

**Estimativa de diversidade genética
entre acessos do BAG de muricizeiro
(*Byrsonima crassifolia*) da
Embrapa Amazônia Oriental**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 111

**Estimativa de diversidade
genética entre acessos do
BAG de muricizeiro (*Byrsonima
crassifolia*) da Embrapa
Amazônia Oriental**

Simone de Miranda Rodrigues
Elisa Ferreira Moura Cunha
Maria do Socorro Padilha de Oliveira
José Edmar Urano de Carvalho
Walnice Maria Oliveira do Nascimento

Disponível no endereço eletrônico:
<https://www.embrapa.br/amazonia-oriental/publicacoes>

Embrapa Amazônia Oriental

Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n.
CEP 66095-903 – Belém, PA.
Fone: (91) 3204-1000
Fax: (91) 3276-9845
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicação

Presidente: *Silvio Brienza Júnior*
Secretário-Executivo: *Moacyr B. Dias-Filho*
Membros: *Orlando dos Santos Watrin*
Eniel David Cruz
Sheila de Souza Correa de Melo
Regina Alves Rodrigues

Supervisão editorial e revisão de texto: *Narjara de F. G. da Silva Pastana*
Normalização bibliográfica: *Regina Alves Rodrigues*
Tratamento de imagens: *Vitor Trindade Lôbo*
Editoração eletrônica: *Euclides Pereira dos Santos Filho*
Foto da capa: *Walnice Maria Oliveira do Nascimento*

1ª edição

Publicação digitalizada (2016)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) **Embrapa Amazônia Oriental**

Estimativa de diversidade genética entre acessos do BAG de urucizeiro (*Byrsonima crassifolia*) da Embrapa Amazônia Oriental / Simone de Miranda Rodrigues ... [et al.].- Belém, PA : Embrapa Amazônia Oriental, 2016.

18 p : il. ; 15 cm x 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1983-0483; 111).

1. Muruci. 2. Fruta tropical. 3. Melhoramento genético.
I. Rodrigues, Simone de Miranda. II. Título. III. Série.

CDD (21. ed.) 634.6

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	12
Conclusões	16
Referências	17

Estimativa de diversidade genética entre acessos do BAG de murucizeiro (*Byrsonima crassifolia*) da Embrapa Amazônia Oriental

Simone de Miranda Rodrigues¹

Elisa Ferreira Moura Cunha²

Maria do Socorro Padilha de Oliveira³

José Edmar Urano de Carvalho⁴

Walnice Maria Oliveira do Nascimento⁵

Resumo

O murucizeiro produz a fruta muruci, com potencial econômico em virtude da crescente demanda por novos sabores da região amazônica. A Embrapa Amazônia Oriental possui um banco de germoplasma (BAG) constituído por 22 acessos coletados no Estado do Pará. Com objetivo de identificar a diversidade genética entre esses germoplasmas e auxiliar o programa de melhoramento da espécie, foi realizada a caracterização genética utilizando marcadores ISSR. Inicialmente extraiu-se os DNAs dos acessos do BAG, os quais foram quantificados e usados nas reações de PCR. Um total de 23 *primers* pré-selecionados foi utilizado, resultando em 109 bandas polimórficas e 51 bandas monomórficas. A análise utilizando o método UPGMA baseado na similaridade de Jaccard separou os acessos em dois grupos. Os valores de similaridade genética variaram de 0,10 a 0,59. A análise usando o

¹Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

²Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

³Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

⁴Engenheiro-agrônomo, mestre em Produção Vegetal, pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

⁵Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

programa Structure utilizando abordagem Bayesiana resultou em valor de $K = 2$, identificando dois grupos geneticamente homogêneos de indivíduos. Os marcadores ISSR usados foram eficientes em detectar polimorfismo, apesar dos poucos acessos estudados, demonstrando a importância de usar esse marcador em espécies contendo pouco estudo molecular, com possibilidade de trazer informações para o melhoramento da espécie.

Termos para indexação: Espécie semidomesticada; fruteira da Amazônia; ISSR; Malpighiaceae.

