed serious problems to crop system. On the other hand, high variability allows the identification of superior genotypes for cropping industry. This study aimed to evaluate the genetic variability among 56 genotypes using ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) primers. Leaf samples were collected at the seed and clone gardens of Pacajus Experimental Station of Embrapa Agroindústria Tropical, their DNA was extracted and polymerase chain reactions were performed using ISSR primers at the Molecular Biology Laboratory of Embrapa Agroindústria Tropical. Altogether, 20 primers were used which yielded 148 polymorphic bands (79.57%), with an average of 9.3 marker per primer, enabling the differentiation within the population study. Grouping analyses allowed a division of 56 genotypes of Indian cherry into eleven similar groups, at 0.98 showing that ISSR primers were highly efficient to evaluate and differentiate Indian cherry genotypes. An estimate of genetic variability between and within populations was obtained through AMOVA analyses. This analysis showed 7.87% genetic variability between populations and 92.14% within the populations. As a result, this information may be used in future studies on breeding programs, such as choosing best combinations for parental crossings.

**Key-words:** *Malpighia emarginata*, genetic improvement, ISSR. Genetic variability, molecular biology.

## 5. 1 INTRODUÇÃO

A aceroleira é originária de regiões da América Central, Noroeste da América do Sul e Antilhas (NEVES et al., 2002). É uma importante frutífera tropical, planta rústica, que cresce como arbusto ou arvoreta e produz frutos conhecidos pelo elevado conteúdo de ácido ascórbico (vitamina C) (GUEDES et al., 2011).

O cultivo da aceroleira no Brasil intensificou-se rapidamente devido à adaptabilidade da espécie ao clima tropical e subtropical, com uma grande produção de frutos de excelente qualidade e elevado teor de vitamina C, garantindo uma intensa demanda no mercado internacional, sendo exportado principalmente para a Europa, Estados Unidos e Japão (MANICA et al., 2003).

Segundo Paiva et al., (1999), nos pomares brasileiros, observa-se alta variabilidade entre os materiais cultivados no que se refere a importantes características como produtividade, hábito de crescimento e porte da planta, arquitetura da copa, cor, sabor, consistência e tamanho do fruto, além do rendimento de polpa, entre outras, resultado da propagação seminal. Esta alta variabilidade dos materiais genéticos vem acarretando sérios problemas ao sistema de produção, pois dificulta a execução racional de todas as práticas culturais, desorganizando, principalmente, o sistema de comercialização do produtor, com prejuízos para os produtores. Em razão disso, a preservação da variabilidade genética da acerola, mediante a constituição de bancos de germoplasma, tem grande importância tanto do ponto de vista da conservação biológica como da aplicação no melhoramento genético (SALLA et al., 2002).

Os marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica (LANZA et al., 2000). Entretanto, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica limitam sua utilização (GUIMARÃES & MOREIRA, 1999).

Com o advento da biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do DNA, que culminou no surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares (LANZA et al., 2000).

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), um marcador molecular é definido como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondendo a regiões expressas ou não do genoma). Diversas técnicas moleculares estão disponíveis para a

avaliação da diversidade genética em nível de sequência de DNA, ou seja, para a determinação do polimorfismo genético, permitindo a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo.

Dentre as diversas técnicas moleculares, os marcadores moleculares ISSR representam uma das classes mais recentes, e foi desenvolvida a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA (ZIETKIEWICZ et al., 1994; CAIXETA et al., 2006). São facilmente detectados usando poucos equipamentos, são bastante variáveis, e fornecem grande número de dados por um custo razoável para o pesquisador (WOLFE, 2005).

Os marcadores ISSR tem sido utilizados para estimar a extensão da diversidade genética em nível inter e intra-específico em uma ampla variedade de espécies. Devido à sua abundância e dispersão no genoma, tem sido muito empregado para avaliar as relações entre duas populações muito próximas (REDDY et al., 1999a; HUANG & SUN 2000, DESHPANDE et al., 2001). Além disso, também tem sido utilizados em estudos de “fingerprinting”, seleção assistida por marcadores, filogenia e mapeamento genético. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho estimar a variabilidade genética de genótipos de aceroleira utilizando-se marcadores ISSR.

## **5.2 MATERIAL E MÉTODOS**

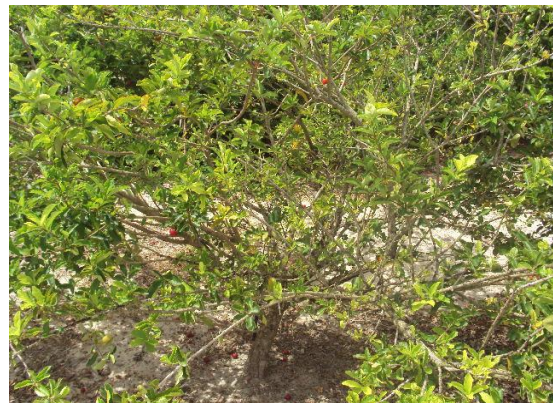
### **5.2.1 Origem dos genótipos**

Para a realização desse trabalho foram utilizados 56 genótipos de aceroleira, sendo 38 genótipos provenientes do jardim de sementes e 18 do jardim clonal. Os 38 genótipos (Figura 1) foram plantados aleatoriamente em uma área, denominada de Jardim de Sementes (Tabela 1). A área desse experimento é composta por 190 mudas enxertadas, no espaçamento de 4 m entre linhas e 4 m entre plantas, esses genótipos são provenientes da continuidade do programa de melhoramento genético desta espécie vegetal da Embrapa Agroindústria Tropical. Já os 18 genótipos do jardim clonal (Figura 2) foram selecionados do jardim de sementes (Tabela 2), composto por 180 mudas, no espaçamento de 4 m por 2 m. Todos os genótipos encontram-se no Campo Experimental de Pacajus da Embrapa Agroindústria Tropical, que está localizado no município de Pacajus-Ce, a 50 km de Fortaleza, em uma região de transição entre o litoral leste e o semiárido, com latitude 4°11'26,62" S e longitude 38°29'50,78".

Foram coletadas folhas jovens de cada uma das três repetições representativas de cada genótipo. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas resfriadas durante o transporte, em caixa de isopor com gelo, até o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram mantidas congeladas à temperatura de -20 °C até o início das extrações de DNA.



**Figura 1:** Jardim de sementes de aceroleira (Fotos: Eveline Lima, 2012).



**Figura 2:** Jardim clonal (Fotos: Eveline Lima, 2012).

**Tabela 1.** Identificação dos 38 genótipos do jardim de sementes.

Identificação da progênie /planta selecionada	Numeração da planta selecionada	Número das plantas no jardim de semente*
8/4/1	1	25, 68, 107, 184, 192
8/4/8	2	15, 33, 122, 132, 171
12/7/3	3	8, 13, 72, 137, 173
20/4/5	4	58, 62, 124, 131, 155
20/6/1	5	34, 38, 117, 142, 162
23/7/9	6	4, 36, 52, 98, 170
26/6/3	7	64, 92, 77, 104, 118
26/6/5	8	19, 22, 23, 78, 160
26/8/7	9	42, 93, 100, 144, 174
38/6/1	10	14, 31, 59, 75, 161
38/7/6	11	11, 30, 123, 128, 188
91/7/9	12	40, 94, 114, 152, 165
47/5/2	13	43, 53, 103, 127, 138
51/3/4	14	9, 10, 26, 46, 71, 177
56/3/4	15	21, 37, 102, 151, 168
56/6/5	16	49, 91, 99, 148, 176
56/7/7	17	1, 18, 44, 83, 95
72/3/3	18	12, 27, 39, 47, 106
72/3/8	19	24, 121, 146, 169, 191
72/7/4	20	69, 89, 110, 135, 139
72/7/8	21	16, 29, 32, 86, 183
79/10/5	22	3, 35, 126, 172, 178, 185
79/10/9	23	2, 17, 74, 87, 112
23/7/16	24	56, 76, 101, 159, 164
26/2/12	25	5, 6, 81, 113, 140
26/2/16	26	65, 105, 116, 149, 175
51/7/16	27	28, 55, 90, 154, 189
87/11/15	28	20, 41, 45, 57, 130
66/7/14	29	61, 88, 115, 133, 150
66/7/15	30	7, 48, 125, 136, 157
68/1/14	31	51, 63, 109, 158, 190
68/1/15	32	60, 67, 85, 167, 186
26/5/13	33	70, 80, 96, 153, 163
51/3/17	34	111, 119, 147, 179, 187
26/8/14	35	73, 134, 141, 145, 181
12/7/15	36	66, 82, 97, 143, 166
20/4/17	37	54, 79, 129, 156, 182
56/7/10	38	50, 84, 108, 120, 180

\*Cada clone apresenta no jardim de sementes cinco repetições.



**Tabela 2.** Identificação dos 18 genótipos do jardim clonal.

Identificação dos 18		
genótipos do jardim clonal	Clones	Origem
39	C71	FRUCESA/CE
40	BRS 152	CPATSA/PETROLINA
41	BRS 235	FRUCESA/CE
42	BRS 236	FRUCESA/CE
43	BRS 237	FRUCESA/CE
44	BRS 238	FRUCESA/CE
45	F. BRANCA	EMBRAPA/CPATU/PA
46	OKINAWA	TOMÉ AÇÚ/PA
47	BARBADOS	TOMÉ AÇÚ/PA
48	MINEIRA	TOMÉ AÇÚ/PA
49	II 47/1	FRUCESA/CE
50	CAMTA 40-2	TOMÉ AÇÚ/PA
51	BV1	EPACE/BARREIRA VERMELHA
52	BV7	EPACE/BARREIRA VERMELHA
53	MONAMI	TOMÉ AÇÚ/PA
54	FP 19	FRUNORTE/RN
55	FLÓRIDA T	C. EXP. DE PACAJUS/CE.
56	C 69	FRUCESA/CE

### 5.2.2 Extração de DNA

O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular na Embrapa Agroindústria Tropical, Campus do Pici, Fortaleza-Ce.

