

INFORME DE RESULTADOS DA ACTUACIÓN CIAM/02/2015

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DO PEMENTO AMPARADO POLA DOP PEMENTO DE HERBÓN”

SUBMEDIDA 214.2.2 DE CONSERVACIÓN DE RECURSOS XENÉTICOS NA AGRICULTURA

INTRODUCCIÓN

O pemento (*Capsicum* spp.) é un dos cultivos hortícolas máis importantes. É cultivado en todo o mundo, principalmente nos países tropicais e subtropicais. O pemento é un complexo de especies orixinario da zoa intertropical de América. O xénero *Capsicum* pertence a familia das Solanaceae e inclúe 27 especies recoñecidas. A estrutura taxonómica do xénero foi establecida de xeito multidisciplinar usando taxonomía numérica, datos citoxenéticos, bioquímicos, xeográficos e etnobotánicos. Datos que evidenciaron 5 diferentes especies cultivadas: *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L., e *C. pubescens* Ruiz et Pav., os cales se orixinaron a partir de diferentes eventos de domesticación en centros de diversificación primaria, onde as especies salvaxes seguen a existir. Os pementos foron introducidos en Europa polo final do século XV, sendo a especie máis exitosa nos países europeos o *C. annuum*. Dende estes centros de diversificación secundaria, as diferentes especies foron seleccionadas polos agricultores durante décadas de cultivo dependendo dos diferentes ambientes agroclimáticos de cada rexión, dando lugar a liñas locais ou ecotipos e resultando nunha gran diversidade fenotípica dos cultivares de pemento de hoxe en día.

A conservación de ecotipos e variedades locais é crucial, xa que os cultivares altamente mellorados e modernos estanos a remprazar, o cal é unha ameaza que provoca erosión xenética. Para a maioría das especies cultivadas, a perda de variabilidade xenética comeza tan pronto como comeza o proceso de domesticación. Os miles de ecotipos e variedades locais orixinados pola selección dos agricultores representan unha gran fonte de diversidade, particularmente para alelos de interese agrícola e adaptacións locais, como por exemplo caracteres de calidade, tolerancia ou resistencia a estreses bióticos e abióticos. En España pódese atopar unha gran variedade de rexións agroclimáticas e polo tanto, heteroxeneidade dos ecotipos e liñas locais adaptadas e moi diversas fenotípicamente.

O comezo do cultivo en Galicia asóciase ás sementes traídas polos Franciscanos ó convento de Herbón dende México polo século XVII. Este pemento xa se comezou a comercializar nesta poboación polo século XVIII en forma de especia seco e moído. Como se dixo anteriormente, o proceso de selección comezou dende ese momento, e tamén comeza a práctica de recolección precoz do froito. Neste caso a semente era transmitida como ben parafernall e nunca fora da zona de produción.

Os microsátélites (SSRs) son secuencias de ADN que consisten en cortas repeticións en tandem de entre 1 a 6 nucleótidos que frecuentemente exhiben polimorfismo entre xenotipos cercanos. Son marcadores codominantes e poden ser analizados por técnicas de alto rendemento baseadas na PCR (Reacción en Cadea da Polimerasa). Os microsátélites son una ferramenta ideal para tarefas de tipos de pegada xenética e identificación xenotípica así como para a construción de mapas xenéticos e para a mellora asistida por marcadores (MAS).

No caso do pemento, a pesares de ter un xenoma relativamente grande (3.7-4.7Gb), exhibe un baixo nivel de polimorfismo. Durante a última década son múltiples os traballos que se levaron a cabo co fin de obter diferentes mapas xenéticos do pemento, acadándose no ano 2014 a secuenciación total do xenoma do pemento da especie *C. annuum* cv CM334.

METODOLOXÍA

Material vexetal

O material vexetal foi recollido en 21 invernadoiros pertencentes a SAT A Pementeria, inscritos na DOP Pemento de Herbón. Recolléronse dúas follas novas de 15 plantas ó azar en cada un dos invernadoiros, e se conservaron en frío durante toda a colleita. Posteriormente se gardaron no conxelador a -20°C ata que se necesitaron (Imaxe 1)

Tamén foron recollidas mostras da variedades Padrón (seleccionado no CIAM), Couto San Martiño, Habanero (*C.chinense* Jacq) e Celta F1 (Ramiro Arnedo). Estas variedades foron sementadas nos invernadorios do CIAM e foron empregadas como mostras de referencia e tratadas como liñas puras, xa que neste caso é posible a trazabilidade das liñas ó pertencer ó banco de xermoplasma de horta do CIAM.

