

CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MIRTILO UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES¹

SERGIO DELMAR DOS ANJOS E SILVA², LUIS EDUARDO CORREA ANTUNES³, DENILSON GOUVEA ANTHONISEN⁴, JULIANA SILVA LEMÕES⁵, EMERSON DIAS GONÇALVES⁶

RESUMO- O cultivo do mirtilo está em expansão no Brasil, em especial em regiões de clima temperado, onde há grande demanda em relação a cultivares adaptadas às condições edafoclimáticas regionais. O objetivo deste trabalho foi caracterizar genótipos de mirtilo do programa de melhoramento da Embrapa Clima Temperado, utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD e SSR. Foram caracterizados 40 genótipos de mirtilo por RAPD e oito cultivares por microssatélites. Os nove *primers* utilizados na técnica de RAPD geraram 89 marcadores. A similaridade genética entre os genótipos variou de 64 a 89%. Utilizando a similaridade média (66%), foram obtidos quatro grupos. Foram gerados 11 marcadores a partir de três pares de *primers* de microssatélites. A similaridade genética entre as cultivares variou de 25 a 75%. Com similaridade média (42,4%), foram obtidos três grupos. Com apenas três pares de *primers* de SSR, foi possível definir o padrão das oito cultivares de mirtilo, revelando a eficiência da técnica de microssatélite na caracterização de genótipos dessa espécie. Esses resultados revelam a eficiência dos marcadores tipo RAPD e SSR na caracterização de genótipos de mirtilo. Entretanto, os marcadores tipo microssatélites geram resultados mais precisos, sendo os mais recomendados para uso em programas de melhoramento e identificação de cultivares.

Termos para indexação: RAPD, SSR, *Vaccinium*.

CHARACTERIZATION OF BLUEBERRY GENOTYPES USING MOLECULAR MARKERS

ABSTRACT- The blueberry crop planting area is increasing in Brazil, especially in Temperate Climate Zones, generating demands relating to suitable cultivars adapted to regional climate and soil conditions. This work aimed to characterize blueberry genotypes from Embrapa Clima Temperado breeding program, using RAPD and SSR molecular markers. There were characterized 40 blueberry genotypes using RAPD and 8 cultivars using SSR molecular markers. The 9 RAPD primers generated 89 markers. The genetic similarity ranged from 64 to 89%. Through the average similarity (66%), it was possible to identify four groups. The three pairs of SSR primers generated 11 markers. The genetic similarity among cultivars ranged from 25 to 75%. With a similarity average of 42,4%, it was generated three groups. It was possible to define the pattern of the eight blueberry cultivars using only three pairs of SST primers, which shows the efficiency of SST technique when characterizing blueberry genotypes. These results reveal that both RAPD and SSR are efficient to characterize genotypes of this specie. However, SSR markers are more accurate and, therefore, recommended for use in breeding programs and cultivars identification.

Index Terms: RAPD, SSR, *Vaccinium*.

INTRODUÇÃO

O mirtilo (*Vaccinium* spp) é uma espécie frutífera pertencente à família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoideae* e gênero *Vaccinium*, originária da Europa e América do Norte. Seus frutos apresentam significativo valor de mercado, devido ao sabor exótico, seu valor econômico e suas propriedades medicinais. A fruta é considerada como “fonte de longevidade”, fator que se deve, especialmente, ao alto conteúdo de antocianinas, substâncias que beneficiam a visão, a pele, os vasos sanguíneos e ajudam em casos de varizes, hemorróidas,

problemas circulatórios, transtornos cardíacos, feridas externas e internas, edemas, artrites e artroses. Além disso, suas propriedades nutracêuticas e, principalmente, oportunidades de negócio têm despertado a atenção de técnicos e produtores de frutas do Brasil (Raseira & Antunes, 2004).

O cultivo do mirtilo (*Vaccinium* spp) está em franca expansão em países da América do Sul, como Chile, Argentina e Uruguai (Strick, 2005; Bañados, 2006), pois há uma grande demanda dos países do Hemisfério Norte, entre os quais os Estados Unidos, por mirtilos frescos na contra-estação de produção daquelas regiões, o que gera uma oportunidade de negócio muito interessante para o setor produtivo brasileiro.

