

CIRCULAR TÉCNICA

n. 383 - abril 2023

ISSN 0103-4413

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Departamento de Informação Tecnológica
Av. José Cândido da Silveira, 1647 - União - 31170-495
Belo Horizonte - MG - www.epamig.br - Tel. (31) 3489-5000



AGRICULTURA,
PECUÁRIA E
ABASTECIMENTO



MINAS
GERAIS

GOVERNO
DIFERENTE.
ESTADO
EFICIENTE.

Diversidade genética em acessos de umbuzeiro com base em marcadores moleculares¹

Luciana Cardoso Nogueira Londe²
Jéssica Guerra Calaes³

INTRODUÇÃO

O umbu é uma espécie frutífera de importância ambiental e socioeconômica para as regiões Semiáridas brasileiras. Com o surgimento de áreas comerciais e a necessidade da preservação genética, esta espécie demanda maior conhecimento de caracterização dos acessos e de seus frutos, a fim de identificar genótipos com potencial para mercado in natura ou indústria (SANTOS, 2018).

Dessa forma, os marcadores moleculares têm sido cada vez mais utilizados por sua ampla aplicação em estudos genéticos. Dentre essas ferramentas biotecnológicas, os marcadores Inter Repetições de Sequência Simples – Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) têm grande potencial para aplicação em programas de melhoramento. Baseiam-se na amplificação de regiões entre sequências microssatélites adjacentes do DNA via Polymerase Chain Reaction (PCR), e, além de não exigirem conhecimento prévio do genoma, apresentam elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo (GONZALÉZ; COULSON; BRETTELL, 2002; NG; TAN, 2015).

Esta Circular Técnica tem por objetivo estimar a divergência de 16 acessos de umbuzeiro, pertencentes ao jardim clonal da EPAMIG Norte, por meio de marcadores moleculares.

CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (Labbiotec), da EPAMIG Norte - Campo Experimental do Gorutuba (CEGR), Nova Porteirinha, MG, e no Laboratório de Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes) - Campus Janaúba, MG, durante os anos de 2019 a 2022.

O DNA foi extraído a partir de primórdios foliares retirados dos 16 acessos de umbuzeiro do matrizeiro da EPAMIG Norte. Utilizou-se o método brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) de acordo com a metodologia de Doyle e Doyle (1990). Para a verificação da qualidade do DNA foi utilizado um gel de agarose 0,8% corado em solução de GelRed®. A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm. A partir de então foi realizada a diluição, padronizando todas as amostras a 10 ng de DNA/μL.

As amostras foram submetidas a reações de amplificação compostas das seguintes concentrações finais: cloreto de potássio (KCl) 50 mM; Tris (hidroximetil)-aminometano – Tris hydrochloride (Tris-HCl) 10 mM (pH 8,3); cloreto de magnésio (MgCl₂) 2,5 mM; nucleosídeo trifosfato – dinucleotide triphosphates (dNTPs) 2,5 mM; 0,4 mM do primer; 25 ng/μL de DNA genômico; 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (Sinapse) e água ultrapura para completar o

¹Circular Técnica produzida pela EPAMIG Norte - CEGR, (38) 3834-1760, cegr@epamig.br.

²Bióloga, D.Sc., Pesq. EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, luciana@epamig.br.

³Eng. Agrônoma, Doutoranda Produção Vegetal UNIMONTES - Campus Janaúba, Janaúba, MG, jessica_guerra_calaes@hotmail.com.

volume final. As amplificações foram efetuadas em termociclador Techne, modelo TC-412, empregando-se um programa sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por três minutos; seguido de 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos e temperatura de anelamento de 47 °C durante 30 segundos para cada primer e extensão a 72 °C por 90 segundos. Posteriormente, prosseguiu um ciclo final de extensão de 72 °C por dois minutos, seguido de um ciclo a 4 °C até a retirada das amostras do termociclador.

Os produtos resultantes das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% e em tampão Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 1 vez por uma hora e corados em solução de 3 µL corante Tipo IV e 5 µL de GelRed® por um período de 15 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital UVP® *Life Science Software*.

Dos 100 primers ISSR testados, 14 forneceram produtos nítidos para amplificação, os quais foram utilizados em todos os indivíduos (Quadro 1).

Quadro 1 - Primers ISSR selecionados para umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) – Nova Porteirinha, MG, 2022

Primer	Sequência (5'→ 3')
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC 819	GTG TGT GTG TGT GTG TA
UBC 820	GTG TGT GTG TGT GTG TC
UBC 821	GTG TGT GTG TGT GTG TT
UBC 823	TCT CTC TCT CTC TCT CC
UBC 824	TCT CTC TCT CTC TCT CG
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
UBC 828	TGT GTG TGT GTG TGT GA
UBC 829	TGT GTG TGT GTG TGT GC
UBC 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
UBC 844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC

Fonte: Elaboração das autoras.

