

Caracterização molecular da coleção de germoplasma de ora-pro-nóbis (*Pereskia* spp.) da Embrapa



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
361**

**Caracterização molecular da coleção
de germoplasma de ora-pro-nóbis
(*Pereskia* spp.) da Embrapa**

*Márcio de Carvalho Moretzsohn
Dijalma Barbosa da Silva
Peter Ward Inglis
Adriana Regina Custódio
Nuno Rodrigo Madeira
Roberto Fontes Vieira*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Wagner Alexandre Lucena

Secretária-Executiva
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
Bruno Machado Teles Walter; Daniela Aguiar de Souza; Eudes de Arruda Carvalho; Luiz Joaquim Castelo Branco Carvalho; Marcos Aparecido Gimenes; Solange Carvalho Barrios Roveri Jose; Márcio Martinello Sanches; Sérgio Eustáquio de Noronha

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
Dijalma Barbosa

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Dijalma Barbosa

1ª edição
1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Caracterização molecular da coleção de germoplasma de ora-pro-nóbis (*Pereskia ssp.*) da Embrapa. / Márcio de Carvalho Moretzsohn et al ... – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019.

23 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 361).

ISSN: 0102-0110
Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader
Modo de Acesso: World Wide Web

1. Hortaliça não-convencional. 2. Variabilidade genética. I. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. IX. Série.

615.321 – CDD 21

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	15
Conclusões.....	19
Agradecimentos.....	19
Referência Bibliográfica.....	19

Caracterização molecular da coleção de germoplasma de ora-pro-nóbis (*Pereskia* spp.) da Embrapa

Márcio de Carvalho Moretzsohn¹

Dijalma Barbosa da Silva²

Peter Ward Inglis³

Adriana Regina Custódio⁴

Nuno Rodrigo Madeira⁵

Roberto Fontes Vieira⁶

Resumo – *Pereskia aculeata* e *P. grandifolia* são duas espécies de cactáceas denominadas ora-pro-nóbis, cujas folhas apresentam alto valor nutricional. A espécie *P. aculeata* é utilizada como alimento, sendo considerada uma hortaliça não convencional. *Pereskia grandifolia* também tem sido utilizada como alimento, em menor escala. Além disso, as duas espécies são empregadas na medicina tradicional e na indústria farmacêutica, devido a seu alto teor de mucilagem. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética dos acessos da coleção de *Pereskia* da Embrapa, utilizando marcadores AFLP. As seis combinações de primers utilizadas geraram um total de 469 bandas polimórficas. Entre os 58 acessos de *P. aculeata* analisados, a similaridade genética de Dice média foi de 0,78, com mínima de 0,64 e máxima de 0,93. Um dendrograma foi construído a partir da matriz de similaridades. As três espécies de *Pereskia* incluídas localizaram-se em grupos diferentes, corroborando a taxonomia atual. Os acessos de *P. aculeata* formaram diversos subgrupos, geralmente não relacionados à região de coleta. Os resultados mostraram que a coleção de germoplasma de ora-pro-nóbis da Embrapa possui uma razoável variabilidade genética, sem duplicatas.

¹ Engenheiro Agrônomo, doutor em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Engenheiro Agrônomo, mestre em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Biólogo, PhD em Microbiologia Molecular, bolsista, Fundação de Apoio a Pesquisa Agrícola (FUNDAG).

⁴ Bióloga, doutora em Recursos Genéticos Vegetais, bolsista, Fundação de Apoio a Pesquisa Agrícola (FUNDAG).

⁵ Engenheiro Agrônomo, doutor em Fitotecnia/Olericultura, pesquisador da Embrapa Hortaliças.

⁶ Engenheiro Agrônomo, PhD em Horticultura, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Termos para indexação: recursos genéticos, hortaliça não-convencional, AFLP, variabilidade genética.