Extracción do ADN e xenotipado de microsátélites

O ADN xenómico foi illado dunha folla de cada mostra (quedando a outra de reserva) usando o método do CTAB con pequenas modificacións. O ADN foi resuspensión en 150ul de H₂O bidestilada e cuantificado co Nanodrop (Imaxe 2).

Os SSR usados neste estudo foron desenvolvidos dende librerías xenéticas e/ou secuencias rexistradas nas bases de datos, escolléronse un total de 36 marcadores moleculares de tipo SSR (Life Technologies) que mostraron validez, boa resolución, estabilidade, reproducibilidade e utilidade para a diferenciación das distintas especies de pemento, para a xeración de mapas xenéticos e para a realización de mapas filoxenéticos (Táboa 1). Para este traballo, os marcadores elixíronse en función do seu alto polimorfismo mostrado nas diferentes especies de pemento, e se atopan espallados polos 12 cromosomas do pemento.

As rexións que flanquean os SSR están xeralmente conservadas entre os xenotipos da mesma especie, polo que as secuencias cebadoras (primer) para a PCR son deseñadas nestas zonas flanqueantes. A metodoloxía empregada para a PCR e detección foi a descrita por Schuelke baseada no marcaxe fluorescente dun primer universal (Figura 1). Brevemente, engadiuse unha cola M13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') o extremo 5' do primer "forward" de cada un dos 36 marcadores. Por outro lado, o M13 (primer universal) foi marcado cunha molécula fluorescente (5-FAM (LifeTechnologies) e VIC(Applied Biosystems)). As amplificacións foron feitas nun volume final de 20ul que contiña 25ng de ADN xenómico, 1X PCR Buffer (Invitrogen), 2.5mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.4uM de Reverse primer e do M13 marcado, 0.04uM do Forward primer, 0.2mM dNTP (Invitrogen), e 1 U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen). Tódolos fragmentos foron amplificados usando un protocolo "Touchdown", que consiste nunha desnaturalización inicial de 95°C durante 5min, seguido de 14 ciclos con desnaturalización de 94°C-30seg, annealing a 62°C-30seg (descendendo 0.5°C por cada ciclo) e extensión a 72°C durante 1min; logo 28 ciclos de desnaturalización a 94°C-30seg, annealing a 55°C-30s e extensión a 72°C-1min, finalmente unha extensión de 72°C-10min (Imaxe 3).

O éxito da amplificación foi testado en xeles de agarosa ó 1.5% (Imaxe 4 e 5) e os fragmentos de ADN foron revelados mediante electroforese capilar un equipo de ABI Prism 3730 (Applied Biosystems) (realizado pola Unidade de Xenómica da Universidade Complutense de Madrid) (Imaxe 6). O programa Peak Scanner v.2 (Applied Biosystems) empregouse para a avaliación do tamaño dos alelos.

RESULTADOS

Obxectivo 1. Caracterización molecular dos pementos amparados pola DOP Pemento de Herbón.

Para a caracterización molecular dos pementos amparados por la DOP Pemento de Herbón, empregáronse 35 marcadores moleculares do tipo microsátelite (SSR). Cada un deles foi amplificado empregando como ADN

molde, unha mestura independente de cada un dos invernadoiros e como mostras de referencia e tomadas como parental, os xenotipos Padrón CIAM, Couto e Habanero (referencia como especie diferente a *C. annuum*) procedentes dos programas de mellora do CIAM.

Dos 35 SSR iniciais, 17 de eles amosaron o mesmo tamaño de alelo (pares de bases: pb) para os parentais así como para as mostras dos invernadoiros de Herbón (Táboa 2).

Houbo 13 marcadores (Táboa 3) que deron como resultado tamaños de alelo diferenciais entre o xenotipo Padrón e Couto. Para eses 13 marcadores, as mostras dos invernadoiros de Herbón, deron como resultado un tamaño de alelo igual o de Padrón en 8 dos 13 SSR (Figura 2) e nos outros 5, amosaron ambos alelos (Padrón e Couto), co que se pode dicir que son heterozigotos para ese marcador (Figura 3).

Finalmente, os 5 marcadores restantes amosaron tamaños de alelos diferentes ós dos parentais (Padrón e Couto). Estes 5 marcadores diferenciais foron HpmsE016, CAMS336, GPMS19, GPMS178 e GPMS159 (Táboa 4).

Obxectivo 2. Caracterización molecular dunha variedade comercial de pemento (Pimiento Celta F1) fenotípicamente idéntico ós pementos amparados pola DOP, para avaliar a efectividade do método.

