

MARCADORES MOLECULARES ISSR PARA ESTUDOS GENÉTICOS DE *Pityrocarpa moniliformis* (Benth.) Luckow & R. W. Jobson

Francival Cardoso Felix ^{(1)*}; Kyvia Pontes Teixeira das Chagas ⁽¹⁾; Cibele dos Santos Ferrari ⁽¹⁾;
Fábio de Almeida Vieira ⁽¹⁾; Mauro Vasconcelos Pacheco ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais/ PPGCFL, Universidade Federal do Rio Grande do Norte/ UFRN, Macaíba/ RN, *E-mail: francival007@gmail.com.

Introdução

Pityrocarpa moniliformis (Benth.) Luckow & R. W. Jobson (Fabaceae) é uma espécie arbórea com ocorrência natural em regiões semiáridas e litorâneas do Nordeste brasileiro, a qual é conhecida popularmente como catanduva (MAIA-SILVA et al., 2012). Além disso, apresenta potencial social, ecológico e econômico por causa da madeira utilizada como lenha, folhas para forragem, produção de mel e recuperação de áreas degradadas (AZERÊDO et al., 2011). Na região semiárida do Brasil, a *P. moniliformis* se destaca como uma das principais espécies arbóreas apícolas e melitófilas (ALVES et al., 2014) que quantitativamente mais contribuem para o fornecimento de mel com qualidade (JESUS et al., 2015).

Assim, conhecer a variabilidade genética de populações naturais é essencial para o desenvolvimento e incorporação da espécie em sistemas produtivos regionais (COSTA et al., 2011), bem como conservar os recursos genéticos da espécie de modo a evitar a sua erradicação (SIMON, 2010). Dessa forma, a obtenção de material genético de *P. moniliformis* pode contribuir para a elaboração de programas de melhoramento florestal, e assim incorporar o desenvolvimento socioeconômico de pequenos e grandes agricultores da região Nordeste do Brasil.

Para estudos de diversidade genética são utilizados diversos marcadores moleculares, destacando-se os ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*), os quais são marcadores dominantes comumente utilizados em estudos de diversidade genética; possuem baixo custo de desenvolvimento, elevadas taxas de polimorfismo e alta reprodutibilidade (BARTH et al., 2002).

Dado o esboço e diante das potencialidades que esta espécie apresenta, sobretudo para conservação e programas de desenvolvimento do semiárido, o objetivo com o presente trabalho foi selecionar iniciadores ISSR para estudos genéticos de *P. moniliformis*.

Metodologia

Obtenção de material foliar e extração de DNA

Amostras foliares jovens e em bom estágio de conservação foram coletadas de 30 indivíduos de *P. moniliformis*, distanciadas entre si em duas vezes e meio a sua altura (SEBBEN, 2006),

localizados na Área de Experimentação Florestal (5°54'01" S e 35°21'28" W, raio de 500 m) da Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UAECIA/ UFRN), Macaíba/ RN, Brasil.

As amostras foram transferidas para tubos contendo 2% de solução tampão detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) e mantidas em refrigerador a -20 °C. O DNA foi extraído utilizando-se o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1987), em seguida, realizou-se a quantificação em espectrofotômetro (Epoch™). Os três indivíduos que apresentaram conteúdos de DNA em maior concentração foram reunidos para serem utilizados na reação em cadeia de polimerase (PCR).

Amplificação do DNA com iniciadores ISSR

Testaram-se 28 iniciadores moleculares ISSR (*University of British Columbia – UBC*). A amplificação da reação de PCR continha 12 µL de volume final por amostra, 2,0 µL DNA concentrado e 10,0 µL de mistura de reação [2,0 µL de iniciador ISSR 0,33 µM; 1,2 µL de tampão de PCR (Buffer IC Phoneutria®); 3,0 µL de BSA 0,25 mg.mL⁻¹; 0,48 µL de MgCl₂ 2,0 mM; 1,2 µL dNTPs 2,0 mM; 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 0,5 U e 2,0 µL de água ultra pura].

As reações de amplificação do DNA foram feitas em termociclador (BioClycle™) durante o período de 1 h 40 min, conforme as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C durante 2 min, seguido de 37 ciclos de 15 segundos a 94 °C para desnaturação, 30 segundos a 47 °C para anelamento dos iniciadores ISSR e 1 min a 72 °C para extensão, com extensão final a 72 °C durante 7 min e posterior resfriamento a 4 °C.

Após a reação de amplificação, 5 µL do produto da PCR foram corados com 4 µL de azul de bromofenol e Gelred™, e inseridos em cuba horizontal de corrida da Eletroforese contendo gel de agarose (1,5 m.v⁻¹), além de uma amostra de peso molecular padrão de 10.000 pares de bases (Bp) (Ladder Kasvi® 1KB). Em seguida, o gel de agarose foi imerso em solução tampão TAE 1X (Tris-acetato-EDTA), mantidos em corrente de 100 V durante 2 h 30 min. Por fim, realizou-se a captura da fotografia sob luz ultravioleta em fotodocumentador (E-Box VX2).