Molecular characterization of the Embrapa ora-pro-nobis (*Pereskia* spp.) germplasm collection

Abstract – *Pereskia aculeata* and *P. grandifolia* are two species of Cactaceae known as ora-pro-nobis. *Pereskia aculeata* is considered an unconventional food plant with high nutritional content. *Pereskia grandifolia* has also been used as food, but is grown on a smaller scale. Additionally, both species have been used in folk medicine and the pharmaceutical industry, due to their high mucilaginous content. The objective of this work was to analyze the genetic variability of the *Pereskia* germplasm collection of Embrapa using AFLP markers. The six primer combinations used generated a total of 469 polymorphic bands. Among the 58 accessions of *P. aculeata*, the mean Dice genetic similarity value was 0.78, ranging from 0.64 to 0.93. A dendrogram was constructed from the Dice matrix of genetic similarities. The three *Pereskia* species included in the analysis were separated into distinct groups, in agreement with their current taxonomy. The *P. aculeata* accessions clustered into subgroups, generally not related to the regions where they were collected. The results showed that the Embrapa germplasm collection of ora-pro-nobis has reasonable genetic variability, without duplicates.

Index terms: genetic resources, unconventional food plant, AFLP, genetic variation

Introdução

O gênero *Pereskia*, pertencente à família Cactaceae, possui 17 espécies e é considerado o mais primitivo dessa família (Nyffeler, 2002). Sua ocorrência está associada a regiões de clima seco, distribuindo-se na faixa tropical do continente americano (Leuenberger, 1986). As espécies *P. aculeata* Mill. e *P. grandifolia* Haw., denominadas popularmente de ora-pro-nóbis (do latim “ora por nós” ou “rogai por nós”), lobrodô ou lobrodó, têm sido as mais utilizadas, principalmente nas regiões sudeste e nordeste do Brasil. Relacionada como Planta Alimentícia Não-convencional (PANC) (Kinupp, 2007) e como Hortaliça de Uso Tradicional (Madeira et al., 2013), recentemente, *P. aculeata* foi citada entre os importantes alimentos regionais brasileiros (Brasil, 2015) e incluída na relação das espécies nativas da flora brasileira de valor econômico, atual ou potencial, como planta para o futuro da região Centro-Oeste (Telles et al., 2016).

Pereskia aculeata é uma espécie perene, de porte arbustivo (Figura 1). Devido aos altos teores de proteína e minerais encontrados em suas folhas, esta planta tem recebido a denominação popular de “carne verde” ou “carne de pobre”. Suas folhas também são ricas em fibras, vitaminas A e C e ácido fólico (Takeiti et al., 2009). Recentemente, a Embrapa Hortaliças desenvolveu um sistema de produção de plantio adensado com podas sucessivas e escalonadas para a produção sustentável de *P. aculeata*, visando a sua utilização como hortaliça folhosa in natura ou na forma desidratada e moída, usada por empresas da área de nutrição que têm fomentado seu cultivo e uso como suplemento alimentar (Madeira et al., 2016). Os frutos comestíveis de *P. aculeata* também apresentam substâncias bioativas, como carotenoides pró-vitamina A (401 RAE/100g), com potencial antioxidante, associado à redução do risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas degenerativas (Agostini-Costa et al., 2012). Maciel et al. (2019), em uma abrangente revisão sobre a composição química, propriedades funcionais e aplicações das espécies *P. aculeata* e *P. grandifolia*, citam que as folhas de ora-pro-nóbis, além de serem usadas na alimentação, também são empregadas na medicina tradicional e na indústria farmacêutica, devido a seu alto teor de mucilagem.



Foto: Dijalma Barbosa

Figura 1. Plantas de *Pereskia aculeata* da coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, dispostas em sistema de espaladeira ao longo de uma cerca. Foto: Dijalma Barbosa da Silva

Desde a época do Brasil colonial, *P. aculeata* tem sido cultivada em quintais e hortos de plantas medicinais de instituições de pesquisa, ensino e “farmácias vivas”. Souza et al. (2009) destacam o potencial dessa espécie no consumo e na diversificação da produção agrícola, principalmente na agricultura familiar.