Para quantificar a diversidade genética entre os genótipos, foram codificadas as bandas produzidas na amplificação pelos primers ISSR, resultando em uma matriz binária (1 para presença e 0 para ausência de bandas). O cálculo da matriz de dissimilaridade foi obtido pelo complemento do Índice de Gower (GOWER, 1971). A divergência genética foi representada por dendrograma obtido pelo método

de agrupamento hierárquico aglomerativo simples – unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA). Para verificar a consistência do agrupamento, calculou-se o coeficiente de correlação cofenética (CCC). Os dados foram analisados por meio do software R versão 3.5.2., com auxílio dos pacotes Cluster, RCMR e Ade4.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR COM BASE EM MARCADORES INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT

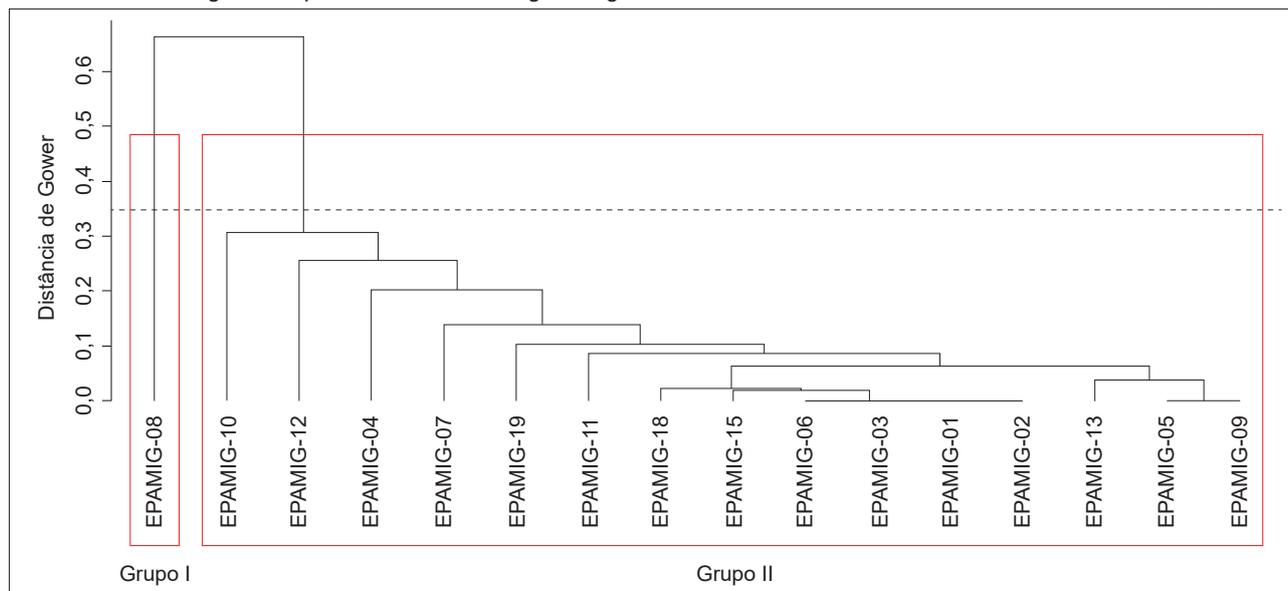
Nos últimos anos os marcadores moleculares estão sendo utilizados em estudos genéticos, pois possibilitam a discriminação genotípica de forma hábil, detectam o polimorfismo intra e interpopulacional (SOUZA, 2015). São importantes para os estudos de divergência genética, principalmente, por considerarem na estimativa de dissimilaridade genética apenas a constituição genotípica e não a fenotípica, passível de influência do ambiente (ROCHA *et al.*, 2020).

Dentre os marcadores, destacam-se os ISSR, que são dominantes e não necessitam de conhecimento prévio do genoma. Com rápida resposta, proporcionam um vasto número de dados, possuem baixo custo de utilização, quando comparados a outros marcadores, e elevados níveis de polimorfismo e reprodutibilidade (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002; BORÉM; CAIXETA, 2016; NADEEM *et al.*, 2018).

Desse modo, a técnica de ISSR tornou-se mais acessível, e, por isso, tem sido frequentemente usada em estudos de dissimilaridade genética de população (COSTA *et al.*, 2015). Os marcadores ISSR têm exibido eficiência em vários estudos de diversidade genética de espécies frutíferas, como o uso na análise genética de *Spondia* sp. (SANTANA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2017; SALES, 2020).

