



1
2 **DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE CAMU-CAMU (*MYRCIARIA DUBIA*)**
3 **BASEADO EM MARCADORES ISSR**

4
5 CLAUDINÉIA FERREIRA NUNES¹; LEILA APARECIDA SALLES PIO²; MOACIR
6 PASQUAL³; EDIANARA GENEROSO SANTOS⁴; EDVAN ALVES CHAGAS⁵

7
8 **INTRODUÇÃO**

9 O camu-camu (*Myrciaria dubia*), espécie considerada silvestre é uma frutífera da família
10 das Mirtaceas encontrada na Amazônia. Apresenta frutos ácidos, podendo ser consumidos na forma
11 de sucos, geléias, doces e sorvetes e têm elevado teor de vitamina C, excedendo em muito aos
12 apresentados pela maioria das plantas cultivadas no Brasil.

13 O conhecimento da diversidade genética existente em acessos de camu-camu é de grande
14 importância para o êxito de programas de melhoramento e para a exploração dos recursos genéticos
15 disponíveis. O estudo com marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR), tem
16 colaborado de forma significativa como ferramenta auxiliar na definição do status populacional de
17 amostras biológicas. Tais marcadores têm sido amplamente utilizados para esta abordagem, pois são
18 eficientes, reprodutíveis, rápidos e geram números elevados de polimorfismos (KURAS et al.,
19 2004). Além disso, esta técnica tem um baixo custo associado.

20 No presente estudo, os marcadores ISSR foram utilizados para avaliar a variabilidade
21 genética de acessos de camu-camu.

22
23 **MATERIAL E MÉTODOS**

24 Folhas jovens de 94 acessos de camu-camu provenientes de populações mantidas nas
25 margens do Lago do Rei, localizado no município de Caracaraí, Roraima/RR foram coletadas e
26 armazenadas em freezer -80°C. O DNA genômico foi extraído segundo metodologia descrita por
27 Nunes et al. (2011). Para a amplificação por PCR foram utilizados 14 primers ISSR (Tabela 1). A
28 amplificação do DNA foi realizada em termociclador de gradiente (MultiGene, EUA) com volume

1 Dra. Bolsista Pós-Doutorado, UFLA, MG, e-mail: claudineia.f.nunes@gmail.com

2 Dra. Professora pelo Departamento de Agricultura, UFLA, MG, e-mail: leilapio.ufla@gmail.com

3 Dr. Professor Titular pelo Departamento de Agricultura, UFLA, MG, e-mail: mpasqual@dag.ufla.br

4 Bióloga, Bolsista de Apoio Técnico (FAPEMIG), EPAMIG, MG, e-mail: digeneroso@hotmail.com

5 Dr. Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, RR, e-mail:edvan.chagas@embrapa.br

29 final de 25 µL para cada reação, contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 100 mM KCl,
 30 0,10% de Triton X-100, 200µM de cada trifosfato de desoxirribonucleótido (dNTPs), 0,8 mM de
 31 primer, 1,5 unidade de enzima DNA polimerase GoTaq Flexi (Prodimol, EUA) e 50 ng de DNA.
 32 Em PCR, as amostras foram submetidas a temperatura de 95 °C por 2 min e, em seguida, 40 ciclos
 33 de amplificação. Cada ciclo submetia as amostras a 95 °C por 45 s, com temperatura de anelamento
 34 variando de 47-52 °C (dependendo do primer utilizado), por 1 min e extensão de 72 °C por 2 min.
 35 Após os ciclos, as amostras foram mantidas a 72 °C por 5 min de extensão final. Os produtos
 36 obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% com 0,2 mg mL⁻¹ EtBr em
 37 tampão TBE 1X e realizado a 100 mV por pelo menos 3 h. Os géis foram visualizados e registrados
 38 pelo digitalizador de imagem UV (Uvitec, EUA). Os marcadores obtidos foram analisados pelo
 39 aplicativo computacional “Genealex 6” (PEAKALL e SMOUSE, 2006) e pelo aplicativo 'Structure
 40 2.3.1' (PRITCHARD et al., 2000.).

