



OTIMIZAÇÃO DE PCR-ISSR PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *Byrsonima crassifolia*

Gleyce Kelly de Sousa RAMOS¹, Simone de Miranda RODRIGUES², Maria do Socorro Padilha de OLIVEIRA³, Walnice Maria Oliveira do NASCIMENTO⁴

Resumo: O murici, frutífera nativa da região Amazônica, encontra-se dispersa em grande parte do território brasileiro. A caracterização molecular da espécie é de considerável importância para identificação de genótipos promissores para cultivo comercial. Optou-se pelo uso de marcadores ISSR, arbitrários, dominantes e complementares a um determinado microssatélite, havendo necessidade, em alguns casos, de ajuste de temperatura para as PCR-ISSR. Após a seleção de 24 *primers* ISSRs polimórficos para murici, realizou-se a otimização de amplificação para cada primer selecionado. As PCRs foram preparadas para um volume final de 20 µl, utilizando DNA de duas cultivares de muricizeiro (Açu e Maracanã-2), e testando-se 18 temperaturas de anelamento para cada *primer* (47 °C a 64 °C). Objetivou-se aprimorar as PCR-ISSR usando reações em gradiente para identificar a melhor temperatura de anelamento para cada *primer* pré-selecionado. A temperatura de anelamento de 53 °C foi selecionada para a maioria dos *primers* usados, seis (811, 813, 843, 855, 857, 858) dos vinte e quatro selecionados, apresentando qualidade satisfatória na amplificação das bandas polimórficas, enquanto o primer ISSR-845 foi o único a obter produto satisfatório da amplificação a temperatura de 48 °C.

Palavras-chave: murici, marcador molecular, temperatura de anelamento.

Introdução

O murici (*Byrsonima crassifolia*), espécie frutífera da família Malpighiaceae, nativa da região Amazônica, encontra-se dispersa em grande parte do território brasileiro. Apresenta importância econômica na região já que o mercado da fruta é bem diversificado, podendo ser consumida *in natura* e cristalizada, e sua polpa é também utilizada em refrescos, sorvetes, cremes, iogurtes, doce em pasta e licores (EMBRAPA RONDÔNIA, 2005).

Trabalhos relacionados à botânica e morfologia do muricizeiro são facilmente encontrados na literatura, entretanto referente à caracterização molecular, passo complementar ao melhoramento genético, é escasso. O estudo molecular da espécie é de considerável importância, pois permite a identificação de genótipos promissores para cultivo comercial, sendo que os marcadores moleculares vêm sendo utilizados para essa finalidade.

O marcadores moleculares *inter simple sequence repeat* (ISSR) são primers desenhado com base em sequências repetidas dos microssatélites na extremidade 5', acrescentando-se alguns nucleotídeos na extremidade 3'. Assim, os *primers* anelam-se dentro das repetições e amplificam as regiões genômicas entre os SSRs, cujos tamanhos dos fragmentos são limitados pela própria técnica da *polymerase chain reaction* (PCR) (GUIMARÃES et al. 2009).

Marcador ISSR assemelha-se ao RAPD (*random amplified polymorphic*), uma vez que amplifica sequências aleatórias no genoma, embora seja mais reproduzível que o RAPD, considerando que o tamanho dos *primers* são maiores e necessita de temperatura de anelamento mais elevada nas reações de cadeia da polimerase (GUIMARÃES et al. 2009). Nesse sentido, objetivou-se otimizar as PCR-ISSR usando reações em gradiente para identificar a melhor temperatura de anelamento para cada *primer* pré-selecionado ISSR (808, 809, 811, 812, 813, 814, 815, 825, 826, 835, 836, 843, 844, 845, 846, 848, 850, 855, 856, 858, 888, 889) de acordo com a obtenção de polimorfismo em materiais de murici.

Material e Métodos

Para as análises de otimização foram utilizados 24 *primers* ISSRs pré-selecionados e o DNA genômico de duas cultivares de muricizeiro, Açu e Maracanã-2.

Para o processo de extração de DNA vegetal, foram coletadas folhas frescas da coleção de muricizeiro da Embrapa Amazônia Oriental e transportadas em um isopor com gelo até o Laboratório de Genética

¹Estudante do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia. E-mail: gleyceramos17@yahoo.com.br. Bolsista da Fapespa

² Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: simone.rodrigues@embrapa.br

³ Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: socorro-padilha.oliveira@embrapa.br

⁴ Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: walnice.nascimento@embrapa.br



