

## TESTE DE *PRIMERS* DE ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) PARA O ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Euphorbia heterophylla* L.

SILVA, D. (DBC - UEM, Maringá/PR – dhebybio@gmail.com), BEVILAQUA, M. R. R. (DBC – UEM, Maringá/PR – maycon.bevilaqua@gmail.com), MEIRELLES, A. S. (DBC – UEM, Maringá/PR – anameirelles83@gmail.com), MANGOLIM, C. A. (DBC – UEM, Maringá/PR – mangolinca@gmail.com), OLIVEIRA JR., R. S. (NAPD - UEM, Maringá/PR – rsojunior@uem.br).

**RESUMO:** A espécie *Euphorbia heterophylla* L. é popularmente conhecida no Brasil como “amendoim bravo” ou “leiteiro”; ela é uma planta daninha comum e anual, sendo reconhecida como uma das plantas daninha mais importante da cultura de soja no Brasil. Ela afeta a produtividade de cerca de 31 culturas anuais e perenes em 56 países. A importância agrícola dessa planta deve-se à sua frequente presença como invasora em plantio direto quanto convencional. A avaliação da diversidade genética e o entendimento da estrutura de genética de populações são elementos importantes para identificar formas de manejo e para orientar o desenvolvimento de planos efetivos de controle das plantas daninhas. Frente à importância do controle desta daninha, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética de amostras coletadas em diferentes regiões do Paraná e Rio Grande do Sul, caracterizando desta forma a diversidade para esta espécie. Para esta avaliação foram utilizados 9 marcadores moleculares ISSR. Que são bastante variáveis e fornecem grande número de dados sobre a espécie em estudo. Os marcadores ISSR tem sido utilizados para estimar a extensão da diversidade genética em nível inter e intraespecífico em uma ampla variedade de espécies.

**Palavras-chave:** Marcadores ISSR, diversidade genética;

### INTRODUÇÃO

A *Euphorbia heterophylla* L., também conhecida como leiteiro ou amendoim bravo, tem seu centro de origem na região Brasil - Paraguai. É uma planta daninha bastante frequente no Sul, no Sudeste e no Centro-Oeste do Brasil (KISSMANN; GROTH, 1992).

Seu controle químico é realizado principalmente com herbicidas que agem inibindo a enzima acetolactato sintase, ALS. O controle desta planta daninha é muito importante, pois afeta a produtividade de cerca de 31 culturas anuais e perenes em 56 países, sendo as principais soja, milho e cana-de-açúcar (VASCONCELOS et al., 2000).

Sua classificação ainda não está bem definida, a variabilidade no formato das folhas sugere que a espécie ainda esteja em evolução e tem sido utilizada para sugerir que *E. heterophylla* seria de fato, formada por diferentes espécies.

Uma forma de avaliar esta diversidade é estudar diferentes populações utilizando diferentes classes de marcadores. Marcadores moleculares de DNA são sequências genômicas localizadas num mesmo loco e são definidos como elementos capazes de prever, mapear e caracterizar um fenótipo molecular (ZIETKIEWICZ et al. 1994).

O princípio da técnica é baseado em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e envolve ampliações de segmentos de DNA presente numa região de distância amplificável entre duas regiões repetidas de microssatélites idênticas e orientadas em direções opostas. As ampliações não requerem informações da sequência do genoma e o resultado avalia multilocos com alto padrão de polimorfismo.

Os marcadores ISSR são bastante variáveis, fornecem grande número de dados, são facilmente detectados usando poucos equipamentos e ainda possuem um custo razoável para o pesquisador (WOLFE, 2005). Devido à sua abundância e dispersão no genoma, os marcadores ISSR tem sido utilizados para estudar relações entre duas populações muito relacionadas e também para estimar a extensão da diversidade genética a nível inter e intraespecífico em uma ampla variedade de espécies. Assim como em estudos de “fingerprinting”, seleção assistida por marcadores, filogenia e mapeamento genético. (REDY et al, 2002).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de *Euphorbia heterophylla* L. de 10 diferentes localidades, nove amostras foram coletadas de diferentes regiões do estado do Paraná e uma amostra foi coletada em Rio dos Índios no Rio Grande do Sul. As sementes coletadas foram semeadas em vasos, onde em cada vaso foram semeadas em torno de 50 sementes. Estes vasos foram mantidos em condição ambiente na Universidade Estadual de Maringá (UEM). Para cada amostra coletada foi avaliado um número diferente de indivíduos variando de 7 a 17 plantas, totalizando 132 amostras estudadas.

Para a extração de DNA utilizados no estudo da variabilidade genética, foram coletadas 100mg de folhas jovens de plantas individuais de cada genótipo (local), totalizando 132 amostras. O DNA genômico de cada planta foi extraído seguindo a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994), com pequenas modificações.

Para selecionar os *primers* utilizados neste trabalho foram avaliados 30 *primers* de ISSR, que fazem parte do banco de *primers* do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais (DBC/UEM). Para o uso de cada *primer* foi testada a concentração de DNA de 15 e 10ng, também foi avaliada a concentração do MgCl<sub>2</sub>, foram testadas as

concentrações de 2,0 e 2,4 mM, a concentração do *primer* também foi avaliada, foram testadas as concentrações de 0,2 e 0,4  $\mu\text{M}$ , já a temperatura de anelamento foi testada variando de 49°C à 51°C. Dos 30 *primers* testados neste trabalho foram selecionados 9, pois estes apresentaram um padrão de fragmentos amplificados bem definido. Os *primers* que após estes testes não amplificaram fragmentos específicos foram descartados deste trabalho.

