

# VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE MARACUJAZEIRO COM O USO DE MARCADORES ISSR

Lucas Ferraz dos Santos<sup>1</sup>, Eder Jorge de Oliveira<sup>2</sup> e Juliana Leles Costa<sup>3</sup>

## Resumo

Os marcadores moleculares do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) são bastante úteis por serem arbitrários, informativos e com boa reprodutibilidade. O objetivo deste trabalho foi a caracterização do germoplasma de maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical com marcadores ISSR. Os 11 iniciadores utilizados foram bastante polimórficos para a detecção da variabilidade genética dos acessos de maracujazeiro. Em média foram encontradas cerca de 10 bandas polimórficas por iniciador. A estruturação da variabilidade genética permitiu a formação de 5 grupos principais de diversidade.

## Introdução

Dentre as classes de marcadores moleculares existentes, o marcador ISSR é um dos mais recentes e foi desenvolvido a partir da necessidade de explorar repetições de microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA (Zietkiewicz et al., 1994). O princípio da técnica está baseado na reação de PCR e envolve amplificações de segmentos de DNA, presente entre duas regiões repetidas de microssatélites idênticas orientadas em direções opostas.

ISSR é uma técnica simples rápida e eficiente. Os produtos amplificáveis são geralmente de 200-2000 pb (pares bases) de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade, possivelmente devido ao uso de iniciadores longos, permitindo um subsequente uso de alta temperatura de anelamento. Estes marcadores têm sido utilizados para estimar a diversidade genética em nível inter e intra-específico em uma ampla variedade de espécies. Além disso, também tem sido utilizados em estudos de DNA “fingerprinting”, seleção assistida, filogenia e mapeamento genético.

Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de determinar a variabilidade genética presente no Banco Ativo de Germoplasma de Maracujazeiro (BAG-Maracujá) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, com o uso de marcadores ISSR.

## Material e Métodos

Para realização deste trabalho utilizou-se 52 acessos do BAG-Maracujá, sendo coletadas folhas de cinco plantas dos acessos BGM004, BGM007, BGM018, BGM020, BGM028, BGM044, BGM049, BGM162, BGM163, BGM164 e BGMRB; e uma planta dos demais acessos, totalizando 96 amostras. O DNA dos acessos foi extraído utilizando o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990), com modificações. A quantificação do DNA foi feita após eletroforese (3volts/cm) de alíquotas de cada amostra, comparando-as com uma série de concentrações conhecidas de DNA Lambda (Invitrogen), realizadas em géis de agarose 1,0%. A concentração de DNA foi estimada à partir das intensidades das bandas reveladas pela coloração com brometo de etídeo (1,0 mg/mL).

<sup>1</sup>Estudante de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, CEP 44380-000, E-mail: lufts@hotmail.com

<sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000, E-mail: eder@cnpmf.embrapa.br

<sup>3</sup>Estudante de Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, CEP 44380-000, E-mail: julianaleles\_17@hotmail.com

Apoio financeiro: CNPq e Fapesb

Para as análises da variabilidade genética, foram testados 11 iniciadores ISSR (Tabela 1). As reações de amplificação foram feitas em volume final de 25 uL, utilizando: 20 ng de DNA, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 uM de dNTP, 0,3 uM de cada iniciador e 1,0U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research), de acordo com o seguinte programa: 94 °C por 5 min; 35 ciclos a 94 °C por 40s, 48°C por 40s, 72 °C por 60s; e extensão final a 72 °C por 2 min.

A visualização dos resultados foi realizada após eletroforese em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídeo e o tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular (Bio Labs) 100 pb.

A matriz de distância genética foi obtida pelo programa SAS (Versão 9.1). Para esta finalidade foi utilizado o coeficiente de similaridade “Simple Matching”. O agrupamento foi realizado pelo programa Statistica (Versão 7.0). Sendo avaliados os seguintes métodos: 1) ligação simples; 2) ligação completa; 3) método de Ward; e 4) UPGMA (*unweighted pair-method using an arithmetic average*). O ajuste entre a matriz de distâncias e dendograma foi verificado pelo coeficiente de correlação cofenética (r).