Estimation of genetic diversity within the nanche (*Byrsonima crassifolia*) BAG of Embrapa Amazônia Oriental

Abstract

Nanche is a fruit with potential for regional growth due to increasing demand for new flavors from the Amazon region. Embrapa Amazônia Oriental has a germplasm bank (BAG) consisting of 22 accessions collected in Pará State. In order to identify the genetic diversity among these germplasm and assist the breeding program of the species, a genetic characterization using ISSR markers was carried out. Initially, DNA from BAG accessions was extracted, quantified and used in PCR. A total of 23 pre-selected primers were used, resulting in 109 polymorphic bands and 51 monomorphic bands. The analysis using UPGMA method based on Jaccard similarity indicated that the accessions were divided into two groups, and genetic similarity values ranged from 0.10 to 0.59. The analysis using the Structure program using Bayesian approach resulted in value of $K = 2$, identifying two genetically homogeneous groups of individuals. The ISSR markers used were efficient to detect polymorphism in a few accessions studied, demonstrating the importance of using this markers in species containing little molecular study, with the possibility of bringing information to the improvement of the species.

Index terms: Amazon fruit; ISSR; Malpighiaceae; Semi-domesticated species.

Introdução

Nativo da região amazônica, o murucizeiro (*Byrsonima crassifolia*) é uma espécie cujo fruto, o muruci ou murici, possui potencial de crescimento econômico, uma vez que pode ser consumido in natura e nas formas de sucos, sorvete, doces, geleias e licor (CAVALCANTE, 2010; CARVALHO; NASCIMENTO, 2013). É considerada uma espécie semidomesticada pertencente à família Malpighiaceae, cultivada basicamente por agricultores familiares. Requer um programa de melhoramento genético, para desenvolver cultivares que apresentem qualidades superiores visando aumento da produção. Nesse sentido, a Embrapa Amazônia Oriental montou um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de murucizeiro constituído por 22 acessos coletados em 11 municípios do Estado do Pará. Esses acessos necessitam ser caracterizados, visando à identificação da constituição genética do BAG.

Para determinar a variabilidade genética de espécies, descritores morfológicos têm sido usados com muito sucesso, mas apresentam limitações quanto à quantidade e influência do ambiente (TOPPA; JADOSKI, 2013). De modo alternativo, tem-se utilizado os marcadores moleculares por serem de fácil detecção no genoma e disponíveis em grande número. O conhecimento da variabilidade genética dentro de um BAG é útil para o planejamento de estratégias de conservação que proporcionam maior viabilidade da espécie, além de possibilitar o direcionamento de programas de melhoramento, como é o caso do melhoramento genético do murucizeiro na Embrapa, por ser de fundamental importância para a fruticultura regional.

Nesse sentido, espécies com informações moleculares escassas na literatura podem ser facilmente caracterizadas com o uso de alguns tipos de marcadores moleculares, como o caso de *Inter Single Sequence Repeats* (ISSR). Esses marcadores são vantajosos por serem marcas arbitrárias no genoma baseadas em microssatélites (SSR), anelando-se dentro dessas repetições e amplificando as regiões genômicas entre os SSR (GUIMARÃES et al., 2009). A técnica considera o uso de temperaturas de anelamento mais elevadas nas

reações de cadeia da polimerase e específicas para cada *primer*. Os ISSR são caracterizados como dominante e não necessitam de conhecimento prévio do genoma.

O objetivo desse trabalho foi verificar a diversidade genética do BAG de murucizeiro da Embrapa utilizando ISSR como uma forma rápida, simples e barata para acessar a diversidade e identificação de materiais de *B. crassifolia*, visando principalmente o direcionamento do melhoramento genético da espécie.

Material e Métodos

Material vegetal

Em 2014, foram coletadas folhas de 22 acessos de *B. crassifolia* do BAG da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará (Tabela 1), as quais foram refrigeradas em caixas de isopor com gelo e transportadas ao Laboratório de Genética Molecular dessa instituição, onde foram realizados os experimentos.

Tabela 1. Origem dos acessos de *Byrsonima crassifolia* coletados no Estado do Pará, pertencentes ao BAG da Amazônia Oriental.

Acesso	Local de coleta
1 - Açú (AÇU)	Tomé-Açú
2 - Santarém-1 (SANT-1)	Santarém
3 - Santarém-2 (SANT-2)	Santarém
4 - Igarapé-Açú-1 (IG.AÇU-1)	Igarapé-Açú
5 - Tocantins-2 (TO-2)	Nova Ipixuna
6 - Cristo	Belém
7 - Maracanã-2 (MARAC-2)	Maracanã
8 - Guataçara 1.1 (GUAT 1-1)	Terra Alta
9 - Tocantins-1 (TO-1)	Nova Ipixuna
10 - São José (S. JOSÉ)	Igarapé-Açú
11 - Aurora 1 (AUR 1)	Aurora do Pará
12 - FCAP-7	Belém
13 - Baião-2	Baião
14 - Augusto Corrêa-PI 1 (AC 1)	Augusto Corrêa
15 - Augusto Corrêa-PI 2 (AC 2)	Augusto Corrêa
16 - Kishi-3	Monte Alegre
17 - Igarapé-Açú-2 (IG.AÇU-2)	Igarapé-Açú
18 - Igarapé-Açú-3 (IG.AÇU-3)	Igarapé-Açú
19 - Igarapé-Açú-4 (IG.AÇU-4)	Igarapé-Açú
20 - Unnamed (UN)	Local não conhecido
21 - Aurora-2 (AUR 2)	Aurora do Pará
22 - Xininga-5 (XIN-5)	Baião

