

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais

II Jornada Científica

Embrapa Meio-Norte



Teresina, 14 e 15 de setembro de 2016

Embrapa Meio-Norte
Teresina, PI
2016

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires
Caixa Postal 01
CEP 64006-220, Teresina, PI
Fone: (86) 3198-0500
Fax: (86) 3198-0530
www.embrapa.br/meio-norte
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Meio-Norte

Comitê de Publicações

Presidente: *Jefferson Francisco Alves Legat*

Secretário-administrativo: *Jeudys Araújo de Oliveira*

Membros: *Ligia Maria Rolim Bandeira, Flavio Favaro Blanco, Luciana Pereira dos Santos Fernandes, Orlane da Silva Maia, Humberto Umbelino de Sousa, Pedro Rodrigues de Araujo Neto, Carolina Rodrigues de Araujo, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevedo, Karina Neob de Carvalho Castro, Francisco das Chagas Monteiro, Francisco de Brito Melo, Maria Teresa do Rêgo Lopes, José Almeida Pereira*

Normalização bibliográfica e editoração eletrônica: *Orlane da Silva Maia*

Capa: *Luciana Pereira dos Santos Fernandes*

1ª edição

Publicação digitalizada (2016)

Revisores Ad hoc (Embrapa Meio-Norte)

Aderson Soares de Andrade Junior, Adriana Mello de Araújo, Alitieni Moura Lemos Pereira, Ana Lúcia Horta Barreto, Angela Puchnick Legat, Braz Henrique Nunes Rodrigues, Bruno de Almeida Souza, Cândido Athayde Sobrinho, Edson Alves Bastos, Fabíola Helena dos Santos Fogaça, Francisco José de Seixas Santos, Geraldo Magela Côrtes Carvalho, João Avelar Magalhães, Jorge Minoru Hashimoto, José Ângelo Nogueira de Menezes Júnior, José Lopes Ribeiro, Lúcio Flavo Lopes Vasconcelos, Maria Clideana Cabral Maia, Maurisrael de Moura Rocha, Paulo Fernando de Melo Jorge Vieira, Paulo Henrique Soares da Silva, Raimundo Bezerra de Araújo Neto, Ricardo Montalvan Del Aguila, Rosa Maria Cardoso Mota de Alcântara, Tânia Maria Leal, Teresa Herr Viola, Valdenir Queiroz Ribeiro

Comissão organizadora

Coordenador: *Edvaldo Sagrilo*

Membros: *José Oscar Lustosa de Oliveira Júnior, Bruno de Almeida Souza, Flávio Favaro Blanco, Izabella Cabral Hassum, Jefferson Francisco Alves Legat, Paulo Sarmanho da Costa Lima, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevedo, Juliana Priscila Sussai, Magda Cruciol, Orlane da Silva Maia, Francisco de Assis David da Silva*

A linguagem escrita, os conceitos e opiniões emitidos nos resumos constantes desta publicação, são de inteira responsabilidade dos respectivos autores. A Comissão Organizadora não assume responsabilidades pelos dados e conclusões apresentadas nos trabalhos publicados nos anais desta jornada.

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 Meio-Norte

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Meio-Norte (2. : 2016 : Teresina, PI).

Anais da II Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte / II Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI, 13 a 14 de setembro de 2016. – Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2016. 126 p.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cpamn.embrapa.br/jornada2016/downloads/EMBRAPAEBOOK.pdf>>.

1. Pesquisa científica. 2. Iniciação científica. 3. Agricultura. 4. Pecuária. 5. Tecnologia. I. Título. II. Embrapa Meio-Norte.

CDD 607

© Embrapa 2016

SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE *Dimorphandra mollis* BENTH (FABACEAE)

Raiane de Sousa Oliveira¹; Jarbson Henrique Oliveira Silva²; Jéssica Barbara Vieira Viana³; Raimundo Bezerra de Araújo Neto⁴; Paulo Sarmanho da Costa Lima⁴

¹Graduanda de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Piauí - UESPI, Teresina - PI

²Graduando de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina - PI

³Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina - PI

⁴Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI.

RESUMO

No presente estudo, o objetivo foi selecionar primers ISSR adequados para estudos genéticos da espécie *Dimorphandra mollis* Benth. Para a extração do DNA, foram utilizadas amostras de folhas jovens de *D. mollis*, coletadas na Embrapa Meio-Norte, em Teresina - PI e o método de quantificação do DNA escolhido foi o de quantificação em Gel de Agarose 8%. Os primers selecionados, por apresentarem um número satisfatório de bandas nítidas e polimórficas em gel de agarose 1,5% quando submetidos à eletroforese, foram: primers UBC-807, UBC-808, UBC-810, UBC-811, UBC-818, UBC-825, UBC-827, UBC-834, UBC-840, UBC-856, UBC-857 e UBC-890, usando as temperaturas para anelamento dos primers de 52 °C, 50 °C, 52 °C, 50 °C, 49 °C, 56 °C, 60 °C, 54 °C, 48 °C e 55 °C, respectivamente na PCR. O primer UBC-890 foi o que gerou a maior quantidade de regiões ISSR amplificadas e o UBC-808, a de regiões polimórficas.

