



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
ÁREA DE FITOTECNIA

**Seleção de *primers* ISSR para estudo da diversidade genética da espécie
Myrciaria floribunda O. Berg**

Aluno: Allison Vieira da Silva

Orientador: Edson Ferreira da Silva

Recife, 2018

INFORMAÇÕES GERAIS

Seleção de *primers* ISSR para estudo da diversidade genética da espécie *Myrciaria floribunda* O. Berg

Aluno: Allison Vieira da Silva

E-mail: allison_dico@hotmail.com

Telefone: (81)98813-5618

Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) vinculado ao curso de agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Sede), como requisito para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Recife, 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586s Silva, Allison Vieira da.
Seleção de primers ISSR para estudo da diversidade genética da espécie *Myrciaria floribunda* O. Berg / Allison Vieira da Silva.
– Recife, 2018.
12 f.: il.

Orientador(a): Edson Ferreira da Silva.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências.

1. Cambuí 2. ISSR 3. Marcadores I. Silva, Edson Ferreira da, orient. II. Título

CDD 630

SUMÁRIO

RESUMO	4
INTRODUÇÃO:.....	4
O cambuí (<i>Myrica floribunda</i> O. Berg)	4
Protocolo de extração	5
Mascadores ISSR:.....	5
OBJETIVOS:.....	6
Objetivo geral:	6
Objetivos específicos.....	6
MATERIAL E MÉTODOS:	6
Coleta do material.....	6
Otimização da extração do DNA:	7
Eletroforese.....	8
Seleção dos iniciadores ISSR:	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
Conclusão.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	11

RESUMO:

A espécie *Myrciaria floridunda* O. Berg, conhecida popularmente como cambuí, pertence à família das Myrtaceae. O cambuí é uma espécie nativa, não endêmica que ocorre em diversificados ambientes na América Central e na América do Sul. São plantas de crescimento lento, com hábito arbustivo ou subarbustivo. Os frutos, produto de interesse da espécie, são do tipo baga, pequenos, esféricos com coloração laranja, vermelha e vinho quando estão maduros. A exploração da espécie ainda é majoritariamente extrativista, realizada por famílias tradicionais locais que em época de frutificação da espécie alavancam a renda com venda dos frutos em feiras. Os frutos podem ser consumidos em natura, em forma de geleias, licor ou vinho. Para estudo da diversidade genética da espécie com utilização de marcadores moleculares do tipo ISSR, é necessário que primeiramente seja isolado DNA em qualidade e quantidade suficientes para desenvolvimento do trabalho. A coleta do material foi realizada no banco de germoplasma ativo da Universidade Federal de Alagoas, foram coletadas folhas como amostras. O DNA da espécie foi extraído a partir da metodologia do detergente CTAB com modificação de adaptação à espécie. Com o DNA isolado, foram testados doze *primers* ISSR em dois genótipos de cambuí. Dos doze primers, oito foram selecionados por apresentarem índice de polimorfismo acima de 50%, são eles: UFAL-2, UFAL-3, UFAL-5, UFAL-6, UFAL-7, UFAL-8, UFAL-9 e UFAL-10.

INTRODUÇÃO:

O cambuí (*Myrica floribunda* O. Berg):

A espécie *Myrciaria floribunda* pertence à família das Myrtaceae. Com distribuição pantropical, a família Myrtaceae compreende aproximadamente 133 gêneros e mais de 3800 espécies, tem como centro de diversidade a Austrália, o sul da Ásia, a região Neotropical e uma pequena parcela na África (Wilson et al., 2001). As principais características botânicas que distinguem a família são: folhas completas com presença de glândulas de óleo, ovário semi-ínfero a ínfero, floema interno, estames normalmente numerosos e vasos com orifícios revestidos (Wilson et al., 2001).

O cambuí é uma espécie nativa, não endêmica que ocorre em diversificados ambientes na América Central e na América do Sul (Sobral et al., 2015). São plantas de crescimento lento que apresentam hábito arbustivo ou subarbustivo. O cambuí possui inflorescências cimosas composta por pequenas flores brancas. Os frutos são do tipo baga, pequenos, esféricos com coloração laranja, vermelho e vinho quando estão maduros. Em um trabalho de caracterização realizado com populações da costa alagoana, Araújo (2012) que os diâmetros dos frutos podem chegar a 12,18 mm, com peso médio de até 1,43 g e rendimento de polpa de 76,19%.