Foram testados os protocolos de extração de Ferreira & Grattapaglia (1995), Cavalcanti (2004) e Doyle & Doyle (1987), adaptado a partir do método utilizando-se o detergente CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) para verificação e escolha do protocolo que fornecesse DNA de qualidade para o trabalho. Após otimização, o protocolo definitivo foi seguido como descrito a seguir.

Aproximadamente, 50 mg de tecido foi macerado em nitrogênio líquido utilizando um microtubo de 2 ml e um bastão. Foram adicionados a cada tubo 800 µL do tampão de extração pré-aquecido, composto dos seguintes reagentes: 100 mM de TRIS-HCL pH 8,0, 20 mM de EDTA (ethylenediaminetetracetate), 1,4 M de NaCl; 2% de CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide); 1% de PVP 40 (Polivinilpirrolidona); e 0,2% de B-mercaptoethanol, sendo posteriormente incubada a 65 °C por 40 minutos, com agitação suave dos tubos a cada 10 minutos. Após essa etapa, foi feita a centrifugação a 1300 rpm, por 5 minutos. Uma fração do sobrenadante (800 µL) foi transferida para novos tubos, onde foram adicionados 800 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), seguindo-se, então, inversões contínuas dos tubos até a solução tornar-se túrgida. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Após nova centrifugação a 1300 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos tubos, onde foi adicionado dois terços do volume de isopropanol gelado, seguindo-se de suave inversão e, posteriormente, repouso em ultrafreezer a -80 °C, por 30 minutos. Novamente foi feita a centrifugação a 1300 rpm, por 10 minutos, obtendo-se um “pellet”. Esse foi lavado duas vezes com 300 µL de etanol 70%, para a retirada de sal presente, e mais uma vez com 300 µL de etanol 95% (entre cada lavagem, o material foi centrifugado a 1300 rpm, durante 10 minutos). Após o descarte do último sobrenadante, o material foi desidratado em condições naturais por, aproximadamente, 30 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 300 µL de solução Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) com RNase numa concentração final de 40 µg/ml e incubado em banho-maria a 37 °C, por 30 minutos. Em seguida, foram feitas adição de 20 µL de NaCl 5 M e 150 µL de isopropanol gelado, para precipitar o DNA novamente, incubando-se essa mistura a -80 °C, por 30 minutos. Após essa etapa o DNA foi sedimentado por centrifugação, a 1300 rpm, por 10 minutos e

lavado, duas vezes, com etanol a 70% e, uma vez, com etanol a 95%. Após a desidratação, o precipitado final foi suspenso em 300 µL de água ultra pura.

### **5.2.3 Integridade do DNA**

Os DNAs extraídos foram visualizados através de eletroforese (100 V, por 30 minutos) em gel de agarose. O gel foi preparado com agarose na concentração de 1% (p/v), TBE (90 mM Tris-ácido bórico/1 mM EDTA) e 3 µl de brometo de etídio. No gel foram aplicadas uma solução de 4 µl de DNA de cada genótipo, 2 µl de corante Blue Juice. Foi utilizado o marcador molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen) para efeito de comparação entre o tamanho dos fragmentos. Após a eletroforese, o gel foi exposto à luz ultravioleta e imediatamente fotografado no equipamento digital Canon PowerShot A620. Em seguida, o DNA foi submetido à quantificação em Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) e diluído para as concentrações adequadas, que foram utilizadas nas reações de ISSR.

### **5.2.4 Seleção dos Iniciadores**

Foram realizados testes preliminares de amplificação com 56 iniciadores ISSR da marca IDT (Integrated DNA Technologies), utilizando quatro genótipos selecionados ao acaso, desses, 25 iniciadores apresentaram os melhores resultados quanto à amplificação em termos de quantidade, nitidez de bandas e polimorfismo gerado pelas bandas. A partir dos resultados obtidos, esses iniciadores foram selecionados para participar da caracterização dos 56 genótipos de aceroleira.

Os padrões de fragmentos que cada iniciador produziu, em cada combinação de fatores, foram avaliados visualmente, tendo-se observado a reprodutibilidade e a intensidade dos fragmentos e a presença de polimorfismo. Finalmente, foram escolhidos 20 iniciadores entre os 25 testados.

### **5.2.5 Condições de Amplificação**

As reações de ISSR foram realizadas em um volume final de 25 µl, compostas por: 2,5 µl de tampão de reação 10x, 1,0 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,2 µl de dNTPs (10 mM/nucleotídeo), 2,0 µl de DNA (10 ng/µl), 2 µl de cada iniciador (10µM), 0,2 µl de Taq DNA polymerase e água ultra pura para completar o volume da reação. Todos os reagentes usados são da marca Invitrogen.

As condições de PCR utilizadas foram: 5 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguindo-se de 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 minuto), anelamento (47-55 °C, dependendo do iniciador, por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto) seguindo-se de uma etapa de extensão final (72 °C por 5 minutos). Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador TECHNE do modelo TC 512. As reações foram preparadas isoladamente. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose (1,8%) corados com brometo de etídeo (0,5 µg/µL) e submetidos a 100 volts por 3 horas. Posteriormente, os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados em foto documentador.

### 5.2.6 Análise Estatística dos Dados

A partir da leitura dos géis gerou-se uma matriz binária em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas. Em seguida, esses dados foram utilizados para construção de uma matriz de similaridade genética onde foi utilizado o coeficiente de similaridade de Jaccard, estimado de acordo com expressão a seguir:

$$I_{AB} = \frac{A}{(A + B + C)}$$

Onde:

A: presença da mesma banda em ambos os indivíduos;

B: presença da banda no indivíduo 1 e ausência no indivíduo 2;

C: ausência da banda no indivíduo 1 e presença no indivíduo 2.

A partir dessa matriz, o método de agrupamento utilizado para a obtenção do dendrograma foi o método UPGMA (Método de média aritmética não ponderada). Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa computacional Genes (CRUZ, 2006).

Para a verificação do ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma, foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (r), conforme Sokal & Rohlf (1962). As análises foram realizadas com auxílio do programa computacional NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000).

A matriz binária também foi utilizada para a divisão da variância entre seus componentes dentro e entre populações (níveis hierárquicos), foram consideradas como populações os genótipos que se originaram do mesmo local, portanto os 56 acessos foi agrupados em sete populações diferentes (Tabela 3). A análise de variância molecular

(AMOVA) foi realizada de acordo com Excoffier et al., (1992), com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2006).

**Tabela 3.** Identificação das sete populações.

<b>População</b>	<b>Acessos</b>	<b>Local de Origem</b>
I	Os 38 genótipos do jardim de sementes, C71, BRS 235, BRS 236, BRS 237, BRS 238 e C 69.	FRUCESA/CE
II	BRS 152	CPATSA/PETROLINA
III	F. BRANCA	EMBRAPA/CPATU/PA
IV	OKINAWA, BARBADOS, MINEIRA, CAMTA 40-2 e MONAMI.	TOMÉ AÇÚ-PA
V	BV1 e BV7	EPACE/BARREIRA VERMELHA
VI	FP 19	FRUNORTE/RN
VII	FLÓRIDA T	C. EXP. DE PACAJUS CE.

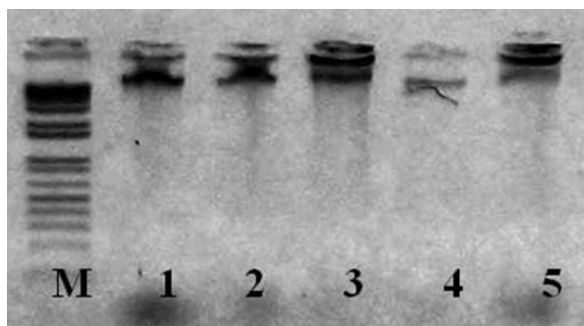
## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Extração de DNA

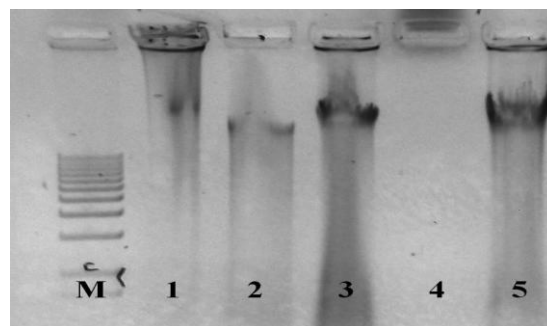
As figuras 3 e 4 mostram os DNAs extraídos pelos protocolos de Ferreira & Grattapaglia (1995) e Cavalcanti (2004), enquanto a figura 5 apresenta os resultados obtidos com o protocolo Doyle & Doyle (1987). Os melhores resultados para a variável qualidade do DNA extraído foram observados utilizando-se o protocolo Doyle & Doyle (1987) adaptado a partir do método CTAB, como tampão de extração.

De acordo com Faleiro (2003), diferentes protocolos de extração de DNA a partir de tecido foliar, como os que utilizam CTAB (Brometo de cetil trimetil amônia) têm sido utilizados e estão bem estabelecidos para diferentes espécies vegetais.

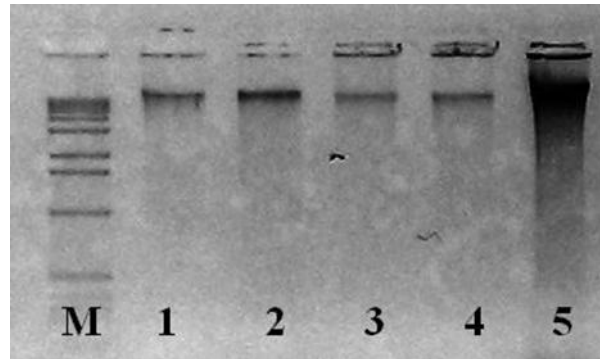
Na análise de pureza do DNA extraído, verificadas pelas relações  $A_{260}/A_{280}$ , constatou-se que foram obtidas amostras de boa qualidade variando de 1,70 a 2,00. A integridade do DNA é fundamental para a nitidez e reprodutibilidade dos produtos de amplificação via PCR (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). As quantidades extraídas foram suficientes para realização de todas as reações.



