

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



19º Seminário de
Iniciação Científica e
3º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2015

19 a 20 de agosto

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2015



DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DO BAG DE BACURIZEIRO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL POR MEIO DE MARCADORES ISSR

Johnes P. Sanches¹, Elisa Ferreira Moura Cunha², José E. Urano de Carvalho³, Mônica F. Moura⁴

¹Bolsista Pibic / Fapespa Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética. johnes.p.sanches@gmail.com

²Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental, elisa.moura@embrapa.br

³Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental, jose.urano-carvalho@embrapa.br

⁴Pós-doutoranda – UNESP, agromonika@yahoo.com.br

Resumo: O bacuri (*Platonia insignis* Mart.) é uma espécie frutífera nativa da região da Amazônia, que vem sendo utilizada na cultura alimentar da região Norte do Brasil. Seu consumo é realizado na forma de sucos, doces, sorvetes e na forma in natura. Visando conservar parte da variação genética da espécie, a Embrapa Amazônia Oriental mantém um banco de germoplasma de bacuri, contendo materiais coletados em diferentes locais do Estado do Pará. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética presente no BAG de bacurizeiro com base em marcadores moleculares ISSR (inter simple sequence repeats). Para isso, 31 acessos de bacurizeiro foram caracterizados com sete primers ISSR. Os sete primers amplificaram 60 locos, dos quais 53 (83,3%) foram polimórficos. Por meio das similaridades de Jaccard entre os acessos foi gerado o dendrograma, que apresentou coeficiente de correlação cofenético $r = 0,86$ e onde pode-se observar a formação de cinco grupos, sendo que três grupos continham apenas um acesso, indicando alta variabilidade genética.

Palavras-chave: banco Ativo de Germoplasma, marcadores moleculares, *Platonia insignis*

Introdução

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma espécie frutífera nativa da região da Amazônia, que vem sendo bastante utilizado na cultura alimentar da região Norte do Brasil. O fruto do bacurizeiro pode ser consumido de diversas formas como: suco, doces, sorvete e na forma in natura.

Por meio da conservação ex situ, a Embrapa Amazônia Oriental vem mantendo nos últimos anos um Banco Ativo de Germoplasma (BAG), que representa uma coleção ativa de acessos com fins de uso na pesquisa. A caracterização do germoplasma pode ser baseada em marcadores moleculares, os quais acessam diretamente o DNA (MELONI et al., 2006). Dentre os marcadores, existem os ISSR



(Inter Simple Sequence Repeat), que são dominantes e apropriados para uso em espécies para as quais informações extensivas em sequências de DNA ainda não estão disponíveis. Os marcadores moleculares ISSR baseiam-se na amplificação de regiões de DNA situados dentro de regiões microssatélites.

O objetivo deste trabalho foi estimar a divergência genética entre acessos de bacurizeiro do BAG da Embrapa da Amazônia Oriental, por meio de marcadores ISSR.

Material e Métodos

Foram avaliados 31 acessos de bacurizeiro do BAG, coletados em diferentes locais do estado Pará (Tabela 1). O DNA genômico foi extraído de acordo com o método de Doyle e Doyle (1990). Em seguida, as amostras foram quantificadas em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio, utilizando-se três DNAs lambda com padrões de (50, 100 e 200 ng.µl⁻¹). O DNA das amostras foi diluído para 10 ng.µl⁻¹. As reações de PCR foram preparadas para 20 µl, na qual foram utilizados sete primers ISSR (Tabela 2). Os produtos das reações foram aplicados em gel de agarose a 1,5%, preparado com TBE (0,45 M de Tris-Borato e 0,01 M de EDTA) 1,0X e corados com brometo de etídio, sendo submetido à eletroforese horizontal a 100 v por um período de 3 horas e 30 minutos. Em todas as corridas foi utilizado o marcador de peso molecular de 1Kb DNA (Ladder).

As imagens foram analisadas e a partir da ausência ou presença de bandas dos fragmentos amplificados foi construída uma matriz binária. Posteriormente, foram analisadas a presença (1) ou ausência (0) da banda em de cada acesso. O dendrograma gerado para a análise de similaridade foi baseado no método de agrupamento UPGMA por meio do programa PAST (HAMMER et al., 2001).