A exploração da espécie é em sua maior parte extrativista. Segundo Gama et al. (2017), o extrativismo do cambuí é geralmente realizado por famílias tradicionais locais e representa significativa importância econômica e social, compondo parte importante da renda dessas famílias em época de colheita. Os frutos são consumidos em natura ou utilizados para fabricação de suco, geleias, licores e vinhos (Santos, 2010).

Protocolo de extração:

O desenvolvimento de estudos moleculares depende diretamente da qualidade do DNA extraído, desse modo a otimização e estabelecimento de protocolos de extração são necessários, visto que um bom procedimento de extração deve produzir DNA de pureza, qualidade e quantidades adequadas para manipulação (Romano, 1998).

A presença de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários representam o principal problema encontrado no processo de purificação de DNA vegetal, pela ação que estes contaminantes apresentam sobre a atividade da enzima *Taq* DNA polimerase. Folhas de diversas espécies vegetais possuem níveis variados de polissacarídeos que são inibidores da reação de PCR e os protocolos tradicionalmente utilizados para extração de DNA vegetal, embora removam as proteínas, nem sempre removem efetivamente esses polissacarídeos (Demek & Adams, 1992).

A otimização de um protocolo de extração se torna necessária quando protocolos padrões que são utilizados para a maioria das espécies, como os protocolos baseados no método CTAB. O objetivo da otimização é desenvolver um protocolo rápido, simples e com boa reprodutibilidade.

Marcadores ISSR:

Os marcadores moleculares vêm sendo amplamente empregados em estudos de diversidade, caracterização, filogenia, estrutura de populações, entre outros. Os marcadores dominantes do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) são segmentos de DNA com 100 a 3.000 pares de base e é baseado na técnica de PCR (Zietkiewicz et al., 1994). São marcadores que apresentam elevado grau de polimorfismo, tem boa reprodutibilidade e apresentam baixo custo para desenvolvimento, uma vez que não é necessário ter conhecimento prévio da sequência de DNA para desenvolvimento do *primer* utilizado (Reddy et al., 2002).

As regiões amplificadas por marcadores do tipo ISSR são abundantes e se encontram distribuídas por todo o genoma. Por apresentar baixa especificidade e geralmente acessar diversos locos polimórficos, os marcadores ISSR se apresentam como uma ferramenta importante

para estudos de diversidade genética principalmente em espécies pouco exploradas nesse aspecto, uma vez que, por ser um marcador multiloco não é necessário o conhecimento prévio do DNA a ser avaliado (Gupta et al., 1994).

OBJETIVOS:

Objetivo geral:

- Selecionar marcadores do tipo ISSR para serem utilizados no estudo da diversidade genética do cambuí.

Objetivos específicos:

- Otimização de um protocolo de extração de DNA total para o cambuí.
- Avaliar e selecionar *primers* ISSR para serem utilizados como marcadores moleculares para a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS:

Coleta do material:

A coleta do material foi realizada no banco de germoplasma ativo, localizado no Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). O banco de germoplasma ativo tem como curador o professor doutor Eurico Eduardo Pinto de Lemos.

No ato da coleta, foram priorizadas plantas com maior presença de folhas jovens. Com o auxílio de uma tesoura de poda, foram coletadas folhas das extremidades dos ramos e logo após, as folhas foram transferidas para tubos do tipo Falcon (50 ml) e receberam uma identificação alfanumérica. Depois de serem identificados os tubos foram acondicionados em uma caixa térmica na presença de gelo.

O material coletado foi transportado para o Laboratório de Genética de População (LGP) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Ao chegarem ao LGP, os tubos foram transferidos para um freezer com temperatura de -20 °C e permanecem conservados à disposição do grupo de pesquisa (Figura 1).



Figura 1: Amostras de folhas coletadas de cambuí, conservadas em freezer no LGP.