**Figura 3.** DNA genômico extraído utilizando-se o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1995). Eletroforese realizada em gel de agarose a 1,0%. A primeira e a última coluna correspondem ao marcador de 1 Kb da Invitrogen e as demais são amostras de DNA de aceroleira (colunas de 1 a 5).



**Figura 4.** DNA genômico extraído utilizando-se o protocolo de Cavalcanti (2004). Eletroforese realizada em gel de agarose a 1,0%. A primeira e a última coluna correspondem ao marcador de 1 Kb da Invitrogen e as demais colunas são amostras de DNA de aceroleira (colunas de 1 a 5).



**Figura 5.** DNA genômico extraído utilizando-se o protocolo de Doyle & Doyle (1987). Eletroforese realizada em gel de agarose a 1,0%. A primeira e a última coluna correspondem ao marcador de 1 Kb da Invitrogen e as demais colunas são amostras de DNA de aceroleira (colunas de 1 a 5).

Ferreira et al., (2008), estudando três metodologias de extração de DNA do Buriti (*Mauritia flexuosa* Mart.), a partir de folha e caule, concluíram que o protocolo mais eficiente foi o baseado na metodologia descrita por Doyle & Doyle (1990) e modificada por Faleiro et al., (2003). O mesmo autor enfatiza que essa metodologia possibilitou a extração, a partir de material foliar em todos os indivíduos testados e permitiu também a obtenção de DNA de melhor qualidade. Já Molinari & Crochemore (2001), estudando três protocolos diferentes em *Passiflora spp*, concluíram que os três métodos foram eficientes para a obtenção de DNA de qualidade e em concentrações suficientes para realização do trabalho. Um dos protocolos utilizados foi o protocolo de Doyle & Doyle (1991), mesmo caracterizando o mais demorado, também foi considerado eficiente.

### 5.3.2 Análise da variabilidade genética

A análise dos dados com os 20 iniciadores selecionados revelou variação no número de fragmentos amplificados, totalizando 186 fragmentos de DNA. Foi possível identificar 148 (79,57%) fragmentos polimórficos (Tabela 4), com uma média de 9,3 marcadores por iniciador ISSR. O número de bandas polimórficas por iniciador variou de quatro (I 822) a doze (I 808), e o polimorfismo variou de 42,87% (I834) a 100% (I827). Salla et al., (2002), ao avaliarem a diversidade genética de 24 genótipos de *Malpighia emarginata* utilizando 37 iniciadores RAPD, obtiveram 164 fragmentos de DNA, onde 149 foram polimórficas (90,8%).

Couceiro (1985) cita que a variabilidade detectada com marcadores de DNA concorda igualmente com as informações existentes sobre a origem dos genótipos de acerola cultivados no Brasil. Considera-se que estes genótipos derivam de poucas sementes

trazidas de Porto Rico e multiplicadas por via sexuada. No entanto, apesar de ter uma base genética estreita, uma elevada segregação genética pode ainda ser observada em pomares onde sementes são intensamente utilizadas na produção de mudas (CARVALHO, 1998).

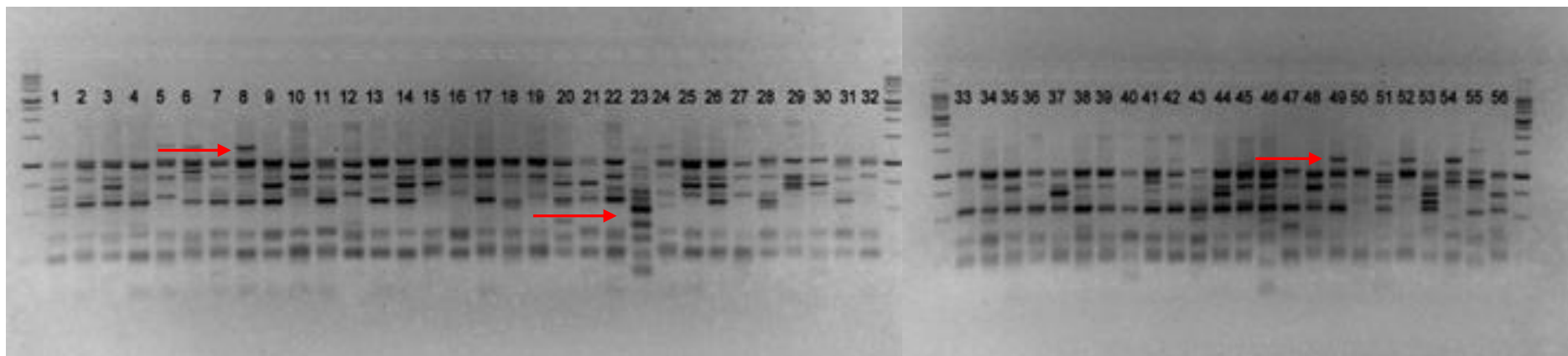
Na Figura 6 encontra-se o padrão obtido a partir do iniciador de código I 841. Segundo Colombo et al., (1998), 7 a 30 iniciadores gerando de 50 a 200 fragmentos são suficientes para estimar relações genéticas dentro e entre espécies.

**Tabela 4.** Sequência do iniciador, bandas geradas e bandas polimórficas obtidas a partir da adoção dos 20 iniciadores ISSR utilizadas na caracterização dos genótipos de aceroleira.

Iniciador	Seqüência (5'→ 3')	Bandas geradas	Bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)
808	5' AGA GAG AGA GAG AGA GC	14	12	85,71
822	5' TCT CTC TCT CTC TCT CA	4	3	75
826	5' ACA CAC ACA CAC ACA CC	9	6	66,66
816	5' CAC ACA CAC ACA CAC AT	8	7	87,5
811	5' GAG AGA GAG AGA GAG AC	9	7	77,77
846	5' CAC ACA CAC ACA CAC ART	15	11	73,33
817	5' CAC ACA CAC ACA CAC AA	9	8	88,88
827	5' ACA CAC ACA CAC ACA CG	10	10	100
812	5' GAG AGA GAG AGA GAG AA	7	3	42,85
857	5' ACA CAC ACA CAC ACA CYG	12	10	83,33
828	5' TGT GTG TGT GTG TGT GA	8	7	87,5
829	5' TGT GTG TGT GTG TGT GC	7	5	73,43
834	5' AGA GAG AGA GAG AGA GYT	10	6	60
818	5' CAC ACA CAC ACA CAC AG	9	8	88,88
830	5' TGT GTG TGT GTG TGT GG	8	7	87,5
848	5' CAC ACA CAC ACA CAC ARG	11	9	81,81
821	5' GTG TGT GTG TGT GTG TT	8	6	75
841	5' GAG AGA GAG AGA GAG AYC	11	8	72,72
823	5' TCTCTCTCTCTCTCTCG	8	7	87,5
844	5' CTC TCT CTC TCT CTC TRC	9	8	88,88
TOTAL		186	148	

**B:** S,G,T; **H:** A, C, T; **Y:** C,T





**Figura 6.** Padrão de amplificação de 56 genótipos de aceroleira utilizando o iniciador I 841. Linhas laterais marcador de 1kb e linhas de 1 a 56 correspondem aos genótipos de aceroleira. As setas indicam as bandas polimórficas.

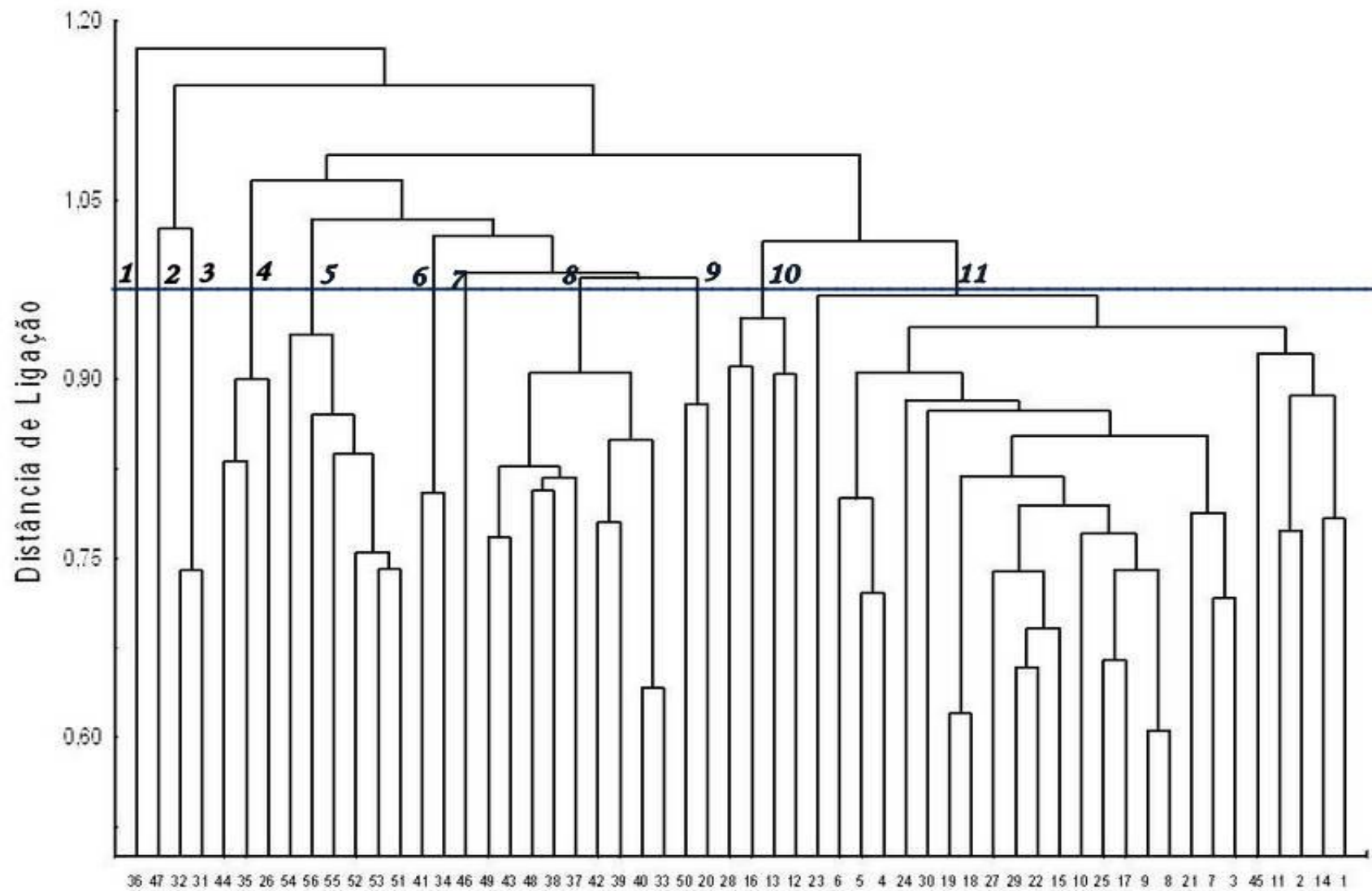
### 5.3.3 Análise de divergência genética

