



20º Seminário de
Iniciação Científica e
4º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

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



20º Seminário de
Iniciação Científica e
4º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2016



DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE TAPEREBAZEIRO (*Spondias mombim* L.) DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL COM USO DE MARCADORES ISSR

Danyllo Amaral de Oliveira¹, Amanda Teixeira Lobato², Abel Jamir Ribeiro Bastos³, Rafael Moysés Alves⁴

¹ Bolsista Pibic Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética, pingodanyllo@gmail.com

² Bolsista Pibic Embrapa Amazônia Oriental Pavilhão de Pesquisa, amandalobatot@yahoo.com

³ Bolsista Pibic Embrapa Amazônia Oriental, Pavilhão de Pesquisa, abel.bastos.ufra@gmail.com

⁴ Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental, Pavilhão de Pesquisa, rafael-moyses.alves@embrapa.br

Resumo: *Spondias mombim* L. uma árvore frutífera encontrada nos estados do Norte e Nordeste brasileiro, cujo fruto é conhecido como cajá ou taperebá, possui importância econômica nessas regiões devido a fabricação de derivados da polpa. Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de conhecer a variabilidade genética entre os acessos presentes no Banco Ativo de Germoplasma do Taperebazeiro, situado na Embrapa Amazônia Oriental, a fim de servir como indicativo para o programa de melhoramento da espécie. Foram analisados 29 acessos procedentes de diferentes municípios do Estado do Pará, utilizando-se sete primers ISSR. os quais produziram 30 fragmentos polimórficos. As dissimilaridades genéticas tiveram variação de 0,034 a 0,189, onde os acessos 3 e 12 foram os menos similares e acessos 19 e 22 os mais similares. Os acessos foram agrupados em quatro grupos pelo método UPGMA, a partir do ponto de corte definido pela média das distâncias. Os marcadores ISSR mostram-se bastante eficientes para estudos com a espécie mostrando-se nítidos e polimórficos.

Palavras-chave: divergência genética, marcadores moleculares, melhoramento de plantas, taperebá.

Introdução

Cajazeira (*Spondias mombim* L.) é uma árvore da família Anacardiaceae, que está presente em diversos países tropicais da América, Ásia e África, e em vários estados brasileiros, especialmente nas regiões Norte e Nordeste. Recebe diversos nomes vulgares nas diferentes localidades, na região amazônica é conhecida como taperebazeiro.

A principal forma de exploração da espécie é pelo extrativismo e em pomares domésticos, mas



ainda pouco encontrada em monocultivo, pois ainda é uma espécie em fase de domesticação. Devido a falta de pomares de cajá, a indústria depende excessivamente das práticas extrativistas, dependência esta que causa uma sazonalidade na produção tornando-se insuficiente para a demanda do mercado que cresce devido a importância do fruto e seus derivados no cenário econômico brasileiro, consumidos de forma in natura ou processados em polpas, geleias, vinhos, cervejas e sorvetes (SANTANA, 2010).

A grande influência humana em áreas naturais, devido o avanço da agricultura, pastagens e desmatamentos, faz com que seja necessário um estudo de variabilidade de espécies de importância comercial. Usa-se o banco de germoplasma como conservador e fornecedor de genótipos diferenciados de espécies de interesse que possibilita selecionar os melhores materiais para implantação e melhoramento de plantas (SILVA, 2009).

Os marcadores moleculares de DNA são ferramentas para a caracterização e diferenciação de populações superiores em nível de DNA, capaz de diferenciar os indivíduos por variações de nucleotídeos ocasionadas por mutação, deleção, inversão e inserção. Estes não são influenciados por fatores externos do meio ambiente nem por epistasia, além de poder ser feita a avaliação dos polimorfismos em qualquer fase de desenvolvimento da planta (BERED, 1997). O marcador ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) é um marcador dominante baseado em PCR (Polymerase Chain Reaction), possui alta reprodutibilidade e repetibilidade e utiliza iniciadores microssatélites longos (16 a 25 pb) para amplificar principalmente as sequências Inter-SSR de diferentes tamanhos com produtos de 200 a 2000 pb de comprimento com possibilidade de detecção em gel de agarose (MENDES, 2014).

Este marcador mostrou-se eficiente quando usado com a espécie *Spondias mombim* L., determinando eficiência na detecção de polimorfismos e revelou grande variabilidade entre acessos (SANTANA, 2010; SILVA, 2009).

O trabalho teve como objetivo conhecer a variabilidade genética entre os acessos de Taperebá do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, por meio de marcadores moleculares ISSR com fins de ajudar na seleção dos materiais com características superiores para futuros programas de melhoramento genético.



Material e Métodos

O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental está situado na cidade de Belém-PA (01°27'21"S; 48°30'16"W), onde se encontram 29 acessos de cajá com procedências de diferentes municípios do Pará (Belém, Tomé-Açu, Igarapé-Açu, Castanhal e São Francisco). A parte laboratorial do estudo foi realizada no Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental e no Laboratório de Biologia Molecular da Ceplac- Erjoh, onde se realizou a extração do DNA das folhas dos acessos, segundo o protocolo CTAB de Doyle e Doyle (1990), modificado por Figueira et al. (1997). Foi utilizado o Fastprep na maceração das folhas do taperebazeiro, e o DNA foi quantificado com o kit Invitrogen de DNAs lambdas (50, 100 e 200 ng/ μ L). Em seguida, feita a diluição para concentração de 10 ng/ μ L.

Para a caracterização molecular foram testados 14 iniciadores UBC (808, 813, 817, 818, 820, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 834, 849, 860) dentre esses foram selecionados sete, os quais obtiveram boa amplificação (808, 813, 818, 822, 825, 826, 827).