PALAVRAS-CHAVE: marcadores moleculares, diversidade genética, PCR.

INTRODUÇÃO

Dimorphandra mollis Benth, popularmente conhecida como faveira, é uma espécie arbórea de ampla distribuição, sendo encontrada em quase todo o cerrado do Brasil Central, ocorrendo nas regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e ainda há relatos de sua presença na região Nordeste Central (LORENZI, 1992). É uma espécie medicinal de alto potencial econômico devido ao fato de conter o flavonoide rutina em suas vagens e ser utilizada como forragem na alimentação bovina. Considerando ainda a crescente destruição do cerrado para atividades agropecuárias, *D. mollis* pode estar sendo ameaçada. Nessa situação, são necessários conhecimentos científicos para orientar a sua conservação e utilização racional a fim de não comprometer a sua diversidade (PANEGASSI et al., 2000).

O uso de marcadores moleculares tem-se mostrado importante para quantificar a variabilidade genética em populações naturais, permitindo avaliar o fluxo gênico, efeitos de deriva genética, sistema reprodutivo e níveis de endogamia. Dentre os marcadores moleculares, o ISSR é bastante utilizado nos estudos de diversidade, pois o mesmo tem a vantagem de gerar grande número de sequências informativas por reação (sequências polimórficas). Além disso, são formados por mais de 10 pb apresentando maior superfície de ancoragem em comparação com outros primers e possuem temperaturas de ligação mais altas, aumentando a reprodutibilidade (TSUMURA et al., 1996). Dessa forma, são indicados para os estudos ao nível específico e populacional, inclusive para *D. mollis*. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi selecionar primers ISSR-PCR para a obtenção de melhores resultados quanto à avaliação de estudos genéticos dessa planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a seleção de primers foram coletadas amostras de 10 folhas jovens da espécie *Dimorphandra mollis*, do banco de germoplasma da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI. As folhas coletadas foram embaladas em papel toalha e colocadas dentro de sacos plásticos e, em seguida, armazenadas a -20°C, até o momento da extração do DNA. Para a extração, as folhas foram maceradas em Precellys - 6600rpm (2x 25-30) até a obtenção de um pó fino. A extração foi realizada segundo o protocolo de Doyle e Doyle (1990) com modificações e armazenadas a -20°C. As amostras foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando, como padrão, quantidades conhecidas do DNA do Fago λ (100 ng).

Para a amplificação do DNA foram testados 25 primers ISSR. As reações de PCR foram conduzidas em volume final de 10 μ L, contendo, para cada amostra: 7 ng de DNA, 6,8 μ L de água, 1 μ L de dNTP (10 mM), 1 μ L de Buffer (10X), 0,3 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0,3 μ L de primer e 0,5 U de Taq DNA polimerase (5U/ μ L). O programa de amplificação para as reações consistiu de uma desnaturação inicial do DNA a 94°C durante 1 minuto e 30 segundos, seguido de 40 ciclos que inclui 40 segundos a 94°C (desnaturação) e Ta por 45 s, 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. As temperaturas de anelamento variaram de acordo com o especificado para cada primer.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com gel red a 0,8 μ L e submetidos a uma voltagem de 80 V por, aproximadamente, 2:30 horas. Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado como parâmetro o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb. O resultado da eletroforese foi visualizado em transluminador (UV) acoplado ao sistema de aquisição de imagens em sistemas digitalizado GelCapture 4.1.11.4. Para a seleção dos primers testados levou-se em consideração o número total de bandas geradas, a quantidade de bandas polimórficas, bem como a resolução das mesmas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as reações de amplificação, o DNA de cada amostra foi diluído para a concentração de 7 ng e foi usado 0,5 μ L de DNA de cada amostra. As temperaturas de anelamento selecionadas para os primers, UBC-808, UBC-834, UBC-840 e UBC-890, foram: 54°C, 50°C, 48°C e 55°C, respectivamente, que amplificaram sequências de DNA nítidas, bem definidas e polimórficas no gel de agarose 1,5%, nas amostras de *D.mollis* (Figura 2).