A partir do polimorfismo identificado foi possível determinar a matriz de distâncias entre os acessos. Desta, construiu-se o dendrograma (Figura 7) que apresentou uma correlação cofenética ( $r_c$ ) de 0,71, um valor considerado alto quando comparado com o mínimo de 0,6 sugerido por Manly (1997). Valores acima de  $r=0,70$  são os ideais, pois significa que existe uma forte relação entre os valores na matriz de distâncias e a representação no dendrograma.

As distâncias genéticas entre os 56 acessos variaram entre 0,358 e 0,766. A menor distância genética (0,358) foi obtida entre os genótipos 8 (26/6/5) e 9 (26/8/7). A maior distância genética (0,766) foi observada entre os genótipos 32 (68/1/15) e 36 (12/7/15).

A análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas permitiu dividir os 56 acessos em pelo menos 11 grupos de similaridade genética, para a escolha do ponto de corte no dendrograma foi utilizada a média da matriz de distâncias genéticas (Figura 7). Almeida et al., (2009) trabalhando com 14 cultivares de cana-de-açúcar e oito iniciadores ISSR foram capazes de realizar o agrupamento desses genótipos em seis grupos. Santana et al., (2011), estimando a variabilidade acessos de Umbu-Cajazeira através de 25 iniciadores ISSR verificaram o agrupamento de 17 acessos em cinco grupos principais. Esses resultados demonstram a eficiência dos marcadores ISSR na detecção do polimorfismo genético.

De acordo com Esselman et al., (1999), os marcadores ISSR possuem a vantagem de gerar grandes quantidades de bandas, sendo abundantes ao longo do genoma de eucariontes, assim são bastante úteis na avaliação de populações em estudos genéticos, na detecção da diversidade genética e em estudos de mapeamento genético.



**Figura 7.** Dendrograma obtido a partir da amplificação de 20 marcadores ISSR para 56 de genótipos de aceroleira.

Na Tabela 5 são observados os diferentes grupos com os respectivos genótipos agrupados. Observou-se a formação de grupos isolados, como foi o caso dos grupos I, II e VII, formados pelos acessos 36 (12/7/15), 47 (Barbados) e 46 (Okinawa), respectivamente.

Segundo Vieira et al., (2005), grupos formados por apenas um indivíduo indicam que tais indivíduos são mais divergentes em relação aos demais. Caixeta et al., (2003), estudando variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. por meio de marcadores RAPD, observaram a formação de dois grupos isolados, sendo os mesmos considerados os mais divergentes entre os 44 genótipos estudados.

Observa-se a distância máxima quando estes genótipos são combinados com os outros genótipos estudados, os valores máximos de divergência genética obtidos entre os genótipos 36 (12/7/15) e 32 (68/1/15) (76,60%), 36 (12/7/15) e 31 (68/1/14) (72,40%), 47 (Barbados) e 2 (8/4/8) (76,30%), 47 (Barbados) e 23 (79/10/9) (73,90%), 46 (Okinawa) e 32 (68/1/15) (72,20%) e 46 (Okinawa) e 36 (12/7/15) (71,90%), indicando esses genótipos como o mais divergente entre todos. Estas combinações devem receber uma atenção maior por parte dos programas de melhoramento de acerola, sendo estes genótipos os mais indicados para a utilização em combinações híbridas, devido à alta divergência genética encontrada. Entretanto, a caracterização morfológica e agrônômica, junto com a caracterização molecular, permitirá o acesso de informações mais detalhadas para a criação e o desenvolvimento de novos genótipos, onde o potencial genético de cada espécie será maximizado.

Além destas combinações citadas acima os genótipos 36 (12/7/15), 47 (Barbados) e 46 (Okinawa), poderão ser utilizados em programa de melhoramento em cruzamentos específicos com os genótipos: 4 (20/4/5), 5 (20/6/1), 9 (26/8/7), 25 (26/2/12) e 38 (56/7/10). Bandeira (2012), ao realizar estudos sobre a morfologia destes mesmos genótipos observou uma alta floração durante os anos de 2010 e 2011 para os clones citados acima. Este conhecimento é da maior importância para o produtor de acerola, pois poderá ocorrer uma alta taxa de frutificação efetiva.

De acordo com Fonseca et al., (2006), alta variabilidade genética possibilita a identificação de genótipos divergentes e, por conseguinte, possíveis combinações híbridas de maior efeito heterótico, e assim, permitindo em suas gerações segregantes o desenvolvimento de genótipos superiores. Devendo-se, portanto, na seleção de genitores para cruzamentos, procurar sempre aliar o bom desempenho fenotípico dos genótipos com a divergência genética.

Os grupos III, VI e IX foram formados por dois acessos cada, sendo, os clones 32 (68/1/15) e 31(68/1/14), 41 (BRS 235) e 34 (51/3/17) e 50 (Camta 40-2) e 20 (71/7/4), respectivamente.

O grupo IV é formado por três clones (44, 35 e 26), sendo o clone 44 (clone BRS 238) originado da fazenda Frucesa em Jaguaruana-CE e os outros dois, 26 (26/2/16) e 35 (26/8/14), provenientes da continuidade do programa de melhoramento genético da aceroleira, da Embrapa Agroindústria Tropical. Entretanto, estes dois últimos genótipos, apesar de terem sido melhorados, também foram originados a partir de uma seleção realizada no pomar da fazenda Frucesa, Jaguaruana-CE, justificando assim o maior grau de similaridade entre esses clones.

O grupo V foi formado por clones de origens distintas, com exceção dos clones 51 (BV1) e 52 (BV7) que são provenientes da EPACE (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará) /Barreira Vermelha-CE.

O grupo VIII é formado pelos clones 49 (clone II 47/1), 43 (BRS 237), 48 (Mineira), 38 (56/7/10), 37 (20/4/17), 42 (BRS 236), 39 (C71), 40 (BRS 152) e 33 (26/5/13), sendo os clones 33(26/5/13) e 40 (BRS 152) os mais similares com distância igual a 0,397.

O grupo X é constituído por quatro clones, 28 (87/11/15), 16 (56/6/5), 13 (47/5/2) e 12 (91/7/9), todos apresentaram grande similaridade entre eles, o que era de se esperar já que todos se originaram no mesmo local, fazenda Frucesa, Jaguaruana-CE.

Em relação ao grupo XI, este concentrou o maior número de clones 23 (79/10/9), 6 (23/7/90), 5 (20/6/1), 4 (20/4/5), 24 (23/7/16), 30 (66/7/15), 19 (72/3/8), 18 (72/3/3), 27 (51/7/16), 29 (66/7/14), 22 (79/10/9), 15 (56/3/4), 10 (38/6/1), 25 (26/2/12), 17 (56/7/7), 9 (26/8/7), 8 (26/6/5), 21 (72/7/4), 7 (26/6/3), 3 (12/7/3), 45 (F. Branca), 11 (38/7/1), 2 (8/4/8), 14 (51/3/4) e 1 (8/4/1), com 44,64% de todos os clones avaliados, ou seja, estes se mostraram bem semelhantes, o que era de se esperar, uma vez que são todos provenientes do jardim de sementes e originados do programa de melhoramento genético da Embrapa Agroindústria Tropical. Os genótipos 8 e 9 foram os mais similares entre todos os estudados, com uma distância de 0,358. Bandeira (2012), estudando a divergência genética destes mesmos clones utilizando-se caracteres de pós-colheita, encontrou a menor distância entre os genótipos 8 e 9 ( $D^2 = 2,01$ ).

**Tabela 5.** Grupos obtidos a partir da amplificação de 20 iniciadores ISSR para os 56 genótipos de aceroleira através do ponto de corte.

Grupos	Acessos
I	36 (12/7/15).
II	47 (Barbados).
III	32 (68/1/15) e 31(68/1/14).
IV	44 (BRS 238), 35 (26/8/14) e 26 (26/2/16).
V	54 (FP 19), 56 (C69), 55 (f.t), 52 (BV 7), 53 (Monami) e 51(BV1).
VI	41 (BRS 235) e 34 (51/3/17).
VII	46 (Okinawa).
VIII	49 (II 47/1), 43 (BRS 237), 48 (Mineira), 38 (56/7/10), 37 (20/4/17), 42 (BRS 236), 39 (C71), 40 (BRS 152) e 33 (26/5/13).
IX	50 (Camta 40-2) e 20 (71/7/4).
X	28 (87/11/15), 16 (56/6/5), 13 (47/5/2) e 12 (91/7/9).
XI	23 (79/10/9), 6 (23/7/90), 5 (20/6/1), 4 (20/4/5), 24 (23/7/16), 30 (66/7/15), 19 (72/3/8), 18 (72/3/3), 27 (51/7/16), 29 (66/7/14), 22 (79/10/9), 15 (56/3/4), 10 (38/6/1), 25 (26/2/12), 17 (56/7/7), 9 (26/8/7), 8 (26/6/5), 21 (72/7/4), 7 (26/6/3), 3 (12/7/3), 45 (F. Branca), 11 (38/7/1), 2 (8/4/8), 14 (51/3/4) e 1 (8/4/1).