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens utilizando o protocolo CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) e quantificado com gel de agarose a 1%, usando DNA do fago λ como padrão, em diferentes concentrações ($50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e $200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$).

Amplificação de DNA

As amostras foram amplificadas com 23 primers ISSR. As PCR foram realizadas em volume final de $20 \mu\text{L}$, contendo 10 ng de DNA genômico, $1,5 \mu\text{L}$ de dNTP (10 mM), $2,0 \mu\text{M}$ de *primer*, $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de *bovine serum albumin* (BSA), tampão de reação 10x contendo $1,2 \mu\text{L}$ MgCl_2 (25 mM) e 0,2 U de Taq DNA polymerase. As reações de amplificação consistiram em uma fase de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos que consistiram na desnaturação do DNA a 95°C por 1 minuto, anelamento do *primer* por 45 segundos à temperatura específica para cada primer, variando de 50°C a 60°C (Tabela 2) e elongação a 72°C por 2 minutos. Ao final dos ciclos, ocorreu uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos das reações foram corridos em gel agarose 1,5% contendo TBE 1,0 X ($0,45 \text{ M}$ Tris-borate e $0,01 \text{ M}$ EDTA).

Análise de dados

Apenas as bandas polimórficas foram analisadas. A presença das bandas foi marcada com (1) e a ausência da banda, como (0), gerando uma matriz binária. A matriz de similaridade genética foi gerada usando o programa Past (HAMMER et al., 2001), baseada no coeficiente de Jaccard. Um dendrograma foi gerado usando o método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). A estabilidade dos agrupamentos foi testada pela reamostragem pelo procedimento de *bootstrap*, com 10 mil repetições, e a relação entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi estimada pelo coeficiente de correlação cofenética (CCC), de acordo com Sokal e Rohlf (1962).

Tabela 2. *Primers* de ISSR utilizados no estudo genético de acessos de *Byrsonima crassifolia* do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental.

Primer	Nº. de bandas polimórficas	Temperatura de anelamento	Primer	Nº. de bandas polimórficas	Temperatura de anelamento
808	5	50 °C	844	3	56 °C
809	4	57 °C	845	5	48 °C
811	5	53 °C	846	6	52 °C
812	5	49 °C	848	6	47 °C
813	4	53 °C	850	4	47 °C
814	5	49 °C	855	4	53 °C
815	2	49 °C	856	4	52 °C
825	5	52 °C	857	6	53 °C
826	4	52 °C	858	3	53 °C
835	6	52 °C	888	5	60 °C
836	4	56 °C	889	4	60 °C
843	4	53 °C			

O alinhamento dos genótipos a grupos e grau de parentesco entre os grupos foi avaliado usando o software Structure 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000). Após um período de depuração de 100 mil, dez corridas independentes foram efetuadas para cada valor de K (de 1 a 10) com 100 mil repetições. A escolha do número mais provável de aglomerados (K) foi realizada por meio do cálculo da estatística de ΔK , baseada na taxa de variação do log da probabilidade de cada dado entre os sucessivos valores K, como descrito por Evanno et al. (2005), utilizando o programa Structure Harvester (EARL; VON HOLDT, 2012). Aquele com a maior probabilidade máxima, após as corridas, foi usado para atribuir genótipos individuais.

Resultados e Discussão

Os 23 *primers* ISSR usados nos materiais de *B. crassifolia* totalizaram 160 bandas de DNA, das quais 109 bandas foram polimórficas, com uma média de 4,74 por marcador. Os valores de similaridade genética com base no coeficiente de Jaccard variaram de 0,10 a 0,59, com uma média de 0,33, permitindo a divisão dos indivíduos em grupos. O dendrograma

baseado no método UPGMA e semelhanças genéticas de Jaccard entre os 22 acessos mostraram formação de um grupo de indivíduos coletados no nordeste do Pará, e outro grupo de indivíduos com adesões principalmente do sul e oeste do Pará. No entanto, dois acessos coletados na região Nordeste do estado foram agrupados no último grupo, e um acesso não agrupou com qualquer outro acesso (Figura 1).

