



SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR PARA USO EM GENOMAS DE CAMUCAMUZEIRO

Moisés Rosas da silva¹, Maria do Socorro Padilha de Oliveira², Elisa Ferreira Moura², Simone de Miranda Rodrigues²

¹ Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética molecular, moisesrosas06@hotmail.com

² Pesquisadoras da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética molecular, socorro-padilha.oliveira@embrapa.br, elisa.moura@embrapa.br, simone.rodrigues@embrapa.br

Resumo: Marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) tem padrão de herança dominante, sendo uma técnica rápida, simples e barata permitindo a sua aplicação em qualquer espécie se tornando mais uma ferramenta para análise de variabilidade genética de espécies vegetais. O camu camu (*Myrciaria dúbia* [H.B.K.] McVaugh) é uma espécie típica da região amazônica contendo elevado teor de ácido ascórbico e em vista de seu potencial às agroindústrias de polpa e de medicamentos alguns programas de melhoramento genético vem sendo estabelecido, onde após a seleção tem se clonado os indivíduos para avaliação em ensaios clonais em vários locais, mas o genoma desses clones tem sido pouco explorado. Este trabalho teve por objetivo selecionar *primers* ISSR para avaliar seus potenciais como marcadores moleculares em análise da diversidade genética entre clones selecionados para produção e teor de vitamina C. Foram utilizadas duas amostras de DNA escolhidas ao acaso entre os dez clones e progênie dessa espécie, sendo um clone e uma progênie, conservadas sob baixa temperatura no laboratório de genética molecular da Embrapa Amazônia Oriental. Foram testados 62 *primers* primeiramente em temperatura de anelamento de 47°C para verificar a amplificação e depois em três gradientes. Foram selecionados os *primers* que apresentaram a melhor nitidez de bandas em suas respectivas temperaturas de anelamento. As reações de PCR foram realizadas em um mesmo termociclador sendo submetidas à eletroforese e os resultados fotodocumentados em UV.

Palavras-chave: marcadores moleculares, *Myrciaria dubia*, temperatura de anelamento.

Introdução

O Camucamu (*Myrciaria dúbia* [H.B.K.] McVaugh) é classificado como uma espécie não domesticada usada pelas populações indígenas e locais do Peru e Brasil de forma extrativista a partir de plantas crescendo naturalmente às margens dos rios e lagos ou cultivado em pequenas áreas de terra firme. Esta espécie possui alto potencial econômico pelo elevado conteúdo de vitamina C (até 3 g por



100 g de polpa). Atualmente a produção é destinada para os mercados locais do Brasil e Peru, e parte da produção do Peru para exportação como polpa a Europa, Estados Unidos e Japão (CEDECAM, 2007). Apesar da sua importância econômica, não existem muitas informações a nível molecular que ajudem no processo de melhoramento e obtenção de cultivares com caracteres selecionados para suprir demandas futuras para esta fruta.

Marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) baseiam-se na amplificação de fragmentos, distribuídos no genoma, entre regiões de DNA repetitivo (região microssatélites). Sendo assim, o *primer* é desenhado como sendo parte de uma região microssatélite podendo ser composto somente das repetições (não ancorado) ou contendo bases adicionais, diferentes das repetições, em uma das extremidades (ancorado) (WU et al, 1994). O padrão de herança deste marcador é do tipo dominante, e vem provando ser uma técnica relativamente rápida, simples e barata de acesso a diversidade genética, por também permitir sua aplicação a qualquer espécie, se constituindo em mais uma ferramenta dentro da classe de marcadores dominante para a análise de variabilidade genética de populações (CASU et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi selecionar *primers* ISSR obtendo melhores amplificações com suas respectivas temperaturas de anelamento.

Material e Métodos

Foram escolhidas ao acaso duas amostras de DNA genômico, uma de clone e uma progênie, as quais se encontram conservadas sob baixa temperatura (-80°C) no banco de DNA da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA.

As reações de PCR foram preparadas testando 62 *primers* ISSR, sendo 12 iniciadores sem informações e 50 com informações sobre a temperatura de anelamento (T_a). As reações de PCR foram realizadas em três gradientes de temperatura: 43°C – 48°C, 49°C – 54°C e 55°C – 60°C. O volume final das reações foi de 20 µl, contendo 8,18 µl de água ultra pura, 2,0 µl de DNA de *Myrciaria dúbia*, 1,38 µl de DNTP, 2,66 µl de um iniciador, 1,38 µl de BSA (bovine serum albumin), 1 unidade da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen, Brasil), 2,0 µl de MgCl₂ e 2,2µl de tampão de reação fornecido pelo fabricante da enzima. As reações PCR-ISSR foram colocadas em microtubos de 0,2 mL e realizadas em termociclador Veriti Thermal Cycler da marca Applied biosystems programado para 37 ciclos. Em cada ciclo, a desnaturação do DNA foi efetuada a 94°C por 4 minutos, o anelamento a 94°C



por 1 minuto e a alongação a 72°C por dois minutos. Após, a desnaturação ocorreu a etapa de extensão final realizada a 72°C por 7 minutos.