Reconhecendo a importância desta espécie para a nutrição humana, em 2009, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia iniciou a coleta de acessos de ora-pro-nóbis para a formação de uma coleção de germoplasma, visando à sua conservação e caracterização. Atualmente, esta coleção é constituída de 33 acessos de *P. aculeata*, seis de *P. grandifolia* e um acesso de *P. bleo* (Kunth.) D.C., conservados a campo e in vitro. Esses acessos são provenientes de quintais domésticos, restaurantes, hortos medicinais ou de cultivos de comunidades locais nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, além de 13 acessos doados pelo Dr. Rui Mendes. Detalhes das flores de cada uma dessas três espécies são apresentados na Figura 2.

Silva et al. (2012) avaliaram 32 acessos desta coleção e encontraram variações significativas nos teores de proteína bruta em base seca, fibras, cinzas, lipídios e também no peso dos frutos. *Pereskia grandifolia* mostrou os teores mais elevados de proteína bruta (média de 21,8%), destacando um acesso com 23,5%. Nos acessos de *P. aculeata*, foram encontrados teores

variáveis, entre 17,6% e 10,3% de proteína bruta, sendo que sete acessos apresentaram teores superiores a 15%.

Além disso, a Embrapa Hortaliças mantém, desde 2006, uma coleção de hortaliças não convencionais, incluindo 32 acessos de *P. aculeata*. Alguns desses acessos foram coletados, mas a maioria foi obtida a partir de sementes botânicas, explorando a heterose da progênie, o que se pode perceber pela considerável variabilidade fenotípica.

Devido ao fato dessas espécies serem propagadas predominantemente por via vegetativa, por meio de estacas caulinares, existe a possibilidade de haver acessos em duplicata, especialmente, aqueles de procedência desconhecida. Além disso, nada se sabe sobre a variabilidade genética desse material.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular da coleção de ora-pro-nóbis, por meio de marcadores AFLP, visando conhecer a distância genética entre os acessos e definir estratégias de conservação e uso deste recurso genético. Marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) são bastante efetivos na análise de variabilidade genética intra e interespecífica, além de serem ideais para espécies pouco estudadas, uma vez que não requerem conhecimento prévio do genoma.



Figura 2. Detalhe das flores de *P. aculeata* (A), *P. grandifolia* (B) e *P. bleo* (C) da coleção de *Pereskia* (ora-pro-nóbis) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Material e Métodos

Material vegetal

Em 2018, amostras de folhas tenras de ora-pro-nóbis foram coletadas dos acessos da coleção de *Pereskia* (Tabela 1), estabelecida no Campo Experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Latitude 15°43'43"; longitude 47°54'08" e altitude 1036 metros). As plantas vêm sendo conduzidas em sistema de espaldeira, com espaçamento de 3 metros, em Latossolo Vermelho Escuro, textura argilosa. Foram coletadas, também, amostras de *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaerth. (família Talinaceae), conhecida como major gomes, e *Anredera cordifolia* (Tem.) Steenis (família Basellaceae), denominada ora-pro-nóbis sem espinhos, utilizadas como alimentos tradicionais de forma semelhante a *Pereskia*. Amostras de folhas de 25 plantas de *P. aculeata* de uma coleção de trabalho existente na Embrapa Hortaliças, obtidas de sementes oriundas, provavelmente, de uma única planta, foram também coletadas (Tabela 1).

Tabela 1. Acessos da coleção de ora-pro-nóbis conservados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF (1 a 40). Também são listados os dois acessos de *Talinum paniculatum* (41) e *Anredera cordifolia* (42), bem como os 25 acessos conservados na Embrapa Hortaliças, Brasília/DF (43 a 67).