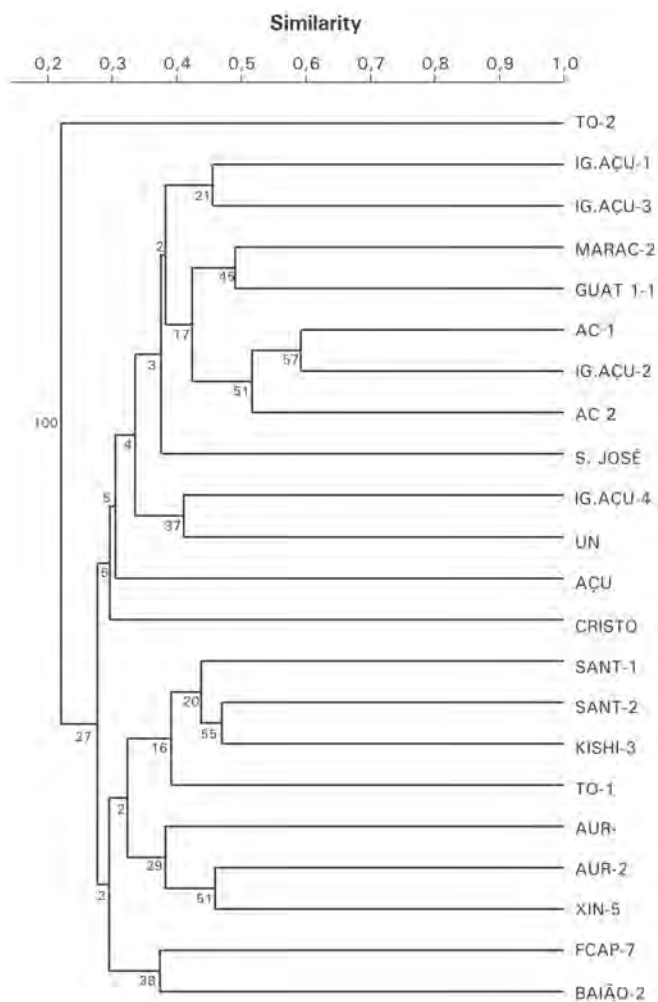


Figura 1. Dendrograma representativo do agrupamento entre 22 acessos de *Byrsonima crassifolia* coletados no Pará, baseado na análise molecular de 23 *primers* ISSR pelo Método UPGMA.

Martínez et al.(2013) avaliaram árvores de *B. crassifolia* de dois locais diferentes no México, usando seis *primers* RAPD, três dos quais apresentaram polimorfismo. A diversidade genética foi maior dentro de cada população (85,20%) que entre as populações (14,80%), e os marcadores dominantes considerados úteis para identificar a variação genética desta espécie, indicando que a variabilidade genética foi pequena para o material analisado no México, e que os *primers* usados mostraram baixa eficiência para reconhecer regiões homólogas no DNA das plantas. Apesar de não terem sido avaliadas populações de muricizeiro nesse trabalho, os marcadores ISSR foram capazes de discriminar e agrupar poucos materiais de muricizeiro, sendo considerados eficientes para o objetivo proposto. Os resultados da divergência genética neste trabalho refletem uma considerável variabilidade genética entre os acessos de *B. crassifolia* coletados no Estado do Pará, provavelmente em razão da avaliação de uma pequena coleção de indivíduos.

Os acessos Igarapé-Açu-2 e Augusto Corrêa-2 foram os mais similares, enquanto os acessos Tocantins-2 e São José foram os mais divergentes. A análise com base no dendrograma confirmou o agrupamento dos acessos de acordo com a proximidade de origem geográfica. O resultado da análise de correlação cofenética mostrou uma associação de 72% entre as distâncias obtidas pelo coeficiente de Jaccard. Cruz e Carneiro (2003) afirmaram que quanto maior o valor de CCC, menor é a distorção causada pelo agrupamento de indivíduos utilizando o método UPGMA. O valor foi considerado adequado, uma vez que os valores de $r \geq 0,56$ são considerados ideais, o que reflete uma boa concordância com os valores de similaridade genética (PATTO et al., 2004).

