

# Otimização de Protocolo de ISSR para Caracterização Molecular de Acessos de Pinhão-manso

**Bruno Guedes Alcoforado Aguiar**<sup>(1)</sup>, Isis Gomes Brito de Souza <sup>(2)</sup>, Michelli Ferreira dos Santos <sup>(2)</sup>, Paulo Sarmanho da Costa Lima

---

<sup>(1)</sup> Primeiro Autor é Graduando em Biomedicina pela Faculdade NOVAFAPÍ. Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123

Uruguai 64057-100 - Teresina, PI - Brasil. E-mail: [onurbguedes@hotmail.com](mailto:onurbguedes@hotmail.com)

<sup>(2)</sup> Segunda Autora é Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí. Campus da Socopo, Bairro Ininga, Cep: 64049-550 - Teresina-PI - Brasil

<sup>(2)</sup> Terceira Autora é Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí. Campus da Socopo, Bairro Ininga, Cep: 64049-550 - Teresina-PI - Brasil

<sup>(3)</sup> Quarto Autor é Pesquisador da EMBRAPA - Meio-Norte. Av. Duque de Caxias - 5650 Buenos Aires 64006-220 - Teresina, PI - Brasil.

Apoio financeiro: Embrapa e FINEP

**RESUMO** - O Pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa que se destaca pelo seu potencial para a produção de biodiesel. Uma abordagem por meio de marcadores moleculares para análise de variabilidade genética contribuirá no processo de melhoramento dessa espécie. Para tanto necessitam que suas reações de amplificação com primers ISSR (*Intersimple Sequence Repeats*) sejam estabilizadas, para que possam ter boa reprodutibilidade dos resultados. Esse trabalho teve como objetivo otimizar o protocolo de amplificação de marcadores ISSR para posterior caracterização molecular dos acessos de pinhão-mansão. Ao analisar os efeitos gerados pelas modificações na reação de amplificação, verificou-se diferenças nos produtos de PCR gerados. Definiu-se melhor padrão de bandas na reação com: Tampão 1X [20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1,0 mM DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl<sub>2</sub> a 3,0 mM; dNTP a 800 µM; 1,2 pMol de *primer*, 1 U de Taq DNA polimerase, 1 µl de DNA genômico (~15 ng) e 48°C para temperatura de anelamento. Com a continuação desse trabalho, a seleção de *primers* capazes de identificar *loci* polimórficos na espécie constitui-se em uma importante ferramenta para estudos de diversidade genética e caracterização molecular do pinhão-mansão.

## Introdução

O Pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa com alta produtividade de óleo, perenidade, tolerante ao estresse hídrico e se destaca pelo seu potencial para a produção de biodiesel. Uma abordagem molecular engrandece significativamente seu conhecimento e aumenta a possibilidade dessa planta se tornar uma espécie com grande importância econômica no país.

Para caracterização e identificação molecular de diversas espécies, marcadores moleculares se dispõem aos pesquisadores com grande confiabilidade e de maneira viável. Para a diferenciação de espécies, marcadores aleatórios e semi-aleatórios são utilizados frequentemente. Dos vários utilizados na atualidade, ISSR (*Intersimple Sequence Repeats*) tem sido um bom marcador molecular para estudo de populações da mesma espécie [1], pois possui grande capacidade de identificar polimorfismo. Tecnicamente, o marcador é de simples operação, possui relativo baixo custo e não tem a necessidade de conhecimento prévio da informação genética do DNA alvo [2].

Esse trabalho teve como objetivo otimizar o protocolo de amplificação de marcadores ISSR para futuras análises da variabilidade genética em pinhão-mansão.