¹(Trabalho 099-07). Recebido em: 11-04-2007. Aceito para publicação em: 19-09-2007.

²Embrapa – Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas- RS. E-mail: sergio@cpact.embrapa.br

³Embrapa – Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas- RS. Bolsista CNPq. E-mail: antunes@cpact.embrapa.br.

⁴Embrapa – Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas- RS. E-mail: denilson@cpact.embrapa.br

⁵Embrapa – Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas- RS. Bolsista CNPq. E-mail: julianalemoes@terra.com.br.

⁶Embrapa – Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas- RS. Bolsista CNPq/RD. E-mail: emersondng@hotmail.com.

Os trabalhos com mirtilo no Brasil iniciaram em 1983, na Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS), com a introdução da coleção de cultivares de baixa exigência em frio do grupo 'rabbiteye' (olho-de-coelho), oriundas da Universidade da Flórida (Estados Unidos). O plantio comercial iniciou em 1990, na cidade de Vacaria (RS).

Atualmente, estima-se a produção de mirtilo em cerca de 60 toneladas, concentradas nas cidades de Vacaria e Caxias do Sul (RS), Barbacena (MG) e Campos do Jordão (SP), totalizando uma área de aproximadamente 35 ha. A região de Vacaria foi pioneira no cultivo dessa espécie e é a grande referência em termos de produção (Raseira & Antunes, 2004). Segundo o Instituto Brasileiro de Fruticultura (IBRAF, 2006, citado por Antunes & Madail, 2007), em 2002, o Brasil exportou cerca de quatro toneladas de mirtilo, o que representou uma receita de US\$ 24.000,00 aos produtores e divisas para o Brasil. Trata-se de um número pouco significativo, face ao potencial natural que o País oferece à produção comercial.

Segundo Longley (1927) e Newcomber (1941), citados por ECK (1966), o número básico de cromossomos da espécie é 12 ($x = 12$). O mirtilo é nativo da América do Norte, Estados Unidos e Canadá, onde é denominado "blueberry".

Galletta & Ballington (1996) classificam os tipos de mirtilo comercialmente plantados em cinco grupos importantes: o grupo 'Highbush' (arbusto alto), que possui variedades que necessitam geralmente entre 650 e 850 horas de frio abaixo de 7,2 °C; o grupo 'Half high' (arbusto de médio porte), que envolve híbridos de *V. angustifolium* e *V. corymbosum* L.; o grupo 'Southern highbush' (arbusto de porte alto, originário do sul dos Estados Unidos), o qual engloba plantas de baixa necessidade em frio, com predomínio da espécie *V. corymbosum* ($4x = 48$); o grupo 'Rabbiteye' (olho-de-coelho - espécie hexaplóide) ($6x = 72$), cujas plantas podem alcançar de dois a quatro metros de altura, com as seguintes características: vigorosas, longevas, produtivas, possuem tolerância ao calor e à seca, baixa necessidade em frio, produzindo frutos ácidos, firmes e de longa conservação; o grupo 'Lowbush' (arbusto de pequeno porte), no qual as plantas têm menos de meio metro de altura. A maioria delas pertence à espécie *V. angustifolium*, embora esteja neste grupo, também, o mirtilo do Canadá (*V. myrtilloides* e *V. boreale*) ($2x = 24$).

Para a adoção de um sistema de certificação de mudas, além de aspectos inerentes à sanidade, a identidade genética das variedades é imprescindível para a garantia da qualidade da muda e respaldo para o produtor, que está adquirindo o produto que melhor lhe convém. A variabilidade fenotípica observada nas plantas pode ser devido a variações no genótipo, a variações no efeito de ambiente e na resposta diferencial de alguns genótipos ao ambiente. Para uma caracterização mais eficiente, é necessário o uso de técnicas moleculares que permitem identificar o polimorfismo entre indivíduos a partir do DNA e associar a gene de grande efeito.