Análise usando o programa Structure resultou no maior valor de ΔK para $K = 2$ (Figura 2), identificando dois grupos geneticamente homogêneos de acessos. A designação dos 22 acessos de *B. crassifolia* aos grupos foi feita usando software Structure, determinada pelo método de Evanno et al. (2005). A abordagem Bayesiana mostrou o número de grupos genéticos (valor k) que melhor se ajustou aos dados.

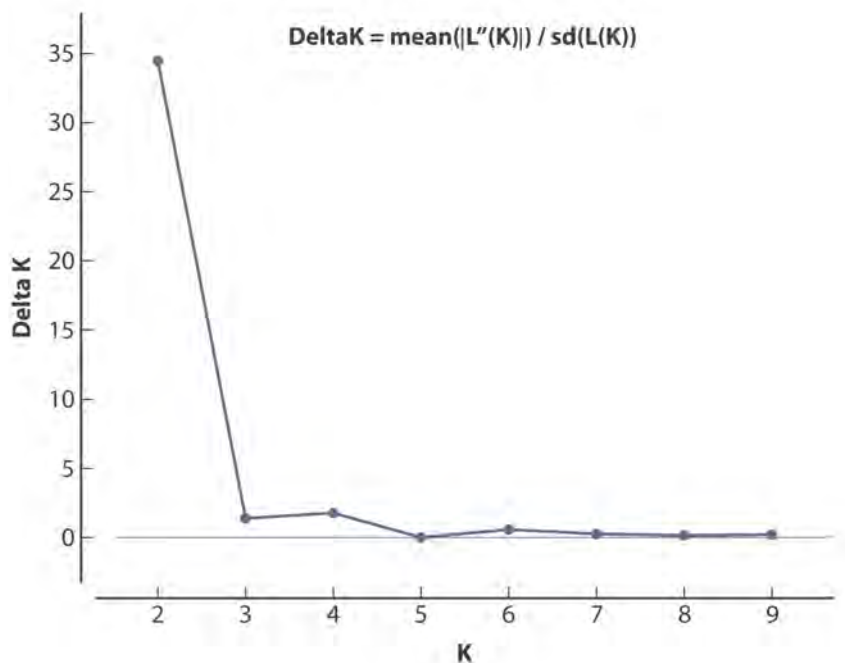


Figura 2. Análise de Delta K usando o programa Structure (PRITCHARD et al., 2000) baseado em dados de ISSR. Indicação do número de grupos ótimos presentes na amostra (K = 2).

Esses resultados refletem a variabilidade genética dos acessos estudados, o que destaca a importância de gerar esforços de coleta na área representados neste estudo, a fim de identificar genótipos com boas perspectivas de exploração comercial e para ser usado em programas de melhoramento genético. Os marcadores ISSR foram eficientes para detectar polimorfismos moleculares em *Byrsonima crassifolia*, no entanto, é necessário ampliar a área de coleta, aumentando o número de genótipos prospectados e incluir populações naturais, com o objetivo de obter informações sobre as estruturas populacionais, visando estratégias de manutenção e conservação das espécies, particularmente na escolha dos indivíduos e áreas de coletas.

Conclusões

O marcador ISSR mostra-se promissor e de grande valia para utilização em estudos de diversidade genética em acessos de *Byrsonima crassifolia*, sobretudo para a identificação de indivíduos mais próximos geneticamente. Os indivíduos de BAG de muricizeiro da Embrapa Amazônia Oriental estão discriminados e agrupados geneticamente em dois grupos distintos, distribuídos de acordo com a proximidade genética, sendo reflexo da origem geográfica de coleta dos acessos.

Referências

CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. Caracterização biométrica e respostas fisiológicas de diásporos de murucizeiro a tratamentos para superação da dormência.

Revista Brasileira de Fruticultura, v. 35, n. 3, p. 704-712, 2013.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis na Amazônia**. 7. ed. Belém, PA: CNPq, Museu Paraense Emílio Goeldi, 2010. 282 p.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003. 585 p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

EARL, D. A.; VON HOLDT, B. M. Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 30, n. 253, p. 24-33, nov./dez. 2009.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v. 4, p. 1-9, 2001.

MARTÍNEZ, M. E.; LESHER, J. M. G.; CASTAÑÓN, N. G.; E. DE LA CRUZ, L.; ZAPATA, H. C. Genetic variability of nanche in Tabasco, Mexico, determined with RAPDs. **Phyton, International Journal of Experimental Botany**, v. 82, p. 209-214, 2013.

PATTO, M. V.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, v. 137, n. 1, p. 63-72, 2004.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, p. 30-40, 1962.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013.



Amazônia Oriental

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**



CGPE 13240