**Palavras-Chave:** Marcadores Moleculares, Diversidade Genética, Espécie Oleaginosa.

## Material e métodos

Foram coletadas amostras de tecido foliar jovem e fresco de Pinhão-mansão proveniente da coleção de acessos da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI. O

tecido foi estocado na sílica por 24 horas. O tecido foliar desidratado em sílica foi macerado no equipamento Precellys® e em seguida foi realizada a extração do DNA genômico por meio do Kit INVITEK. A eletroforese foi realizada em gel de agarose horizontal a 0,8%, com TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) e corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain, concentração a 10.000X. O DNA foi quantificado comparado com o DNA de alto peso molecular (DNA-λ) e diluído a 15 ng/µL.

Para otimização do protocolo de ISSR foi utilizado um acesso de pinhão-mansão proveniente de Araçuaia-MG, o *primer* UBC 880, onde os componentes testados foram a temperatura de anelamento (51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C), a concentração de MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM, 3,0 mM e 3,5 mM) e de dNTP (200 µM, 400 µM, 600 µM, 800 µM).

As reações foram preparadas em volume final de 20 µL, com tampão 1X [20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1,0 mM DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl<sub>2</sub> a 2,5 mM-3,5 mM; dNTP a 200-800 µM; 1,2 pMol de *primer* UBC 880, 1 U de Taq DNA Polimerase e 1 µl de DNA genômico (~15 ng). As amplificações foram efetuadas em termociclador com uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 1 min e 30 seg, seguida de 40 ciclos nas seguintes condições: 40s para desnaturação a 94°C; temperatura de anelamento variando em função da temperatura de fusão do *primer*, 2 min para extensão a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por cinco min. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo SYBR® Safe DNA Gel stain e fotodocumentados.

## Resultados e Discussão

Ao analisar os efeitos das temperaturas de anelamento no *primer* UBC 880, juntamente com variação na concentração de MgCl<sub>2</sub>, verificou-se diferenças nos produtos de PCR visualizados (Figura 1). A melhor reação comparando a quantidade e intensidade das bandas geradas foi avaliada para concentração de 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub> e 51°C para temperatura de anelamento.

Para avaliação da concentração de dNTP observou-se melhor resultado para reação com 800 µM de dNTP e temperatura de anelamento à 48°C (Figura 2). Esses resultados são coerentes com os obtidos por Wujun et al. [3], que mesmo com pequenas variações nos três parâmetros avaliados, obteve grande diferenças na resolução das bandas.

A variação da temperatura de anelamento em função dos componentes da reação avaliados indica a ocorrência de interação entre os fatores estudados, conforme observado por Wu [4] quando estudou os efeitos de vários fatores na otimização da reação de ISSR em nêspera.