Resultados e Discussão

Foram amplificados 60 locos com sete primers ISSR, com um polimorfismo de 88,3% (53 locos), sendo o primer UBC 810 mais polimórfico, com 13 locos polimórficos (Tabela 2), com destaque para os primers UBC 811, UBC 834 e UBC 888 que apresentaram 100 % de polimorfismo. Pontes (2014) utilizando primers ISSR em progênies de bacurizeiro encontrou 121 produtos com 23



primers ISSR dos quais 57 foram polimórficos, correspondendo a 47% dos locos, com média de 2,4 locos polimórficos por primer.

Os valores de similaridade genética de Jaccard entre os 31 genótipos de bacurizeiro variaram de 0,33 (207-3 e 103-4) a 0,93 (Ozaki 1 e Ozaki 4), com média de 0,62. A alta similaridade entre Ozaki 1 e Ozaki 4 pode estar ligada ao local de coleta, pois ambos foram coletados no município de Augusto Corrêa.

Tabela 1. Lista do local de coleta no Estado do Pará dos 31 acessos de bacurizeiro do BAG da Embrapa Amazônia Oriental.

Local de coleta	Acessos
Augusto Corrêa	Ozaki 5, Paqueta, Ozaki 3, Ozaki 2, 158-1, Augusto Corrêa, Ozaki 4 e Ozaki 1
Belém	Fernando
Ilha do Marajó	257-5
Maracanã	Aliança 1, Doce Maracanã, Aliança 3, Maracanã, Flor branca Maracanã e SS Maracanã
Microrregião Salgado	151-1
Salvaterra	113-2, 114-4, 115-4, 116-3 e 116-4
Soure	103-4 Soure P-3, 207-3 e 107-1
Terra Alta	Curupeté
Tomé-Açu	Solitário, Nativo e Kunió
Vila de Tacuateua	Taciateua

Tabela 2. Identificação dos sete primers ISSR utilizados na caracterização molecular de acessos do BAG de bacurizeiro da Embrapa Amazônia Oriental com temperatura de anelamento (T_a), sequências nucleotídicas, quantidade de locos, total de polimorfismo e taxa de polimorfismo de cada.

Primer	T_a (°C)	Sequência (5'-3')	Total de locos	Total de locos polimórficos	Taxa de polimorfismo (%)
UBC 810	53	(GA) ₈ T	14	13	92,9
UBC 811	54	(GA) ₈ C	11	11	100,0
UBC 817	53	(CA) ₈ A	6	4	66,7
UBC 826	59	(AC) ₈ C	6	3	50,0
UBC 834	53	(AG) ₈ YT	5	5	100,0
UBC 840	54	(GA) ₈ YT	10	9	90,0
UBC 888	59	BDB (CA) ₇	8	8	100,0
Total	-	-	60	53	88,3

Como base no dendrograma gerado pelo método UPGMA (Figura 1), observou-se a formação de diferentes grupos de genótipos de bacurizeiro, ilustrando as diferenças genéticas. O coeficiente de correlação no valor de 0,86 ilustra uma alta correlação entre a matriz e o dendrograma. Souza et al. (2013) obtiveram $r = 0,79$, que são valores considerados altos e significativo apresentando boa confiabilidade.



A partir da análise do dendrograma com base no ponto de corte de acordo com a média de similaridades de Jaccard ($S_{gx} = 0,62$), observou-se a formação de cinco grupos, sendo que três acessos (Fernando, 113-2e 103-4) formaram grupos isolados (Figura 1). O grupo 1 foi formado por dois acessos provenientes de Soure (Soure P-3) e da Ilha do Marajó (257-5). O grupo 2 formou o maior grupo com vários subgrupos, onde maioria são provenientes dos municípios de Maracanã e Augusto Corrêa.

