

SELEÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE ISSR PARA ESTUDOS GENÉTICOS DA *Spondias tuberosa* Arruda

Raiane Pereira de Sales¹
Abidã Genesis da Silva Neves²
Cristiane Gouvêa Fajardo³
Fábio de Almeida Vieira⁴

RESUMO

Spondias tuberosa, que pertence à família Anacardiaceae, é uma espécie nativa da Caatinga com distribuição do Nordeste ao Norte de Minas Gerais. Apresenta destaque econômico no extrativismo, em função do consumo e produção de derivados dos frutos. Devido à importância econômica combinada com o extrativismo da espécie, são necessárias estratégias de conservação de germoplasma, como também criar novas técnicas de propagação que contribuam para a manutenção da diversidade genética das populações. Nesse sentido, os marcadores moleculares possibilitam a caracterização genética populacional, fornecendo informações para a conservação da espécie. Assim, o estudo teve como objetivo selecionar marcadores ISSR para subsidiar estudos de diversidade genética de populações naturais da *Spondias tuberosa*. Foram coletadas amostras foliares de 23 indivíduos em vegetação de Caatinga no Museu Rural Auta Pinheiro Bezerra no município de Santa Cruz/RN. Trinta iniciadores foram testados e destes selecionados dez, que se destacaram por apresentarem maior número de locos com melhor visualização. A partir destes iniciadores, foram identificados 103 locos. Entretanto, com base na resolução e número de locos por iniciador, foram selecionados o M1, UBC 807, UBC 808, UBC 813, UBC 818, UBC 825, UBC 826, UBC 862, UBC 873, fornecendo um total de 53 locos. Os marcadores ISSR selecionados neste estudo demonstraram eficiência na amplificação de locos que permitirão analisar os polimorfismos moleculares para *Spondias tuberosa*. Por meio dos estudos da diversidade genética dos indivíduos, será possível estabelecer estratégias e planos que visem à conservação e à manutenção da espécie.

Palavras-chave: Anacardiaceae, Conservação, Umbu, Variabilidade genética.

INTRODUÇÃO

O bioma Caatinga é constituído por vegetação xerófila composta por espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas, caducifólias na grande maioria, com mecanismos de adaptação, como o caule revestido por espinhos, ocorrendo nos Estados da Bahia, Sergipe,

¹Mestranda do Curso de Ciências Florestais Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, raianepsales@gmail.com;

²Graduando pelo Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, abidagenesis@hotmail.com;

³Professora coorientadora: Doutora em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, genegoista00@gmail.com;

⁴Professor orientador: Doutor da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, vieirafa@gmail.com.

Alagoas, Pernambuco, Piauí, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Norte de Minas Gerais. Estas regiões têm entre as características a baixa pluviosidade, evapotranspiração elevada, salinidade, entre outras (FABRICANTE, 2007; KOCH et al., 2017).

A família Anacardiaceae possui 80 gêneros e 800 espécies, com distribuição principalmente em regiões tropicais ou subtropicais (PELL et al., 2011). As espécies da família Anacardiaceae são conhecidas pelas espécies frutíferas, que têm grande importância no paisagismo, madeireiro ou para fins alimentícios como o caju, manga entre outros (LUZ, 2011; PICKEL e ALMEIDA, 2008).

A *Spondias tuberosa* Arruda, Anacardiaceae, é uma planta nativa da região semiárida do Nordeste do Brasil, que produz frutos do tipo drupa, esféricos ou ovais, com cerca de 4 cm de diâmetro, casca de média espessura, bastante lisa, esverdeada e amarelo pálido quando maduro. Os frutos são muito apreciados devido ao excepcional sabor e odor (sabor agridoce) e apresentam alto teor de compostos fenólicos garantindo uma dieta com bom suprimento de compostos antioxidantes (MELO; ANDRADE, 2010).

