

CIRCULAR TÉCNICA

n. 417 - novembro 2024

ISSN 0103-4413

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Departamento de Informação Tecnológica
Av. José Cândido da Silveira, 1647 - União - 31170-495
Belo Horizonte - MG - www.epamig.br - Tel. (31) 3489-5000

EPAMIG
Pesquisa Agropecuária

AGRICULTURA,
PECUÁRIA E
ABASTECIMENTO



**MINAS
GERAIS**

GOVERNO
DIFERENTE.
ESTADO
EFICIENTE.

Otimização de gradiente de PCR-ISSR para amplificação de DNA genômico do morangueiro¹

Luciana Cardoso Nogueira Londe², Joana D'Ark Nunes da Silva Lima³, Débora Ferreira de Souza⁴, Izabela Cristina Pires Gomes⁵, Mickaelly Jordanya Guimarães Silva⁶, Joseane Faria da Silva Souza⁷, Elizângela Kele Celestina Pereira Silveira⁸, Mário Sérgio Carvalho Dias⁹

INTRODUÇÃO

O morangueiro é classificado botanicamente, de acordo com Cronquist (1988), na divisão Magnoliophyta (Angiospermae), classe Magnoliopsida (Dicotyledoneae), subclasse Rosidae, ordem Rosales, família Rosaceae, gênero *Fragaria*, e a maioria das espécies cultivadas atualmente pertence a *Fragaria x ananassa* Duch. Conforme Rocha *et al.* (2008), o pseudofruto é muito apreciado pelos consumidores em virtude de seu aroma, sabor e valor de mercado, sendo considerado como alimento funcional, visto que possui propriedades nutricionais benéficas à saúde do organismo humano. É uma cultura de grande importância econômica e social em muitas regiões do Brasil, pois o consumo da fruta vem-se expandindo nos últimos anos, e o cultivo caracteriza-se pela agregação de contingente considerável de mão de obra familiar rural. O morangueiro cultivado *F. x ananassa* Duch. originou-se de uma hibridação natural entre as espécies *Fragaria chiloensis* e

Fragaria virginiana. Estas espécies obtiveram sucesso moderado após a introdução, destacando-se somente após serem identificados os primeiros frutos da hibridação que deu origem a *F. x ananassa* Duch., por volta de 1750. O melhoramento do morangueiro teve início na Inglaterra, em 1817, quando Thomas A. Knight, usando as espécies *F. chiloensis* e *F. virginiana*, produziu as cultivares Downton e Elton (Conti, 1998).

O princípio do melhoramento do morangueiro é o cruzamento dos melhores pais divergentes geneticamente, seleção e multiplicação dos clones promissores (Camargo; Passos, 1993). Muitos métodos estão disponíveis para avaliar a divergência genética entre populações de plantas. Essas metodologias diferenciam-se na habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custos, facilidade de uso e repetibilidade dos resultados (Milach, 1998).

A caracterização de genótipos com marcadores moleculares que se baseiam em DNA possibili-

¹Circular Técnica produzida pela EPAMIG Norte - CEGR, (38) 3834-1760, cegr@epamig.br.

²Bióloga, D.Sc., Pesq. EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, luciana@epamig.br.

³Graduanda Agronomia UNIMONTES, Campus Janaúba, Bolsista CNPq/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, joanadark93_@hotmail.com.

⁴Graduanda Agronomia UNIMONTES, Campus Janaúba, Bolsista CNPq /EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, fdesouza@gmail.com.

⁵Engenheira-agrônoma, M.Sc., Bolsista BDCT&I Nível III FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, belapgomes@yahoo.com.

⁶Engenheira-agrônoma, Bolsista BDCT&I Nível IV FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, mickaellyagronomia@gmail.com.

⁷Bióloga, Bolsista BDCT&I Nível IV FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, joseanefariasilva@yahoo.com.br.

⁸Engenheira-agrônoma, Doutoranda Produção Vegetal no Semiárido UNIMONTES, EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, kelecelestina@gmail.com.

⁹Engenheiro-agrônomo, D.Sc., Pesq. EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, mariodias@epamig.br.

ta maior conhecimento do germoplasma disponível para o início de um programa de melhoramento, pois permite a determinação do nível de divergência genética e o padrão molecular de cada cultivar, dados que auxiliam o delineamento racional de cruzamentos para obtenção de cultivares superiores em curto prazo (Ferreira; Grattapaglia, 1998). A caracterização molecular da espécie é de considerável importância para identificação de genótipos promissores para cultivo comercial. Várias classes de marcadores moleculares têm sido utilizadas em estudos envolvendo morangueiro, das quais se destacam: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) – Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificado, Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) – Inter Repetições de Sequências Simples e microssatélites (Simple Sequence Repeat (SSR) – Sequências Simples Repetidas). Dentre os marcadores moleculares, o ISSR baseia-se em Polymerase Chain Reaction (PCR) – Reação em Cadeia da Polimerase, e tem-se destacado como alternativa eficiente para caracterização de genomas complexos. Para esse propósito utilizou-se de marcadores ISSR, arbitrários e dominantes, no entanto, em alguns casos, há necessidade de ajuste de temperatura para PCR-ISSR. Após a seleção de 15 primers ISSR polimórficos, realizou-se a otimização de amplificação para cada primer selecionado por meio de marcadores ISSR. Diante disso, o objetivo com este estudo foi avaliar a melhor temperatura de anelamento da PCR-ISSR, usando reações em gradiente para cada primer pré-selecionado.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (Labbiotec), da EPAMIG Norte - Campo Experimental do Gorotuba (CEGR), Nova Porteirinha, MG.