Nº	Acessos¹	Espécies	Procedência
1	DBS 092	<i>P. aculeata</i> Mill.	Lavras, MG
2	DBS 122	<i>P. aculeata</i> Mill.	Cristalina, GO
3	DBS 180	<i>P. aculeata</i> Mill.	Belo Horizonte, MG
4	DBS 181	<i>P. aculeata</i> Mill.	Taguatinga, DF
5	DBS 182	<i>P. aculeata</i> Mill.	Tiradentes, MG
6	DBS 183	<i>P. aculeata</i> Mill.	Belo Horizonte, MG
7	DBS 184	<i>P. aculeata</i> Mill.	Gama, DF
8	DBS 185	<i>P. aculeata</i> Mill.	Campo Grande, MS
9	DBS 186	<i>P. aculeata</i> Mill.	Brasília, DF
10	DBS 187	<i>P. aculeata</i> Mill.	Brasília, DF
11	DBS 188	<i>P. aculeata</i> Mill.	Ibiá, MG
12	DBS 189	<i>P. aculeata</i> Mill.	Brasília, DF
13	DBS 190	<i>P. aculeata</i> Mill.	Brasília, DF
14	DBS 191	<i>P. aculeata</i> Mill.	Brasília, DF
15	DBS 192	<i>P. aculeata</i> Mill.	Paranoá, DF
16	DBS 193	<i>P. aculeata</i> Mill.	Brasília, DF
17	DBS 194	<i>P. aculeata</i> Mill.	Campos Altos, MG
18	DBS 195	<i>P. aculeata</i> Mill.	Brasília, DF
19	DBS 196	<i>P. aculeata</i> Mill.	Brasília, DF
20	DBS 197	<i>P. aculeata</i> Mill.	Brasília, DF
21	DBS 198	<i>P. aculeata</i> Mill.	Sobradinho, DF
22	DBS 199	<i>P. aculeata</i> Mill.	Campos Altos, MG
23	DBS 200	<i>P. aculeata</i> Mill.	Brasília, DF
24	DBS 201	<i>P. aculeata</i> Mill.	Brasília, DF
25	DBS 202	<i>P. aculeata</i> Mill.	Luziânia, GO
26	DBS 203	<i>P. aculeata</i> Mill.	Brasília, DF
27	DBS 204	<i>P. aculeata</i> Mill.	Sobradinho, DF
28	DBS 206	<i>P. aculeata</i> Mill.	Campos Altos, MG
29	DBS 368	<i>P. aculeata</i> Mill.	Campos Altos, MG
30	DBS 395	<i>P. aculeata</i> Mill.	São Gotardo, MG
31	RBN 54	<i>P. aculeata</i> Mill.	Itajaí, SC
32	RFV 2450	<i>P. aculeata</i> Mill.	Sabará, MG
33	RFV 2453	<i>P. aculeata</i> Mill.	Prudente de Moraes, MG

Nº	Acessos ¹	Espécies	Procedência
34	DBS 106	<i>P. grandiflora</i> Haw.	Cristalina, GO
35	DBS 176	<i>P. grandiflora</i> Haw.	Planaltina, DF
36	DBS 177*	<i>P. grandiflora</i> Haw.	Desconhecida
37	DBS 179	<i>P. grandiflora</i> Haw.	Ibiá, MG
38	DBS 179	<i>P. grandiflora</i> Haw.	Brasília, DF
39	RFV 2449	<i>P. grandiflora</i> Haw.	Sabará, MG
40	DBS 205	<i>P. bleo</i> (Kunth) DC.	Manaus, AM
41	DBS 460	<i>Talinum paniculatum</i> (Jack.) Gaertn.	Brasília, DF
42	DBS 473	<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis	Brasília, DF
43	JRE 01	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
44	JRE 02	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
45	JRE 03	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
46	JRE 04	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
47	JRE 05	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
48	JRE 06	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
49	JRE 07	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
50	JRE 08	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
51	JRE 09	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
52	JRE 10	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
53	JRE 11	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
54	JRE 12	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
55	JRE 13	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
56	JRE 14	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
57	JRE 15	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
58	JRE 16	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
59	JRE 17	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
60	JRE 18	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
61	JRE 19	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
62	JRE 20	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
63	JRE 21	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
64	JRE 22	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
65	JRE 23	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
66	JRE 24	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG
67	JRE 25	<i>P. aculeata</i> Mill.	Extrema, MG

¹Acessos identificados com as iniciais dos coletores seguidas do número de coleta: DBS - Dijalma Barbosa da Silva; RFV - Roberto Fontes Vieira; RBN - Rosa de Belém das Neves Alves e JRE - Jesus Rodrigues Eres.