Molecular da mesma instituição. As folhas foram lavadas em água corrente, imersas em hipoclorito a 10%, e em seguida lavadas com água destilada. Em seguida, foram cortadas e colocadas em cadrinho sendo adicionado antioxidant PVP (Polivinilpolipirrolidona), para maceração com auxílio do pistilo e nitrogênio líquido. O material macerado foi depositado em tubo falcon e adicionado 3 ml de solução extratora. Em seguida levados a banho-maria (65°C) por 1 hora. Após esfriar, foram adicionados 5 ml de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitado-se antes de serem centrifugados duas vezes por 10 minutos a 10000rpm. O DNA foi precipitado usando o mesmo volume de etanol (99%), e homogeneizando até aparecerem as fitas de DNA. Em seguida, foram novamente centrifugado duas vezes por 10 minutos a 10000rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao pellet 5 ml de etanol 70%, centrifugando a 10000rpm/10 minutos. O etanol foi evaporado em bancada, e o DNA foi ressuspensos em solução de TE contendo RNase, sendo levado a estufa por 37 °C. Após a corrida dos DNAs em gel de agarose 1% para verificar a qualidade dos materiais extraídos, estes foram quantificados e armazenados em freezer -80°C, antes de serem diluídos e usados nas PCRs.

O preparo das reações consistiu na confecção de mix, considerando um volume final de PCR de 20 µl/indivíduo utilizando-se: 9,4 µl de H₂O; 2,0 µl de tampão (10x PCR); 1,2 µl de MgCl₂ (25 mM); 1,0 µl de BSA (bovine serum albumin), 1,5 µl de dNTP (10 mM); 1,2 µl de DNA (10 ng); 3,5 µl de cada *primer* (808, 809, 811, 812, 813, 814, 815, 825, 826, 835, 836, 843, 844, 845, 846, 848, 850, 855, 856, 858, 888, 889) (1 mM) e 0,2 µl de *Taq* DNA polimerase.

As reações foram realizadas em termociclador Thermolyne Amplitron II, modelo DB 80225, seguindo protocolo de Nienhuis et al. (1995) com algumas alterações, em um total de 35 ciclos, em três etapas: Desnaturação, Anelamento e Elogação. A desnaturação do DNA ocorreu a 95°C por um minuto; na etapa de anelamento, as temperaturas foram ajustadas para cada *primer*, sendo testadas 18 temperaturas (47 °C a 64 °C) por 45 segundos; e a etapa de elongação ocorreu a 72 °C por dois minutos. Ao final dos 35 ciclos, ocorreu a etapa de extensão final das reações, realizada a 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, preparados com TBE 1X (0,45 M de Tris-Borato e 0,01 M de EDTA) e corado com brometo de etídeo, a uma voltagem de 60 v/3 horas, antes de serem visualizados e fotografados sob luz ultravioleta para posterior análise dos géis.

Resultados e Discussão

As temperaturas de anelamento para cada primer foram escolhidas de acordo o resultado da reação que ofereceu melhor nitidez e intensidade das bandas no gel de agarose para cada um dos primers avaliados, além da capacidade de discriminação das bandas polimórficas.

A média da temperatura de anelamento escolhida foi 52,75 °C, sendo que a maior temperatura de anelamento selecionada foi 60 °C para os primers ISSR-888, ISSR-889 e ISSR-890 e a menor temperatura usada selecionada foi de 47 °C para os primers ISSR-847 e ISSR-848.

Como mostra a tabela 1, a temperatura de anelamento 53 °C apresentou melhor qualidade de amplificação para o maior número de primers, seis (ISSR-811, ISSR-813, ISSR-843, ISSR-855, ISSR-857, ISSR- 858) dos vinte e quatro selecionados, com qualidade satisfatória na amplificação das bandas polimórficas, seguida da temperatura de anelamento 52 °C com cinco primers, ISSR-825, ISSR-826, ISSR-835, ISSR-846, ISSR-856, e apenas o primer ISSR-845 obteve produtos satisfatórios da amplificação a temperatura de 48 °C.