## Resultados e Discussão

A técnica de ISSR possibilitou a geração de 116 produtos de amplificação, com tamanho de fragmentos variando entre 200 e 1300 pb. Todos os marcadores analisados mostraram polimorfismo na população de plantas analisadas, sendo que os iniciadores DiGA3'YC, DiGA3'C, DiCA3'G, DiGT3'YG, DiCA3'RG e DiGA5'CY, apresentaram o maior número de bandas polimórficas (Tabela 1).

O número médio de bandas polimórficas por iniciador foi de 10,5, o que indica um conteúdo informacional elevado. Estudos em outras espécies também comprovaram a eficiência dos marcadores ISSR como técnica promissora para detecção de polimorfismos (Santos et al., 2008; Buso et al., 2008).

**Tabela 1:** Características dos 11 iniciadores de ISSR desenvolvidos para o maracujazeiro

| Nome do iniciador | Sequência do iniciador ISSR* | Nº de bandas polimórficas |
|-------------------|------------------------------|---------------------------|
| DiCA3'G           | CACACACACACACACAG            | 13                        |
| DiCA3'RG          | CACACACACACACACARG           | 11                        |
| DiCA3'YG          | CACACACACACACACAYG           | 7                         |
| DiCA5'CR          | CRCACACACACACACACA           | 4                         |
| DiGA3'C           | GAGAGAGAGAGAGAGAC            | 18                        |
| DiGA3'T           | GAGAGAGAGAGAGAGAT            | 8                         |
| DiGA3'YC          | GAGAGAGAGAGAGAGAYC           | 18                        |
| DiGA5'C           | CGAGAGAGAGAGAGAGA            | 8                         |
| DiGA5'CY          | CYGAGAGAGAGAGAGAGA           | 10                        |
| DiGT3'YG          | GTGTGTGTGTGTGTYG             | 11                        |
| DiGT5'CY          | CYGTGTGTGTGTGTGT             | 8                         |

Sequência do iniciador ISSR\*: R = A , G; Y = C, T

Os dados moleculares foram utilizados para obtenção de um dendrograma. Dentre os quatro métodos de agrupamentos avaliados, o método UPGMA foi o que apresentou a maior correlação cofenética (0,75), sendo, portanto, utilizado para estruturar a diversidade dos genótipos (Figura 1). Os métodos de ligação simples, ligação completa e de Ward, apresentaram correlações entre a matriz de distância e agrupamento de 0,66, 0,72 e 0,60, respectivamente.