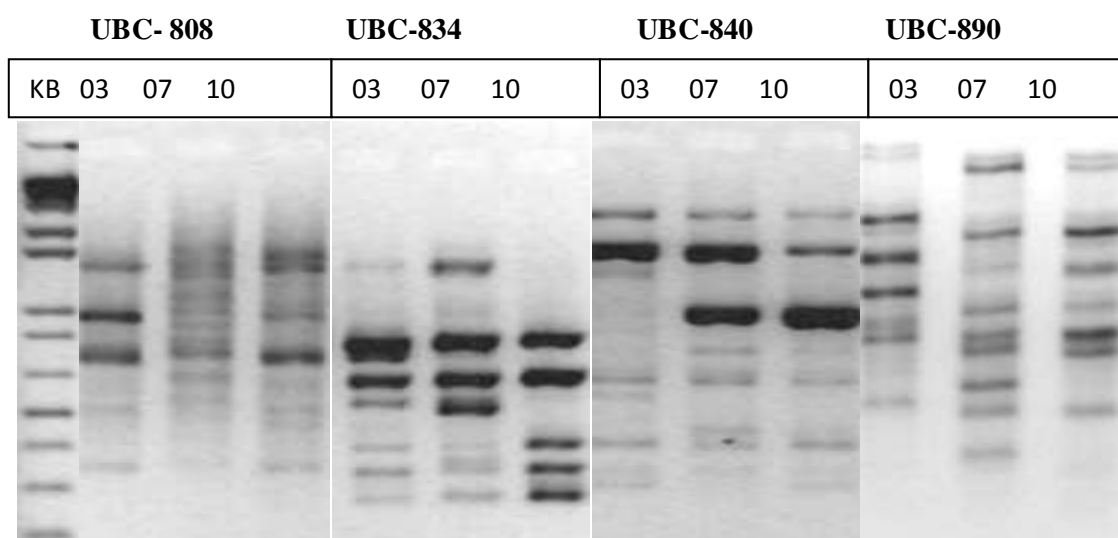


Figura 2. Visualização em gel de agarose dos produtos de amplificação gerados pelo UBC-808, UBC-834, UBC-840 e UBC-890. Para cada primer foi utilizado o DNA de três amostras diferentes. A primeira amostra (KB) indica o DNA *ladder* de 1Kb.

Foram observadas várias bandas polimórficas em cada um dos quatro primers (Figura 2). O primer UBC-811 foi o que gerou menor número de regiões ISSR amplificadas, sendo o UBC-890 o que apresentou um maior número de bandas. Em relação ao número de bandas polimórficas, o UBC-808 foi o que se destacou dentre os selecionados (Tabela 1). Além desses, outros primers (UBC-807, UBC-810, UBC-811, UBC-818, UBC-825, UBC-827, UBC-856 e UBC-857) também geraram bandas nítidas e polimórficas.

Tabela 1. Primers selecionados, temperatura de suas respectivas sequências de nucleotídeos e número total de bandas obtidas e de bandas polimórficas em cada um dos primers, para as diferentes amostras de DNA de *Dimorphandra mollis*.

Primers ISSR	Sequência de Nucleotídeos	Temperatura de anelamento	Número total de bandas obtidas	Número de bandas polimórficas
807	(AG)8T	52°C	11	3
808	(AG)8C	50°C	21	6
810	(GA)8T	52°C	9	2
811	(GA)8C	50°C	5	1
818	(CA)8G	49°C	15	2
825	(AC)8	56°C	17	4
827	(AC)8G	60°C	12	2
834	(AG)8YT	54°C	22	5
840	(GA)8YT	48°C	20	3
856	(AC)8YA	55°C	9	1
857	(AC)8YG	55°C	17	3
890	VHV GTG TGT GTG TGT GT	55°C	29	2

CONCLUSÕES

Os primers UBC-807, UBC-808, UBC-810, UBC-811, UBC-818, UBC-825, UBC-827, UBC-834, UBC-840, UBC-856, UBC-857 e UBC-890 anelaram-se de maneira efetiva no DNA genômico de *D. mollis* por meio da reação de PCR, produzindo, assim, um número satisfatório de bandas nítidas em gel de agarose 1,5%. Portanto, os primers selecionados podem ser empregados para caracterização molecular de acessos de *Dimorphandra mollis* como também podem servir de base para estudos moleculares em espécies da mesma família.

Agradecimentos: Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.

REFERÊNCIAS

- DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

PANEGASSI, V. R. et al. Seeds of faveiro (*Dimorphandra mollis*) as a potential source of galactomannan for the food industry. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 406-415, 2000.

TSUMURA, Y. et al. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 92, n. 1, p. 40-45, 1996.