Otimização da extração do DNA:

Para extração dos indivíduos coletados em campo, 39 no total, foram macerados 150 mg de folha em almofariz na presença de 1,3 μL do tampão de extração (CTAB 2%). Após a maceração das amostras foi adicionado o 2-Mercaptoetanol, a proteinase K e o material foi transferido para tubos eppendorf e colocado em banho-maria a 60 °C por uma hora. Após ser retirado do banho-maria, o material esfriou em temperatura ambiente e recebeu o volume de 650 μL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico – 24:1) gelado e os tubos foram levemente agitados com as mãos até a formação de uma emulsão. Após esta etapa, os tubos foram centrifugados a 12.000 RPM por 5 minutos a temperatura ambiente. Depois da centrifugação a fase aquosa superior de cada tubo foi coletada e transferida para um novo tubo eppendorf onde foram adicionados 200 μL do tampão de extração e 650 μL de CIA, os tubos foram agitados novamente, centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos e tiveram novamente a fase aquosa superior coletada e transferida para um novo tubo eppendorf. A etapa anterior foi repetida mais uma vez e após a transferência para um novo tubo eppendorf as amostras receberam o volume de 650 μL de Isopropanol gelado e permaneceram em freezer -20 °C por uma noite.

No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos e todo sobrenadante foi descartado, deixando-se apenas os pellets nos tubos. Foram realizadas duas lavagens com um mL de etanol 70% em temperatura ambiente e as amostras foram centrifugadas por 3 min a 12.000 RPM. Após as lavagens os pellets secaram nos tubos em temperatura ambiente e foram ressuspensos em 40 μL de água ultrapura e colocados em freezer a -20 °C (Figura 2).

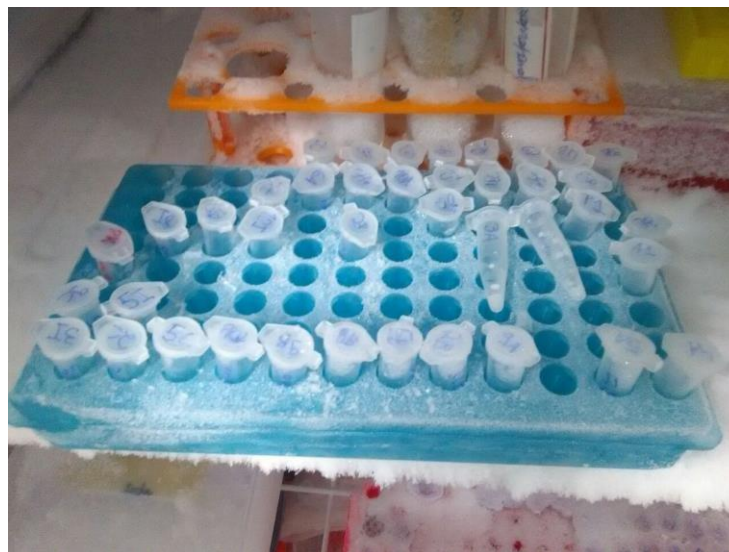


Figura 2: DNA isolado das folhas coletadas de cambuí, mantidas em freezer no LGP.

Eletroforese:

O DNA extraído foi submetido à técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose para a análise da quantidade e qualidade do material obtido. O gel de agarose foi preparado a uma concentração final de 1% em TBE 0,5x. A corrida teve duração de 20 minutos, a 80 V.

Foram aplicadas em um mesmo gel com 40 poços, as 39 amostras de DNA extraídas. Em cada poço foram aplicados 3,5 μ L do DNA com 0,8 μ L do corante Blue Green. O resultado da eletroforese foi visualizado com o auxílio de um transluminador do tipo LED.

Seleção dos iniciadores ISSR:

Um total de 12 iniciadores ISSR disponíveis foi utilizado, a fim de selecionar aqueles cujos marcadores produzidos fossem mais polimórficos para o estudo da diversidade genética de *M. floribunda*. Para isso, o DNA de nove amostras pré-selecionadas foi submetido a ampliações via PCR com os iniciadores.

Foram utilizados para cada reação: 25 ng de DNA molde, tampão para *Taq* PCR a 1x, 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP (Sinapse), 0,4 mM do iniciador (Tabela 1) e 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Sinapse), para um volume final de 15 μ L. Todas as reações foram realizadas em um termociclador Biogener e foram submetidas a uma desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguida por 40 ciclos compostos pelas etapas de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 46°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Por fim, foi realizado um passo de extensão final de 72°C por 5 minutos. Controles negativos consistindo de todos os