Lopes et al., (2002), estudando o polimorfismo isoenzimático de aceroleira, sugerem que o alto grau de polimorfismo observado nesta cultura seja um indicativo de considerável taxa de cruzamento, confirmando a predominância de/ alogamia da aceroleira. Segundo Oliveira et al., (2007), estudos de diversidade sugerem que há uma tendência em germoplasma de plantas arbóreas e arbustivas, alógamas ou autógamas com alta taxa de alogamia, especialmente naquelas pouco melhoradas, apresentarem alto polimorfismo. Portanto, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho constata-se a possibilidade de se obter ganhos genéticos significativos com o emprego dos genótipos considerados nesta avaliação a partir do seu emprego em futuros programas de melhoramento.

Com as informações obtidas pela análise molecular (AMOVA) realizada com base nos dados de 148 bandas polimórficas, verificou-se que 7,87% da variabilidade genética total estão contidas entre as populações e 92,14% dentro da população, conforme Tabela 6. A habilidade dos indivíduos em trocar alelos, associadas ao fluxo gênico entre populações, reduzem as diferenças entre populações por deriva genética e seleção, reduzindo a diversidade genética entre populações (KAGEYAMA, 2003). Segundo Loveless & Hamrick (1984), espécies tipicamente alógamas ou de sistema misto apresentam alta variação genética dentro de suas populações e baixa entre elas.

**Tabela 6.** Análise de variância molecular (AMOVA) para 56 genótipos de aceroleira coletados em dois diferentes experimentos e avaliados com 148 marcas de ISSR. GL: graus de liberdade; SQ: somatória do quadrado dos desvios e P: percentagem variação.

Fonte de variação	GL	SQ	Total da variação (%)	P
Entre Populações	6	172,8484	7,87	(<0,001)
Dentro de Populações	49	1108,0444	92,14	(<0,001)
TOTAL	55	1280,8929	100,00	
F <sub>ST</sub>	0,0787			

Fst: Divergência genética entre populações.

Em trabalhos com pitanga foi observado maior variação dentro de populações (MARGIS et al., 2002; SALGUEIRO et al., 2004). Em trabalho realizado por Brandão (2008) utilizando marcadores ISSR, observou-se a maior parte da diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW) DC. (Myrtaceae) dentro das populações, tanto nos ambientes de vegetação primária (96,49%), quanto nos ambientes de vegetação secundária (91,15%). De acordo com Nybom & Bartish (2000), estimativas de diferenciação genética entre populações cuja

fecundação é cruzada, são, em média iguais a 28%, obtidas a partir de marcadores dominantes e calculadas pela AMOVA.

O valor  $F_{st}$  observados no presente trabalho foi de 0,0787 (Tabela 6). De acordo com Wright (1978) citado por Mwase et al., (2006), valores de  $F_{st}$  entre 0,05 e 0,15 sugerem moderada diferenciação genética entre populações. Neste trabalho, o valor  $F_{st}$  esta dentro desta faixa.

#### **5.4 CONCLUSÃO**

Há significativa variabilidade genética entre os clones estudados. Os clones 36 (12/7/15), 47 (Barbados) e 46 (Okinawa) foram os mais divergentes, podendo ser indicadas para cruzamentos em programa de melhoramento da cultura da aceroleira.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C.M.A. de.; LIMA, S.E.N.de.; LIMA, G.S. de. A.; BRITO, J. Z. de.; DONATO, V.M. T.S.; SILVA, M. V. da.; Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciênc. agrotec.** Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1771 -1776, 2009.
- BRANDÃO, M.M. **Diversidade genética de *Myrcia Splendens* (S.W) DC. (MYRTACEAE) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no Sul de Minas Gerais.** 2008. 80f, Dissertação (Mestrado em engenharia ambiental)- Universidade Federal de Lavras. Lavras.
- BANDEIRA, M.P.E. **Caracterização de genótipos de aceroleira por meio de características agronômicas e de pós-colheita.** Fortaleza, CE: UFC, 2012. 113p. Dissertação de Mestre em Agronomia.
- CAIXETA, R.P.; CARVALHO, D.; ROSADO, S.C.S.; TRUGILHO, P.F. Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectada por meio de marcadores moleculares. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 357-363, 2003.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Editora). **Marcadores moleculares.** Viçosa, Editora Folha de Viçosa. 2006. p. 9-78.
- CARVALHO, R.I.N. Variabilidade em plantas jovens de aceroleira propagadas por semente. **Agropecuária Catarinense**, v. 11, n. 1, p. 16-18. 1998.
- CAVALCANTI, J.J.V. **Genetic Mapping and QTL Identification in Cashew (*Anacardium occidentale* L.).** 2004. 178f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - The University of Reading, UR, Inglaterra, 2004.v 6. p 279.
- COLOMBO, C.; Second, G.; Valle. T.L.; Charrier. A.; Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) with RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 1, p. 105-113, 1998.
- COUCEIRO, E. M. **Curso de extensão sobre a cultura da acerola.** Recife: UFRPE. 45p. 1985.
- CRUZ, C. D.. **Programa Genes - Biometria.** 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV. v. 1. 2006, p 382.
- DESHPANDE. K.U.; APTE. G.S.; BAHULIKAR. R.A.; LAGU. M.D.; KULKARNI. B.O.; SURESH. H.S.; SINGH. N.P.; RAO. M.K.; GUPTA. V.S.; PANT. A.; RENJEKAR. P.K.; Genetic diversity across natural populations of montane plant species from the western Ghats, India revealed by inter-simple sequence repeats. **Mol Ecol.** v10. p2397-2408, 2001.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** v1, p 13-15, 1991.
- DOYLE, J.J.; J.L. DOYLE. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** v 12, p13-15, 1990.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15. 1987.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**. V. 131, p479-491, 1992.

ESSELMAN, E.J.; JIANQIANG, L; CRAWFORD, D.J.; WINDUSS, J.L.; WOLFE, A.D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *Inspersata* (*Poaceae*) : comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v.8, p.443-451, 1999.

FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R., KARIA, C.T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 6 p. (Comunicado Técnico, 92)

FERREIRA, M.F.M.; PIMENTA, M.A.S.; MELO JÚNIOR, A.F.de.; TISSOT, S.A.; FERREIRA, P.H.G.; VALÉRIO, H.M.; OLIVEIRA, D.A.de.; **Avaliação da eficiência de três metodologias de DNA do Buriti (*Mauritia flexuosa* Mart.) a partir de folhas e caules**. II Simpósio Internacional savanas Tropicais. 12 a 17 de out. 2008. Porta Mundial, Brasília. DF.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética**. Embrapa, Cenargem, Brasília, DF. 220 p.1995.

FONSECA, A.F.A.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C.D.; SAKAYAMA, N.S.; FERRÃO, M.A.G.; BRAGANÇA, S.M. **Divergência genética em café conilon**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.4, p.599-605. 2006.

GUEDES, R.S; ZANELLA, F.C.V.; MARTINS, C.F.; SCHLINDWEIN, C. Déficit de Polinização da aceroleira no período seco no semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 465-471, 2011.

GUIMARÃES, C.T., MOREIRA, M.A. **Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas**. In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV, 1999. p.715-740.

HUANG, J.C.; SUN, M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (*Convolvulaceae*) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. **Theor. Appl. Genet.** V 100, p 1050-1060, 2000.

KAGEYAMA, P.Y. 2003. Reflexos e potenciais da resolução SMA-21 de 21/11/2001 na conservação da biodiversidade específica e genética. **Anais do seminário temático sobre recuperação de áreas degradadas**. 7-12.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. **Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 21, n. 197, p. 97-108, 2000.

LOPES, R.; BRUCKNER, C.H.; FINGER, F.L.; LOPES, M.T.G. Polimorfismo isoenzimático e potencial de utilização das isozimas como marcadores genéticos em aceroleira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.2, p.151-158, 2002.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. **Ecological determinants of genetic structure in plant populations**. Annual Review of Ecology and Systematics, Palo Alto, v. 15, p. 65-95, 1984.

MANICA, I.; ICUMA, I.M.; FIORAVANÇO, J.C.; PAIVA, J.R.; PAIVA, M.C.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Acerola- Tecnologia de produção, pós-colheita, congelamento, exportação, mercado**. Porto Alegre: Editora Cinco Continentes, 2003, p 394.

MANLY B.F.J.; **Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology**. Chapman e Hall, London, 1997. 281p.

MARGIS, R.; FELIX, D.; CALDAS, J.F.; SALGUEIRO, F.; ARAÚJO, D.S.D.; BREYNE, P.; VAN MONTAGU, M.; OLIVEIRA, D.DE; MARGISPINHEIRO, M. Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. **Biodiversity and Conservation**, London, v.11, n.1, p.149-163, 2002.

MOLINARI, H. B.; CROCHEMORE, M. L. Extração de DNA genômico de passiflora spp. para análises PCR-RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 447-450, 2001.

MWASE, W.F.; BJORNSTAD, A.; STEDJE, B.;BOKOSI, J.M.; KWAPATA, M.B. Genetic diversity of *Uapaca kirkiana* Muel. Arg. populations as revealed by amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi,v5, n13, p.1205-1213, 2006.