No estudo de variabilidade genética entre espécies de mirtilo utilizando microssatélites, Broches et al. (2004) observaram que os *primers* VcEST23 e VcEST169 produziram fragmentos facilmente identificáveis, afirmando que poderão ser muito úteis na análise de diversidade genética e identificação de

cultivares. Trabalhos já realizados com marcadores RAPDs mostraram que é possível estudar a diversidade genética de ameixeiras (Shimada et al., 1999; Ortiz et al., 1997), de acerola (Salla et al., 2002), de castanha (Galderisi et al., 1998) e de maçã (Dunemann et al., 1994).

Em função das poucas informações encontradas na literatura e com a finalidade de subsidiar o programa de melhoramento genético e identificação de cultivares de mirtilo, o objetivo deste trabalho foi o de caracterizar genótipos de mirtilo do programa de melhoramento da Embrapa Clima Temperado, utilizando marcadores moleculares RAPD e SSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizando-se de marcadores tipo RAPD e SSR, foram caracterizados genótipos de mirtilo cultivados na Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS. Através da técnica de RADP, 40 indivíduos foram caracterizados: oito cultivares (Tabela 1), duas seleções e 30 plantas individuais pré-selecionadas. Para a amplificação, foram utilizados nove oligonucleotídeos com 10 bases, sintetizados pela Operon Technologies, selecionados em função do polimorfismo. Os *primers* selecionados foram A-1, A-8, A-17, A-4, I-7, A-2, C-6, A-11 e Y-20.

A extração do DNA foi realizada segundo método CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), e as reações de amplificação foram realizadas segundo protocolo descrito pelos mesmos autores, em um volume total de 13 µL de mix contendo tampão (1X), MgCl₂ (3mM), dNTPs (0,2mM), BSA purificada (5µg), *primer* (15ng), taq DNA polimerase (1U) e DNA genômico (20ng). As amplificações foram realizadas em tubos de 200 µL em termociclador programado para 40 ciclos de um minuto a 92 °C, um minuto a 35 °C e dois minutos a 72 °C, seguidos de uma extensão final de cinco minutos a 72 °C.

Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel submerso de agarose a 1,5%, com brometo de etídio (25µg), onde migraram 8 cm sob diferença de potencial de 110 V. A revelação dos fragmentos foi efetuada em câmara escura, sob luz ultravioleta.

A partir da identificação dos fragmentos amplificados, foram construídas matrizes binárias de similaridade, baseadas na presença (1) e ausência (0) de bandas, que foram analisadas no programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers), versão 2.0, utilizando o coeficiente de Jaccard e o método da média aritmética não-ponderada.

As cultivares que constam na Tabela 1 foram caracterizadas através de marcadores de microssatélites, utilizando 3 pares de oligonucleotídeos (Tabela 2). A extração do DNA foi realizada pelo método CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). As reações de amplificação foram realizadas segundo protocolo descrito por Rowland et al. (2003), em um volume total de 25 µL, de tampão (2X), MgCl₂ (1,8mM), dNTPs (0,2mM), BSA purificada (5µg), *primer* (0,5µM), taq DNA polimerase (1U) e DNA genômico (20ng). As amplificações foram realizadas em tubos de 200 µL, em termociclador programado para um ciclo de três minutos a 92 °C,

40 ciclos de quarenta segundos a 92°C, setenta segundos a 56°C e dois minutos a 72°C.

Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel submerso de agarose a 3,5%, com brometo de etídio (25µg), onde migraram 10 cm sob diferença de potencial de 110 V. A revelação dos fragmentos foi efetuada em câmara escura, sob luz ultravioleta.

