



17^o Seminário de Iniciação Científica e 1^o Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 21 a 23 de agosto de 2013, Belém-PA

SELEÇÃO DE *PRIMERs* ISSR PARA GENOTIPAGEM DE MURICI

Gleyce Kelly de Sousa Ramos¹, Simone de Miranda Rodrigues², Elisa Ferreira Moura Cunha², José Edmar Urano de Carvalho²

¹ Bolsista da Fapespa, Estudante do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia. E-mail: gleyceramos17@yahoo.com.br

² Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: simone.rodrigues@embrapa.br

² Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: elisa.moura@embrapa.br

² Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: jose.urano-carvalho@embrapa.br

Resumo: O muricizeiro, espécie frutífera da família Malpighiaceae, encontra-se disperso em todo o território brasileiro. A Embrapa possui plantas matrizes que precisam ser caracterizadas à nível de DNA. Nesse sentido, os materiais vegetais foram coletados da coleção da Embrapa Amazônia Oriental e conservadas no banco de DNA dessa instituição. As reações de PCR-ISSR foram realizadas testando 100 *primer* disponíveis em cinco clones de muricizeiro, com objetivo de selecionar os melhores fragmentos polimórficos para os materiais de murici, totalizando no mínimo 100 bandas polimórficas.

Palavras-chave: *Byrsonima crassifolia*, polimorfismo de DNA, marcador molecular

Introdução

Espécie frutífera da família Malpighiaceae, o murici (*Byrsonima crassifolia*) encontra-se disperso em todo território brasileiro, embora na Amazônia e na região nordeste do Brasil a planta ocorre com maior frequência. Alcança de 2 a 6 m de altura, possui folhas opostas e pelos ferrugíneos simples na face inferior. As inflorescências apresentam-se em ráculos terminais alongados, com cerca de 12 cm de comprimento. O fruto é uma drupa pequena, trilobular, arredondada ou alongada, tendo em média 1,5 a 2 cm de diâmetro (EMBRAPA RONDÔNIA, 2005). Pode ser consumido *in natura*, em forma de sucos, sorvete, doces e geléia.

Vários são os trabalhos relacionados às características botânicas da espécie, mas estudos relacionados à genética molecular são escassos e complementares ao melhoramento genético. Marcadores moleculares ISSRs (*Inter Single Sequence Repeats*) é um método baseado em microssatélite, que não necessita do desenho do primer clonado, sendo marcadores arbitrários, amplificados por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em presença de um oligonucleotídeo



complementar para um determinado microssatélite, e que vem sendo empregado em programas de melhoramento para a diferenciação rápida entre indivíduos próximos, devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo (COSTA, 2010).

Objetivou-se selecionar *primers* que forneçam os melhores fragmentos polimórficos para os clones de murici da Embrapa, totalizando pelo menos 100 bandas polimórficas.

Material e Métodos

Amostras de folhas de 5 clones (5 plantas/clone) foram coletadas da coleção de germoplasma de *B. crassifolia* da Embrapa Amazônia Oriental para a extração do DNA, realizada de acordo com o protocolo Doyle & Doyle (1990). Em seguida, as amostras foram quantificadas em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio, utilizando-se três padrões de DNA do fago λ (50, 100 e 200 ng. μl^{-1}) no Laboratório de Genética Molecular da instituição.

As reações de PCR foram preparadas para 20 μl contendo: 9,4 μl de H_2O ; 2,0 μl de tampão (10x PCR); 1,2 μl de MgCl_2 (25 mM); 1,0 μl de BSA (bovine serum albumin); 1,5 μl de dNTP (10 mM); 1,2 μl de DNA (10 ng); 3,5 μl de cada *primer* (1 mM); e 0,2 μl de *Taq* DNA polimerase.

Nessa etapa foram testados 100 primers ISSR (801 a 900), e a amplificação ocorreu em termociclador Thermolyne Amplitron II, modelo DB 80225, consistindo em 3 estágios: anelamento, desnaturação e elongação.

