



ANAIS - II CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS

11-SESSÃO PÔSTER 01  
25/09/2012 17:30-18:30  
CAMAROTE A/B

[Trabalho 91 ]

 **Clique para abrir o Artigo Completo/Click to open the paper**

VEGETAL  
**DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE ANELAMENTO COM MARCADORES ISSR EM ACESSOS DE PINHÃO-MANSO.**

SULIMARY OLIVEIRA GOMES<sup>1</sup>; RAUL FERREIRA DE MIRANDA MENDES<sup>2</sup>; PAULO SARMANHO DA COSTA LIMA<sup>3</sup>;

1,2.UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ-UFPI, TERESINA, PI, BRASIL; 3.EMBRAPA MEIO-NORTE, TERESINA, PI, BRASIL;

[sgomes\\_pi@hotmail.com](mailto:sgomes_pi@hotmail.com)

**Resumo:**

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie perene, monóica que pertence à família das Euforbiáceas. Essa planta está sendo implantada em diversas regiões do Brasil, sendo que os genótipos usados nos plantios são geneticamente desconhecidos, tornando-se assim necessário um estudo de modo mais detalhado desta espécie, principalmente no âmbito molecular. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo determinar temperaturas de anelamento em 15 *primers* ISSR. Foram coletadas folhas jovens de pinhão-mansão oriundos do Banco de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte, sendo utilizados os acessos CMN 102, CMN 325, CMN 327, NP e J. As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 20 µL, sendo os produtos amplificados separados em gel de agarose (1,5%) conduzido a 80 V por 5 horas, corado com GelRed TM 10.000 × (*Uniscience*) e fotodocumentados sob luz ultravioleta. Foram observados produtos de amplificação com número e intensidade de bandas satisfatória para 10 dos 15 *primers* ISSR, em que a Tm variou de 47,4 a 52,4 °C. Obteve-se boa amplificação, no entanto, *primers* com Tm inferiores a 30°C podem comprometer a determinação de temperatura de anelamento.



## DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE ANELAMENTO COM MARCADORES ISSR EM ACESSOS DE PINHÃO-MANSO

**Resumo:** O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie perene, monóica que pertence à família das Euforbiáceas. Essa planta está sendo implantada em diversas regiões do Brasil, sendo que os genótipos usados nos plantios são geneticamente desconhecidos, tornando-se assim necessário um estudo de modo mais detalhado desta espécie, principalmente no âmbito molecular. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo determinar temperaturas de anelamento em 15 *primers* ISSR. Foram coletadas folhas jovens de pinhão-mansão oriundos do Banco de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte, sendo utilizados os acessos CMN 102, CMN 325, CMN 327, NP e J. As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 20  $\mu$ L, sendo os produtos amplificados separados em gel de agarose (1,5%) conduzido a 80 V por 5 horas, corado com GelRed<sup>TM</sup> 10.000  $\times$  (*Uniscience*) e fotodocumentados sob luz ultravioleta. Foram observados produtos de amplificação com número e intensidade de bandas satisfatória para 10 dos 15 *primers* ISSR, em que a  $T_m$  variou de 47,4 a 52,4 °C. Obteve-se boa amplificação, no entanto, *primers* com  $T_m$  inferiores a 30°C podem comprometer a determinação de temperatura de anelamento.

**Palavras-chave:** *Jatropha curcas* L., oleaginosa, recursos genéticos

### Introdução

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie perene, monóica que pertence à família das Euforbiáceas. Embora essa planta esteja sendo implantada em diversas regiões do Brasil, os estudos de melhoramento com pinhão-mansão são incipientes, não havendo recomendação a partir de programas de melhoramento de genótipos para plantio. Segundo LAVIOLA et al., (2009) as informações são insuficientes de forma a garantir boa produtividade nas regiões com potencial de desenvolver o cultivo do pinhão-mansão. Nesse contexto, essa espécie deve ser estudada de modo mais detalhado, principalmente no âmbito molecular, iniciando-se com estudos de determinação de temperatura de anelamento de *primers*. A temperatura de anelamento ( $T_a$ ) corresponde à temperatura em que ocorre o pareamento entre *primer* e *template*. Geralmente, a  $T_a$  difere de 3 a 5°C abaixo da temperatura de *melting* ( $T_m$ ) calculada, que pode ser definida como a temperatura de desnaturação de 50% das moléculas de DNA. Devido à ampla faixa de temperaturas e a longa sequência dos *primers* ISSR, acredita-se que há maior confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos (BORNET &



BRANCHARD, 2001). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo determinar a temperatura de anelamento em 15 *primers* com marcadores ISSR em acessos de pinhão-mansão.

### Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI. Foram coletadas folhas jovens de acessos de pinhão-mansão do Banco de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte. A extração de DNA genômico foi realizada a partir de folhas jovens conforme recomendações do manual do Kit de purificação Invitex. Foram utilizados os acessos CMN 102, CMN 325, CMN 327, NP e J de pinhão-mansão para testar diferentes temperaturas de anelamento em 15 *primers* (Tabela 1). As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 20  $\mu$ L, tampão 1,5 $\times$  [30 mM de Tris-HCl; 75 mM KCl] (Ludwig), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Ludwig), 0,8 mM de dNTP, 0,25  $\mu$ M de *primer*, 1U de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig), 1  $\mu$ L de DNA genômico (7 ng) e água ultrapura. As amplificações foram realizadas em termociclador *Veriti™ 96 Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*), com uma fase inicial de desnaturação de 1,5 minutos a 94° C, seguida de 40 ciclos de 40 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 48°C para anelamento, 2 minutos a 72°C para extensão e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose (1,5%) conduzido a 80 V por 5 horas, corado com GelRed™ 10.000  $\times$  (*Uniscience*) e fotodocumentados sob luz ultravioleta.

### Resultados e Discussão

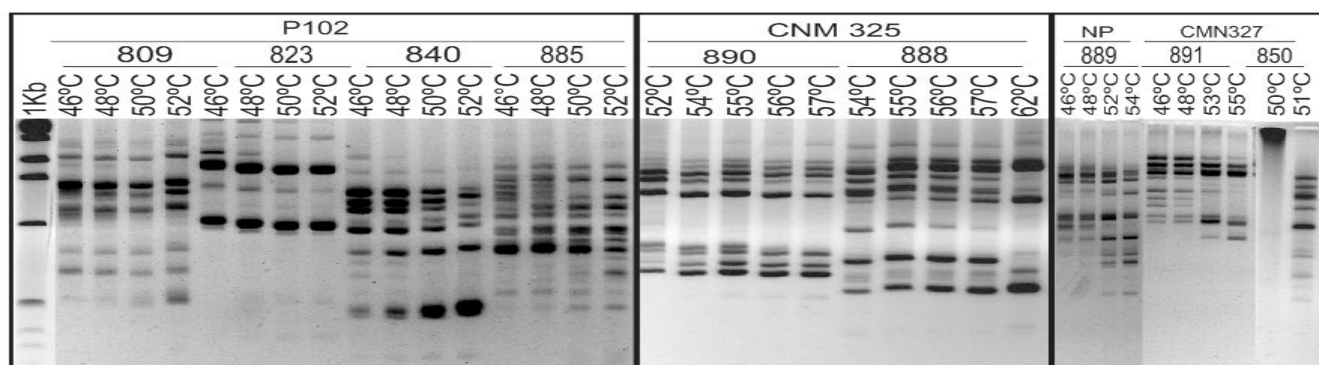
Foram observados produtos de amplificação com número e intensidade de bandas satisfatória para 10 dos 14 *primers* ISSR (Tabela 1). *Primers* em que a T<sub>m</sub> variou de 47,4 a 52,4 °C obteve-se boa amplificação (Figura 1), no entanto, T<sub>m</sub>'s inferiores a 30°C podem comprometer ensaios de determinação de temperatura de anelamento. HRISTOVA et al., (2011) em estudo de biodiversidade, na Búlgaria, também não obtiveram amplificação quando usaram os *primers* UBC 801 a UBC 805, provavelmente, isso ocorreu devido à baixa temperatura de fusão desses *primers*. PASQUALONE et al., (2000) ao identificarem cultivares de trigo através de marcadores ISSR, também não obtiveram amplificação nos *primers* UBC 803 e UBC 872. Os autores atribuem esse fato à baixa temperatura de anelamento que foi de 31 e 35°C, respectivamente. As temperaturas de anelamento dos *primers* UBC 809, UBC 840, UBC 888, UBC 889 e UBC 891, que foram determinadas neste ensaio, são semelhantes com as definidas por CAI et al., (2010) em estudo de diversidade genética de *Jatropha curcas* L., cujas temperaturas foram de 51,5°C, 54,2°C, 56,1 °C, 53,6 °C e 50,4 °C, respectivamente. SOUZA et al., (2009) em trabalho de determinação da Ta, também com pinhão-mansão, obtiveram

número de bandas nos *primers* UBC 889 e UBC 850 muito próximos aos encontrados neste estudo, isso confirma a reprodutibilidade do marcador ISSR (REDDY, 2002).

