

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



18º Seminário de
Iniciação Científica e
2º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2014

12 a 14 de agosto

Embrapa
Belém, PA
2014



18^o Seminário de Iniciação Científica e 2^o Seminário de pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 12 a 14 de agosto de 2014, Belém-PA

SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR PARA ANÁLISES GENÉTICAS EM TUCUMÃ-DO-PARÁ

(*Astrocaryum vulgare* MART.)

Ilenilce Castro da Silva¹, Maria do Socorro Padilha de Oliveira², Andréa Cristina Rodrigues Fortes³

¹ Bolsista FAPESPA Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética, ilenilcecastrolamarck@gmail.com

² Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética, socorro-padilha.oliveira@embrapa.br

³ Bolsista CAPES Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética, andreafortes@rocketmail.com

Resumo: Dentre as espécies oleaginosas existentes na Amazônia o tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) se destaca com grande potencialidade nas indústrias alimentícia, medicinal e como matéria prima ao mercado de biodiesel. Marcadores ISSR são utilizados em estudos de diversidade e variabilidade genética por não necessitarem de informação prévia da seqüência de DNA. Este trabalho teve como objetivo selecionar *primers* ISSR para análises genéticas em tucumã-do-pará. Foram aplicados 100 *primers* ISSR do Set 9 da UBC em cinco amostras de DNA de tucumã representantes de genótipos conservados no BAG da Embrapa Amazônia Oriental em Belém-PA. As PCR's foram feitas em temperatura de anelamento padrão (Ta=47°C). A análise foi feita visualmente considerando a amplificação ou não amplificação de produtos. Dos 100 primers 54 não amplificaram bandas. Dos 46 que revelaram produtos, 17 produziram bandas claras e inespecíficas, enquanto 29 primers revelaram bandas específicas. Com o presente estudo foi possível selecionar preliminarmente 26 *primers* capazes de amplificar regiões de *A. vulgare*, e sugere-se inicialmente, os *primers* ISSR UBC 890 e UBC 891 que melhor amplificaram, para estudos de divergência genética do tucumã-do-pará.

Palavras-chave: Amazônia, DNA, genoma, marcador molecular, palmeira, polimorfismo

Introdução

Dentre as espécies oleaginosas existentes na Amazônia o tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) se destaca, é uma palmeira que possui espinhos pretos e flexíveis em quase toda a extensão da planta, sendo nativa da América do Sul (OLIVEIRA et al., 2012). Essa palmeira vem sendo indicada como uma alternativa no fornecimento de matéria prima ao mercado de biodiesel na região Norte (BIODIESEL..., 2008).

Sua importância econômica baseia-se principalmente na exploração da polpa dos frutos, que pode ser consumida ao natural ou na forma de sorvete, suco, licor e doce. Da polpa dos frutos e das sementes podem ser extraídos diferentes tipos de óleos comestíveis, além de poderem ser utilizadas na suplementação alimentar humana e na fabricação de ração animal (MENDONÇA, 1996).

A utilização de marcadores ISSR (Entre Sequências Simples Repetidas) (ZIETKIEWICZ et al., 1994) são amplamente utilizados em estudos de diversidade e variabilidade genética por não necessitar de informação



prévia da sequência de DNA, ter baixos custos de desenvolvimento e os procedimentos laboratoriais podem ser transferidos para qualquer espécie de planta (BARTH et al., 2002). O marcador molecular ISSR tem se mostrado uma poderosa ferramenta para análise da diversidade genética, bem como para a caracterização de acessos e cultivares de diversas espécies (CHARTERS; WILKINSON, 2000). Goulão e Oliveira (2001) mencionam que marcadores ISSR são úteis em identificação de cultivares com a vantagem de terem alta reprodutibilidade em relação a outros métodos utilizados baseados em PCR, como RAPD e AFLP.

Este trabalho teve como objetivo selecionar *primers* ISSR para análises genéticas em tucumã-do-pará.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no laboratório de genética da Embrapa Amazônia Oriental. Foram quantificadas e usadas cinco amostras de DNA genômico total representantes de materiais genéticos de Tucumã: 6, 8, 12 (Tuc 3-1), 17 (Tuc 4-1) e 20 (Tuc 4-4) conservados no Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, e 100 *primers* ISSR da UBC do SET n^o 9 (801 a 900).

As amplificações foram realizadas em termociclador AB (Applied Biosystems) com mix de volume final de 20 µL por amostra e contendo: 8,18 µL de água miliq (ultra pura), 2,2 µL de Tampão (10x PCR-MgCl₂), 2 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,38 µL de dNTPs, 1,38 µL de BSA, 2,66 µL de *primer*, 0,2 µL de TAQ polimerase e 2 µL de DNA (10 ng). O programa de amplificação utilizado teve fase inicial de desnaturação a 94°C por 1,5 min, seguida de 40 ciclos nas seguintes condições: 40s para desnaturação a 94°C; temperatura de anelamento padronizada em 47°C; 2 min para extensão a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 min.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% contendo SYBR® Safe DNA Gel (Invitrogen) com tampão TBE 1X e Ladder de 1kb (Invitrogen), conduzida em 90 V por 1,5 h. Os resultados das eletroforeses foram visualizados em transluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados. A análise preliminar dos produtos gerados em cada *primer* foi feita visualmente considerando a amplificação ou não amplificação, além da nitidez das bandas.

Resultados e Discussão

Dos 100 *primers* utilizados 54 não amplificaram bandas. Dos 46 que revelaram produtos, 17 produziram bandas claras e inespecíficas, enquanto 29 *primers* revelaram bandas específicas, mas que precisam de ajustes para temperatura de anelamento.