NEVES, C.S.V.J; MURATA, I.M.; AINDA, F.T; BORGES, A.V; FONSECA, I.C. de B.; Recuperação de plantas de genótipos de aceroleira afetadas por geada no norte do Paraná, Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 173-178. 2002.

NYBOM, H.; BARTISH, I. **Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants**. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, Zurich, v. 3/2, p. 93-114, 2000.

OLIVEIRA, M.G; OLIVEIRA, J.G; FILHO, A,G; PEREIRA, M.G; VIANA, A,P; FILHO,G. A S.; LOPES, G.E. M; Diversidade genética de aceroleiras (*malphigia emarginata* D.C.), utilizando marcadores moleculares rapd e características morfoagronômicas. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - sp, v. 31, n. 1, p. 162-170, março 2009.

OLIVEIRA, M. S. P.; AMORIM, E. P.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, D.F. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. **Ciências Agrotécnicas**. Lavras, v. 31, n. 6, p. 1645-1653, 2007.

PAIVA, J.R.; ALVES, R.E.; CORREA, M.P.F.; FREIRE, F.C.O.; BRAGA SOBRINHO, R. **Seleção massal de acerola em plantio comercial**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.34, n.3, p.505- 511, 1999.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1.** Exeter Software, New York, 2000. 98p.

Reddy K.D.; NAGARAJU J.; ABRAHAM E.G. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. **Heredity** v 83, p 681–687, 1999a.

SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J.F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity and Distributions**, Oxford, v.10, n.3, p.201-210, 2004.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Berlin, v.11, n.1, p.30-40, 1962.

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**, Jaboticabal v.24, n.1, p.015-022, 2002.

SANTANA, I.B.B.; OLIVEIRA, E.J. de.; FILHO, W.S.S; RITZINGER, R; AMORIM, E.P; COSTA, M.A.P.C.; MOREIRA, R.F.C. (2011) Variabilidade genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Rev. Bras. Frutic.** Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

VIEIRA, E.A.; FIALHO, J.F.; FALEIRO, F.G.; FUKUDA W.M.G.; JUNQUEIRA N.T.V. Variabilidade genética para caracteres morfológicos entre acessos do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Cerrados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 11., 2005, Campo Grande. **Anais...** CD-ROM, 2005.

WOLFE, A. D. **ISSR techniques for evolutionary biology.** Methods Enzimol. v 395, p 134-144, 2005.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics.** v 20. p173-183, 1994.

## 6. CAPÍTULO 3. Variabilidade genética para à reação a *Lasiodiplodia theobromae*

**Resumo:** O Nordeste brasileiro, por suas condições edafoclimáticas, é a região do país onde a aceroleira melhor se adapta o que incentiva a instalação de grandes empreendimentos agroindustriais em torno desta cultura, favorecendo o surgimento de empregos nessa região. Porém, um dos fatores limitantes nas áreas produtoras é a doença causada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*. A resistência genética é o método mais promissor no controle deste fitopatógeno. Entretanto, a seleção de clones resistentes em campo é onerosa e demorada. Portanto, a inoculação artificial em mudas jovens se faz necessária para a superação desse problema. Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar a variabilidade genética de aceroleira quanto à reação à *Lasiodiplodia theobromae* utilizando o método de inoculação artificial. O trabalho foi realizado em casa de vegetação, Laboratório de Fitopatologia pertencente a Embrapa Agroindústria Tropical. Os clones 13 (47/5/2), 32 (68/1/15) e 36 (12/7/15) mostraram-se mais resistentes ao fungo em estudo, já os clones 10 (38/6/1), 11 (38/7/6) e 14 (51/3/4) apresentaram susceptíveis. De acordo com os resultados, a técnica de inoculação viabiliza a identificação de genótipos resistentes e divergentes ensejando uma maior eficiência no melhoramento para resistência.

**Palavras-Chave:** Estágio juvenil, Clones, Resistência genética, seleção, e fungo.

**Abstract:** Brazilian Northeast, as for its edaphoclimatic conditions, is a country region where Indian cherry may be well-adapted, a fact which promotes great agriculture and industries to install projects, increasing labor demand. However, one of the main constrain in production is increase of disease caused by *Lasiodiplodia theobromae*. Genetic resistance is the most feasible way to manage this plant pathogen. Meanwhile, selection of resistant plants is both costly and time consuming. Therefore, artificial inoculation of juvenile plants should be necessary to overcome this constraint. This work had the objective of evaluate genetic variability as to the reaction to *L. theobromae* using an artificially developed method of inoculation. The study was carried out at Embrapa Agroindústria Tropical greenhouse. Indian cherry clones 13 (47/5/2), 32 (68/1/15) and 36 (12/7/15) showed the most resistance, while 10 (38/6/1), 11 (38/7/6) and 14 (51/3/4) were the most susceptible. These data pointed that the method of inoculation makes it possible to identify resistant and divergent genotypes, which may enhance breeding programs for Indian cherry resistance.

**Key-words:** juvenile stage, clone, genetic resistance, selection, fungus.

## 6.1 INTRODUÇÃO

*Lasiodiplodia theobromae* (syn. *Botryodiplodia theobromae* Pat. (SUTTON, 1980) é um fungo típico de regiões tropicais e subtropicais, sendo patogênico a numerosas espécies vegetais, como a gravioleira, ateira e o sapotizeiro (PONTE, 1985; FREIRE et al., 2004). Também é patógeno a diversas espécies que são de grande importância econômica para o país como o cajueiro, a mangueira, o coqueiro, a aceroleira e o maracujeiro, todas cultivadas em regiões tropicais e subtropicais (TAVARES, 1995; FREIRE, 1995; VIANA et al., 2002; FREIRE & CARDOSOS, 2003; FREIRE, 2002).

Em relação à cultura da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) são relatadas diversas doenças fúngicas, destacando-se a antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. e *C. dematium* (Pers. ex Fr.) Grove que, segundo Alves et al. (1995), é a doença mais difundida no Brasil. No Nordeste, em pomares de acerola situados em áreas irrigadas do vale do São Francisco, foram constatados os fungos *Fusarium oxysporum* Schlecht, causando seca rápida de toda planta e levando à morte, e *Botryodiplodia theobromae* Pat., que reduz o vigor, e provoca secamento descendente (TAVARES, 1995). No estado do Ceará, Holanda et al., (1997) realizaram o mapeamento das doenças da aceroleira nas zonas fisiográficas do Sertão, Litoral e Serras Úmidas, sendo constatado a podridão dos frutos e a podridão seca das hastes causadas, respectivamente, por *Rhizopus nigricans* Ehr. e *Lasiodiplodia theobromae* (Pat) Griff. & Maubl. (= *Botryodiplodia theobromae* Pat.).

De acordo com Freire & Cardoso (2003), *Lasiodiplodia theobromae* causa uma enfermidade em aceroleira denominada podridão-seca, que vem assumindo considerável importância econômica, por provocar a morte de um grande número de plantas, tanto em pomares caseiros como em plantios comerciais. A seca do ramo inicia-se a partir da extremidade, avançando em direção ao caule. A infecção pode, raramente, se iniciar pelo sistema radicular. A morte descendente de um ramo pode demorar meses para atingir o caule e provocar a morte da planta.

Segundo Paiva et al., (2002) o processo de obtenção de clones resistentes requer programas de melhoramento demorados e onerosos, já que os primeiros sintomas são observados a partir do segundo ano após o plantio. A inoculação artificial, portanto, torna-se necessária para a superação desses problemas. Os primeiros testes visando definir uma metodologia de inoculação foram desenvolvidos recentemente, revelando aspectos preliminares para viabilização de uma metodologia padrão (COSTA, 2006).

As metodologias de inoculação e de avaliação em condições de casa de vegetação são de grande importância, principalmente nos programas de melhoramento de plantas visando resistência a patógenos, pois podem ser executados em quaisquer épocas do ano agilizando, viabilizando e reduzindo os custos destes programas. Entretanto, eles necessitam ser ajustados para cada patossistema patógeno/planta hospedeira (SOUSA et al. 2003; LIMA, 2011).

Teve-se como objetivo neste trabalho a identificação de variabilidade genética em genótipos de aceroleira quanto à reação a *Lasiodiplodia theobromae*.



## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Embrapa Agroindústria Tropical, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, no Laboratório de Fitopatologia (crescimento e esporulação do fungo) e em casa de vegetação (estudos dos métodos de inoculação).

### 6.2.1 Obtenção das mudas

Foram feitas avaliações no campo de jardim de sementes onde se realizou o diagnóstico a partir de genótipos com sintomas da doença causada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*. Os critérios de avaliação utilizados nas plantas de acerola foram os seguintes: nota 0- sem sintomas; 1- pequena e pouca presença de podridão seca das hastes (quase sem sintomas); 2- hastes secas maiores, espalhadas pelos ramos ou no tronco (1/3 da circunferência); 3- hastes secas maiores que 1/3 da planta; 4- podridão seca das hastes atingindo toda planta com seca do(s) ramo(s). Após a avaliação no campo, foram selecionadas seis repetições de diferentes clones de aceroleira (Tabela 1), sendo três considerados resistentes clones 10 (38/6/1), 11 (38/7/6) e 13 (47/5/2): não apresentaram os sintomas, nota zero e três considerados susceptíveis clones 14 (51/3/4), 32 (68/1/15) e 36 (12/7/15): plantas doentes, notas variando de 3 a 4. Após a escolha das mudas foi feito um teste preliminar, com mudas de 4 meses de idade, onde não houve diferença na inoculação. Portanto, com base nesse teste foi feita uma nova inoculação em mudas mais velhas, com 6 meses de idade. Todo material utilizado para este estudo foi proveniente da estação experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, de Pacajus - Ce. Todas as mudas de aceroleira foram enxertadas sobre porta enxerto e aclimatadas em casa de vegetação a uma temperatura média de 30 °C, umidade de 70% e receberam uma lâmina d'água de 15 mm diários de irrigação do tipo localizada, por meio de microaspersores.