Igual que no caso anterior, mostras de ADN procedentes da variedade comercial Celta F1 (Ramiro Arnedo) foron amplificadas mediante PCR, empregando os mesmos 35 SSR referidos anteriormente para a súa caracterización molecular. Os resultados amósanse na táboa 5. Os primeiros 17 marcadores amosan un tamaño de alelo idéntico para Padrón, Couto, invernadoiros de Herbón e Celta. Estes 17 marcadores non serían informativos.

Nos seguintes 13 SSR, aparecen no Celta os alelos tanto do Padrón como do Couto, podendo comprobar que a variedade Celta é heterozigótica para estes marcadores (Figura 4). Estes 13 marcadores tampouco serían moi informativos aínda que sí son máis que os anteriores, xa que poderíase distinguir entre a liña pura e o híbrido Celta, pero non sería tan claro no caso da comparación entre o Celta e as mostras dos invernadoiros de Herbón.

Os 5 SSR restantes, si que permitirían facer unha diferenciación a nivel molecular entre o Celta e os pementos dos invernadoiros de Herbón.

CONCLUSIONS

Tódalas variedades aquí estudadas, agás o Habanero (resultados non mostrados), pertencen o grupo *C. annuum* co que é de prever que sexan moi semellantes xenéticamente xa que derivaron e se domesticaron a partires do mesmo parental salvaxe. Despois de estudar os 35 marcadores empregados, pódese dicir que as mostras dos invernadoiros que pertencen a DOP Pemento de Herbón mostran unha certa homoxeneidade entre elas, aínda que pódese observar pequenas diferenzas, podendo deberse a selección interna que se leva a cabo en cada explotación.

Caben destacar 5 marcadores (Táboa 4), os cales mostraron un tamaño de alelo totalmente diferente ás mostras de referencia empregadas, de xeito que estes marcadores poderían ser empregados para a diferenciación de froitos e plantas que proveñan destes invernadoiros doutros alleos a DOP, e de outras variedades que poidan dar lugar a confusión, como pode ser a variedade comercial Celta F1, Entenza ou o pemento do Couto (Figura 4). Aínda así, estes 5 marcadores non serían suficientes, polo que serían necesario máis mostraxes de material vexetal desta e doutras zonas, análises, repeticións, confirmacións e aumentar o número de marcadores diferenciais para poder ser empregados na loita contra o fraude.