A partir da identificação dos fragmentos amplificados, foram construídas matrizes binárias de similaridade, baseadas na presença (1) e ausência (0) de bandas, que foram analisadas utilizando o programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers), versão 2.0, sendo adotado o coeficiente de Dice e o método da média aritmética não-ponderada para a determinação dos grupos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na técnica de RAPD, foram gerados 89 marcadores a partir dos nove *primers* utilizados (Tabela 3), com polimorfismo igual a 74%. Burgher et al. (2002), trabalhando com mirtilos do tipo “lowbush”, utilizando 11 *primers*, obtiveram polimorfismo de 53%, enquanto Salla et al. (2002), trabalhando com acerola, obtiveram 91% de polimorfismo, utilizando 37 *primers*. A etapa de seleção desses marcadores é fundamental para a eficiência dos trabalhos de caracterização, podendo ser feita através de revisão bibliográfica ou testes no laboratório.

A similaridade genética entre os genótipos analisados variou de 64 a 89% (Figura 1). Utilizando a similaridade média (66%), foram obtidos quatro grupos. Burgher et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes, utilizando 11 *primers*, com similaridade média de 70%, gerando seis grupos.

Como observado na Figura 1, o primeiro grupo, com similaridade mínima de 69%, reuniu genótipos oriundos do programa de melhoramento da Embrapa Clima Temperado. No segundo grupo, ficou isolado o genótipo 68, também obtido do programa de melhoramento local, enquanto no terceiro foram agrupadas as cultivares Climax, Bluegem, Powderblue, Delite e Bluebelle, além do genótipo 70, com similaridade mínima de 68%. No último grupo, foram reunidos os demais genótipos e as cultivares Aliceblue, Briteblue e Woodard, com similaridade mínima de 68,5%. Esses dados caracterizam a variabilidade genética dentro dos grupos, indicando possibilidades de obtenção de material superior através de cruzamento e seleção.

Os resultados demonstram a eficiência da técnica do RAPD para a caracterização de genótipos de mirtilo.

Para as oito cultivares de mirtilo caracterizadas através da técnica de microsatélite, foram gerados 11 marcadores a partir dos três pares de *primers* utilizados (Tabela 4). A similaridade genética entre os genótipos analisados variou de 25 a 75% (Figura 2). Utilizando a similaridade média (42,4%), foram obtidos três grupos. No primeiro grupo, foram reunidas as cultivares Florida, Florida M, Bluebelle, Bluegem e Climax, no segundo, Woodard e Powderblue, e no terceiro, Briteblue e Delite. Analisando a Tabela 4 e a Figura 2, verifica-se que, utilizando apenas três pares de *primers*, foi possível definir o padrão das oito cultivares de mirtilo avaliadas, revelando a eficiência de marcadores microsatélites

na caracterização de genótipos dessa espécie. Outros trabalhos realizados através dessa técnica também obtiveram bons resultados não só para mirtilo, mas também para outras espécies (Graham et al., 2002; Rowland et al., 2003; Ahmad et al., 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a eficiência das duas técnicas na caracterização de genótipos de mirtilo. Entretanto, a técnica de microsatélites gera resultados mais precisos, sendo a mais recomendada para uso em programa de melhoramento e identificação de cultivares.

TABELA 1 - Procedência e material de origem de cultivares de mirtilo caracterizadas através da técnica de RAPD e SSR. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2007.

Cultivares	Procedência	Material de origem
Florida M*	-	-
Aliceblue**	Gainesville, Flórida	polinização livre de ‘Beckyblue’
Bluebelle	Tifton, Geórgia	‘Callaway’ e ‘Ethel’
Bluegem	Gainesville, Flórida	polinização livre de uma seleção chamada Tifton 31.
Briteblue	Tifton, Geórgia	
Climax	Tifton, Geórgia,.	‘Callaway’ e ‘Ethel’
Delite	Geórgia	Seleções T14 e T15.
Powderblue	Beltsville, Maryland,.	‘Tifblue’ e ‘Menditoo’,
Woodard	Tifton, Geórgia	‘Ethel’ e ‘Callaway’.

* Não caracterizada por RAPD ** Não caracterizada por SSR.

TABELA 2 - Seqüência dos Primers de microsatélite utilizados na caracterização de cultivares de mirtilo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2007.