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 1 hora e 30 minutos. Em todas as corridas foi utilizado o marcador de peso molecular de 1Kb DNA *Ladder* (Invitrogen). Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e as imagens capturadas em meio digital.

Para a seleção dos marcadores foi avaliado primeiramente a amplificação, depois o padrão de amplificação de cada iniciador.

Resultados e Discussão

Dos 62 primers testados foram selecionados 29 *primers*, os quais apresentaram amplificaram bandas com os melhores padrões (Tabela 1). Dos 29 iniciadores selecionados, 26 continham informações sobre a *Ta* e 3 não continham informação.

Tabela1: Identificação dos 29 *primers* ISSR selecionados para uso em genomas de camucamuzeiro.

Primers selecionados (T.A.)			
Primers	T. A.	Primers	T. A.
810	53°C	854	49°C
811	51°C	855	54°C
814	49°C	857	51°C
815	58°C	859	50°C
816	50°C	864	59°C
817	51°C	866	57°C
818	53°C	868	50°C
822	45°C	873	56°C
823	50°C	880	49°C
824	44°C	881	50°C
825	54°C	888	49°C
835	57°C	890	49°C
836	56°C	891	50°C
844	54°C	895	50°C
851	50°C		

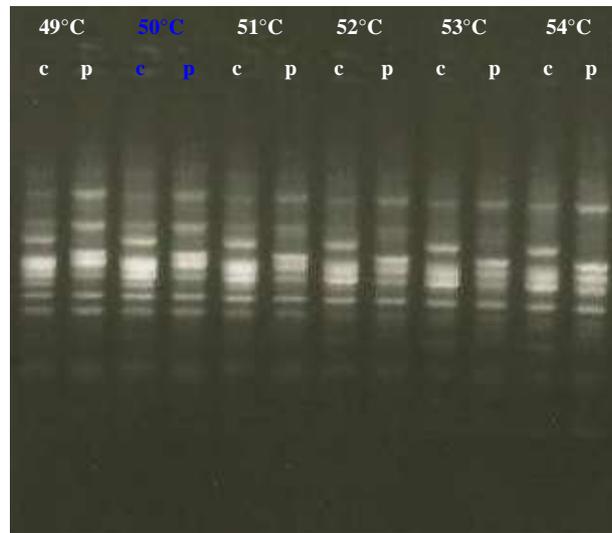


Figura 1: Perfil do gel de agarose contendo os produtos de amplificação do primer 821 em diferentes Ta°C. As letras “c” e “p” identificam os clones e as progênies, respectivamente.

Conclusão

Os primers ISSR selecionados apresentam bons padrões de amplificação e podem ser utilizados, por exemplo, para estudos de variabilidade e similaridade genética desta espécie.

Agradecimentos

À Embrapa Amazônia Oriental pela concessão de bolsa de projeto ao primeiro autor.

Referências Bibliográficas

- BOREM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2^a. Ed. UFV – Viçosa. 2009, 532p.
- CASU, M.; CASU D.; LAI, T.; COSSU, P.; CURINI-GALLETTI, M. Inter-simple sequence repeat markers reveal strong genetic differentiation among populations of the endangered mollusc *Patella ferruginea* (Gastropoda: Patellidae) from two Sardinian marine protected areas. **Marine Biology**, 149 (5): 1163-1174, 2006.
- CEDECAM.2007.**Camucamu.Información general**.En:http://www.cedecam.org/camucamu_informacion.htm; consulta: junio 2011.
- SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B.; SILVA, L. H. R.; ARAUJO, V. A. A. C.; CABRAL, J. C. Extração de DNA e seleção de marcadores ISSR para análise da diversidade genética em *Theobroma grandiflorum* (WILLD. EX SPRENG.) K. SCHUM In: Congresso de iniciação científica, 4^a.(JC), 2011, Cáceres/MT. **Anais**. Cáceres/MT: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG, 2011. Vol. 7 (2011). Cód. 4914. ISSN ONLINE 2237-9258. CDROM 2178-7492.



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

GOMES, S.O; MENDES, R.F de M.; LIMA, P.S da C. Determinação da temperatura de anelamento com marcadores ISSR em acessos de pinhão-manso. In: Congresso brasileiro de recursos genéticos, 2, 2013, Belém, PA. **Anais**. Belém, PA: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos. CDROM.