A fruta apresenta grande valor econômico, mas devido à sua alta perecibilidade e sazonalidade pronunciada é muito comum a perda de grande quantidade de frutos maduros durante o pico de produção. Além disso, o setor enfrenta uma infraestrutura precária de manuseio pós-colheita que também contribui para a perda de frutos. Atualmente as frutas são consumidas frescas ou usadas para sucos, sorvetes, conservas de frutas ou para fazer geleia, e não é incomum que essas frutas sejam uma fonte de renda econômica para as comunidades que vivem na região semiárida do Nordeste do Brasil (SANTOS e CASTRO, 2011). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019) a produção do país foi de cerca de 7.465 toneladas de umbu em 2017, e o Estado da Bahia apresentou maior expressividade na produção extrativista dessa fruta, atingindo cerca de 90% da produção total do Brasil (IBGE, 2019).

Estudos de genética de populações de espécies florestais são necessários para caracterizar a diversidade genética remanescente nas populações naturais, e quando associados a aspectos ecológicos, como sistema sexual, mecanismos de polinização e dispersão, regeneração e estabelecimento de plântulas, favorecem a definição de estratégias de conservação e manejo. Estas informações servem, ainda, para a compreensão de processos evolutivos, como seleção natural e fluxo gênico, além de eventos de endogamia, gargalos genéticos, dentre outros (VIEIRA e CARVALHO, 2008; SILVA et al., 2011; CHAGAS et al., 2015).

Neste sentido, estudos com marcadores moleculares têm como finalidade avaliar a variabilidade genética em populações naturais, utilizando os ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeat*), visto que são eficazes no reconhecimento de polimorfismo, com baixa demanda de custo, possui alto grau de polimorfismo e de fácil utilização em laboratórios (FAJARDO et al., 2018; SANTANA et al., 2011; SILVA et al., 2017; PINHEIRO et al., 2017). Assim, o presente estudo teve como objetivo selecionar marcadores ISSR para análises de diversidade genética de populações naturais de *Spondias tuberosa* Arruda.

METODOLOGIA

Foram coletadas amostras foliares de 23 indivíduos em uma população natural em vegetação de Caatinga no Museu Rural Auta Pinheiro Bezerra no município de Santa Cruz/RN, situada nas coordenadas 6°13'38,9"S e 36°01'15,75"O, no município de Santa Cruz – Rio Grande do Norte (RN). A região tem solo Planossolo - fertilidade natural alta, textura arenosa e argilosa, relevo suave ondulado, imperfeitamente drenados, rasos. A vegetação no município de Santa Cruz/RN é Caatinga Hipoxerófila - vegetação de clima semiárido que apresenta arbustos e árvores com espinhos e de aspecto menos agressivo do que a Caatinga Hiperxerófila (BELTRÃO et al., 2005). O local está na mesorregião do Agreste Potiguar e microrregião da Borborema Potiguar (IDEMA, 2008).

A coleta foi realizada de fragmentos de tecido foliar dos indivíduos e inseridos em tubos plásticos contendo 2 mL de CTAB 2x, posteriormente identificados e transportados ao Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal (LabGem) – UFRN, Macaíba-RN, aonde foram armazenados em freezer à -20 °C, até iniciar a extração do DNA.

Cerca de 250 mg de material foliar foram utilizadas para a extração do DNA pelo método CTAB proposto por Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações. Foram utilizados 100 mM de Tris pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA pH 8,0; 2% (p/v) CTAB; 1% (p/v) PVP-40 e 0,2% (v/v) de β-mercaptoetanol pré-aquecido a 60°C em banho-maria. O DNA foi levado à geladeira e submetido a uma temperatura média de 4°C, até que o *pellet* solubilizasse na solução. Em seguida foi armazenado em freezer até a utilização. A concentração total de DNA foi mensurada com o auxílio do espectrofotômetro EpochTM. Para as reações de PCR foram utilizados 30 iniciadores ISSR da Universidade de British Columbia (UBC *primer set #9*, Vancouver, Canadá). O mix de PCR foi constituído de Buffer (10 X),

BSA ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), MgCl_2 (50 mM), dNTP (2,5 mM), *primer* (2 μM), Taq polimerase ($\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), DNA (diluído 1:50) e água ultra pura, em um volume final de 12 μL por amostra.