A desnaturação do DNA foi efetuada a 95°C por um min, o anelamento ocorreu a 47°C por 45 seg e a elongação a 72°C por dois min. Após os 35 ciclos, ocorreu a etapa de extensão final realizada a 72°C por 5 min. Os *primers* foram selecionados de acordo com a obtenção de polimorfismo.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, preparados com TBE (0,45 M de Tris-Borato e 0,01 M de EDTA) 1,0X, a uma voltagem de 60V em 3h, corados com GelRed, antes de serem visualizados e fotografados sob luz ultravioleta utilizando fotodocumentador digital para posterior análise dos géis.

Resultados e Discussão

Entre os *primer* testados foram selecionados 24 de acordo com a presença de polimorfismos (Tabela 1) (808, 809, 811, 812, 813, 814, 815, 825, 826, 835, 836, 843, 844, 845, 846, 848, 850, 855, 856, 857, 858, 888, 889, 890). O restante não apresentaram produtos de amplificação ou apresentaram produtos de baixa qualidade.

Para cada *primer* foram usados 5 clones de murici: Açú, Santarém-2, Igarapé-Açu-1, Tocantins-2



e Maracanã-2. A Figura 1 apresenta o polimorfismo gerado pelo *primer* 857.

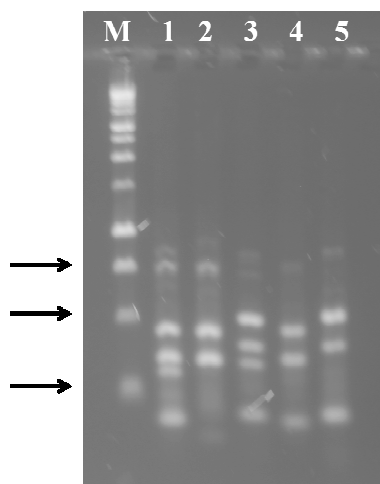


Figura 1: *Primer* ISSR 857. (1 a 5) DNA de 5 materiais distintos de murici (Açu, Santarém-2, Igarapé-Açu-1, Tocantins-2 e Maracanã-2, respectivamente). Setas indicam das bandas polimórficas. M é marcador molecular.

De acordo com a Tabela 1, em média cada *primer* apresentou quatro bandas polimórficas, totalizando aproximadamente 100 bandas polimórficas.

Tabela 1: Identificação dos *primers* – ISSR usando 5 indivíduos de murici.

PRIMER	QUANTIDADE DE BANDAS POLIMÓRFICAS	PRIMER	QUANTIDADE DE BANDAS POLIMÓRFICAS
808	5	844	3
809	4	845	5
811	5	846	6
812	5	848	6
813	4	850	4
814	5	855	4
815	2	856	4
825	5	857	6
826	4	858	3
835	6	888	5
836	4	889	4
843	4	890	4
Média 4,5			

Conclusão

Primers ISSR selecionados apresentaram bandas polimórficas para murici e podem ser utilizados em trabalhos de amplificação de DNA, via PCR, para essa espécie.



17^o Seminário de Iniciação Científica e 1^o Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 21 a 23 de agosto de 2013, Belém-PA

Agradecimentos

À Embrapa pelo financiamento do projeto e a FAPESPA pela bolsa de iniciação científica.

Referências Bibliográficas

COSTA, J. C. da. **Utilização de Marcadores ISSR na Caracterização de Cultivares**. Revisão de Literatura. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 2010. Disponível em: <http://lira.pro.br/wordpress/wp-content/uploads/downloads/2010/11/revisao-jose-carlos.pdf>. 2010. Acesso em: 17. 06.2013.

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

EMBRAPA RONDONIA. **MURICI (*Byrsonima crassifolia* (L.) Rich.)**. Embrapa Rondônia, 2005. Disponível em: http://www.cpafrro.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/folder_murici.pdf. Acesso em: 30 de maio de 2013.