Análise com marcadores AFLP

DNA genômico total foi extraído a partir de folhas jovens, de acordo com Inglis et al. (2018). A qualidade e a quantidade de DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1% de concentração e em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). As análises de AFLP foram realizadas basicamente seguindo o protocolo original descrito por Vos et al. (1995), mas usando primers marcados com fluorescência. O DNA de cada amostra foi digerido simultaneamente com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI* (New England Biolabs) por duas horas a 37°C, uma hora a 17°C e deixados a 4°C por duas horas para inativação das enzimas. A reação continha 1X de tampão ligase, 50 mM de NaCl, 0,05 µg/µL de BSA (bovine serum albumin), uma unidade de T4 DNA ligase (Promega), 5 pmol do adaptador *EcoRI*, 5 pmol do adaptador *MseI*, 5 unidades de *EcoRI*, 5 unidades de *MseI* e 100 ng do DNA genômico, em um volume final de 20 µL. Os fragmentos de DNA foram ligados aos adaptadores *EcoRI* (5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3') e *MseI* (5'-TAC TCA GGA CTC ATC-3') (Invitrogen), à temperatura de 23°C durante três horas. A pré-amplificação foi realizada com primers complementares aos adaptadores, contendo uma base seletiva na posição 3': *EcoRI*+A e *MseI*+C. A reação (20 µL) continha 1X de tampão de PCR com 2 mM de Mg²⁺, 1M de betaína, 0,25 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada primer, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase e 2 µL do DNA ligado aos adaptadores (diluído 1:5 em H₂O). As PCRs foram realizadas com um ciclo inicial a 72°C por 2 minutos, seguido de 20 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e dois ciclos finais a 72°C por 2 minutos e 60°C por 30 minutos, em termocicladores ABI GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em géis de agarose (1,5%), para verificar o sucesso da pré-amplificação.

A amplificação seletiva dos fragmentos de restrição foi realizada usando primers *EcoRI*+3, marcados com fluorescência, e primers *MseI*+3 não marcados (Tabela 2). A reação, em volume de 10 µL, continha 1X do tampão de PCR com 2 mM de Mg²⁺, 0,15 µM de cada primer *MseI*+3, 0,15 µM de cada primer *EcoRI*+3 marcado com fluorescência, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 unidade de *Taq* polimerase e 2 µL do DNA pré-selecionado diluído 1:5. A PCR foi realizada com um ciclo inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 10 ciclos a 94°C por 30 segundos, 66°C (menos 1°C por ciclo) por 30 segundos (touchdown) e 72°C por 1 minuto, mais 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. As reações foram mantidas a 72°C por 3 minutos e a 60°C por 30 minutos. As PCR foram realizadas em

termocicladores ABI GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems), usando seis combinações de primers (Tabela 2). A 1 µL do produto de PCR foram acrescentados 9 µL de HiDi formamida e 0,3 µL do marcador de peso molecular Genescan 600-LIZ v 2.0 (Applied Biosystems). As amostras foram então desnaturadas a 95°C por 5 minutos e incubadas em gelo, antes da injeção em um analisador de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems).

Tabela 2. Sequências dos primers e adaptadores utilizados.

Nome	Sequência (5' -3')
<i>EcoRI</i> Adaptador 1	CTCGTAGACTGCGTACC
<i>EcoRI</i> Adaptador 2	AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>EcoRI</i> + A	GACTGCGTACCAATTCA
<i>MseI</i> Adaptador 1	GACGATGAGTCCTGAG
<i>MseI</i> Adaptador 2	TACTCAGGACTCATC
<i>MseI</i> + C	GATGAGTCCTGAGTAAC
<i>EcoRI</i> -ACA FAM	FAM+GACTGCGTACCAATTCACA
<i>EcoRI</i> -AAC NED	NED+GACTGCGTACCAATTCAAC
<i>EcoRI</i> -ACC NED	NED+GACTGCGTACCAATTCACC
<i>EcoRI</i> -AAG VIC	VIC+GACTGCGTACCAATTCAAG
<i>EcoRI</i> -AGG VIC	VIC+GACTGCGTACCAATTCAGG
<i>EcoRI</i> -ACG VIC	VIC+GACTGCGTACCAATTCACG
<i>MseI</i> -CTG	GATGAGTCCTGAGTAACTG
<i>MseI</i> -CTT	GATGAGTCCTGAGTAACTT
<i>MseI</i> -CAT	GATGAGTCCTGAGTAACAT
<i>MseI</i> -CTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA
<i>MseI</i> -CAG	GATGAGTCCTGAGTAACAG