Para a seleção dos marcadores foi feito um “bulk” misturando-se 4 μL de DNA concentrado de três indivíduos para aumentar as chances de amplificação de locos. As PCRs foram realizadas em termociclador automático Biocycler, aonde as amostras foram inicialmente desnaturadas a 94 °C por 2 min, seguidos de 37 ciclos, iniciando-se com 15 segundos a 94 °C; em seguida 30 segundos a 47 °C e posteriormente 72 °C por 1 minuto; ao final de todos os ciclos o processo foi finalizado por 7 minutos a 72 °C e resfriado a 4 °C.

Após a PCR foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), com tampão TAE 1X (Tris-Acetato EDTA), com a voltagem de 100 V, por duas horas e meia. Foi utilizado o marcador de peso molecular (Ladder) de 1.000 pares de bases para definição do tamanho molecular dos fragmentos amplificados. Ao fim da eletroforese, os géis foram fotografados através da fonte de luz ultravioleta e fotografados com o auxílio do sistema de foto documentação E-Box VX2. Assim, os iniciadores foram selecionados por meio de comparação, avaliando aqueles que apresentaram melhor nitidez e maior número de fragmentos amplificados. Os locos foram desconsiderados para os iniciadores que mostraram baixas definições ou não amplificaram.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 30 iniciadores testados apresentaram fragmentos amplificados, mostrando assim que o método de extração de DNA empregado foi eficiente para a espécie (Figura 1), com um total de 103 locos. No entanto foram selecionados os iniciadores que apresentaram um número significativo de locos e de boa definição.