reagentes exceto o DNA molde foram realizados em cada experimento, a fim de verificar possível contaminação.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 2%, submerso em tampão TBE 0,5x (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA), sob tensão constante de 80V, durante 70 minutos. As amostras foram diretamente coradas com *Blue Green* loading dye I. Ao final, elas foram visualizadas sob luz de LED e fotografadas com câmera digital (Major Science). O marcador de peso molecular Ladder 100 bp Plus (Sinapse) foi usado para comparação do tamanho das bandas produzidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O isolamento do material genético das amostras teve sua qualidade avaliada visualmente. A extração não funcionou para todas as amostras e foi notado um fato em comum entre as amostras das quais não obtivemos uma bandida nítida e íntegra, tratavam de amostras de folhas velhas e escuras. As demais amostras apresentaram bandas nítidas e íntegras (Figura 3). Em trabalhos relacionados a extração de DNA a partir de tecido foliar, os autores aconselham que sejam priorizadas folhas jovens, tenras e com bom aspecto físico, a fim de, evitar a maiores concentrações de fenóis e polissacarídeos, que interferem negativamente no processo de isolamento do DNA (Mitton et al., 1979).

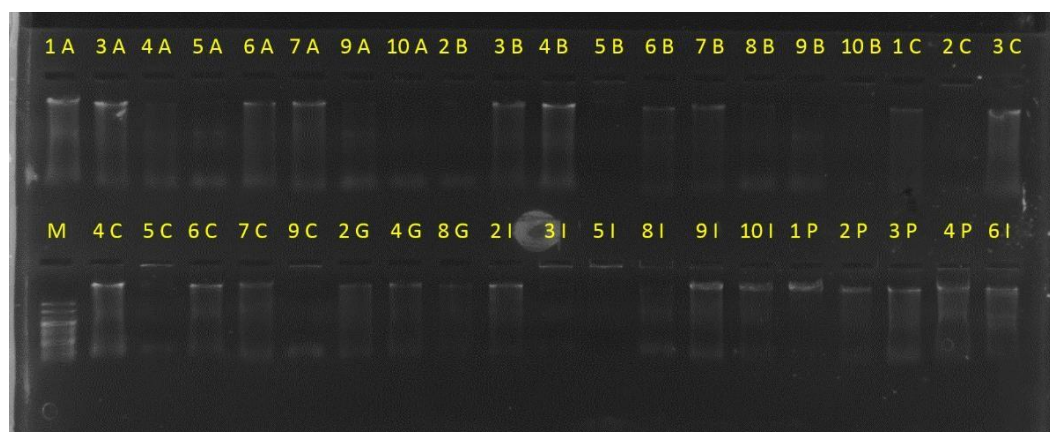


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose do material genético obtido a partir do protocolo de extração de DNA. As amostras foram comparadas em relação ao marcador (M) com 100 pares de base.

A partir dos 12 *primers* avaliados, três não mostraram produto de amplificação. Dos nove *primers* que amplificaram, todos foram polimórficos (Figura 4). O número de bandas variou de duas a sete, com média de quatro bandas. O comprimento de bandas variou de 2000 a 400 pares de bases. Quanto ao polimorfismo, a média dos *primers* que amplificaram ficou em

torno de 80%, resultado parecido com o encontrado por Santana et al. (2011) ao trabalharem com umbu-cajazeira, aplicando marcadores ISSR para estudo da diversidade genética da espécie.

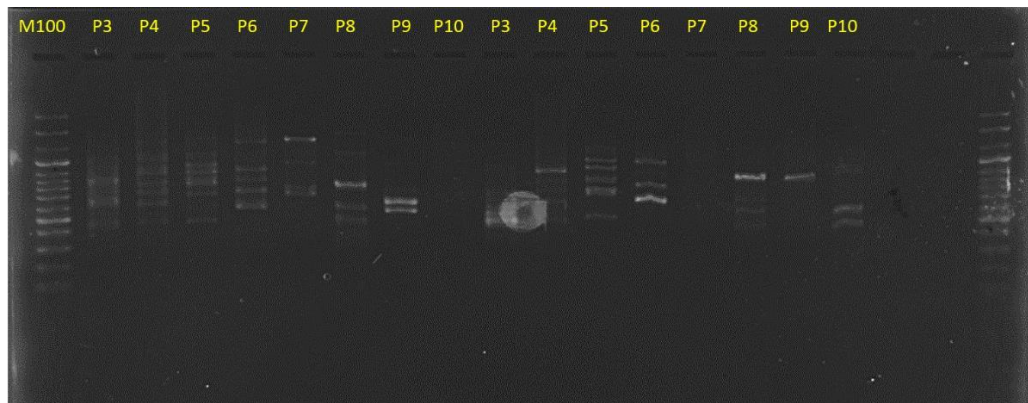


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose com o material amplificado por oito dos doze *primers* analisados. O primeiro e último poço do gel receberam a aplicação do Ladder com 100 pares de bases para análise comparativa do comprimento das bandas. Os oito primeiros poços após o marcador são referentes ao genótipo 2G, e os oito seguintes são referentes ao genótipo 4G.