**Tabela 1.** Identificação dos clones de aceroleira.

Clones	Planta*
10 (38/6/1)	59
11 (38/7/6)	11
13 (47/5/2)	103
14 (51/3/4)	26
32 (68/1/15)	67
36 (12/7/15)	82

\*Planta: Plantas que compõem a parcela, repetições (cinco).

### **6.2.2 Obtenção do fungo *Lasiodiplodia theobromae***

Para a obtenção do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, foram feitas avaliações no jardim de sementes onde foram coletados material vegetal infectado pelo fungo. Em seguida, esse material vegetal foi levado para o Laboratório de Fitopatologia/Embrapa/Fortaleza onde se procedeu o isolamento do patógeno. Após o crescimento do mesmo, este foi usado no teste de patogenicidade nas mudas de aceroleira.

### **6.2.3 Avaliação de diferentes métodos de inoculação**

Foram realizados testes preliminares para a escolha do melhor método de inoculação. Foram utilizados os clones BRS 152 e BRS 236, na qual foram avaliados três métodos de inoculação: Corte em Bisel, Furadeira e Palito. As mudas dos clones de aceroleira foram obtidas do campo experimental da Embrapa localizado em Pacajus-Ce e levadas para a Embrapa/Fortaleza-CE.

#### **Método do Bisel**

O patógeno foi cultivado em placas contendo BDA, durante sete dias. Após esse período, um disco de 0,5 cm de diâmetro do micélio foi retirado e introduzido em um corte na muda de aceroleira feito a 13 cm acima do ponto de enxertia, e a uma profundidade de corte de cinco milímetros (largura da lâmina do bisturi). Imediatamente após a inoculação, o caule cortado foi coberto com vaselina sólida e externamente protegido com fita Parafilm®.

## **Método do Palito**

O patógeno foi cultivado em placas contendo BDA, durante sete dias, foi colocado palito de dente esterilizado dentro da placa, depois do crescimento micelial as mudas de acerola foram furadas com auxílio de uma furadeira elétrica e broca de 2 mm, em uma altura de 13 cm acima do ponto de enxertia e com profundidade aproximada de 2 mm. No local perfurado foi colocado o palito de dente contendo o fungo *L. theobromae*, sendo depois coberto com vaselina sólida e externamente protegido com fita Parafilme®.

## **Método da Furadeira**

Os caules das plantas foram furados, com auxílio de uma furadeira elétrica e broca de 2 mm, 13 cm acima do ponto de enxertia e à profundidade aproximada de 2 mm no interior da planta. O inóculo, constituído de disco de micélio de *L. theobromae* crescido em BDA, foi introduzido no local perfurado que, em seguida, foi coberto com vaselina sólida e externamente protegido com Parafilm®.

A avaliação da infecção foi realizada 15 dias após a inoculação do fungo, medindo-se o comprimento das lesões internas observadas nas plantas, mediante corte longitudinal do caule das mudas. Os dados obtidos do comprimento da lesão foram analisados utilizando o programa estatístico Sisvar (versão 5.3). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P=0,05$ ).

### **6.2.4 Caracterização Genética à reação a *Lasiodiplodia Theobromae***

Para o experimento, foram utilizadas 10 repetições de cada clone, conduzido em um delineamento inteiramente causalizado (DIC), em que foi inoculado um isolado. Os tratamentos foram constituídos dos seis clones mais dois controles de cada clone, totalizando 72 mudas inoculadas.

O método que foi utilizado para inoculação das 72 mudas foi o da furadeira descrito acima, sendo que nas 12 mudas dos tratamentos controle foram colocados discos do meio de cultura BDA esterilizado, sem presença do fungo.

A avaliação da agressividade do patógeno com base nos sintomas foi realizada 15 dias após a inoculação do fungo, através de medição do comprimento das lesões internas observadas nas plantas (cm), após corte longitudinal do caule das mudas.

O reisolamento do fungo a partir das lesões avaliadas, visando comprovar a presença do mesmo nos tecidos infectados. Foi isolado em placas de Petri contendo ágar-água, um fragmento do tecido do caule de cada muda, totalizando 10 pedaços do material lesionado por tratamento, os quais foram avaliados, após 3 dias. Procedimento semelhante foi realizado a partir das mudas não inoculadas que constituíram os tratamentos controle.

Os dados coletados de cada tratamento foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003), sendo transformado para  $(X+0,5)^{0,5}$ . As médias foram comparadas por meio do teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.3.1 Avaliação de diferentes métodos de inoculação

Após a análise estatística dos dados observou-se que na avaliação dos sintomas internos (Tabela 2) não houve diferença estatística entre os tratamentos que fizeram uso de inoculações artificiais sobre o clone BRS 152, seja pelo método do Bisel, Palito ou pelo método da Furadeira. Já o clone BRS 236 evidenciou diferença estatística entre os tratamentos que fizeram uso de inoculações artificiais, seja pelo método do Bisel, Furadeira ou pelo método Palito.

Smith et al., (1991), trabalhando com *Phytophythora* spp. em citros, ressaltaram que o método do Bisel é severo, devido ao alto potencial de inóculo, pois a densidade do inóculo pode afetar a susceptibilidade da planta ao patógeno, fato que não foi comprovado, já que estatisticamente este método foi o que apresentou menor comprimento da lesão.

Já o método do Palito, mostrou-se bastante agressivo, podendo interferir nos resultados. Portanto, o método escolhido foi da Furadeira, por se apresentar um método menos agressivo.

**Tabela 2.** Comprimento médio da lesão interna (mm) em plantas de aceroleira inoculadas por três métodos.

Clone	Método de inoculação	Comprimento médio da lesão (cm)	
BRS 152	Testemunha	0,0	b
	Bisel	10,7	a
	Palito	16,9	a
	Furadeira	14,0	a
BRS 236	Testemunha	0,0	c
	Bisel	3,8	a
	Palito	18,5	b
	Furadeira	14	b

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

### 6.3.2 Avaliação a reação a *Lasiodiplodia Theobromae* pelo método da furadeira

A avaliação dos sintomas internos mostrou que houve diferença estatística entre os tratamentos que fizeram uso de inoculações artificiais, de acordo com as lesões apresentadas pelas mudas após quinze dias de inoculação (Tabela 3). Foram observados sintomas de escurecimento e até morte da planta. De acordo com Cardoso et al., (2005), plantas infectadas por *L. theobromae* exibem seus sintomas mais intensamente quando sob condições de estresse.

**Tabela 3.** Comprimento médio da lesão interna (cm) em mudas de aceroleira inoculadas pelo método furadeira. Fortaleza – CE, 2012.

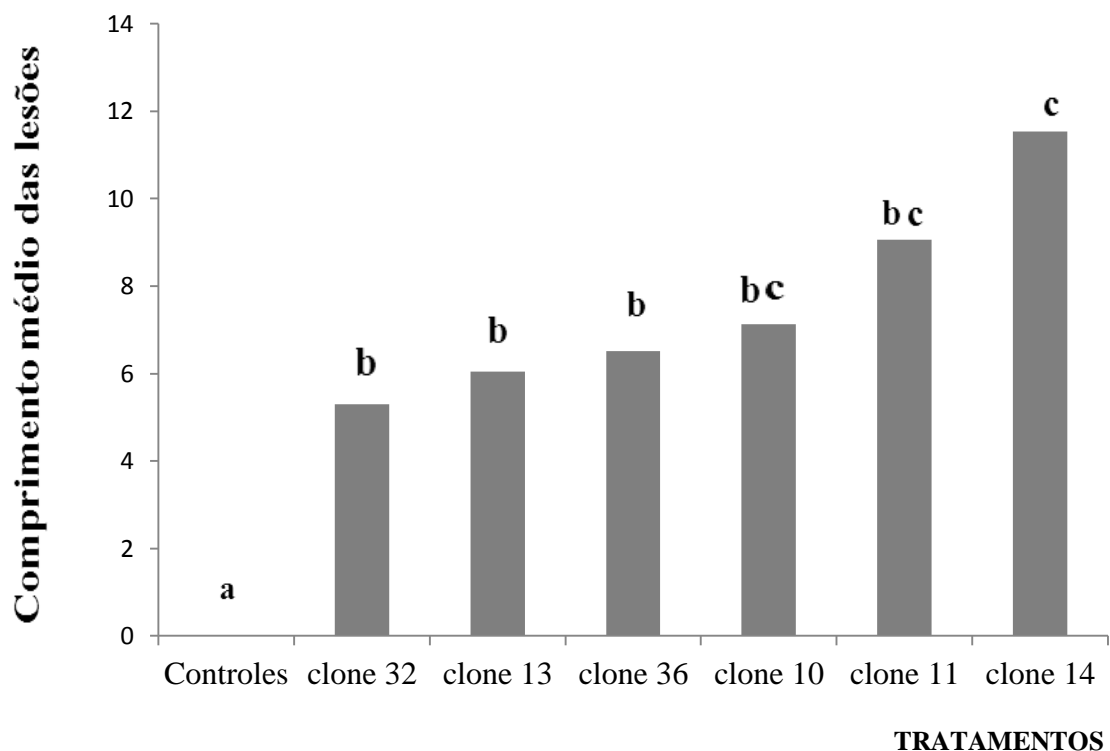
Clones	Comprimento médio da lesão (cm)	
Controle	0,0	a
10 (38/6/1)	7,13	bc
11 (38/7/6)	9,06	bc
13 (47/5/2)	6,04	b
14 (51/3/4)	11,53	c
32 (68/1/15)	5,3	b
36 (12/7/15)	6,52	b

CV(%): 24,543

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O comprimento médio das lesões nas mudas de aceroleira inoculadas com o fungo *L. theobromae* variou de 5,3 a 11,53 cm. Nas mudas dos clones 10 (38/6/1), 13 (47/5/2), 32 (68/1/15) e 36 (12/7/15) inoculadas com o fungo, o comprimento das lesões variou entre 0,00 a 11,40; 2,30 a 13,40; 1,20 a 14,30; e 1,60 a 14,30, respectivamente, apresentando os menores comprimentos de lesão não diferindo estatisticamente entre si. Os clones 10 (38/6/1), 11 (38/7/6) e 14 (51/3/4) mostraram-se igualmente mais susceptíveis. Nesses clones *L. theobromae* apresentou maior agressividade, causando lesão de maior comprimento nas mudas. Entretanto, o clone 14 (51/3/4) foi o mais suscetível, com valor de comprimento de lesão que diferiu dos valores dos clones 13 (47/5/2), 32 (68/1/15) e 36 (12/7/15), sendo estes os materiais resistentes.