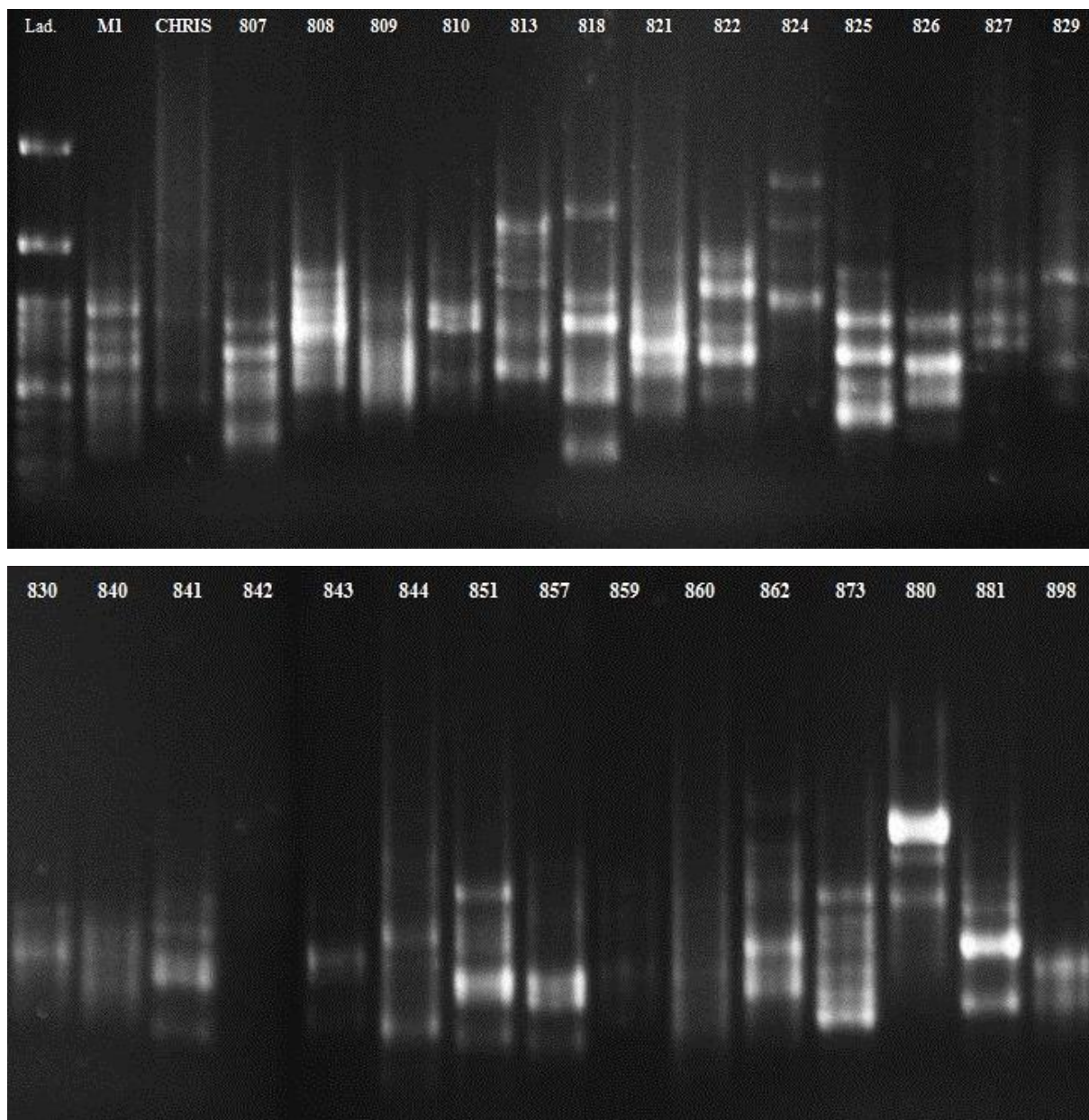


Figura 1 - Resultado da amplificação dos fragmentos, concebido pelos 30 iniciadores ISSRs.

Dentre estes, destacaram-se os iniciadores M1, UBC 807, UBC 808, UBC 813, UBC 818, UBC 825, UBC 826, UBC 862, UBC 873 por apresentarem locos nítidos e em maior número, totalizando 53, com uma média de 5,3 locos por iniciador (Tabela 1). O iniciador UBC 826 apresentou 3 locos na amplificação do fragmento, sendo o iniciador com menor número de locos dentre os 10 selecionados. Já no trabalho de Costa et al. (2015), os autores encontraram 10 locos utilizando o mesmo iniciador UBC 826 para a espécie *Hancornia speciosa* Gomes, valor este superior ao observado no presente trabalho.

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

Iniciadores ISSR	Sequência de nucleotídeos (5' – 3')	Número total locos
M1	CAAGAGAGAGAGA	6
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	5
UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	6
UBC 813	CTCTCTCTCTCTCTT	5
UBC 818	CACACACACACACACAG	6
UBC 825	ACACACACACACACT	5
UBC 826	ACACACACACACACC	3
UBC 841	GAGAGAGAGAGAGAYC	5
UBC 862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	6
UBC 873	GACAGACAGACAGACA	6
Média		5,3
Total		53

Y = pirimidina (C ou T).

De acordo com a literatura, existem vários trabalhos sobre diversidade genética com o uso de marcadores dominantes em espécies florestais, por exemplo para *Hancornia speciosa* Gomes foram amplificados 70 locos com média de 11,7 locos por iniciador ISSR (FAJARDO et al., 2018); para *Copernicia prunifera* (Miller) H.E. Moore foram observados 102 locos e média de 12,75 locos por iniciador (PINHEIRO et al., 2017), na *Spondias* sp., observaram-se 249 locos para os 25 marcadores selecionados, com média de 10 locos por iniciador ISSR (SANTANA et al., 2011). Adicionalmente, estudos como Fajardo et al. (2018) e Pinheiro et al. (2017) demonstraram a aplicabilidade dos marcadores dominantes nas estimativas da diversidade genética, assim como fizeram implicações para a conservação genética de espécies florestais de relevância econômica.

Neves et al. (2019) realizaram um estudo de seleção de iniciadores para a *Syagrus cearensis* Noblick, o qual obteve 118 bandas utilizando 12 iniciadores. Os autores obtiveram resultados expressivos na seleção de iniciadores. Observaram-se que 42% dos iniciadores apresentaram de 5 a 7 locos, e 42% exibiram 2 a 4 locos (NEVES et al., 2019).