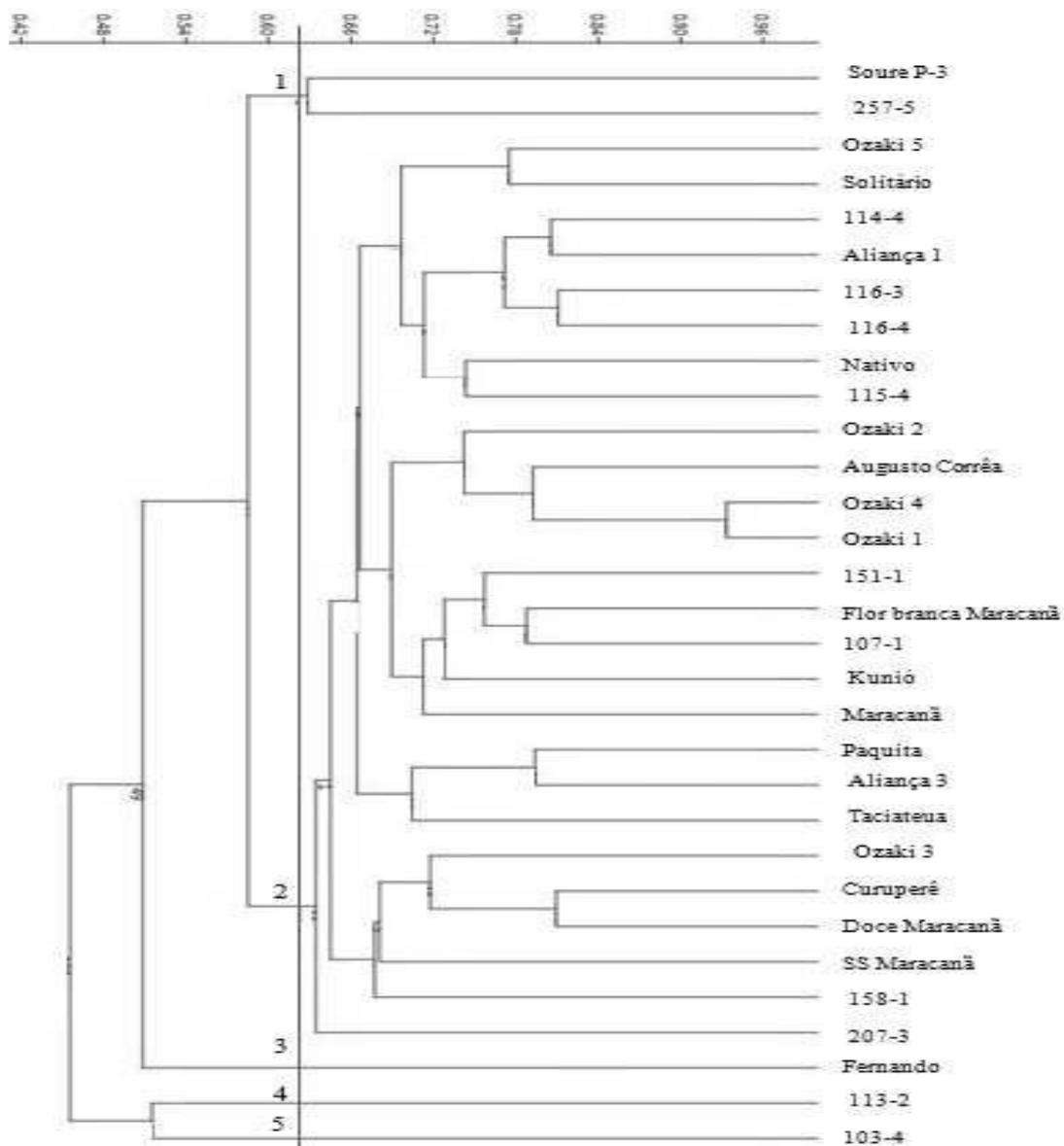


Figura 1: Dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir das similaridades de Jaccard entre 31 acessos de bacurizeiro (*Platonia Insignis* Mart. do BAG da Embrapa Amazônia Oriental.) genotipadas com sete primers ISSR. O valor do coeficiente de correlação cofenética foi 0,86.



Conclusão

Foi verificado por meio de marcadores ISSR, a existência de variabilidade genética entre os acessos de bacurizeiro do BAG da Embrapa Amazônia Oriental.

Referências Bibliográficas

- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v. 4, p. 1-9, 2001.
- MELONI, M.; PERINI, D.; FILIGHEDDU, R.; BINELLI, G. Genetic variation in five mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. **Annals of Botany**, v. 97, p. 299-304, 2006.
- PONTES, L. C. G. **Divergência genética entre acessos de bacurizeiro do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental por meio de marcadores ISSR**. 2014. 26 f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Biologia) – Universidade Federal do Pará, Belém, PA.
- SOUZA, I. G. B.; SOUZA, V. A. B.; LIMA, P. S. C. Molecular characterization of *Platonia insignis* Mart. (Bacurizeiro) using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 3835-3845, 2013.