Táboa 1.- Descrición dos marcadores SSR

Nome	SSR	Chr	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Fonte
Hpms1-139	(CT) ₂ (AG) ₁₅	1	CCAACAGTAGGACCCGAAAATCC	ATGAAGGCTACTGCTGCGATCC	Lee et al. (2004)
Hpms1-281	(TTG) ₆	1	TGAGGCAGTGGTATGGTCTGC	CCCGAGTTCTGCTGCCAATAG	Lee et al. (2004)
Hpms1-148	(GA) ₁₄	1	GGCGGAGAAGAAGCTAGACGATTAGC	CCACCCAATCCACATAGACG	Lee et al. (2004)
Hpms1-143	(AG) ₁₂	2	AATGCTGAGCTGGCAAGGAAAG	TGAAGGCAGTAGGTGGGGAGTG	Lee et al. (2004)
CA514272	(CCG) ₆	2	ATCTATTTTCCTCCGGCGAC	CGGTAAGCTGCCTTGATCTC	Stellari et al. (2011)
HpmsE089	(CTT) ₅	2	CCCCGTCAGTCTCTCTCCAA	GGCCATGTGAGTGAGACCACAG	Yi et al. (2006)
GPMS178	(ATT) ₁₉	2	GATTTTTGACATGTCACATTCATG	AACGTTGAAAAATAAAGTAAGCAAG	Nagy et al. (2007)
Hpms1-173	(GA) ₁₆ (TG) ₂	3	TGCTGGGAAAGATCTCAAAGG	ATCAAGGAAGCAAACCAATGC	Lee et al. (2004)
EPMS472	T ₁₆	3	ATTGTGATAGCAACCCCTGG	CACAGATGAGGGCACAAATG	Nagy et al. (2007)
HpmsE016	(TACA) ₃	3	CCAAGTTCAGGCCAGGAGTAA	TGCAGAGAAGACTCACCAGTCC	Yi et al. (2006)
Hpms1-165	(GA) ₁₃	4	GGCTATTTCCGACAAAACCCCTCAG	CCATTGGTGTTTTACTGTTGTG	Lee et al. (2004)
HpmsAT2-14	(AAT) ₁₆ IMP	4	TTTAGGGTTTCCAACCTCTCTCC	CTAACCCCAAGCAAAACAC	Lee et al. (2004)
CAMS351	(TG) ₃ ...(AG) ₂₆	4	CGCATGAAGCAAATGTACCA	ACCTGCAGTTTGTGTGGGA	Minamiyama et al. (2006)
HpmsE015	(GCA) ₈	5	TTGTGAGGGTTGACACTGGGA	CCGAGCTCGATGAGGATGAACT	Yi et al. (2006)
Hpms2-45	(TTG) ₉	5	CGAAAGGTAGTTTGGGCCTTTG	TGGGCCAATATGCTTAAGAGC	Lee et al. (2004)
CA523558	T ₂₀	6	AATCCTCCAAATCCACCCCTC	ATTCGATTGCTTGCTCCTTG	Ben-Chaim et al. (2006)
Hpms1-6	(AT) ₂ (GT) ₄ (AT) ₈	7	TCCATAACTTACCATGAGTATGA	GCAACACCCACATTCCCTTCTC	Lee et al. (2004)
HpmsCaSIG19	(CT) ₆ (AT) ₈ (GTAT) ₅	7	CATGAATTCGTCTGAAGTCCC	AAGGGTGTATCGTACGCAGCCTTA	Lee et al. (2004)
EPMS426	(AT) ₁₅	7	GAGGAAACACTCTCTCTCTCTCTC	TCAAGAGACCCCAATAGGG	Nagy et al. (2007)
Hpms1-155	(TA) ₃ CA(GA) ₂₁	8	ACGAGGCCAAGCTGTATGTC	TTGTCCCGACTCTCCATTGACC	Lee et al. (2004)
EPMS310	(CAT) ₁₃	8	TGGGAAGAGAAATTGTGAAAGC	AGGAAACATGGTCAATGCC	Barchi et al. (2007)
EPMS342	(CTT) ₇	8	CTGGTAGTTGCAAGAGTAGATCG	ATGATCTTTGACGACGAGGG	Yi et al. (2006)
HpmsE145	(TTA) ₄	8	TGAGGGTATTTTCGTCAATTCAC	GAAAGCGGAAAACATTAAGAGTCA	Yi et al. (2006)
Hpms2-24	(CT) ₁₇ (CA) ₅ A ₂₁	9	TCGTATTGGCTTGTGATTTACCG	TTGAATCGAATACCCGAGGAG	Lee et al. (2004)
Hpms1-3	(AT) ₁₀ (GT) ₁₂	9	TGGGAAATAGGATGCGCTAAACC	AACTTTAAGACTCAAAATCCATAACC	Lee et al. (2004)
HpmsE082	(ATC) ₅	9	TTTTTCCACTTTGCCCTTCC	CAACCCAAGAAAACCCATTGGA	Yi et al. (2006)
CAMS336	(TC) ₁₆	10	GGTGGAAACTTGCTTGAGAGA	CCCAGAACCATCCACCTACT	Minamiyama et al. (2006)
GPMS159	(TAA) ₂₀	10	AAGAACATGAGGAACTTAACCATG	TTCACCTTCTCCGACTCC	Nagy et al. (2007)
HpmsE031	(TC) ₆	10	CCCTAAATCAACCCCAAAATCAA	CCCCATTACCTGACTGCAAAA	Yi et al. (2006)
HpmsE013	(T) ₂₀	10	GCGCCAAGTGAGTTGAATTGAT	CACCAATCCGCTTGCTGTTGTA	Yi et al. (2006)
CAMS405	(TC) ₁₈	11	TTCTGGGTCCACACTTTC	AGGTTGAAAGGAGGCAATA	Minamiyama et al. (2006)
Hpms2-2n	(GT) ₉	11	GCAAGGATGCTTAGTTGGGTGTC	TCCAAAATTACCTTGAGCAC	Lee et al. (2004)
HpmsE075	(ACC) ₆	12	GCGGCTCAGCAGAAAGAGAGAG	TGCCACAGCTGGAGAACGTAAA	Yi et al. (2006)
GPMS197	(GA) ₃ (TAT) ₁₆	12	GCAGAGAAAATAAAATTCCTCGG	CAATGGAAATTCATCGACG	Nagy et al. (2007)
MAP1	INDEL	2	CCATTAGTCGTTCAATTTTGTGTTG	TCTGCCCTTGTTGGATTTTC	Rodriguez-Maza et al. (2012)

Táboa 2. Marcadores co mesmo tamaño nos parentais

Marcador molecular	Tamaño del alelo(pb)
Hpms1-165	227
Hpms2-45	166
HpmsAT2-14	193
HpmsE089	257
HpmsE013	273
Hpms1-155	225
CA514272	276
HpmsE075	220
HpmsE145	244
Hpms1-3	241
Hpms1-6	213
EMPS342	358
HpmsE015	154
Hpms1-139	303
Hpms1-281	150
Hpms1-148	209
EPMS426	116

Táboa 3. Marcadores polimórficos entre os parentais. Tamaño de alelo nos invernadoiros.