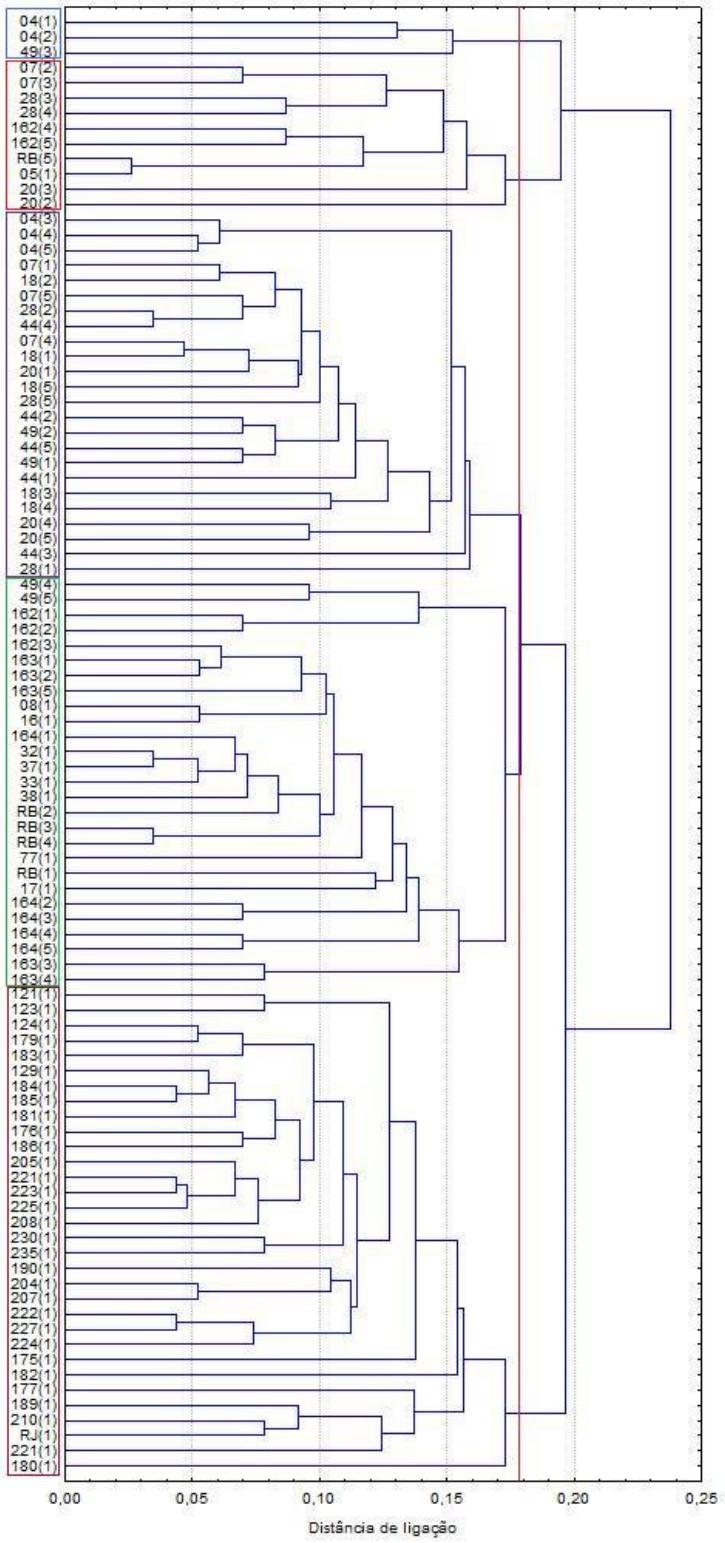


Figura 1. Dendrograma obtido por meio das matrizes de dissimilaridade genética baseadas no coeficiente de “Simple Matching”, agrupados pelo método UPGMA.

Observou-se a formação de cinco agrupamentos principais, com 3, 10, 24, 27 e 32 acessos (Figura 1), utilizando a dissimilaridade média como parâmetro para formação dos agrupamentos. De todos os acessos em que foi analisada a variabilidade intra-específica, e de acordo com os critérios adotados, apenas BGM018, BGM044, BGM163 e BGM164 permaneceram agrupados. O restante, BGM004, BGM007, BGM020, BGM028, BGM049,

BGM162 e BGMRB, ficaram dispersos em um ou mais agrupamentos, o que indica considerável variabilidade intra-específica.

Não foram observados acessos com alta similaridade genética, que poderiam representar duplicatas. Este resultado é de grande importância para orientação das estratégias de manutenção e conservação da variabilidade do gênero *Passiflora*.

## Conclusões

Os marcadores ISSR demonstram eficiência na detecção de polimorfismos moleculares em maracujazeiro, revelando ampla variabilidade genética dentro e entre acessos. Tais marcadores podem ser usados com sucesso na caracterização molecular do germoplasma de *Passiflora*.

## Referências

- BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A. Y.; MELO, L. C.; AMARAL, Z. P. de S.; MAZZUCATO, A. Análise da variabilidade genética de cultivares de feijoeiro comum com marcadores ISSR. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008 (Boletim de Pesquisa, 221).
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.
- SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J. ; COSTA, J. L.; BASTO, V. M. Marcadores do tipo ISSR na análise do polimorfismo em *Passiflora edulis* Sims. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS DA RGV DO ESTADO DA BAHIA, 3, 2008, Vitória da Conquista, Resumo expandido...Vitória da Conquista:UESB, 2008.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, v.20, p.176-183, 1994.