Primers	Seqüência de bases (5’-3’)
M56	AAA TTG CTC GCA AAC CAA TC TTT TCC AAG CAA GGG ATG G
M910	AAT GGA AAG AAG CTC TGA CA ATC AGC CTC AGA TCC ACC AC
M12	CTT TGC CAA GTT CTG GTT GA GCT AAA TGA AGT GCG GGA GA

TABELA 3- Polimorfismo apresentado pelos Primers selecionados na caracterização de genótipos de mirtilo através da técnica de RAPD. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2007.

Identificação	Primer	Seqüência de bases	Marcadores	
			Total n.º	Polimórficos n.º %
OPA-1	CAGGCCCTTC		17	15 88,2
OPA-8	GTGACGTAGG		17	14 82,4
OPA-17	GACCGCTTGT		11	9 81,8
OPA-4	AATCGGGCTG		10	8 80,0
OPI-7	CAGCGACAAG		10	6 60,0
OPA-2	TGCCGAGCTG		8	3 37,5
OPC-6	GAACGGACTC		6	5 83,3
OPA-11	CAATCGCCGT		5	3 60,0
OPY-20	AGCCGTGGAA		5	3 60,0
Total			89	66

TABELA 4- Padrão de marcadores gerados pelos primers de microssatélite M56, M910 e M12 para as cultivares de mirtilo avaliadas. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2007.

Primer	12			56			910				
Marcador	531	527	517	550	546	541	302	300	298	296	294
Genótipo											
Florida M	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Woodard	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
BriteBlue	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
BlueBelle	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
Climax	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Bluegem	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
PowderBlue	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
Delite	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+

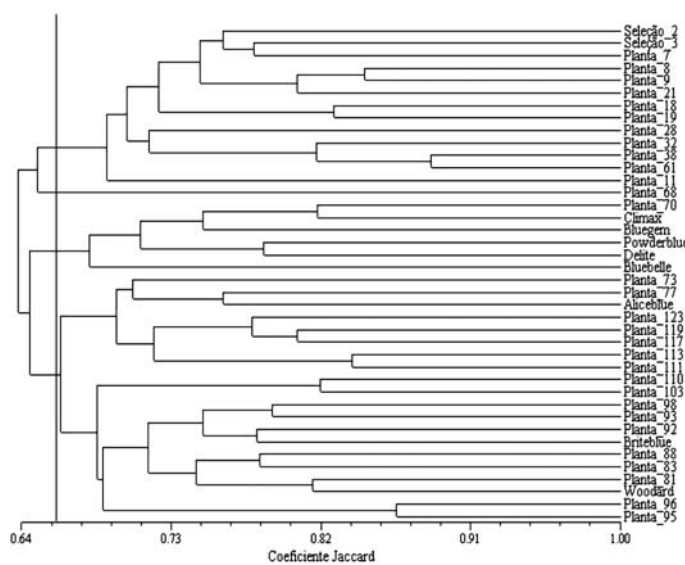


FIGURA 1- Dendrograma gerado a partir de marcadores de RAPD de 40 genótipos de mirtilo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2007.

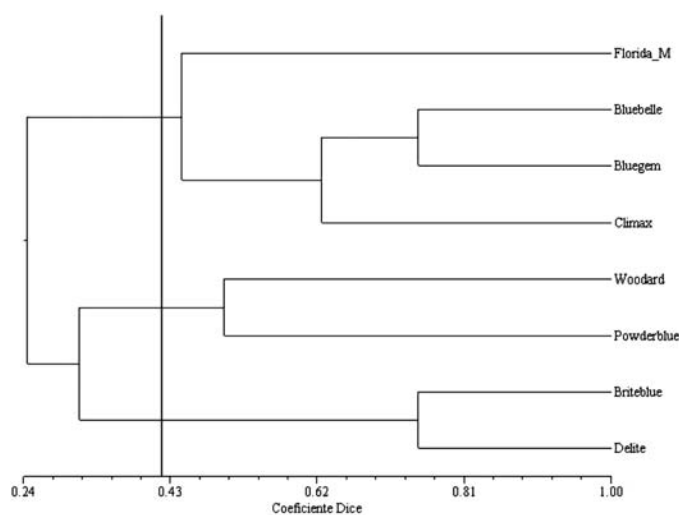


FIGURA 2 - Dendrograma gerado a partir de oito cultivares de mirtilo utilizando três pares de microssatélites. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2007.