Marcador molecular	Padrón	Couto	Invernadoiros Herbón ^a
Hpms1-143	243	239	243
Hpms1-173	184	180	184(180)
EPMS472	311	338	311(338)
CAMS351	222	224	222
CA523558	191	194	191
HpmsCaSIG19	238	236	238
EPMS310	189	186	189(186)
Hpms2-24	203	220	203(220)
HpmsE082	249	254	249
HpmsE031	188	184	188
CAMS405	254	248	254
Hpms2-2n	165	167	165
MAP1	496	496	496(514) ^b

(a) Tamaño de alelos en pares de bases (pb), os números entre paréntese representan que o outro alelo aparece aínda que as veces con menor intensidade. (b) O marcador MAP está asociado a purxencia, o alelo de 496pb asociase a mostras de plantas doces mentres que o alelo de 514pb asociase as plantas picantes.

Táboa 4. Marcadores con diferente tamaño de alelo nos parentais, invernadoiros Herbón e Celta

Marcador molecular	Padrón	Couto	Invernadoiros Herbón	Celta F1
HpmsE016	177	207	193	177/207
CAMS336	190	178	176/190	178/190
GPMS197	291	291	325/291	291
GMPS178	269	280	269/275	269/280
GPMS159	328	328	314	306/328

Táboa 5. Resumo de tódolos alelos (pb) dos marcadores que mostraron as variedades Padrón, Couto, Celta F1 e as mostras dos Invernadoiros de Herbón.

Marcador molecular	Padrón	Couto	CeltaF1	Invernadoiros Herbón
Hpms1-165	227	227	227	227
Hpms2-45	166	166	166	166
HpmsAT2-14	193	193	193	193
HpmsE089	257	257	257	257
HpmsE013	273	273	273	273
Hpms1-155	225	225	225	225
CA514272	276	276	276	276
HpmsE075	220	220	220	220
HpmsE145	244	244	244	244
Hpms1-3	241	241	241	241
Hpms1-6	213	213	213	213
EMPS342	358	358	358	358
HpmsE015	154	154	154	154
Hpms1-139	303	303	303	303
Hpms1-281	150	150	150	150
Hpms1-148	209	209	209	209
EPMS426	116	116	116	116
Hpms1-143	243	239	239/243	243
Hpms1-173	184	180	180/184	184(180)
EPMS472	311	338	311/338	311(338)
CAMS351	222	224	222/224	222
CA523558	191	194	191/194	191
HpmsCaSIG19	238	236	236/238	238
EPMS310	189	186	186/189	189(186)
Hpms2-24	203	220	203/220	203(220)
HpmsE082	249	254	249/254	249
HpmsE031	188	184	184/188	188
CAMS405	254	248	248/254	254
Hpms2-2n	165	167	165/167	165
MAP1	496	496	496	496(514)
HpmsE016	177	207	177/207	193
CAMS336	190	178	178/190	176(190)
GPMS197	291	291	291	325(291)
GMPS178	269	280	269/280	269(275)
GPMS159	328	328	306/328	314