Com base na diversidade genética estimada via marcadores ISSR entre os acessos de umbuzeiro, foi possível a verificação da formação de dois grupos distintos (Gráfico 1). O coeficiente de correlação cofenética obtido foi de 98,40%, evidenciando a consistência da integridade dos agrupamentos formados. Valores do coeficiente de correlação cofenética superiores a 80% são indicativos de consistência nos valores de similaridade genética, o que proporciona maior credibilidade ao agrupamento (CARGNELUTTI FILHO; RIBEIRO; BURIN, 2010). Lins Neto *et al.* (2013), em estudo realizado sobre *Spondias tuberosa*, usando os primers ISSR, encontraram 91,67% de polimorfismo.

Gráfico 1 - Dendrograma representativo da divergência genética entre 16 acessos de umbuzeiro – Janaúba, MG, 2022



Fonte: Elaboração das autoras.

Nota: Resultado obtido pelo método de agrupamento hierárquico aglomerativo simples – unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA), utilizando-se o complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade.

Observou-se que o acesso EPAMIG-08 possui maior dissimilaridade permanecendo isolado no grupo I, enquanto os demais reuniram-se no grupo II (Gráfico 1). No grupo II, é possível detectar similaridade genética entre os pares de acessos EPAMIG-05 e EPAMIG-09, assim como os acessos EPAMIG-06, EPAMIG-03, EPAMIG-01 e EPAMIG-02.

No grupo II, ao adotar-se um percentual de divergência genética em torno de 20%, constatou-se a formação de três subgrupos (Gráfico 1). É possível verificar dissimilaridade genética entre os acessos EPAMIG-10 e EPAMIG-12 em relação aos demais acessos.

Assim, é notável a capacidade de detectar variabilidade genética entre os genótipos avaliados nesse estudo por meio de marcadores ISSR.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível detectar divergência genética entre os acessos de umbuzeiro.

O genótipo EPAMIG-08 foi o mais distante pela análise molecular, podendo ser testado em cruzamentos para avaliação das populações segregantes e possível obtenção de heterose.

AGRADECIMENTO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (ed.). **Marcadores moleculares**. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2016. 385p.
- CARGNELUTTI FILHO, A.; RIBEIRO, N.D.; BURIN, C. Consistência do padrão de agrupamento de cultivares de feijão conforme medidas de dissimilaridade e métodos de agrupamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.45, n.3, p.236-243, mar. 2010.
- COSTA, D.F. da *et al.* Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.37, n.4, p.970-976, dez. 2015.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- GONZÁLEZ, A.; COULSON, M.; BRETTELL, R. Development of DNA markers (ISSRs) in mango. **Acta Horticulturae**, n.575, p.139-143, Apr. 2002. Trabalho apresentado no International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits, 2002, Cairns, Austrália.
- GOWER, J.C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, v.27, n.4, p.857-871, Dec. 1971.

- LINS NETO, E.M.F. de *et al.* Traditional knowledge, genetic and morphological diversity in populations of *Spondias tuberosa Arruda* (Anacardiaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.60, n.4, p.1389-1406, Apr. 2013.
- NADEEM, M.A., *et al.* DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.32, n.2, p.261-285, 2018.
- NG, W.L.; TAN, S.G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **ASM Science Journal**, v.9, n.1, p.30-39, 2015.
- REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.128, n.1, p.9-17, Nov. 2002.
- ROCHA, S.S. *et al.* Congruence between morphological and molecular markers for genetic diversity analysis applied to forage palm genotypes propagated via bioreactors. **Industrial Crops and Products**, v.147, 112230, May 2020.
- SALES, R.P. de. **Ecologia populacional, diversidade genética e modelagem de nicho ecológico da *Spondias tuberosa Arruda***. 2020. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, 2020.
- SANTANA, I.B.B. *et al.* Variabilidade genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.3, p.868-876, set. 2011.
- SANTOS, L.J.S. **Características fisiológicas e qualidade dos frutos de acessos de umbuzeiro e umbu-cajazeira da coleção do IF Baiano, Campus Guanambi- BA**. 2018. 94f. Dissertação (Mestrado Profissional em Produção Vegetal no Semiárido) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, Guanambi, 2018.
- SILVA, B.M. *et al.* Genetic diversity of Cajazeira (*Spondias mombin* L.) in three geographic regions. **Genetics and Molecular Research**, v.16, n.1, gmr16018946, Jan. 2017.
- SOUZA, D.C.L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.3, p.495-503, 2015.