Análise dos dados

Os arquivos de dados brutos foram processados usando PeakScanner v.2 (Applied Biosystems) e RawGeno (Arrigo et al., 2012), para ajuste dos tamanhos dos picos e eliminação dos picos de baixa qualidade ou parcialmente sobrepostos. Os perfis de AFLP filtrados foram então convertidos em uma matriz binária de presença ou ausência de picos. As similaridades genéticas entre cada par de acessos foram estimadas pelo coeficiente de Dice. A matriz diagonal resultante foi submetida a análise de agrupamento pelo método de UPGMA (*unweighted pair-group method analysis*). A consistência do

dendrograma obtido foi avaliada pelo coeficiente de correlação cofenética (r), avaliado pelo teste de Mantel a 5% de significância e 1000 permutações. Todas essas análises foram realizadas usando o programa NTSYS 2.21 (Rohlf, 2009). A consistência do dendrograma foi avaliada também pela análise de bootstrap usando o programa BOOD (Coelho, 2000) com 10.000 iterações.

Resultados e Discussão

Seis combinações de primers foram utilizadas para análise da variabilidade genética da coleção de germoplasma de ora-pro-nóbis da Embrapa. No total, 833 bandas foram amplificadas, das quais 469 (56,3%) mostraram-se polimórficas entre pelo menos dois acessos de *Pereskia* (Tabela 3). As seis combinações de primers amplificaram números de bandas bastante diferentes, variando de 114 (para *EcoRI-ACC/Msel-CAG*) a 209 (*EcoRI-ACA/Msel-CTT*). O número e a porcentagem de bandas polimórficas também variaram bastante entre os pares de primers, de 34 (*EcoRI-ACC/Msel-CAG*) a 114 (*EcoRI-AAG/Msel-CTG*) e de 24,4% (*EcoRI-ACA/Msel-CTT*) a 98,3% (*EcoRI-AAG/Msel-CTG*), respectivamente (Tabela 3). Um exemplo de padrão de amplificação, obtido com a combinação de primers *EcoRI-AAG/Msel-CTG*, é apresentado na Figura 3.

Tabela 3. Combinações de primers AFLP, número total de bandas amplificadas e número e porcentagem de bandas polimórficas.

Combinação de primers	Total de bandas	Bandas polimórficas	% de polimorfismo
<i>EcoRI-ACA/Msel-CTT</i>	209	51	24,4
<i>EcoRI-AAC/Msel-CAT</i>	146	90	61,6
<i>EcoRI-ACC/Msel-CAG</i>	114	34	29,8
<i>EcoRI-AAG/Msel-CTG</i>	116	114	98,3
<i>EcoRI-AGG/Msel-CTA</i>	122	70	57,4
<i>EcoRI-ACG/Msel-CAG</i>	126	110	87,3
Total	833	469	56,3

Os dados de AFLP foram utilizados para estimar as similaridades genéticas entre cada par de acessos, usando o coeficiente de Dice. Entre os 58 acessos de *P. aculeata*, a similaridade média foi de 0,78, com mínima de 0,64, entre os acessos RBN 54 e DBS 188 e máxima de 0,93, entre os acessos JRE 09 e JRE 15 (dados não mostrados). Portanto, todos os acessos puderam ser diferenciados, o que sugere não haver duplicações.