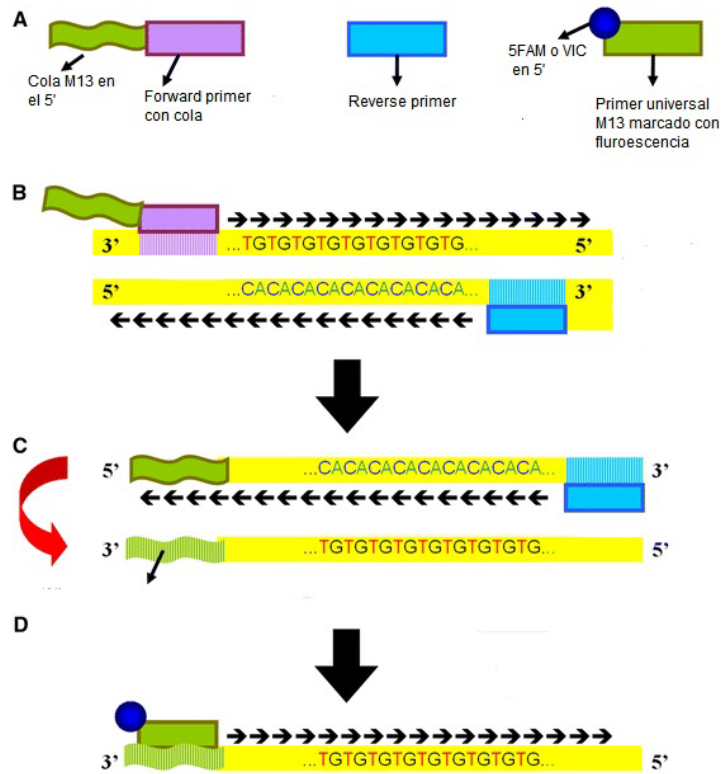


Figura 1.- Representación do protocolo de amplificación (Método deseñado por Schuelke do o emprego dun primer universal M13 con marcaxe fluorescente para PCR)

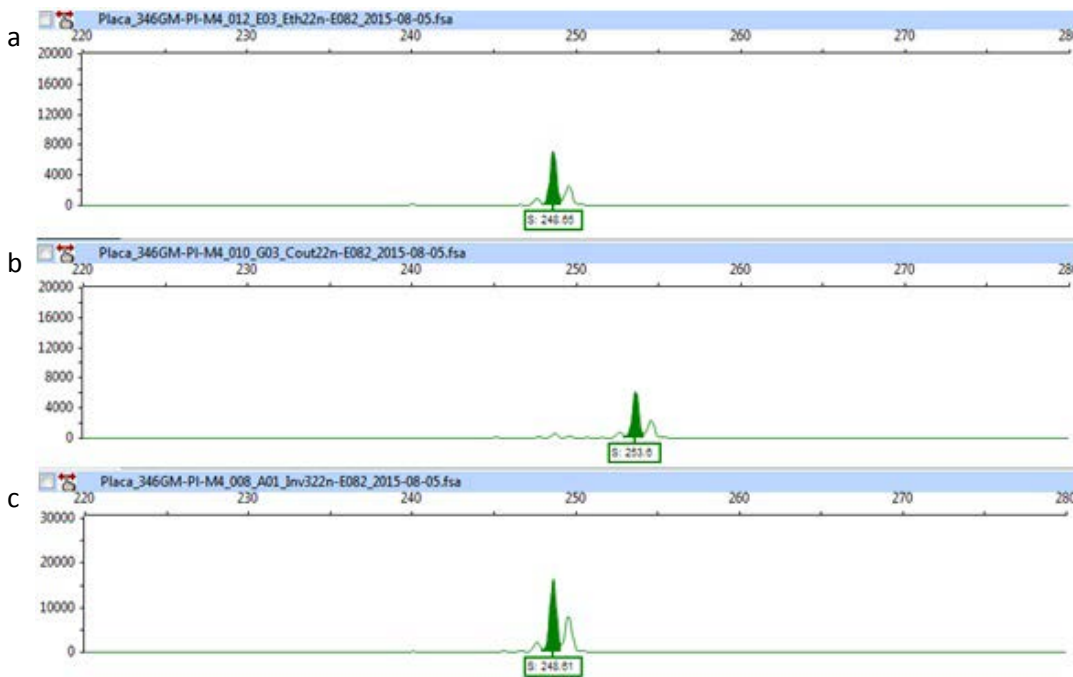


Figura2. Electroferograma mostrando o tamaño de alelo de Padrón (a), Couto (b) e Invernadoiros (c).