No presente estudo foi possível observar que houve diferença entre os clones de aceroleira quanto à resistência ao fungo *L. theobromae*, os quais diferiram estatisticamente quanto ao comprimento da lesão dos tratamentos controle (Figura 1).



**Figura 1.** Crescimento médio das lesões em mudas de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC) inoculadas com isolado de *L. theobromae*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. CV(%)= 24,53

Ao analisar relação clone x isolado, observou-se que os clones 10 (38/6/1), 11 (38/7/6), 13 (47/5/2), 32 (68/1/15) e 36 (12/7/15) mostraram-se resistentes à doença causada pelo fungo *L. theobromae*, sendo estes, em que o fungo comportou-se de forma menos agressiva. O 14 (51/3/4) foi o suscetível a este isolado, diferindo estatisticamente dos clones 13 (47/5/2), 32 (68/1/15) e 36 (12/7/15). Pereira et al., (2006), estudando a patogenicidade de oito isolados de *L. theobromae* em diferentes fruteiras, observou que o isolado de mangueira foi pouco agressivo, enquanto o isolado de mamoeiro mostrou-se virulento quanto inoculados em vários hospedeiros.

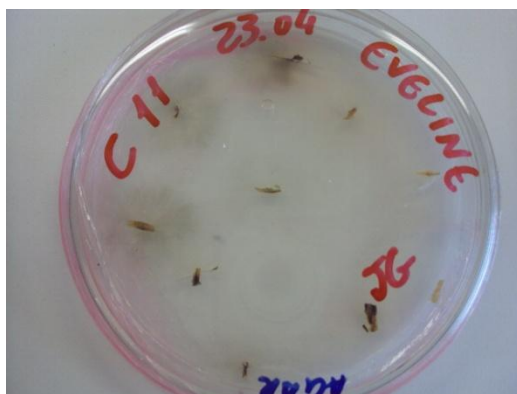
Dos clones avaliados no campo e inicialmente considerados suscetíveis, os clones 32 (68/1/15) e o 36 (12/7/15) mostraram-se resistentes, apresentando lesões menores, semelhantes às médias apresentadas pelos clones que foram considerados resistentes, 10 (38/6/1) e 13 (47/5/2). Já os clones 10 (38/6/1) e 11 (38/7/6) que em campo foram considerados resistentes, juntamente com o clone 14 (51/3/4), foram os que apresentaram maiores comprimento de lesão na avaliação das mudas em casa de vegetação, sendo considerados susceptíveis ao fungo. Este fato pode ser explicado devido à existência de diversos mecanismos de resistência em uma planta. Estes mecanismos podem apresentar variações, dependendo da ação do patógeno e do

ambiente. As plantas jovens (mudas) se mostraram resistentes nas condições da casa de vegetação. Então, se observarmos uma planta adulta nas condições das quais as mudas foram expostas, o esperado é que a resposta seja a mesma. Portanto, uma planta pode ser resistente nas condições de casa de vegetação e suscetível em determinadas condições de campo. Por isso, é que existem variedades de plantas recomendadas para regiões específicas. Outro fato a ser considerado, é que na avaliação das plantas no campo a mesma foi realizada apenas uma vez, sendo necessária a realização de mais avaliações para a confirmação desses resultados.

Dias (2003), diz que embora as avaliações da incidência natural da doença em diferentes genótipos forneçam informações dos níveis relativos de suscetibilidade ou resistência, o entendimento das reações é conseguido por meio de trabalhos com inoculações artificiais, envolvendo diferentes testes e órgãos da planta.

Alguns autores também foram capazes de encontrar indivíduos de *Eucalyptus* sp. resistentes à ferrugem entre e dentro de espécies/procedências e de progênies suscetíveis (FERREIRA, 1981, 1983; FERREIRA & SILVA, 1982).

Em relação ao reisolamento dos materiais infectados após inoculação, houve o crescimento do fungo comprovando a patogenicidade do patógeno (Figura 2).



**Figura 2.** Reisolamento da muda (clone 11(38/7/6)) infectado após inoculação mostrando crescimento micelial de *L. theobromae*.

A consistência dos resultados apresentados demonstra micélio de *L. theobromae* cultivado em BDA e inoculado em mudas de aceroleira pelo método furadeira permite a seleção de genótipos de aceroleira em condições controladas, ensejando uma economia de tempo e recursos nessa fase do programa de melhoramento genético para identificação de genótipos tolerantes de aceroleira à podridão seca das hastes.



## **6.4 CONCLUSÃO**

Houve variabilidade genética quanto à reação à *Lasiodiplodia theobromae* nos clones de aceroleira quando avaliados pelo método de inoculação.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, R.E. **Acerola no Brasil: produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1995. p. 107-23.
- CARDOSO, J.E.; SANTOS, A.A.; VIDAL, J.C., SOUSA, R.N. M. **Efeito do manejo da planta no progresso da podridão-seca-da-gravioleira**. Fortaleza: Embrapa- CNPAT, 2005. 19p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 22).
- COSTA, J.V.T.A. **Metodologia de avaliação de clones de cajueiro para resistência à resinose**. Fortaleza: UFC, monografia de graduação. 2006. 40p. Inclui bibliografia e guia de URL's.
- DIAS, L.A.S. **Melhoramento Genético do Cacaueiro (Ecoport version by Peter Griffee, FAO)**. 1. editora. Roma, Italy: FAO, **Ecoport**, 2003. v. 1. p578.
- ERREIRA, D. **SISVAR software**: versão 4.6. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software.
- FERREIRA, F.A. **Ferrugem do eucalipto**. Revista *Árvore*, v.7, n.2, p.91- 109, 1983.
- FERREIRA, F.A. & SILVA, A.R. **Comportamento de procedências de *Eucalyptus grandis* e de *Eucalyptus saligna* à ferrugem (*Puccinia psidii*)**. Fitopatologia Brasileira, v.7, n.1, p.23-27, 1982.
- FERREIRA, F.A. **Ferrugem do eucalipto - ocorrências, temperatura para germinação de uredosporos, produção de teliósporos, hospedeiro alternativo e resistência**. Fitopatologia Brasileira, v.6, p.603-604, 1981.
- FREIRE, F.C.O., VIANA, F.M.P., CARDOSO, J.E. & SANTOS, A.A. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no estado do Ceará**. Comunicado Técnico N° 91. Fortaleza. Embrapa Agroindústria Tropical, 2004.
- FREIRE, F.C.O. & CARDOSO, J.E. **Doenças do coqueiro**. In: Freire, F.C.O, Cardoso, J.E. & Viana, F.M.P. (Ed.) **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília. Embrapa Informações Tecnológica. 2003. pp. 191 - 226.
- FREIRE, F.das C.O.; CARDOSO, J.E.; SANTOS, A.A.; VIANA, F.M.P. **Diseases of cashew (*Anacardium occidentale L.*) in Brazil**. Crop Protection, v. 21, p. 489-494. 2002.
- FREIRE, F.C.O. **Doenças da Acerola no Brasil**. In: São José, A.R. & Alves, R.E. (Eds.) **Acerola no Brasil: Produção e Mercado**. Vitória da Conquista – BA. 1995. pp.71-76.
- HOLANDA, Y.C.A., PONTES, J.J. da & SILVEIRA FILHO, J. **Doenças da acerola (*Malpighia glabra L.*) no Estado do Ceará, Brasil**. Fitopatologia Brasileira v 22. p 453. 1997.
- LIMA, J.S.; **Diversidade cultural, morfológica e patogênica de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* associados a frutíferas tropicais**. 2011. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PAIVA, J.R.; CARDOSO, J.E.; CRISÓSTOMO, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; ALENCAR, E.S. **Clone de Cajueiro-Anão Precoce BRS 226 ou Planalto: Nova Alternativa para o Plantio na Região Semi-árida do Nordeste.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2002. 4p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 78).

PEREIRA, A.I.; SILVA, G.S.; RIBEIRO, V.Q. **Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*.** Fitopatologia Brasileira, v. 31, p.572-578, 2006.

PONTE, I. I. **Uma doença da ateira (*Annona aquomosa*) e da gravioleira (*A. muricata*) causada por *Botryodiplodia theobromae*.** Fitopatologia Brasileira 10:689-690. 1985.

SOUSA, T.R. de; CARDOSO, J. E.; SOUZA, R. N. M.; CYSNE, A. Q. **Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro.** In: IV Encontro de iniciação científica da EMBRAPA Agroindústria tropical, Resumos..., 2006.

SMITH, G.S.; HUTCHISON, D.J.; HENDERSON, T. **Comparative use of soil infested with chlamydospores to screen for relative susceptibility to *Phytophthora* foot rot in citrus cultivars.** Plant disease, v. 75, p. 402-405, 1991.

SUTTON, B. C. **Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata.** Kew: Surrey, England, C.M.I., 1980. p.696.

TAVARES, S.C.H. **Doenças da acerola no Brasil.** Petrolina – PE. EMBRAPA/CPATSA. 1995.

VIANA, F.M.P.; FREIRE, F.C.O.; BARGUIL, B.M.; ALVES, R.E.; CARDOSO, J.E.; VIDAL, J.C. **Podridão basal pós-colheita do coco (*Cocos nucifera* L.) no estado do Ceará.** Fitopatologia Brasileira, v. 27, n. 5, p.545. 2002.