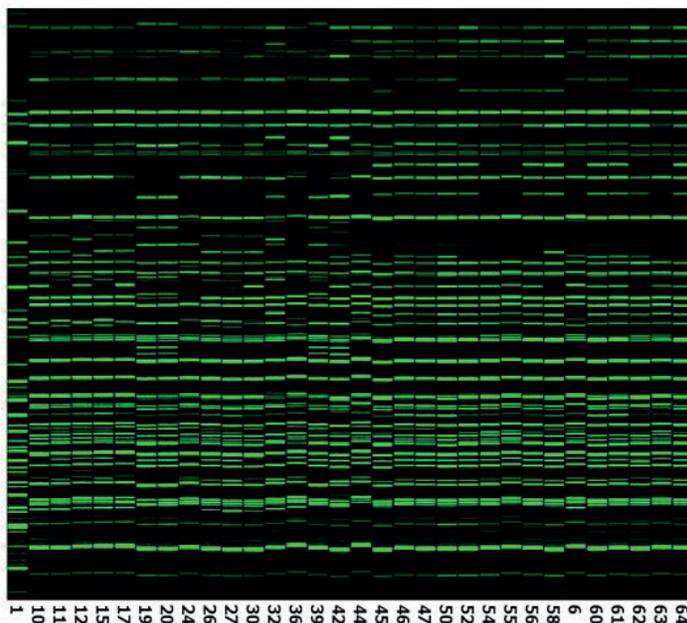


Figura 3 – Perfil de AFLP gerado pela combinação de primers *EcoRI*-AAG/*MseI*-CTG. Os números na parte inferior indicam os acessos, de acordo com os números apresentados na Tabela 1. A imagem foi gerada com o programa Genographer 2.1.4 (<http://sourceforge.net/projects/genographer>).

Um dendrograma foi construído a partir da matriz de similaridades genéticas de Dice (Figura 4). O coeficiente de correlação cofenética (r) foi igual a 0,99 e altamente significativo pelo teste de Mantel ($p < 0,01$), indicando que o dendrograma obtido reflete a matriz original de similaridades genéticas. Os 58 acessos de *P. aculeata* formaram um grupo consistente, com bootstrap igual a 100%, dividido em vários subgrupos. O maior subgrupo dentro da espécie apresentou um bootstrap baixo (23%), apesar do grande número de bandas polimórficas. Isso sugere que alguns acessos são, na verdade, híbridos, o que possibilita seu agrupamento em um ou outro dos grupos contendo os possíveis acessos parentais, com suportes de bootstrap semelhantes. Além

disso, os resultados mostraram que não houve um agrupamento de acordo com a região de origem dos acessos, com exceção de alguns provenientes da região de Campos Altos/Ibiá, em Minas Gerais (DBS 194, DBS 188, DBS 368 e DBS 199). Alguns acessos mostraram-se mais divergentes, formando subgrupos externos aos demais, especialmente RBN 54, DBS 181, DBS 180 e DBS 182. Esse último, coletado em Tiradentes/MG, apresenta uma característica interessante, por possuir frutos consideravelmente maiores do que todos os outros, com potencial de aproveitamento imediato para consumo in natura.

Os acessos cedidos pelo Dr. Rui Mendes, mostraram-se geneticamente similares, com nove dos 12 acessos formando um subgrupo com bootstrap igual a 61% e junto a acessos de Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal. Esses acessos são identificados por _Cen após o nome do acesso na Figura 4.

Os acessos de *P. aculeata* provenientes da Embrapa Hortaliças mostraram-se bastante similares, com 23 dos 25 acessos formando um subgrupo consistente (bootstrap 91%). Esse resultado corrobora a informação de que essas plantas teriam sido obtidas de sementes de uma ou poucas plantas, com exceção dos acessos JRE 11 e JRE 25, que agruparam distante dos demais.

Os seis acessos de *P. grandiflora* formaram um grupo consistente (bootstrap 100%), com variação moderada entre seus acessos, associado ao grupo de *P. aculeata*. O único acesso de *P. bleo* incluído agrupou-se externamente a esse grupo. Esses resultados corroboram a taxonomia atual dessas três espécies e estão de acordo com um extenso estudo filogenético, baseado no sequenciamento de cinco regiões gênicas nos três genomas vegetais, que também mostraram que *P. aculeata* e *P. grandiflora* são geneticamente próximas, com *P. bleo* um pouco mais distante (Edwards et al., 2005).

Como esperado, os dois acessos de *Talinum paniculatum* e *Anredera cordifolia* agruparam-se externamente aos acessos das três espécies de *Pereskia*, mas mostraram-se geneticamente próximos, com similaridade igual a 0,78, valor superior ao observado entre alguns acessos de *P. aculeata*.