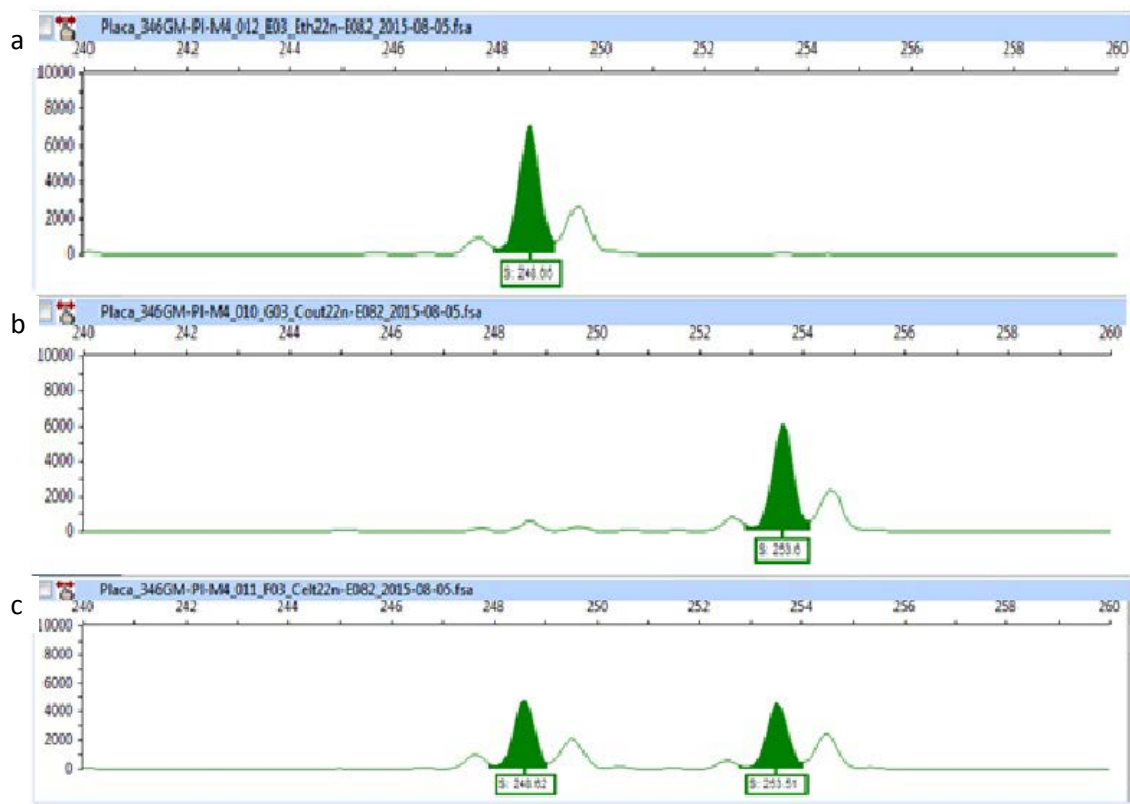


Figura 3.- Electroferograma mostrando o tamaño de alelo de Padrón (a), Couto (b) e o heterocigoto Celta (c).