CONCLUSÃO

Os marcadores do tipo RAPD e Microssatélites são eficientes na caracterização de genótipos de mirtilo.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo apoio financeiro dado ao projeto 04.0668.7, Procoredes I, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de auxílio financeiro e bolsas de pesquisa (RD e PQ) aos autores do trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, L.E.C.; MADAIL, J.C.M. **Mirtilo**: uma oportunidade de negócios. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=15206>. Acesso em: 02 maio 2007.
- AHMAD, R.; FERGUSON, L.; SOUTHWICK, S.M. Identification of pistachio (*Pistacia vera* L.) nuts with microsatellite markers. **Journal American of the Society Horticultural Science**, Alexandria, v.128, n.6, p.898-903, 2003.
- BANÑADOS, M. P. Blueberry production in South America. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.715, p.165-172. 2006. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/715/715_24.htm>.
- BROCHES, P.; ROWLAND, L.; BASSIL, N. Est-derived microsatellites in Blueberry. In: CONFERENCE PLANT & ANIMAL GENOMES, 12., 2004. San Diego, CA: Town & Country Convention Center. Disponível em: <http://www.intl-pag.org/12/abstracts/P3b_PAG12_258.html>. Acesso: 22 jun. 2004.
- BURGHIER, K.L.; JAMIESON, A.R.; LU, X. Genetic relationships among Lowbush Blueberry Genotypes as determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. **Journal American of the Society Horticultural Science**, Alexandria, v.127, n.1, p.98-103, 2002.
- DUNEMANN, F; KAHNAU, R.; SCHMIDT, H. Genetic relationship in *Malus* evaluated by RAPD fingerprint of cultivars and wild species. **Plant Breeding**, Berlin, v.113, p. 150-159, 1994.
- ECK, P. Botany. In: ECK, P.; CHILDRES, N. (Ed.). **Blueberry culture**. Brunswick: Rutgers University, 1966. p.14-44.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220.
- GALDERISI, v.; CIPOLLARO, M.G.; MASI, C.B.L.; GALANO, G.; CASCINO, A. Molecular typing of Italian sweet chestnut cultivar by random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal**

of Science and Biotechnology, United Kingdom, v.73, n.2, p.259-263, 1998.

GALLETTA, G.J.; BALLINGTON, J.R. Blueberry, cranberries and lingonberries In: JANICK, J.; MOORE, J.N.(Ed.). **Fruit breeding**. New York: J. Wiley & Sons, 1996. p.1-108.

GRAHAM, J; SMITH, K., WOODHEAD, M.; RUSSELL, J. Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.2, p.250-252, 2002

ORTIZ, A.; RENAUD, R.; CALZADA, I.; RITTER, E. Analysis of plum cultivars with RAPD markers. **Journal of Horticultural Science**, Alexandria, v.72, p.1-9, 1997.

RASEIRA, M. B. C., ANTUNES, L.E.C. **A Cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. (Documento, 121)

ROWLAND, L. J.; DHANARAJ, A. L.; POLASHOCK, J.J.; ARORA, R. Utility of blueberry-derived EST-PCR primers in related *Ericaceae* species. IN **Breeding, Cultivars, Rootstocks & germplasm resources**. **HortScience**, Alexandria v.38, n 7, p. 1428-1432, 2003.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. de F.; RUAS, P. M.; PÍPOLO V. C. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia marginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.15-22, 2002.

SHIMADA, T.; HAYAMA, H.; HAJI, T.; YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, M. Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Euphytica**, Dordrecht, v.109, p.143-147, 1999.

STRICK, B. Blueberry: an expanding world crop. **Chronica horticultrae**, Wageningen, v.45, n.1, p. 7-12, 2005.