

CIRCULAR TÉCNICA

n. 421 - fevereiro 2025

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.

Testes de gradiente com primers ISSR em acessos de *Caryocar brasiliense*¹

Luciana Cardoso Nogueira Londe², Maria Fernanda Leal Lacerda³, Demerson Arruda Sanglard⁴

INTRODUÇÃO

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess.), família Caryocaraceae é uma espécie arbórea nativa do Cerrado, amplamente distribuída, porém ameaçada. Localmente, sua distribuição ocorre em áreas bem delimitadas. Com a rápida expansão da agricultura, o Cerrado foi fragmentado, comprometendo a viabilidade, a longo prazo, das espécies (Collevatti; Grattapaglia; Hay, 2003).

A fragmentação florestal reduz o número de indivíduos de uma população, causando a perda de variação genética. Quando a população passa a ter um tamanho menor que o mínimo adequado sua continuidade e evolução ficam comprometidas. A curto prazo a deriva genética pode acontecer, alterando aleatoriamente as frequências gênicas e, em alguns casos, levando à perda de alelos importantes. A longo prazo, pode ocorrer aumento de endogamia em razão da maior probabilidade de cruzamentos entre indivíduos aparentados ou de autofecundação (Kageyama; Gandara; Souza, 1998).

Estudos da estrutura genética de populações naturais são cruciais para entender a distribuição da variabilidade genética e garantir a perpetuação das espécies (Botrel; Carvalho, 2004).

Esta Circular Técnica tem por objetivo otimizar as amplificações com primers Inter Repetições de

Sequência Simples – Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) por meio de testes de gradiente, para identificar as temperaturas de anelamento de acessos de pequizeiro para estudos de diversidade genética.

CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (Labbiotec), da EPAMIG Norte - Campo Experimental do Gorotuba (CEGR), Nova Porteirinha, MG, e no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias (CPCA), da Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Montes Claros, MG. Foram coletadas folhas de pequizeiro nos municípios mineiros de Nova Esperança (acessos 1 ao 5), Mirabela (acessos 6 ao 11), Coração de Jesus (acessos 12 ao 16), São João da Lagoa (acessos 17 ao 21) e Montes Claros (acessos 22 ao 25), totalizando 25 acessos. As amostras de tecido foliar coletadas foram armazenadas em um ultrafreezer a -20 °C para conservação do material. O DNA das amostras foi extraído seguindo o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com adaptações, e, em seguida, foi realizada a quantificação em espectrofotômetro (Tecan, modelo Infinite M Plex). As amplificações, via Polymerase Chain Reaction (PCR), foram realizadas utilizando-se

Apoio FAPEMIG.

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.

³Engenharia Florestal, Bolsista BDCT&I Nível III FAPEMIG/EPAMIG Norte – CEGR, Nova Porteirinha, MG, lacerda.fernanda@hotmail.com.

⁴Engenheiro-agrônomo, D.Sc., Prof. Associado UFMG - ICA, Montes Claros, MG, demerson.ufmg@gmail.com.

uma coleção oligonucleotídica ISSR, desenvolvida pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canadá) e, para realização dos testes de gradientes, foram utilizados termocicladores (Eppendorf, modelo Nexus Gradient), configurados no espectro de 45 °C a 65 °C, utilizando o DNA de dois indivíduos aleatórios da população.

As amostras foram amplificadas via PCR, e cada reação continha o total de 25 µL (12,4 µL de H₂O ultrapura; 3,5 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) 2,8 mM; 2,4 µL de hidroximetil-aminometano – Tris hydrochloride/cloreto de potássio (Tris/KCl) pH 8,3 10 mM/50 mM; 1,0 µL de nucleosídeo trifosfato – dinucleotide triphosphates (dNTPs); 2,5 µL de primer 0,4 µM; 0,1 µL de Tag DNA polimerase 1,0 un/µL e 3,0 µL de DNA 10 ng/µL). O aparelho foi configurado com a seguinte programação: a fase inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto), anelamento de 45 °C a 65 °C por 1 minuto e extensão de 72 °C por 2 minutos; extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,4% em tampão SB 1x e cada reação corada com 3 µL de corante tipo IV e 5 µL de GelRed®. Os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados por fotodocumentador (Loccus Biotecnologia, modelo L-PIX).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a extração do DNA, realizou-se a quantificação por espectrofotometria, para verificação das concentrações das amostras e, em seguida, foram diluídas para uma concentração final de 10 ng/µL para o preparo do mix da PCR.