Nos trabalhos que são desenvolvidos utilizando-se marcadores dominantes como os ISSR, a percentagem de locos polimórficos é considerada como medida de diversidade genética (Lorenzoni et. Al, 2014). Com base nesta informação, a seleção de *primers* é realizada com base no percentual de bandas polimórficas apresentadas pelo *primer*, esses resultados podem ser visualizados na Tabela 1. Os *primers* UFAL-2, UFAL-3, UFAL-7, UFAL-9, UFAL-100 tiveram um padrão de amplificação 100% polimórfico. O maior número de bandas foi obtido através da amplificação dos *primers* UFAL-5, UFAL-6, e UFAL-8 com 7 bandas amplificadas com índice de polimorfismo igual 57%, 71% e 71% respectivamente.

Tabela 1: Resultados da amplificação dos marcadores ISSR utilizados, com número de bandas amplificadas, número de bandas polimórficas e índice de polimorfismo calculado entre a proporção de bandas polimórficas e o número de bandas amplificada pelo *primer*.

Primer	Nº Bandas de		
	Nº de Bandas	Pol.	% P
UFAL-1	0	0	0
UFAL-2	4	4	100
UFAL-3	4	4	100
UFAL-4	6	1	17
UFAL-5	7	4	57

UFAL-6	7	5	71
UFAL-7	4	4	100
UFAL-8	7	5	71
UFAL-9	3	3	100
UFAL-10	2	2	100
UFAL-11	0	0	0
UFAL-12	0	0	0

Conclusão:

Os *primers* UFAL-2, UFAL-3, UFAL-5, UFAL-6, UFAL-7, UFAL-8, UFAL-9 e UFAL-10 podem ser utilizados como marcadores moleculares para estudo de diversidade genética com a espécie *M. floribunda* O.Berg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARAÚJO, R. R. Qualidade e potencial de utilização de frutos de genótipos de cambuí, guajiru e maçaranduba nativos da vegetação litorânea de Alagoas. 2012. 175 f. **Tese** (Doutorado em Fitotecnia: Agricultura Tropical) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró.

DEMEK, T.; ADAMS, R. P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. **Biotecnologia**, v.12, n.3, p.333-334, 1992.

GAMA, DRAUZIO CORREIA et al. O CAMBUI (Myrciaria tenella (DC.) O. BERG; MYRTACEAE): EXTRATIVISMO E GERAÇÃO DE RENDA EM RIBEIRA DO POMBAL-BAHIA. **Revista Brasileira de Agroecologia**, [S.l.], v. 12, n. 1, mar. 2017. ISSN 1980-9735. Disponível em: <<http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/rbagroecologia/article/view/20753>>. Acesso em: 22 aug. 2018.

GUPTA, M.; CHYI, Y.-S.; ROMERO-seVERSON, J.; OWEN, J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.998-1006, 1994.

LORENZONI, Rodrigo Monte et al. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal v.36, n.1, p.251-257, 2014.

MITTON, J.B.; LINHART, Y.B.; STURGEON, K.B.; HAMRICK, J.L. Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of Ponderosa pine. **Journal of Heredity**, v.70, n.2, p.86-89, 1979.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.128, p.9-17, 2002.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília. EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CENARGEN. 1998. p.163-177.

SANTANA, I.B.B.; OLIVEIRA, E.J.; SOARES FILHO, W.S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E.P.; COSTA, M.A.P.C.; MOREIRA, R.F.C. Variabilidade genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.3, p.868-876, 2011.

SANTOS, E. D. Fenologia e biometria de frutos de cambuí (*Myrciaria floribunda* O.Berg.) de populações nativas e cultivadas em Alagoas. 2010. 75 f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal e Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió-AL.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. 2015 *Myrtaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10787>>. Acesso em: 14 ago. 2018.

WILSON P.G.; O'BRIEN, M.M.; GADEK, P.A.; QUINN, C.J. Myrtaceae revisited: a reassessment of intrafamilial groups. **American Journal of Botany**, Columbus, n.88, p.2013-2025, 2001.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, p.176-183, 1994.