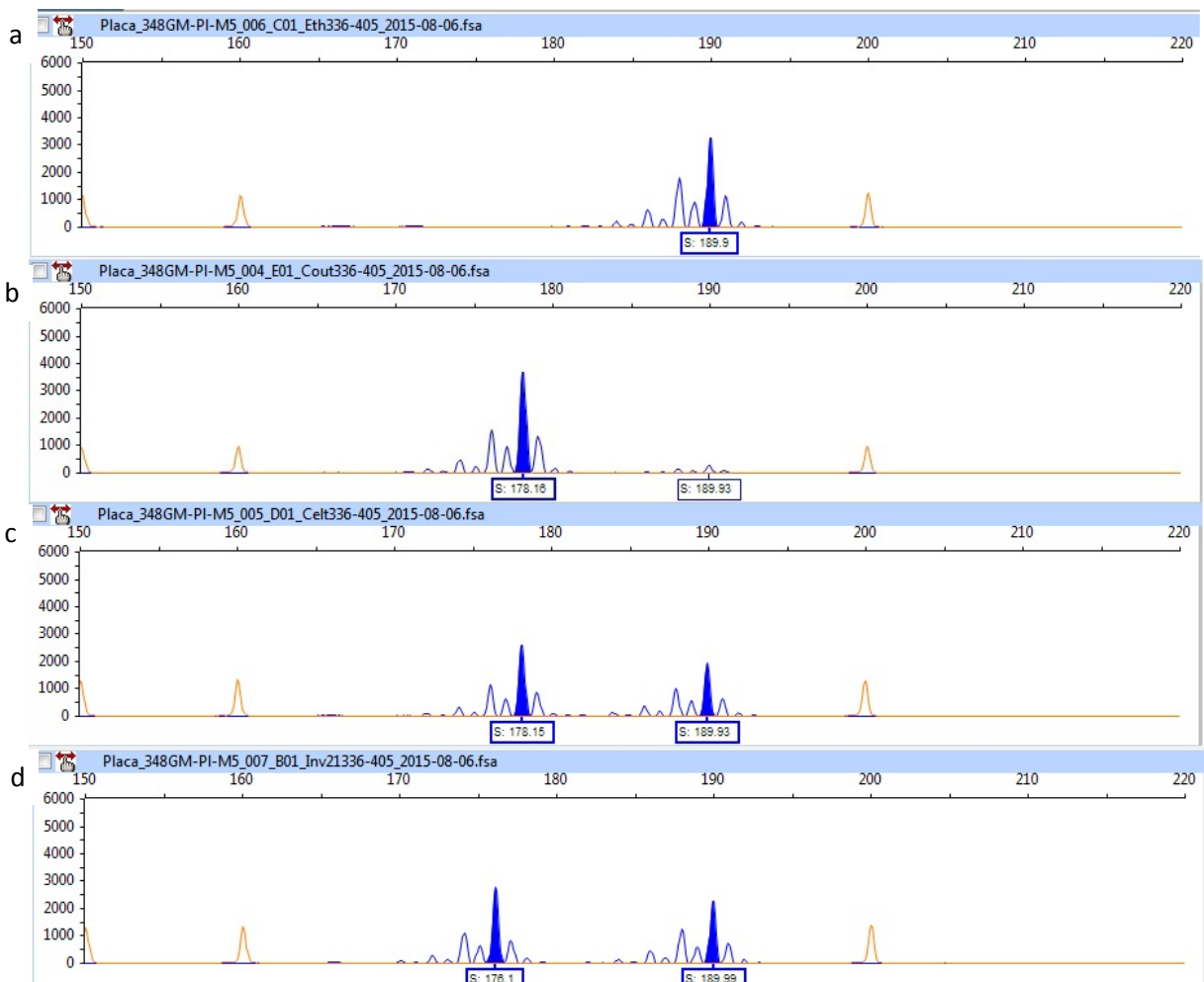


Figura 4.- Electroferograma marcador CAMS336: a) Alelo de tamaño 190pb en Padrón; b) alelos tamaños 178+190pb en Couto; c) alelos tamaños 178+190pb en Celta; d) alelos tamaño 176+190 nas mostrás dos invernadoiros de Herbón.



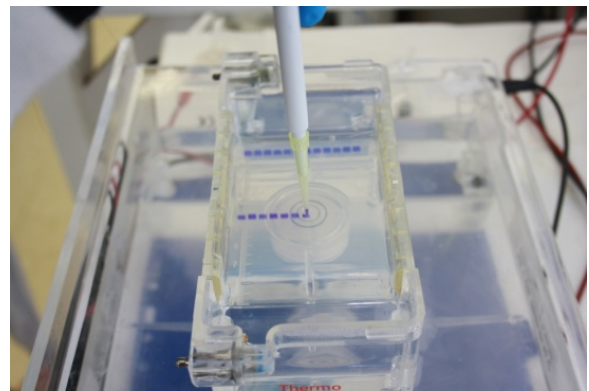
Imaxe 1. Mostras dos invernadoiros da SAT A Pementeira



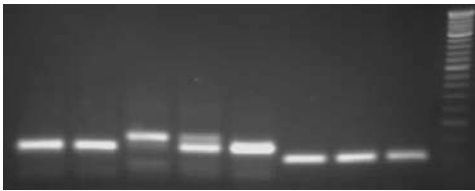
Imaxe 2. Extracción de ADN



Imaxe 3. Termociclador empregado para as PCRs



Imaxe 4. Sistema de electroforese con Xel de Agarosa



Imaxe 5.- Xel de agarosa 1.5%



Imaxe 6.- Equipo de electroforese capilar ABI Prism 3730 (Applied Biosystems)

BIBLIOGRAFÍA:

Barchi, L.; Bonnet, J.; Boudet, C.; Signoret, P.; Nagi I, et al. (2007). A high-resolution, intraspecific linkage map of pepper (*Capsicum annuum* L.) and selection of reduced recombinant inbred line subsets for fast mapping. *Genome* 50: 51-60.

Ben-Chaim, A.; Borovsky, Y.; Falise, M.; Mazourek, M.; Kang, B.C.; Paran, I.; Jahn, M.M. (2006). QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics* 113(8): 1481-1490

Lee, J.M.; Nahm, S.H.; Kim, Y.M.; Kim, B.D. (2004). Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics* 108:619-627.

Minamiyama, Y.; Tsuru, M.; Hirai, M. (2006). An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding* 18: 157-169.

Nagy, I.; Stigel, A.; Sasvari, Z.; Roder, M.; Ganal, M. (2007). Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* 50: 668-688.

Rodriguez-Maza, M.J.; Garces-Claver, A.; Park, S.W.; Kang, B.C.; Arnedo-Andres, M.S. (2012). A versatile PCR marker for pungency in *Capsicum* spp. *Molecular Breeding* 30: 889-898.

Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.

Stellari, G.M.; Mazourek, M.; Jahn, M.M. (2010). Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of *Capsicum*. *Heredity* 104(5): 460-471

Yi, G.; Lee, J.M.; Lee, S.; Choi, D.; Kim, B.D. (2006). Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 113-130

Mabegondo, 29 de setembro de 2015

O Investigador

O Director do CIAM

Alfredo Taboada Arias

Manuel López Luaces