Ensaio de gradiente de temperatura de anelamento foram realizados, para averiguar a eficácia das amplificações com diferentes oligonucleotídeos ISSR, como exemplificado na Figura 1. O gradiente de temperatura foi intervalado entre 45 °C a 65 °C (Fig. 1), de acordo com a funcionalidade do termociclador. A temperatura de anelamento ideal para cada primer foi determinada com base na intensidade, nitidez e capacidade de discriminação de bandas polimórficas observadas em gel de agarose, garantindo a otimização das reações e a máxima detecção de polimorfismos.

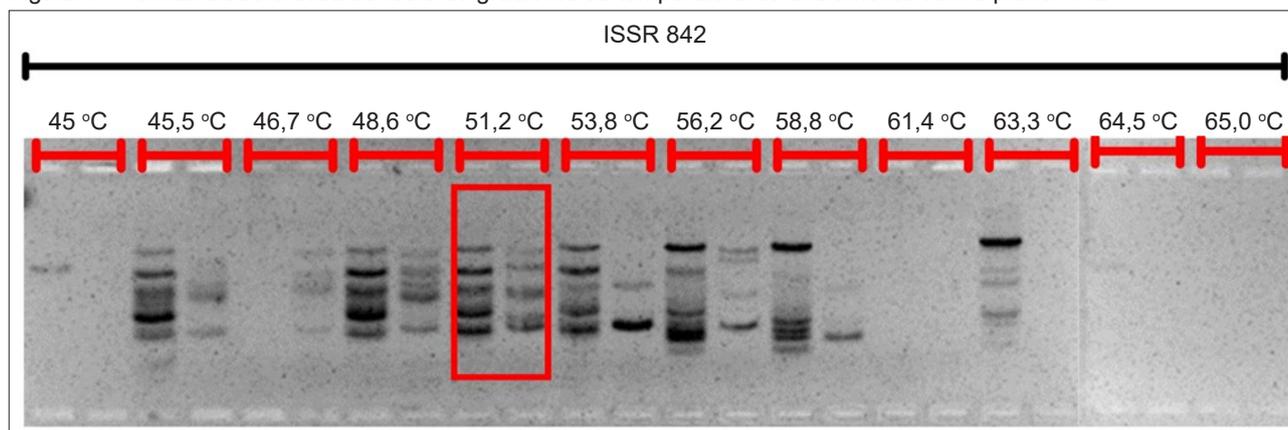
Como demonstrado na Tabela 1, 13 primers apresentaram polimorfismos sob a temperatura de anelamento específica.

Tabela 1 - Primers utilizados e resultado da temperatura de anelamento

Primer	Código do primer (Sequência 5'→3')	Temperatura de anelamento (°C)
813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	54
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	54
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	51
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	54
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	46
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	51
851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	54
857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	59
859	TGT GTG TGT GTG TGT GRC	63
862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	56
864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	51
867	GGC GGC GGC GGC GGC GGC	64
873	GAC AGA CAG ACA GAC A	46

Fonte: Elaboração da autora Maria Fernanda Leal Lacerda.

Figura 1 - Corrida eletroforética do teste de gradiente de temperatura de anelamento com o primer 842



Fonte: Elaboração da autora Maria Fernanda Leal Lacerda.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização prévia de testes de gradiente de temperaturas de anelamento e a seleção de primers ISSR otimizam recursos e esforços nas tarefas de amplificação populacional, garantindo que a análise da divergência genética seja realizada de forma eficiente. A partir das temperaturas específicas, será possível prosseguir com os estudos das análises de diversidade genética do pequi.

AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig).

REFERÊNCIAS

- BOTREL, M.C.G., CARVALHO, D. de. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.4, p.621-627, out./dez. 2004.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. du D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, v.12, n.1, p.105-115, Feb. 2003.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; SOUZA, L.M.I. de. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, [Piracicaba], v.12, n.32, p. 65-70, dez. 1998.

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