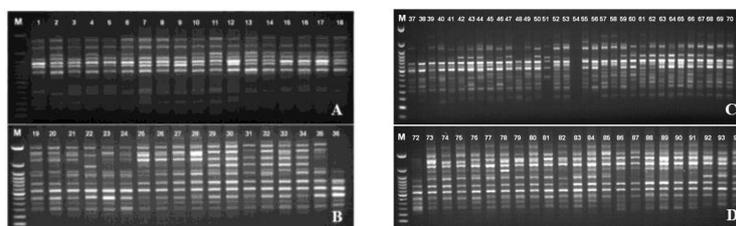
41 **Tabela 1 .** Nomes, sequência e referências dos primers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)

Nome	Sequência primer (5' - 3')	Referência	Nome	Sequência primer (5' - 3')	Referência
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	Alizadeh et al., 2008	UBC890	VHV GTGTGTGTGTGTGTT	Moreno et al., 1998
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	Alizadeh et al., 2008	UBC891	HVH TGTGTGTGTGTGTG	Moreno et al., 1998
UBC827	ACACACACACACACACG	Alizadeh et al., 2008	VBV	VBVACACACACACACAC	Arnau et al., 2002
UBC850	GTGTGTGTGTGTGTGTYC	Moreno et al., 1998	BDV	BDVAGAGAGAGAGAGAG	Arnau et al., 2002
UBC855	ACACACACACACACACYT	Alizadeh et al., 2008	HBH	HBHCTCTCTCTCTCTCT	Arnau et al., 2002
UBC856	ACACACACACACACACYA	Nascimento et al., 2010	BDB	BDBCACACACACACACA	Arnau et al., 2002
UBC857	ACACACACACACACACYG	Alizadeh et al., 2008	GCV	GCVTCTCTCTCTCTCTC	Arnau et al., 2002

42

43 RESULTADOS E DISCUSSÃO

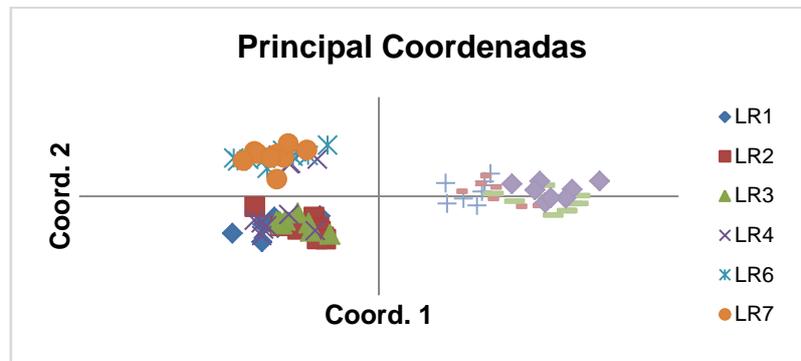
44 O perfil molecular gerado por quatro dos 14 primers ISSR utilizados é apresentado na
 45 Figura 1



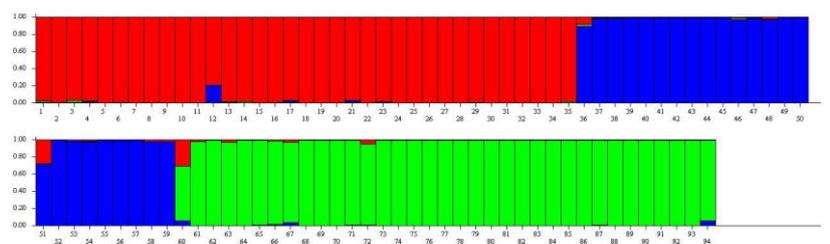
46 Figure 1. Perfil molecular dos primers ISSR em amostras de camu-camu (*Myrciaria dubia*) em gel
 47 de agarose (1.5%). Primer UBC 810 (A); Primer UBC 812 (B); Primer UBC 890 (C) e Primer UBC
 48 850 (D). M representa o marcador molecular (50 bp DNA ladder).

49 Pelas análises realizadas pelo aplicativo 'GenAlex', por meio de dispersão gráfica PCA
 50 (Principal Coordinate Analysis) e pelo 'Structure' observa-se que a população de camu-camu foi

51 dividida em 3 grupos. As análises demonstram as relações de similaridade e distância genéticas
52 entre os acessos, revelando pouca variabilidade entre populações e uma maior variabilidade dentro
53 das populações. Observa-se na figura 2 que as populações mantiveram comportamento dispersivo,
54 mostrando independência e distanciamento umas das outras. Nota-se pela figura 3 que todos os
55 grupos apresentaram praticamente o mesmo grau de estruturação, uma vez que, de acordo com o
56 resultado, seus indivíduos constituintes têm influência dos demais grupos.