Vale ressaltar que 26 *primers* ISSR amplificaram regiões específicas nos cinco genomas de *A. vulgare* (Tabela 1). Os *primers* UBC 890 e 891 foram os que apresentaram amplificações com padrão de bandas, quanto à nitidez e polimorfismo (Figura 1) e os demais com presença de bandas fracas.



Tabela 1. Identificação de 26 *primers* ISSR que amplificaram produtos em cinco amostras de *A. vulgare*.

Primer	Sequência	Primer	Sequência	Primer	Sequência
UBC 815	(CT) ₈ G	UBC 853	(TC) ₈ RT	UBC 881	(AT) ₈ YA
UBC 817	(CA) ₈ ^a	UBC 855	(AC) ₈ YT	UBC 884	HBH(AG) ₇
UBC 818	(CA) ₈ G	UBC 856	(AC) ₈ YA	UBC 885	BHB(GA) ₇
UBC 835	(AG) ₈ YC	UBC 858	(TG) ₈ RT	UBC 886	VDV(CT) ₇
UBC 840	(GA) ₈ YT	UBC 859	(TG) ₈ RC	UBC 887	DVD(TC) ₇
UBC 841	(GA) ₈ YC	UBC 864	(ATG) ₆	UBC 889	DBD(AC) ₇
UBC 846	(CA) ₈ RT	UBC 868	(GAA) ₆	UBC 890	VHV(GT) ₇
UBC 847	(CA) ₈ RC	UBC 872	(GATA) ₄	UBC 891	HVH(TG) ₇
UBC 852	(TC) ₈ RA	UBC 879	(CTTCA) ₃		

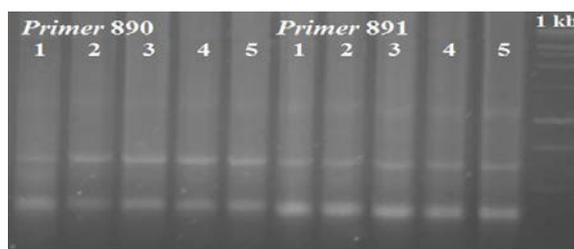


Figura 1. Produtos de um padrão de gel utilizando marcadores ISSR com os *primers* 890 e 891 na temperatura de anelamento igual a 47°C, em cinco indivíduos de *A. vulgare*: 6 (Tuc 2-2), 8 (Tuc 2-4), 12 (Tuc 3-1), 17 (Tuc 4-1) e 20 (Tuc 4-4).

Souza et al. (2009) utilizaram cinco primers ISSR entre eles UBC 840 e UBC 868 em genoma de babaçu e constataram que esses dois primers melhor amplificaram com temperatura de anelamento (T_a) igual a 55°C e 49°C, respectivamente, demonstrando que a T_a deve ser avaliada individualmente para cada *primer*. Bernet e Branchard (2001) ressaltam que a T_a é específica e sempre superior a T_m (Temperatura de Melting) para um *primer*, pois o mesmo requer altas temperaturas para facilitar o anelamento. Hristova et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes a este, os *primers* que vão de UBC 801 a UBC 805 não tiveram amplificação devido a temperatura de fusão desses *primers* serem baixas.

Para melhores resultados, se faz necessário realizar adequações no programa de amplificação específico para cada primer e modificações nas reações de eletroforese para marcadores ISSR. Alguns fatores como o método de extração de DNA, quantidade de *primers* por amostra, concentração de $MgCl_2$ e concentração de dNTP devem ser estudados para obtenção de resultados satisfatórios.

Conclusões

Dos *primers* ISSR testados 26 são capazes de amplificar produtos em genoma de *A. vulgare*. Mas, a temperatura de anelamento (T_a) deve ser ajustada para cada um dos *primers* ISSR de forma a otimizar a



18^o Seminário de Iniciação Científica e 2^o Seminário de pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 12 a 14 de agosto de 2014, Belém-PA

qualidade e quantidade de bandas nesses marcadores. Sugere-se inicialmente, os *primers* ISSR UBC 890 e UBC 891, que melhor amplificaram, para estudos de diversidade genética do tucumã-do-pará.

Referências bibliográficas

- BARTH, S.; MELCHINGER, A. E.; LUBBERSTEDT, T. L. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 495–505, 2002.
- BIODIESEL no mundo. **Revista Biodieselbr.com**, 2008. Disponível em <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/mundo/biodiesel-no-mundo.htm>. Acesso: 28 maio 2009.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Intersimple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology**, v. 19, p. 209–215, 2011.
- CHARTERS, Y. M.; WILKINSON, M. J. The use of self-pollinated progenies as “in-groups” for the genetic characterization of cocoa germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 160–166, 2000.
- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, p. 81–89, 2001.
- HRISTOVA, E.; STOYANOV, K.; GEVEZOVA, M.; DENEV, I. Application of ISSR methods in studying broomrape’s (*Orobanchaceae*) biodiversity in Bulgaria. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, n. 1, p. 2248–2253, 2011.
- MENDONÇA, M. S. **Aspectos morfológicos das sementes de algumas espécies de palmeiras (Arecaceae = Palmae) da Amazônia**. 1996. 68 f. Tese (Concurso de Professor Titular) - Universidade do Amazonas, Manaus.
- OLIVEIRA, N. P.; OLIVEIRA, M. S. P.; MOURA, E. F. Variabilidade e divergência genética entre genótipos de tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) promissores para a produção de frutos por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 216–226, 2012.
- SOUZA, I. G. D.; SANTOS, M. F.; GOMES, R. L. F.; VALENTE, S. E. S.; SITTO LIN, I. M.; ARAÚJO, E. C. E.; LIMA, P. S. C. Otimização de marcadores ISSR para análises de diversidade genética em babaçu. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 6., 2009. Montes Claros. **Biodiesel: inovação tecnológica: anais**. Lavras: UFLA, 2009. 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.