Os estudos moleculares de genética de populações são de suma importância, pois tem como finalidade auxiliar a conservação e melhoramento de espécies florestais

economicamente importantes (LORENZONI et al., 2014). Desta forma, os marcadores ISSR são classificados como eficientes, quando utilizados em técnicas moleculares de análises de genética e melhoramento (COSTA et al., 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dez marcadores ISSR selecionados no estudo foram eficientes para a *Spondias tuberosa* Arruda, permitindo acesso a uma diversidade de locos. Com isso, foram indicados neste estudo iniciadores de ISSR que poderão ser utilizados em estudos futuros quanto à diversidade, melhoramento e conservação genética da espécie.

REFERÊNCIAS

BELTRÃO, B. A. T.; ROCHA, D. E. G.; MASCARENHAS, J. D. C.; SOUZA JUNIOR, L. C. D.; PIRES, S. D. T. M.; CARVALHO, V. G. D. D. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea, estado do Rio Grande do Norte: relatório diagnóstico do município de Mossoró.** CPRM, 2005.

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 guineensis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, p. 147-152, 2015.

COSTA, D. F.; VIEIRA, F. D. 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**, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

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

FABRICANTE, J. R.; ANDRADE, L. A. Análise Estrutural de um remanescente de Caatinga no Seridó paraibano. **Oecologia brasiliensis**. v. 11, n. 3, p. 341-349, 2007.

FAJARDO, C. G.; COSTA, D. F. D.; CHAGAS, K. P. T. D.; VIEIRA, F. D. A. Genetic diversity in natural populations of *Hancornia speciosa* Gomes: implications for conservation of genetic resources. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. 623-630, 2018.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da extração vegetal e silvicultura.** Rio de Janeiro, 2012. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 agosto 2019.

IDEMA – Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente do RN. Perfil do Seu Município – Santa Cruz. Natal: 2008. Disponível em:

<<http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/idema/DOC/DOC000000000013886.PDF>>. Acesso em: 13 de março de 2019.

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.

LUZ, C. L. S. **Anacardiaceae R. Br. na flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. 2011. Tese de Doutorado Universidade de São Paulo.

KOCH, R.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; KLEINSCHMIT, B. Revealing areas of high nature conservation importance in a seasonally dry tropical forest in Brazil: Combination of modelled plant diversity hot spots and threat patterns. **Journal for nature conservation**, v. 35, p. 24-39, 2017.

MELO, E. A.; ANDRADE, R. A. M. S. Bioactive compounds and antioxidant potential from the “umbuzeiro” fruits. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.21, n.3, p.453-457, 2010.

NEVES, A. G. S.; SALES, R. P.; COSTA, M. P.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Seleção de iniciadores moleculares ISSR para estudos de variabilidade genética da *Syagrus cearensis* Noblick. **Revista Agropecuária Científica no Semi-árido**. No prelo.

PICKEL, B. J.; ALMEIDA, A. V. Flora do Nordeste do Brasil segundo Piso e Marcgrave no século XVII. **Editora Universitária UFRPE**, 2008.

PELL, S.; MITCHELL, J.; MILLER A.; LOBOVA, T. Anacardiaceae. In: Kubitzki K (ed.) The families and genera of vascular plants. **Flowering plants. Eudicots. Sapindales, Curcubitales, Myrtales. Vol. X**. Springer, Berlin. p. 7-50, 2011.

PINHEIRO, L. G.; CHAGAS, K. P. T.; FREIRE, A. S. M.; FERREIRA, M. C.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Anthropization as a determinant factor in the genetic structure of *Copernicia prunifera* (Arecaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 16, p. 1-14, 2017.

SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J. D.; SOARES FILHO, W. D. S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M. A. P. D. C.; MOREIRA, R. F. C. Genetic variability among Umu-Cajazeira accessions by ISSR markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SANTOS, B. L.; CASTRO, V. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do umbu**. Brasília: Embrapa Recursos, 2011.

SILVA, M. S.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Diversity and genetic structure in natural populations of *Geonoma schottiana* Mart (Arecaceae): implications for conservation. **Cerne**, v. 17, n.2, p.195-201, 2011.

VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 17, n.2, p. 2305-2321, 2008.