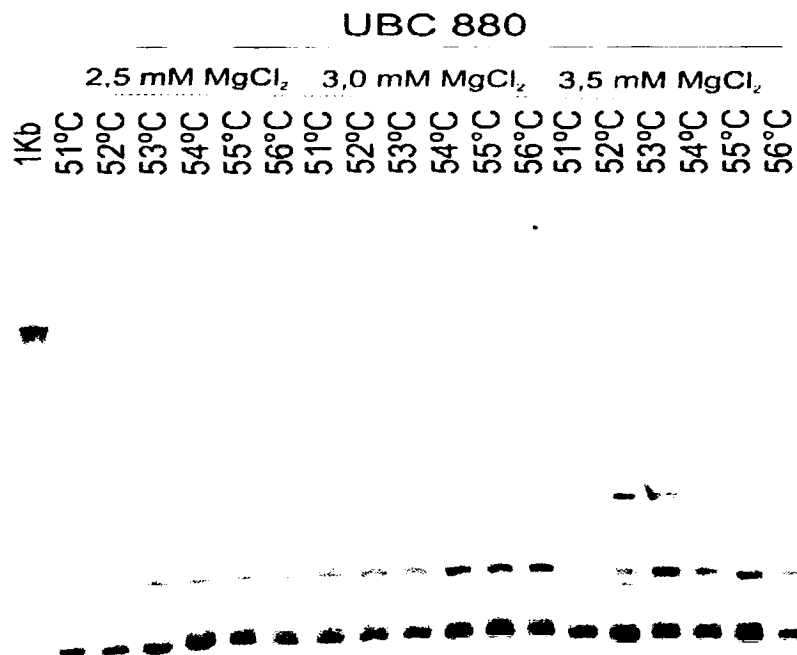
## Conclusão

Definiram-se como melhores parâmetros para estabelecimento de reações com marcadores ISSR em pinhão-mansão: Tampão 1X [20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1,0 mM DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl<sub>2</sub> a 3,0 mM; dNTP a 800 µM; 1,2 pMol de *primer*, 1 U de Taq DNA polimerase, 1 µl de DNA genômico (~15 ng) e 48°C para temperatura de anelamento. Com a continuação desse trabalho, a seleção de *primers* capazes de identificar *loci*

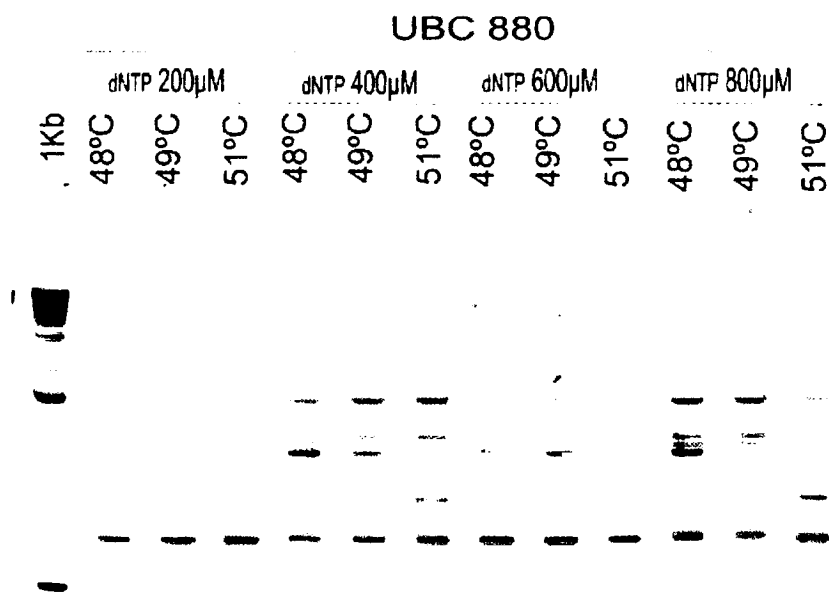
polimórficos na espécie constitui-se em uma importante ferramenta para estudos de diversidade genética e caracterização molecular do pinhão-mansô.

## Referências

- [1] ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. v.20, p.176-183, 1994.
- [2] SHEN, J.; DING, X.; LIU, D.; DING, G.; HE, J.; XUOXIA, LI.; TANG, F.; CHU, B. Intersimple Sequence Repeats (ISSR) Molecular Fingerprinting Markers for Authenticating Populations of *Dendrobium officinale* KIMURA et MIGO. *Biol. Pharm. Bull.* v.29(3), p. 420-422, 2006.
- [3] WUJUN, G.; SHUFEN, L.; DA, H.; CHUANLIANG, D.; LONGDOU, L. Phylogenetic classification as revealed based on optimize ISSR-PCR system in the *Osmanthus*. *Analele Științifice ale Universității "Alexandru Ioan Cuza", Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară*, TOM VIII, 2007.
- [4] WU, J.C; YANG, X.H; LIN, S.Q. Optimization of the inter-simple sequence repeats reaction system in loquat germplasm. *Acta hort. (ishs)* 750:135-142, .2007.



**Figura 1.** Padrão de bandas gerado a partir de diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> e temperaturas de anelamento (Ta). Eletroforese com gel de agarose a 1,5%, 100V, por 4 horas.



**Figura 2.** Padrão de bandas gerado a partir de diferentes concentrações de dNTP e temperaturas de anelamento (Ta). Eletroforese com gel de agarose a 1,5%, 100V, por 4 horas.