Após a amplificação para cada amostra foram acrescentados 2  $\mu\text{L}$  de tampão *loading* (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%), e estas foram separadas em gel de agarose 1,5 % usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA), tanto para o preparo do gel como para as cubas. Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados e separados no gel, foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb *DNA Ladder* (Invitrogen). Para a eletroforese os géis foram expostos a um campo elétrico de 60 Volts por 4 horas, e após este período estes foram corados em solução de brometo de etídio preparada com 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , a imagem dos fragmentos no gel foi capturada em transluminador L-PIX HE, Loccus biotecnologia.

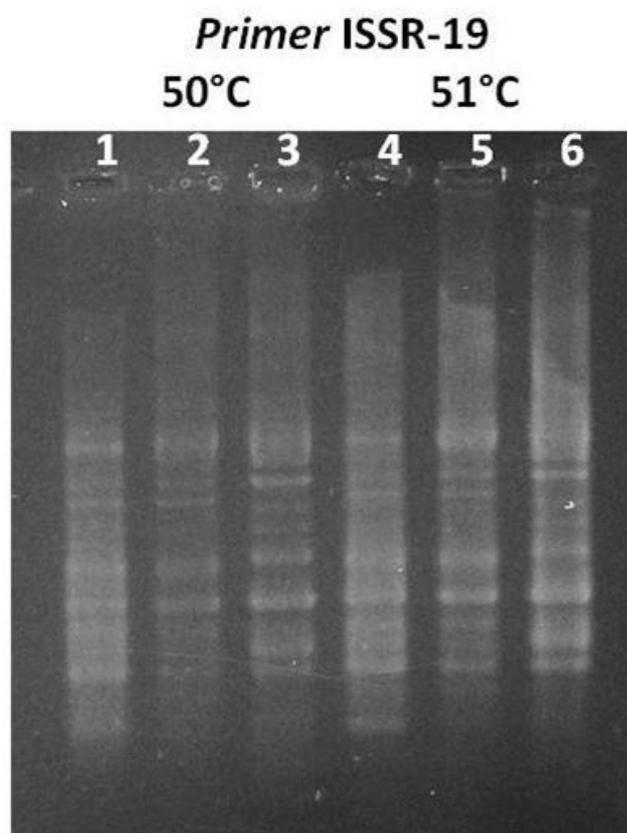
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para que um marcador possa ser utilizado em um estudo, é necessário que se realize a padronização das condições de amplificação, concentração dos componentes do meio de reação, temperatura e tempo para as etapas da PCR. Esta etapa permite um melhor aproveitamento dos marcadores, otimizando o processo de escolha. Para selecionar os marcadores que serão utilizados em futuros trabalhos foram avaliados 30 *primers* de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Para o uso de cada *primer* foi testada a concentração de DNA para 15 e 10ng, também foi avaliada a concentração do  $\text{MgCl}_2$ , para este componente foram testadas as concentrações de 2,0 e 2,4 mM, a concentração do *primer* também foi avaliada, foram testadas as concentrações de 0,2 e 0,4  $\mu\text{M}$ . Para a condição de amplificação foi testada a temperatura de anelamento, que dependendo do *primer* avaliado variou de 49°C à 51°C; cada *primer* utilizado apresentou melhor resultado de amplificação em uma temperatura específica onde os melhores resultados de amplificação foram obtidos quando a reação foi realizada utilizando 10ng de DNA, 2,4 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 0,4  $\mu\text{M}$  de cada *primer* utilizado.

Para a padronização de temperatura ideal para o anelamento dos *primers*, foram feitos vários testes até a obtenção de um bom resultado com bandas nítidas. A figura 1 apresenta o resultado da amplificação do DNA de três amostras distintas realizado com o *primer* ISSR-19, nesta reação foram comparadas as temperaturas de anelamento em 50° e 51°C. Como a temperatura de 50°C foi a que apresentou melhor separação e nitidez dos

segmentos amplificados, foi a temperatura utilizada para avaliar o DNA das 132 plantas de *E. heterophylla* estudadas neste trabalho.

Após a realização das padronizações, apenas 9 *primers* amplificaram e apresentaram um bom padrão com bandas bem definidas no gel, sendo eles: ISSR-2, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-17, ISSR-18, ISSR-19, ISSR-811. Estes *primers* foram utilizados para amplificar o DNA das 132 amostras dos 10 pontos de coleta, gerando um total de 133 segmentos de DNA reproduzíveis (bandas).



**Figura 1.** *Primer* ISSR-19 utilizado para avaliar e selecionar diferentes temperaturas de anelamento; amostras 1, 2, e 3 foram amplificadas com a temperatura de anelamento de 50°C, amostras 4, 5 e 6 são os mesmos DNAs amplificados com a temperatura de 51°C.

### CONCLUSÕES

Conclui-se que dos 20 *primers* testados apenas 9 amplificaram e apresentaram um bom padrão com bandas bem definidas no gel, sendo eles: ISSR-2, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-17, ISSR-18, ISSR-19, ISSR-811.

É possível utilizar esses marcadores como estudo para a diversidade genética da espécie *Euphorbia heterophylla* L.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HOISINGTON, D.A. et al. **Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular genetics Laboratory**. Second ed., Mexico, D.F. Mexico, 1994.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 798p, 1992.

REDDY, M.P. et al. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**. v. 128, p.9–17, 2002.

VASCONCELOS, M. J. V. et al. Variabilidade genética em biótipos de leiteiro de Londrina, PR. **Planta Daninha** 18, 285-291, 2000.

ZIETKIEWICZ, E. et al. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20: 176-183, 1994.

WOLFE K. H. *Evolutionary genomics: yeasts accelerate beyond*. **BLAST**. *Curr. Biol.* 14, R392–R394, 2005.