Seleção dos iniciadores ISSR

A seleção dos iniciadores ISSR foi baseada nos aspectos de resolução e padrão de amplificação dos locos, ou seja, selecionaram-se aqueles que apresentaram melhor padrão de visualização, qualidade de resolução e quantidade.

Resultados e discussão

Os resultados evidenciaram que houve amplificação do DNA de *P. moniliformis* para todos os indicadores moleculares ISSR testados (Figura 1), em que a média obtida foi de seis locos por iniciador, entretanto, os iniciadores UBC 827 e UBC 859 forneceram o maior número, com 10 locos cada, enquanto que para o iniciador UBC 809, verificou-se a amplificação de apenas dois locos (Tabela 1).

As análises moleculares em estudos genéticos são fundamentais para a conservação e melhoramento de espécies florestais e comerciais (LORENZONI et al., 2014). Assim, os marcadores ISSR são considerados vantajosos em comparação a outras técnicas moleculares (COSTA et al., 2015).

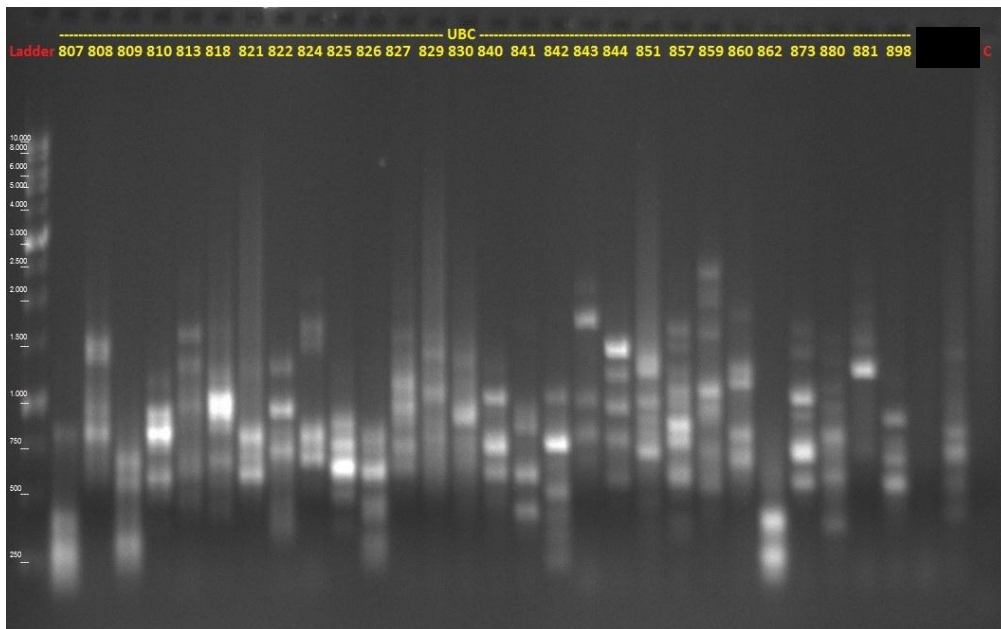


Figura 1. Padrão de amplificação de 28 iniciadores ISSR para *P. moniliformis*.

Resultados satisfatórios foram obtidos com marcadores moleculares ISSR para: *Mimosa caesalpinifolia* Benth., em que sete dentre 27 iniciadores foram selecionados, sendo os iniciadores UBC 827 e UBC 859 os que proporcionaram maior número de locos, 12 e 10, respectivamente (ARÚJO et al., 2016); *Hancornia speciosa* Gomes, em que seis dentre 19 iniciadores testados foram selecionados (COSTA et al., 2015); *Elaeis guineensis* Jacq., em que seis dentre 29 iniciadores testados foram escolhidos (CHAGAS et al., 2015).

Com base no padrão de amplificação do DNA e nitidez na observação de locos por meio da imagem de eletroforese (Figura 1), os iniciadores ISSR UBC 825, 826, 827, 840, 844, 857, 859, 860 e 873 são recomendados para estudos genéticos de *P. moniliformis*, os quais forneceram a amplificação de 70 locos, cuja média encontrada foi de oito por iniciador.

Tabela 1. Iniciadores ISSR com suas respectivas sequências de nucleotídeos e número total de locos amplificados para *P. moniliformis*.