57
58 Figura 2. Dispersão bi-dimensional de acordo com a análise das principais coordenadas por meio do
59 software 'GenAlex'.



60 Figura 3. Estrutura genética de 94 acessos de camu-camu (*Myrciaria dubia*). Cada barra vertical
61 representa um indivíduo de camu-camu, e as cores representam os três grupos que foram definidos.
62 Os grupos com mais de uma cor indicam a composição genética mista deste grupo.

63
64 Os resultados gerados por primers ISSR foram valiosos pois forneceram conhecimento
65 efetivo da constituição genética de cada indivíduo dentro da população correspondente em
66 comparação com os outros indivíduos e populações. Desta forma, a chance de selecionar fenótipos
67 com melhor desempenho agrônômico aumenta, não baseadas apenas em suas respostas ambientais,
68 mas também na sua constituição genética. A estimativa de divergência genética, com base em
69 marcadores moleculares ajudará a determinar se a taxa de seleção é adequada, bem como valerá
70 para manter a variabilidade suficiente para selecionar os ciclos de reprodução (AZEVEDO et al.,
71 2011).

72 CONCLUSÃO

73 Os marcadores ISSR utilizados mostrou adequação e eficiência em discriminar 94
74 indivíduos e as populações correspondentes, separando-os em três diferentes grupos e revelando a
75 variabilidade genética de cada população e seus indivíduos.

76 AGRACIMENTOS

77 À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior – CAPES pela concessão
78 da bolsa de Pós-Doutorado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais –
79 FAPEMIG pelos recursos financeiros.

80 REFERÊNCIAS

- 81 ALIZADEH, M.; SINGH, S.K.; JHANG, T.; SHARMA, T.R. Inter Simple Sequence Repeat
82 Analysis to Confirm Genetic Stability of Micropropagated Plantlets in Three Grape (*Vitis* spp)
83 Rootstock Genotypes. *Journal Plant Biochemistry & Biotechnology*. v. 17, n.1, p. 77-80, 2008
- 84 ARNAU, G.; LALLEMAND, J.; BOURGOIN, M. Fast and reliable strawberry cultivar
85 identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica*, v. 129, n. 1, p.
86 69-79, 2002.
- 87 AZEVEDO, A.L.S.; COSTA, P.P.; MACHADO, M.A.; DE PAULA, C.M.P.; SOBRINHO F.S.
88 High degree of genetic diversity among genotypes of the forage grass *Brachiaria ruziziensis*
89 (Poaceae) detected with ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*. v.10, n.4, p.3530-3538,
90 2011
- 91 KURAS, A.; KORBIN, M.; ZURAWICZ, E. Comparison of suitability of RAPD and ISSR
92 techniques for determination of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) relationship. *Plant Cell,*
93 *Tissue and Organ Culture*, v. 79, n. 2, p. 189-193, 2004.
- 94 MORENO, S.; MARTIN, J.P.; ORTIZ, J.M. Inter simple sequence repeats PCR for characterization
95 of closely related grapevine germplasm, *Euphytica*, v.101, p. 117–125, 1998
- 96 NASCIMENTO, M.A.; BATALHA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, A.M.; TAVARES, M.G.
97 CAMPOS, L.A.O.; SALOMÃO, T.M.F. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata*
98 *Lepeletier* (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. *Genetics and Molecular*
99 *Biology*, v.33, n.2, p.394-397, 2010
- 100 NUNES, C. F.; FERREIRA, J. L.; FERNANDES, M. C. N.; BREVES, S. S.; GENEROSO, A. L.;
101 FONTES-SOARES, B. D. F.; DIAS, M. S. C.; PASQUAL, M.; BOREM, A.; CANÇADO, G. M.
102 A. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. *Ciência Rural*, v. 41,
103 n. 8, p. 1383-1389, 2011.
- 104 PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic
105 software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.
- 106 PRITCHARD JK, STEPHENS M.; DONNELLY P. Inference of population structure using
107 multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959, 2000.