

AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE PRIMERS ISSR EM *Pitcairnia flammea***José Dias de Souza Neto¹, Fabiano Costa Santiliano¹, Taís Cristina Bastos Soares¹,
Fábio Demolinari de Miranda¹, Andréia Barcelos Passos Lima¹**¹Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUFES)/Zootecnia, josedsneto@yahoo.com.br¹Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUFES)/Produção Vegetal, fabianosantiliano@yahoo.com.br¹Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUFES)/Zootecnia, tcbsoares@yahoo.com.br¹Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUFES)/ Produção Vegetal, fademolinari@yahoo.com.br¹Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUFES)/ Produção Vegetal, albarcelos@hotmail.com

Resumo- A família Bromeliaceae compreende aproximadamente 3.086 espécies distribuídas em 58 gêneros e três subfamílias. Estima-se que, aproximadamente, 73% dos gêneros e 40% das espécies conhecidas sejam encontradas no Brasil. Muitas espécies desta família são utilizadas como plantas ornamentais em ambientes externos ou internos, sendo extremamente apreciadas em todo o mundo. O ISSR, por ser um marcador molecular associado ao uso de seqüências microssatélites, possui elevado poder de discriminação entre genótipos quando comparado a outros marcadores. Em vários trabalhos ISSRs tem sido utilizados com sucesso para análises de variabilidade intra e interpopulacional. Estudos demonstraram a possibilidade de amplificação cruzada de *primers* ISSR originalmente descritos para outra espécie o que elimina os custos relacionados ao desenvolvimento destes iniciadores. No presente trabalho *primers* ISSR, desenvolvidos com base em seqüências genômicas de diferentes espécies, foram utilizados em reações de PCR para avaliar dez exemplares de *Pitcairnia flammea*. Foram obtidos um total de 78 fragmentos amplificados dos quais 45 evidenciaram polimorfismos (57,69%) entre os indivíduos.

Palavras-chave: *Pitcairnia flammea*, amplificação cruzada, marcadores ISSR.**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas**Introdução**

A família Bromeliaceae compreende aproximadamente 3.086 espécies distribuídas em 58 gêneros e três subfamílias: Pitcarnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae (SMITH e DOWNS, 1974, 1977 e 1979; LUTHER, 2006), estimando-se que, aproximadamente, 73% dos gêneros e 40% das espécies conhecidas são encontradas no Brasil (LEME e MARIGO, 1993). As bromélias possuem distribuição geográfica limitada à faixa intertropical das Américas, com uma única exceção no Oeste Africano – *Pitcairnia feliciana* (SMITH e DOWNS, 1974).

Várias espécies da família são adaptadas à vida epífita, ocorrendo principalmente nas florestas de regiões tropicais (LUGO e SCATENA 1992). O sucesso das bromélias no epifitismo deve-se, em especial, à capacidade de obtenção de nutrientes e umidade diretamente da atmosfera ou das cisternas formadas pelo imbricamento da base das suas folhas (LUGO e SCATENA, 1992). Mais de 90 espécies de bromélias são utilizadas para os mais diversos fins: fibras, forragem, alimentação humana, ornamentação, em rituais místicos, entre outros (BENNETT, 2000). O uso mais comum das Bromeliaceae é como plantas ornamentais em ambientes externos ou internos, sendo extremamente apreciadas no mundo todo, principalmente nos Estados Unidos, Europa e

Japão, onde seu cultivo movimenta uma economia considerável (PAULA e SILVA, 2000).

A preservação da diversidade genética se tornou o objetivo da maioria dos programas de conservação e conhecer a distribuição desta diversidade entre e dentro de populações naturais é o primeiro passo (BEKESSY et al., 2002). Os marcadores moleculares abrem novas perspectivas para pesquisas em conservação de espécies e têm sido amplamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; ZUCCHI, 2002). Podem diferir com respeito a características importantes como, abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética (PINTO et al., 2001) e ainda distinguir, em alguns casos, homozigotos e heterozigotos (HODGKIN et al., 2001).

O ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) é um marcador molecular associado ao uso de seqüências microssatélites, que são seqüências simples repetidas, organizadas em tandem, contendo de 1 a 3 bases, abundantemente distribuídas ao longo de todo o genoma de eucariotos (RATNAPARKHE et al., 1998; WANG et al., 1994; LIU e WENDEL, 2001; REDDY et al., 2002). Esse tipo de marcador tem sido utilizado com sucesso em análises nas quais objetiva-se a identificação da variabilidade entre indivíduos

analisados (BATISTA et al., 2008; SOUZA, et al., 2008; CASTRO et al., 2009).

A amplificação cruzada de *primers* tem sido usada por autores, que objetivam avaliar a taxa de polimorfismo de um marcador de DNA em diferentes espécies. Alguns estudos demonstraram a possibilidade de uso eficiente de *primers* ISSR, originalmente desenvolvidos para uma espécie, utilizados em reações de PCR para avaliar genomas de outras espécies. Esta possibilidade elimina os custos adicionais para o desenvolvimento de *primers* (KATZIR et al., 1996; MATSUOKA et al., 2002; PLIESKE e STRUSS, 2001; SAHA et al., 2006; LORIEUX et al., 2000). Almeida et al. (2006) avaliaram o grau de diversidade genética em populações de *Aechmea Fulgens Brongn*, utilizando *primers* ISSR originalmente desenvolvidos para *Sphagnum angermanicum* e *Pogonatum dentatum*. Os resultados deste estudo revelaram 90,3% de polimorfismo nos loci amplificados. O objetivo deste trabalho foi verificar a amplificação cruzada de 12 *primers* ISSR selecionados de um conjunto produzido pela University of British Columbia, Vancouver, Canadá para *Sphagnum angermanicum* e *Pogonatum dentatum*, em *Pitcairnia flammea* (Bromeliaceae).