Foram coletadas folhas de 2 progênies de morangueiro da casa de vegetação, logo, foram realizadas as extrações de DNA de acordo com o protocolo Doyle e Doyle (1990). Para a PCR foi utilizado DNA de cada progênie de morangueiro, EP-86 e EP-164; foram testadas 20 temperaturas de anelamento para cada primer (45 °C a 65 °C), e amplificado com 15 primers ISSR, de acordo com a reação descrita a seguir: 30 ng de DNA genômico, 2,5 µL de

Tris/KCl pH 8.3, 2,8 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0,1 mM de cada nucleosídeo trifosfato – dinucleotide triphosphate (dNTP), 4,0 uM de primer, 1 unidade de Taq DNA polimerase e água até completar um volume de 25 µL. As amplificações foram conduzidas em termociclador Life Touch®, modelo TC-96/G/H(b)B, com aquecimento inicial da solução a 94 °C, por 5 minutos, para a desnaturação de toda a fita dupla de DNA, 45 segundos a 94 °C para desnaturação, seguido de 35 ciclos com anelamento (45 °C a 65 °C), por 45 segundos, e extensão de 72 °C por 1 h 30 min, para a síntese da cadeia complementar pela DNA polimerase, além de uma fase de extensão final de 72 °C por 7 minutos. Por fim, os fragmentos de DNA amplificados, via PCR-ISSR, foram separados por eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,4%, a uma corrente de 230 miliampères (mA).

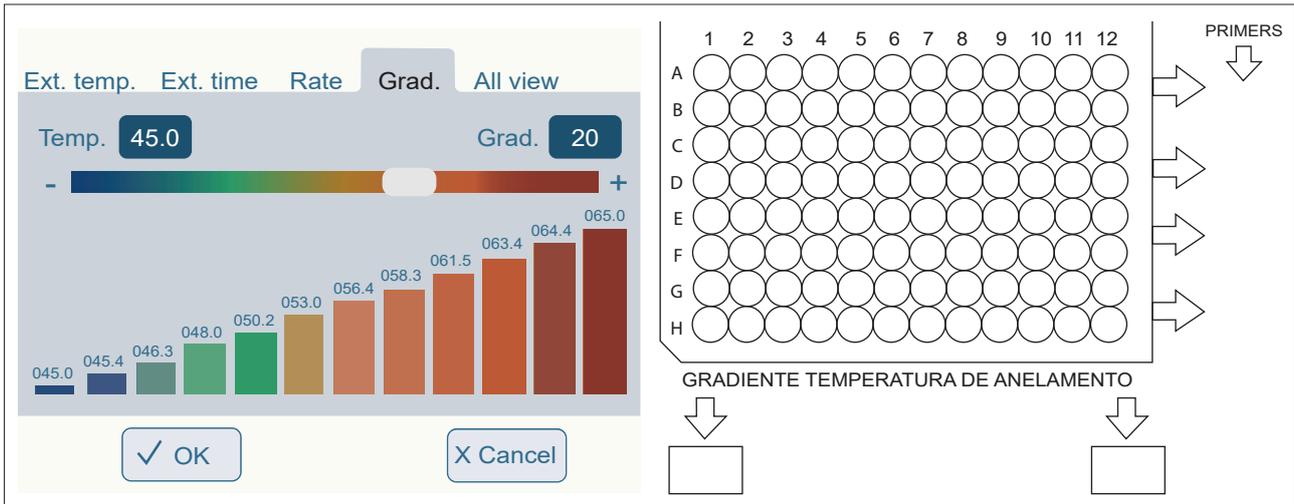
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as extrações de DNA, foi realizada uma corrida eletroforética para averiguação da qualidade do DNA Total extraído. Foram conduzidos ensaios de gradientes de temperaturas de anelamento, como forma de averiguar as capacidades de amplificações com os diferentes primers ISSR disponíveis. As temperaturas do gradiente foram interpostas entre 45 °C e 65 °C, conforme recurso do próprio aparelho termociclador. O arranjo para o preparo das placas de PCR possibilitou testar quatro primers ISSR conjuntamente, conforme esquema apresentado na Figura 1.

Uma exemplificação prática de análise eletroforética nos testes de gradiente está destacada na Figura 2.