**Tabela 1** - Lista de *primers* ISSR usados no estudo de determinação da temperatura de anelamento em pinhão-mansão.

<i>Primers</i> *	Sequência de bases	T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub> testadas	Nº de bandas	T <sub>a</sub> otimizada
UBC 801	ATA TAT ATA TAT ATA TT	23,1	23-24-25-26-27-29-30	-	-
UBC 802	ATA TAT ATA TAT ATA TG	24,6	26-29-30	-	-
UBC 803	ATA TAT ATA TAT ATA TC	24,2	24-25-26-27-28-29-30	-	-
UBC 804	TAT ATA TAT ATA TAT AA	22,4	24-25-29-30	-	-
UBC 805	TAT ATA TAT ATA TAT AC	23,9	24-25-26-27-29-30	-	-
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	48,2	46-48-50-52	6	48
UBC 823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	48,1	46-48-50-52	4	46
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	47,4	46-48-50-52	6	46
UBC 845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	48,1	44-46-48-50-52	4	48
UBC 850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	52,7	50-51-53-55-57	5	51
UBC 885	BHB GAG AGA GAG AGA GA	48,3	46-48-50-52	9	52
UBC 888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	52,4	54-55-56-57-62	9	55
UBC 889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	50,1	46-48-52-54	7	52
UBC 890	VHV GTG TGT GTG TGT GT	52,2	52-54-55-56-57	8	55
UBC 891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	50,3	46-48-52-53-54-55	8	46

\**Primers* desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade Columbia Britânica



**Figura 1**- Perfil de bandas obtido com nove *primers* UBC em diferentes T<sub>a</sub> e acessos de pinhão-mansão.

## Conclusão

Os *primers* ISSR possuem temperatura de anelamento específica que otimiza tanto a quantidade como a qualidade de bandas nos marcadores ISSR em pinhão-mansão. A temperatura de anelamento otimizada permaneceu em maior parte abaixo da temperatura de *melting* calculada e os *primers* com baixa temperatura de *melting* comprometeram fortemente a determinação da temperatura de anelamento.

## Agradecimentos

A FINEP e a Petrobras/ Projeto Fontes Alternativas, pelo suporte financeiro.

## Referências Bibliográficas



- BORNET, B. & BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 209-215, 2001.
- CAI, Y., SUN, D., WU, G., PENG, J. ISSR-Based Genetic Diversity of *Jatropha curcas* L. Germplasm in China. **Biomass & Bioenergy**, n. 34, p. 1739-1750, 2010.
- HRISTOVA, E. STOYANOV, K. GEVEZOVA, M. DENEV, I. Application of ISSR methods in studying broomrape's (*Orobanchaceae*) biodiversity in Bulgaria. **Biotechnol & Biotechnol.** v. 25, p. 2248-2253, 2011.
- LAVIOLA, B. G. BHERING, L. L.; ALBRECHT, J. C.; MARQUES, S. de S.; SATURNINO, H. M.; MARANA, J. Diversidade genética em banco de germoplasma de pinhão-mansão. In: 5º CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS – CBMP, 10, 2009, Guarapari, ES. **Anais...SBMP**, 2009. CD-ROM.
- PASQUALONE A.; LOTTI, C.; BRUNO, A.; VITA, P. de.; FONZO, N. de.; BLANCO, A. Use of ISSR markers for cultivar identification in durum wheat. In: Royo C, Nachit MM, Di Fonzo N, Araus JL (eds) Options Méditerranéennes, Serie: A, **Séminaires Méditerranéens** v. 40, p. 157–161, 2000.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 128, p. 9-17, 2002.
- SOUZA, D. A. SOUZA, D. A. ; MOREIRA, G.B. R ; LIBRELON, S. S ; GUIMARÃES, J. F. R.; FERNANDES, T. P. ; PEREIRA, G. V. N. ; COSTA, M. R. Adequação da Metodologia de Marcadores ISSR para Análise Genotípica de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). In: III Fórum de Gestão, Pesquisa, Ensino e Extensão, 2009, Montes Claros. **Anais... III Fórum de Gestão, Pesquisa, Ensino e Extensão**, 2009.