Iniciador ISSR	Sequência de nucleotídeos (5' – 3')	Número total de locos
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	3
UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	6
UBC 809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	2
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	6
UBC 813	CTCTCTCTCTCTCTT	7
UBC 818	CACACACACACACAG	7
UBC 821	GTGTGTGTGTGTGTGTT	4
UBC 822	TCTCTCTCTCTCTCA	4
UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCG	6
UBC 825	ACACACACACACACT	5
UBC 826	ACACACACACACACC	9
UBC 827	ACACACACACACACG	10
UBC 829	TGTGTGTGTGTGTGTC	7
UBC 830	TGTGTGTGTGTGTGG	5
UBC 840	GAGAGAGAGAGAGAYT	7
UBC 841	GAGAGAGAGAGAGAYC	7
UBC 842	GAGAGAGAGAGAGAYG	6
UBC 843	CTCTCTCTCTCTCTRA	5
UBC 844	CTCTCTCTCTCTCTRC	6
UBC 851	GTGTGTGTGTGTGTG TYG	7
UBC 857	ACACACACACACACYG	9
UBC 859	TGTGTGTGTGTGTGRC	10
UBC 860	TGTGTGTGTGTGTGRA	7
UBC 862	AGCAGCAGCAGCAGC	3
UBC 873	GACAGACAGACAGACA	7
UBC 880	GGAGAGGAGAGGAGA	8
UBC 881	GGGTGGGGTGGGGTG	6
UBC 898	CACACACACARY	4
Média		6

R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T).

Resultados satisfatórios também foram obtidos para outras espécies florestais, como *M. caesalpinifolia* que apresentou 69 locos amplificados e média de dez locos por iniciador ISSR (ARAÚJO et al., 2016), para *H. speciosa* foram observados 63 locos e média de 11 por iniciador (COSTA et al., 2015), *E. guineensis*, observou-se 68 locos com média de 11 locos por iniciador (CHAGAS et al., 2015), e para *Spondias* sp., dentre os 25 marcadores selecionados, obteve-se média de 10 locos por iniciador ISSR (SANTANA et al., 2011).

Conclusões

Os iniciadores UBC 825, 826, 827, 840, 844, 857, 859, 860 e 873 se mostraram eficientes para amplificação de *P. moniliformis*, sendo recomendado seu uso para estudos de diversidade genética populacional e melhoramento genético.

Palavras-chave: Caatinga; catanduva; espécie florestal; *Inter-Simple Sequence Repeat*; semiárido.

Fomento

Os dois primeiros autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas, as quais tornaram viável a execução desta pesquisa.

Referências

ALVES, M.J.; MOURA, A.K.S.; COSTA, L.M.; ARAÚJO, E.J.F.; SOUSA, G.M.; COSTA, N.D.J.; FERREIRA, P.M.P.; SILVA, J.N.; PESSOA, C.; LIMA, S.G.; CITÓ, A.M.G.L. Teor de fenóis e flavonoides, atividades antioxidante e citotóxica das folhas, frutos, cascas dos frutos e sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth (Leguminosae – Mimosoideae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Caribe, v.13, n.5, p.466-476, 2014.

ARAÚJO, F.S.; PACHECO, M.V.; VIEIRA, F.A.; FERRARI, C.S.; FELIX, F.C.; CHAGAS, K.P. ISSR molecular markers for the study of the genetic diversity of *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. **IDESIA**, Chile, v.34, n.3, p.47-52, 2016.

AZERÊDO, G.A.; PAULA, R.C.; VALERI, S.V. Viabilidade de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth. pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.33, n.1, p.61-68, 2011.

BARTH, S. MELCHINGER, A.E.; LUBBERSTEDT, T. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and *Inter-Simple Sequence Repeat* (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.495-505, 2002.

CHAGAS, K.P.T.; SOUSA, R.F.; FAJARDO, C.G.; VIEIRA, F.A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineenses*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.10, n.1, p.147-152, 2015.

COSTA, T.S.; SILVA, A.V.C.; LÉDO, A.S.; SANTOS, A.R.F.; SILVA-JÚNIOR, J.F.S. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v.46, n.5, p.499-508, 2011.

COSTA, D.F.; VIEIRA, F.A.; FAJARDO, C.G.; CHAGAS, K.P.T. 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, 2015.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Washington, v.12, n.1, p.13-15, 1987.

JESUS, M.C.; BORGES, R.L.B.; SOUZA, B.A.; BRANDÃO, H.N.; SANTOS, F.A.R. A study of pollen from light honeys produced in Piauí State, Brazil. **Palynology**, Dallas, v.39, n.1, p.110-124, 2015.

LORENZONI, R. M.; SOARES, T. C. B.; SANTIAGO, V. F.; SILVA, J. A.; COELHO, R. I. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.36, p.251-257, 2014.

MAIA-SILVA, C.; SILVA, C.I.; HRNCIR, M.; QUEIROZ, R.T.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. **Guia de Plantas** – visitadas por abelhas na Caatinga, Fundação Brasil Cidadão. 2012. 99p.

SEBBENN, A. M. **Sistemas de reprodução em espécies tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais**. In: HIGA, A. R.; SILVA, A. L. D. (Coord.). Pomar de sementes de espécies florestais nativas. Curitiba: FUPEF do Paraná, 2006. cap.5, p.93-138.

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**, v.33, n.3, p.868-876, 2011.

SIMON, M. F. **Manual de curadores de germoplasma** - vegetal: conservação *in situ*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Colombo, 2010. 14 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 322).