Na PCR (Polymerase Chain Reaction) foi usada uma solução de amplificação sendo as amostras amplificadas com o uso do termociclador Applied biosystems 2720, programado da seguinte forma: 94 °C por 1,5 min; 40 ciclos de 40 segundos a 94 °C; Anelamento de 1 minuto em temperaturas que variaram de 50 a 55 °C; 2 minutos de extensão a 72 °C; Extensão final a 72 °C por 5 min.

Foi realizada a eletroforese das amostras em gel de agarose a 2,5 % com 110 V e 90 mA durante 2h e 30 min, e depois realizada a foto documentação do gel. As imagens foram analisadas de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de bandas.

Para processamento de dados foi utilizado o programa GENES da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde foram realizadas as análises de dissimilaridade genética pelo complemento do coeficiente de Jaccard, o qual se utilizou para fins da análise de agrupamento pelo método UPGMA. Foi realizado, posteriormente, o cálculo do CCC (coeficiente de correlação cofenética) entre a matriz de dissimilaridade genética e a matriz de valores cofenéticos.

Resultados e Discussão

Com os sete iniciadores ISSR utilizados, foi possível notar a existência de variabilidade nos acessos de taperebazeiro, sendo produzidos 30 fragmentos polimórficos, com média de 4,3



fragmentos por iniciador. Destacou-se o primer UBC 818, o qual produziu 14 fragmentos, sendo que, 13 destes polimórficos. Em contra partida o primer UBC 826 apresentou 100% de bandas monomórficas.

As dissimilaridades genéticas obtidas entre os acessos variaram de 0,189 a 0,034, nas quais a menor similaridade foi entre os acessos 3 e 12 enquanto a maior foi entre os acessos 9 e 22.

A correlação cofenética entre as matrizes apresentaram após 1000 permutações um valor de 0,654, um valor bom já que segundo Vaz Patto et al. (2004), valores de r maiores que 0,56 são considerados ideais para refletir concordância com os valores de similaridade genética.

O dendrograma de diversidade genética formado pelo método de agrupamento UPGMA (Figura 1), separou os acessos em 4 grupos a partir da distância média como ponto de corte. Assim o **Grupo 1** ficou composto pelos acessos: 19; 22; 23; 24; 7; 12; 11; 14; 26; 10; 21; 15; 6; 13; 2; 1; 4; 16; 25 e 20. **Grupo 2:** 27; 28 e 29. **Grupo 3:** 9; 17 e 8. **Grupo 4:** 3; 5 e 18.

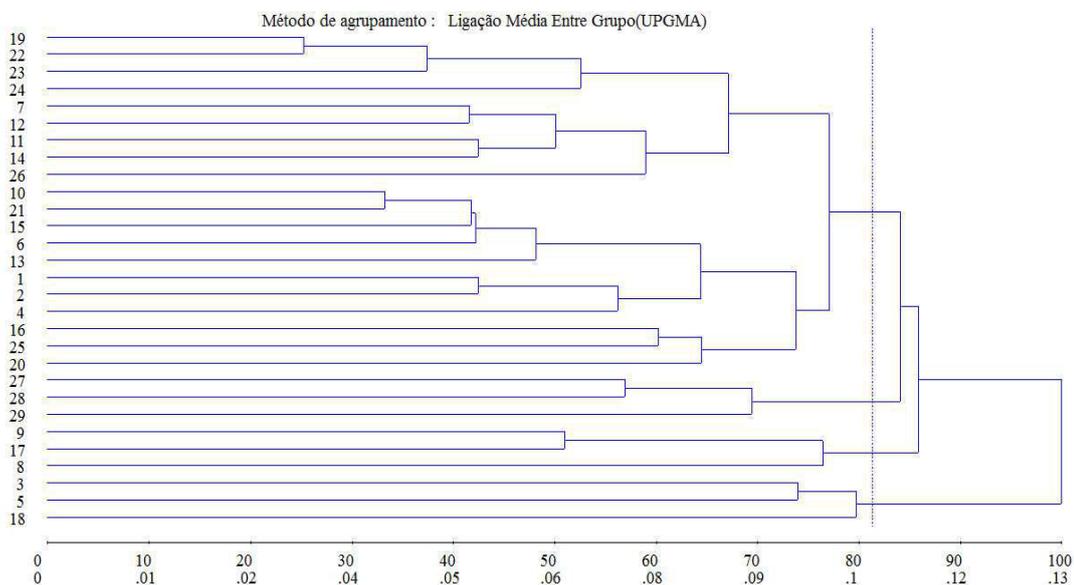


Figura 1 – Dendrograma da divergência genética entre as 29 acessos do BAG do taperebazeiro, obtido pelo método UPGMA. Belém, 2016.

Conclusão

Existe variabilidade genética entre os acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, sendo os marcadores ISSR uma boa ferramenta para caracterização para a espécie estudada, o qual nitidamente e com eficiência é capaz de detectar fragmentos polimórficos.



Referências Bibliográficas

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. de. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

MENDES, R. F. M. **Variabilidade genética de genótipos crioulos de feijão-caupi analisada por marcadores ISSR**. 2014. 43 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Piauí, Teresina.

SANTANA, I. B.B. **Divergência genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise multivariada utilizando marcadores morfoagronômicos e moleculares**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Cruz das Almas.

SILVA, C. J. D. **Caracterização genética de cajazeiras (*Spondias mombim* L. Anacardiaceae) por meio de marcadores moleculares**. 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, v. 137, n. 1, p. 63-72, 2004.