As temperaturas de anelamento para cada primer foram escolhidas de acordo com 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 53 °C, sendo que a maior temperatura de anelamento selecionada foi 65 °C para o primer ISSR-807, e a menor temperatura usada selecionada foi de 45 °C para os primers ISSR-852 e ISSR-882. Como é mostrado na Tabela 1, a temperatura de anelamento 53 °C apresentou melhor qualidade de amplificação para o maior número de primers usados: ISSR-809, ISSR-817, ISSR-841 e ISSR-876, dos 15 selecionados, com qualidade

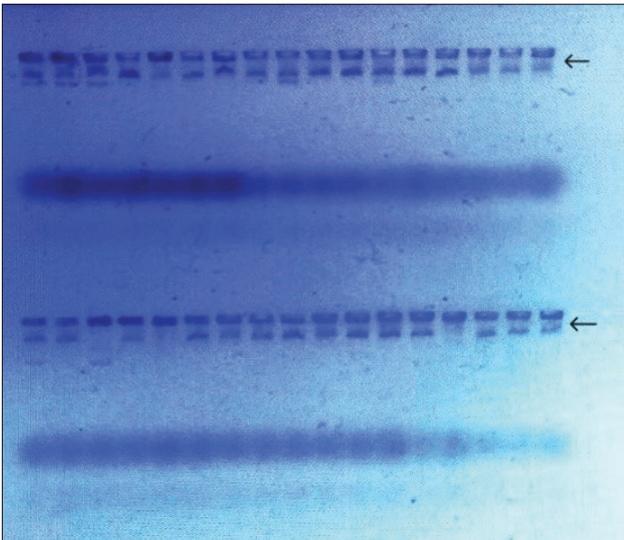
Figura 1 - Interface fornecida pelo aparelho termociclador (gradiente), evidenciando a programação do intervalo em gradiente, quanto às temperaturas de anelamento nas placas de PCR (45 °C a 65 °C)



Fonte: Elaboração da autora Joana D'Ark Nunes da Silva Lima.

Nota: Temp. - Temperatura; Grad. - Gradiente.

Figura 2 - Exemplo de análise eletroforética nos testes de gradiente



Fonte: Elaboração da autora Joana D'Ark Nunes da Silva Lima.

satisfatória na amplificação das bandas polimórficas, seguida da temperatura de anelamento 56,4 °C com três primers: ISSR-844, ISSR-848 e ISSR-896, e temperatura de anelamento 63,4 °C com três primers: ISSR-879, ISSR-880 e ISSR-894. E os primers ISSR-878 e ISSR-883 obtiveram produtos satisfatórios da amplificação à temperatura de 61,5 °C.

Os marcadores moleculares têm sido utilizados para estabelecer grau de parentesco entre linhagens endogâmicas e para a predição de comportamento progênes (Borém; Caixeta, 2009). Há também outros estudos para investigar a relação entre a diversidade genética em relação às regiões de origem, com o intuito de conhecimento de similaridade entre materiais adaptados a diferentes condições ambientais.

Tabela 1 - Lista dos marcadores ISSR utilizados

Primer	Temperatura escolhida
807	65 °C
809	53 °C
817	53 °C
841	53 °C
844	56,4 °C
848	56,4 °C
852	45 °C
876	53 °C
878	61,5 °C
879	63,4 °C
880	63,4 °C
882	45 °C
883	61,5 °C
894	63,4 °C
896	56,4 °C

Fonte: Elaboração da autora Joana D'Ark Nunes da Silva Lima.

Nota: ISSR - Inter Simple Sequence Repeat – Inter Repetições de Sequências Simples.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os primers ISSR selecionados (807, 809, 817, 841, 844, 848, 852, 876, 878, 879, 880, 882, 883, 894 e 896) apresentaram temperaturas de anelamento específicas que otimizaram tanto a quantidade como a qualidade de bandas ISSR polimórficas em morango, variando de 45 °C a 65 °C. A partir da definição das temperaturas, será possível realizar a amplificação dos produtos de PCR-ISSR para análise de divergência genética das progênes de morangueiro da EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG.

REFERÊNCIAS

- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (ed.). **Marcadores moleculares**. 2.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2009. 532p.
- CAMARGO, L.S.; PASSOS, F.A. Morango. *In*: FURLANI, A.M.C.; VIÉGAS, G.P. (ed). **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo**. Campinas, SP: Instituto Agrônomo, 1993. v.1, p.411-432.
- CONTI, J.H. Estudo de caracteres morfológicos, agronômicos e moleculares em cultivares de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.). 1998. 154p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2nd ed. New York: The New York Botanical Garden, 1988. 555p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 1998. 220p. (Embrapa Cenargen. Documentos, 20).
- MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.
- ROCHA, D.A. *et al.* Análise comparativa de nutrientes funcionais em morangos de diferentes cultivares da região de Lavras-MG. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.4, p.1124-1128, dez. 2008.

Os nomes comerciais apresentados nesta Circular Técnica são citados apenas para conveniência do leitor, não havendo por parte da EPAMIG preferência por este ou aquele produto comercial.

Disponível em: <http://www.livrariaepamig.com.br/difusao-de-tecnologia/>
Departamento de Informação Tecnológica