Conclusão

Como citado anteriormente, *P. aculeata* e *P. grandiflora* são propagadas, predominantemente, por via vegetativa, o que poderia gerar duplicações de acessos da coleção de germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que, até então, não havia sido caracterizada molecularmente. Essa análise, no entanto, mostrou que esses acessos possuem considerável variabilidade genética e, não apresentam duplicatas justificando a conservação de todos os acessos.

Agradecimentos

Ao Dr. Rui Mendes, pesquisador aposentado da Embrapa, pela disponibilização dos acessos existentes na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e ao Dr. Valdely Ferreira Kinupp, professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus-Zona Leste (IFAM-CMZL), pela doação do acesso de *P. bleo*.

Referência Bibliográfica

AGOSTINI-COSTA, T. S.; WONDRACEK, D. C.; ROCHA, W. R.; SILVA, D. S. Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 234-238, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000100031>

ARRIGO, N.; HOLDEREGGER, R.; ALVAREZ, N. Automated scoring of AFLPs using RawGeno v 2.0, a free R CRAN library. **Methods in molecular biology**, p. 155-175, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-870-2_10

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Alimentos regionais brasileiros**, 2. ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 484 p.

COELHO, A. S. G. **BOOD**: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/ similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Genética Vegetal, DBG/ICB/UFG, 2000. CD-ROM.

EDWARDS, E. J.; NYFFELER, R.; DONOGHUE, M. J. Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 1177-1188, 2005. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.7.1177>

INGLIS, P. W.; PAPPAS, M. C. R.; RESENDE, L. V.; GRATTAPAGLIA, D. Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. **PLoS ONE**, v.13 n.10, e0206085, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206085>

KINUPP, V. F. **Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS**. (Tese de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. 2007. 562p.

LEUENBERGER, B. E. *Pereskia* (Cactaceae). **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 41, p. 1-141, 1986.

MACIEL, V. B. V.; YOSHIDA, C. M. P.; GOYCOOLEA, F.M. Agronomic cultivation, chemical composition, functional activities and applications of *Pereskia* species: a mini review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 4573-4584, 2019. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180926151615>

MADEIRA, N. R.; AMARO, G. B.; MELO, R. A. de C.; BOTREL, N.; ROCHINSKI, E. **Cultivo de Ora-pro-nóbis (*Pereskia*) em plantio adensado sob manejo de colheitas sucessivas**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2016. 20 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 156)

MADEIRA, N. R.; SILVA, P. C.; BOTREL, N.; MENDONÇA, J. L. DE; SILVEIRA, G. S. R.; PEDROSA, M. W. **Manual de produção de hortaliças tradicionais**. Brasília, DF: Embrapa. 2013. 155p.

NYFFELER, R. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnk/ matk and trnl-trnf sequences. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 312-326, 2002. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.2.312>

ROHLF, F. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy system. ver. 2.21c. New York: Exeter Software: Setauket, 2009. <https://doi.org/10.2307/2684761>

SILVA, D. S.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, J. P.; VIEIRA, R. F.; GOMES, I. S. Caracterização química e conservação de germoplasma de ora-pro-nóbis

(*Pereskia grandifolia* haw. e *P. aculeata* mill.) na Embrapa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém, PA. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012. CD ROM.

SOUZA, M. R.; M.; CORREA, E. J. A.; GUIMARÃES, G.; PEREIRA, P. R. O Potencial do Ora-pro-nobis na diversificação da produção agrícola familiar. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, p. 3550 – 3554, 2009.

TAKEITI, C. Y.; ANTONIO, G. C.; MOTTA, E. M. P.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; PARK, K. J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, p. 148-160, 2009. <https://doi.org/10.1080/09637480802534509>

TELLES, C. C.; MATOS, J. M. M.; MADEIRA, N. R.; MENDONÇA, J. L.; BOTREL, N.; JUNQUEIRA, A. M. R.; SILVA, D. B. da. *Pereskia aculeata*: ora-pro-nobis. In: VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial**: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste. Brasília, DF: MMA, 2016. 1160 p. (Série Biodiversidade; 44). p. 280-289.

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**, v. 23, p. 4407–4414, 1995. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*



CGPE: 16137