

## Reprodutibilidade de marcadores ISSR em Pinhão-mansão

Raul Ferreira de Miranda Mendes (EMBRAPA/UESPI, raul-mendes@hotmail.com), Sulimary Oliveira Gomes (EMBRAPA/UFPI-PPGA, sgomes\_pi@hotmail.com), Paulo Sarmanho da Costa Lima (PESQUISADOR/EMBRAPA MEIO-NORTE, sarmanho@cpamn.embrapa.com.br)

**Palavras Chave:** *Jatropha curcas*, melhoramento, marcadores moleculares.

### 1 - Introdução

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa pertencente à família das Euphorbiaceae com alta produtividade de óleo. Atualmente, essa planta vem despertando um grande interesse como uma fonte potencial de óleo vegetal, podendo ser utilizado principalmente, na produção do biodiesel. Estudos da diversidade do pinhão-mansão com uso de marcadores moleculares polimórficos, reprodutíveis e confiáveis são necessários de forma a subsidiar programas de melhoramento e que permita a exploração econômica (Araújo e Sousa, 2008).

Dentre os marcadores moleculares de DNA baseados em PCR (reação em cadeia da polimerase) tem-se o ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*). Essa técnica apresenta as vantagens de: simplicidade na execução, na obtenção de dados, além de possuir custo reduzido, em relação a outras técnicas moleculares, podendo ser aplicada em qualquer espécie sem um conhecimento prévio do genoma (Reddy *et al.*, 2002).

Em relação à reprodutibilidade os marcadores ISSR apresentam índices superiores aos dos marcadores RAPD (Goulão & Oliveira, 2001). Entretanto, a reprodutibilidade pode ser afetada pelo *ramp rate* (taxa de rampa de temperatura) que influencia na eficiência da amplificação (Xianbo & Jingqui, 2007) e que varia conforme o modelo e fabricante do termociclador usado na condução das reações.

Assim a otimização da PCR e o grau de reprodutibilidade é uma característica muito importante para a confiabilidade dos resultados dos marcadores (Williams *et al.*, 1990). Nesse sentido objetivou-se avaliar a reprodutibilidade de reações de PCR com marcadores ISSR em pinhão-mansão conduzidas em três termocicladores.

### 2 - Material e Métodos

A extração de DNA foi realizada com material fresco macerado em homogeneizador Precellys. Utilizou-se o Kit de extração da Qiagen. A quantificação do DNA extraído foi feito em gel de agarose a 0,8% com TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5x, corado com GelRed™ comparando o DNA das amostras com o DNA  $\lambda$  na concentração de 100 ng.

Para a análise de marcadores ISSR foram usados três *primers*: UBC813, UBC845 e o UBC864, retirados

de um conjunto em que as temperaturas de anelamento já foram testadas e selecionadas, para uma posterior genotipagem. Os acessos de pinhão-mansão utilizados foram CMN 325, CMN 327, NP (Nova Porteirinha) e J (Janaúba).

Com exceção das reações do termociclador Veriti™ 384 well, que foram preparadas com volume final de 10  $\mu$ l, todas as outras reações de amplificação foram preparadas em volume final de 20  $\mu$ l, contendo 7 ng de DNA, 0,8 mM de dNTP, 1U de TaqPolimerase (Ludwig), 0,25  $\mu$ M de *primer*, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 3,0  $\mu$ l de tampão 1,5X (30mM de Tris-HCl; 75mM KCl) e H<sub>2</sub>O ultrapura.

Para testar a reprodutibilidade dos marcadores ISSR, as reações de amplificação foram realizadas em três termocicladores: Veriti™ 96 well com taxa de rampa de temperatura do bloco de 3,9 °C/s (Termociclador 1), Veriti™ 384 well com 3,7 °C/s (Termociclador 2) e TC-412 com taxa de rampa de 2,6°C/s (Termociclador 3). Os dois primeiros são da marca Applied Biosystems e o último da Techne.

As reações foram programadas com uma etapa inicial de desnaturação de 1,5 min a 94°C, seguida de 40 ciclos de 40s a 94°C para desnaturação, 45s a 48°C para anelamento, 2 min a 72°C para extensão e uma extensão final de 7 min a 72°C. Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com GelRed™ e fotodocumentados sob luz ultravioleta.

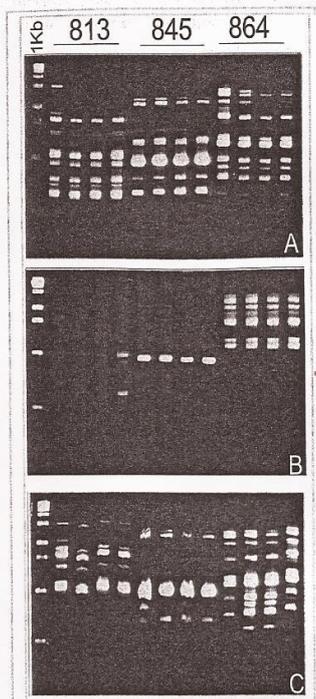
### 3 - Resultados e Discussão

Na análise dos padrões de bandas dos três *primers* em relação aos acessos CMN 325, CMN 327, NP (Nova Porteirinha) e J (Janaúba) obteve-se uma média de reprodutibilidade de 83,3%. O *primer* UBC813 demonstrou a maior reprodutibilidade, que foi de 92,3%, como mostra a figura 1, seguido do UBC 845 (79,02%) e do UBC864 (78,56%). Também constatou-se que os padrões de amplificação dos diferentes acessos, nos três *primers*, não tiveram grandes diferenças quanto à reprodutibilidade, nem mesmo quanto à intensidade das bandas.

Os marcadores ISSR mostraram-se reprodutíveis em pinhão-mansão, mesmo com o uso de equipamentos com diferentes taxas de rampa de temperatura, que corresponde à velocidade de aquecimento e resfriamento. Estes resultados indicam que a variação de até 1,3°C/s da taxa de rampa dos termocicladores usados não comprometeu a ação da

polimerase usada nas reações com marcadores ISSR assim como na eficiência da amplificação.

Williams, J.G.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, L.A.; Tingey, S.V. . DNA polymorphism amplifies by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-3535, 1990.



**Figura 1.** Comparação de padrão ISSR amplificados em termocicladores com *ramp rate* diferentes em pinhão-manso. Gel de agarose 1,5%. (A) Termociclador Tc-412 da Techne. (B) Termociclador Veriti 96 well. (C) Termociclador Veriti 384 well.

#### 4 - Agradecimentos

A FINEP, Petrobras/ Projeto Fontes Alternativas, e ao PAC/Embrapa pelo suporte financeiro.

#### 5 - Bibliografia

Araújo, L. G. de; Sousa, K. C. I. Pinhão-manso para Produção de Biodiesel. *Revista Anhangüera*, Goiânia, v.9, n.1, p.95-119, 2008.

Goulão, L.; Oliveira, C. M. . Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122: 81-89.

Reddy, M.P.; Sarla, N. & Reddy, E. A. . Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. *Euphytica*, n. 128, p. 9-17, 2002.

Qiu, X.; Yuan, J. Hybrid Control Strategy for Thermal Cycling of PCR Based on a Microcomputer. *Instrumentation Science and Technology*. 35: 41-52, 2007