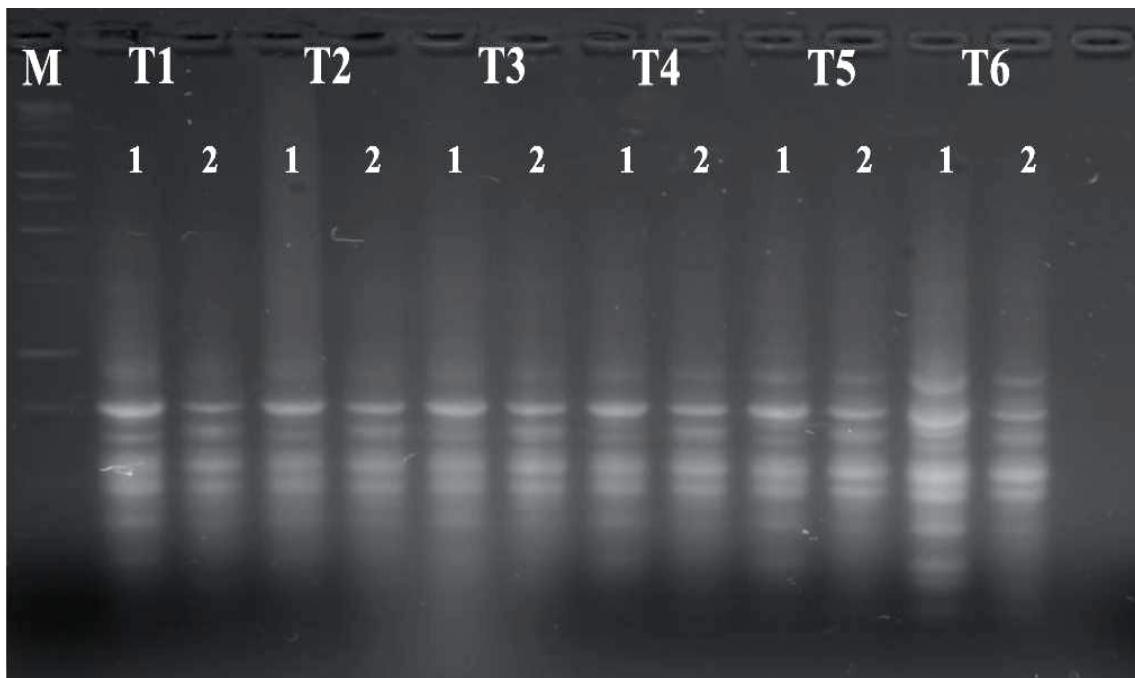
Tabela 1: Temperatura ideal de anelamento para os primers ISSRs usando dois materiais genéticos de murici.

Primer	Tempetura Escolhida
808	50 °C
809	57 °C
811	53 °C
812	49 °C
813	53 °C
814	49 °C
815	49 °C
825	52 °C

826	52 °C
835	52 °C
836	56 °C
843	53 °C
844	56 °C
845	48 °C
846	52 °C
848	47 °C
850	47 °C
855	53 °C
856	52 °C
857	53 °C
858	53 °C
888	60 °C
889	60 °C
890	60 °C
Média	52,75 °C

Entre as temperaturas de anelamento definidas neste ensaio, os *primers* ISSRs 808 (50 °C), ISSR 809 (57 °C), ISSR 811 (53 °C), ISSR 835(52 °C) e ISSR 836(56 °C) apresentaram temperaturas semelhantes a encontradas em estudos relacionados à mini-tomate por PRECZENHAK (2013), cuja temperatura foi de 50 °C, 55 °C, 53 °C, 54 °C, 53 °C, respectivamente. Gomes (2012) encontrou temperatura de anelamento igual para o primer ISSR 845 (48 °C). Entretanto, para os *primers* ISSR 850 (47 °C), ISSR 888 (60 °C), ISSR 888 (60 °C), ISSR 889 (60 °C) e ISSR 890 (60 °C) foram relatados temperaturas diferentes na literatura pesquisada.

Figura 1: Escolha da melhor temperatura para primer ISSRs 826 usando DNA de 2 materiais distintos da coleção de murici (1:Açu e 2:Maracanã-2) utilizando diferentes temperaturas. (T1= 47°C, T2=48°C, T3=49° C, T4=50 C, T5=51° C, T6=52° C).





Conclusões

Os *primers* ISSRs selecionados, 808, 809, 811, 812, 813, 814, 815, 825, 826, 835, 836, 843, 844, 845, 846, 848, 850, 855, 856, 858, 888, 889, apresentam temperatura de anelamento, específicas que otimizaram tanto a quantidade como a qualidade de bandas ISSRs polimórficas em murici, variando de 47 °C a 60 °C.

Agradecimentos

À Embrapa pelo financiamento do projeto e à FAPESPA pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica.

Referências Bibliográficas

EMBRAPA RONDÔNIA. **Murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Rich.)**. Embrapa Rondônia, 2005. Disponível em: http://www.cpfro.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/folder_murici.pdf. Acesso em: 01 de agosto de 2013.

GOMES, S. O. MENDES, R. F. de M. LIMAS, P. S. da C. Determinação da temperatura de anelamento com marcadores ISSR em acesso de Pinhão-manso. In: **II CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**, 2012, Belém - PA. Amazônia: recursos genéticos e sustentabilidade, 2012. v. 2. p. 1-4.

GUIMARÃES, Claudia Teixeira; MAGALHÃES, Jurandir Vieira de; LANZA, Marcelo Abreu, SCHUSTER, Ivan. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n.253, p.24-33, nov./dez. 2009

NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SKROCH, P.; SANTOS, J. B. Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the America Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 2, p. 300-306, 1995.

PRECZENHAK, A. P. **Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate**. 2013. 67f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.