Metodologia

O DNA genômico de folhas de *P. Flammea* foi extraído conforme protocolo de Doyle e Doyle (1990) modificado. As reações para a amplificação dos *primers* ISSR foram realizadas em um volume total de 25 µL, contendo 2 mM de MgCl₂, 10mM/50mM de Tris/KCl pH 8.3, 0,1mM de cada nucleotídeo (dNTP), 0,2 µM de *primer*, 1 unidade de Taq polimerase e 50 ng de DNA (ALMEIDA et al., 2006). As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 15 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos constituídos por três etapas: a) 30 segundos a 94 °C, b) 30 segundos a 52 °C e c) 1 minuto a 72 °C, com uma etapa final de 7 minutos a 72 °C. Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo 0,02 uL.mL⁻¹ de brometo de etídio em tampão SB 1X (0,04% v/v de NaOH e 0,25% v/v de ácido bórico), a 100 Volts por aproximadamente cinco horas. Após a corrida os géis foram fotografados sob luz ultravioleta utilizando o Sistema de Fotodocumentação L PIX HE da Loccus Biotecnologia®. Os géis foram analisados quanto ao número e tamanho de fragmentos amplificados e detecção de polimorfismos.

Os *primers* utilizados neste trabalho estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Codificação e sequência dos *primers* ISSR utilizados em *P. Flammea*.

<i>Primers</i>	Sequência de bases
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAT
UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGYT
UBC 890	VHVGTTGTGTGTGTGT
UBC 841	GAGAGAGAGAGAGAYC
UBC 849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA
UBC 854	TCTCTCTCTCTCTCRG
UBC 855	ACACACACACACACACYT
UBC 857	ACACACACACACACACYG
UBC 859	TGTGTGTGTGTGTGTGRC
UBC 862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC
UBC 880	GGAGAGGAGAGGAGA
UBC 895	AGGTCGCGGCCGCNNNNNNAT

Resultados

Como observado na tabela 2, a maioria dos *primers* ISSR utilizados possibilitaram a amplificação de fragmentos nas reações de PCR utilizando DNA genômico de *Pitcairnia flammea*. A análise comparativa dos dados revelou os valores de bandas totais amplificadas, número de fragmentos polimórficos e monomórficos gerados por cada iniciador, bem como os valores percentuais de polimorfismo em relação à espécie estudada.

Tabela 2 - Número de fragmentos amplificados, bandas polimórficas e monomórficas e porcentagem de polimorfismo gerado pela utilização dos 12 *primers* ISSR aplicadas à bromeliácea *Pitcairnia flammea*.

Primer	Bandas Polimórficas	Bandas Monomórficas	Fragmentos Amplificados	% de polimorfismo
UBC 810	2	2	4	50,00
UBC 834	8	0	11	72,73
UBC 890	10	1	12	83,33
UBC 841	2	2	5	40,00
UBC 849	1	1	2	50,00
UBC 854	0	0	0	0
UBC 855	3	3	8	37,50
UBC 857	3	2	8	37,50
UBC 859	7	0	10	70,00
UBC 862	4	1	7	57,14

UBC 880	3	3	11	27,27
UBC 895	0	0	0	0

Dos 12 *primers* ISSR utilizados no estudo, apenas quatro apresentaram polimorfismo abaixo de 50%, ou seja, 66,67% dos *primers* utilizados apresentam um grau de polimorfismo considerável. Os *primers* UBC 834, UBC 890 e UBC 859 (Figuras 1, 2 e 3 respectivamente) apresentam elevado grau de polimorfismo para a espécie *P. flammea* podendo ser indicados para estudos de variabilidade desta. As reações utilizando os *primers* UBC 895 e UBC 854 não geraram produtos de amplificação detectáveis.

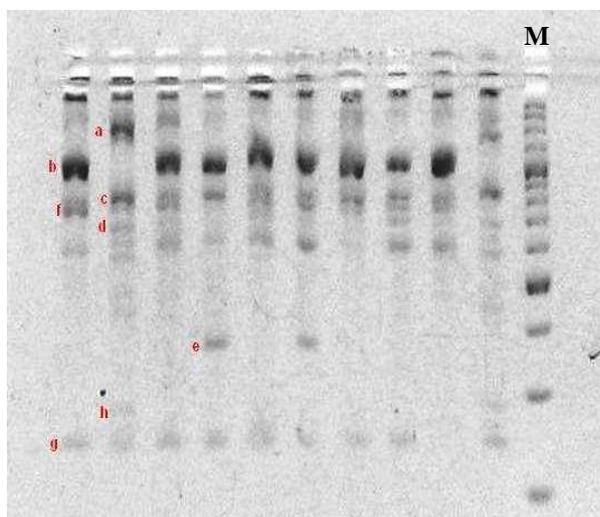


Figura 1: Fragmentos de DNA obtidos nas reações de PCR utilizando o *primer* UBC 834 em *P. Flammea*.

M - marcador de peso molecular (100 pb); letras indicam polimorfismos.

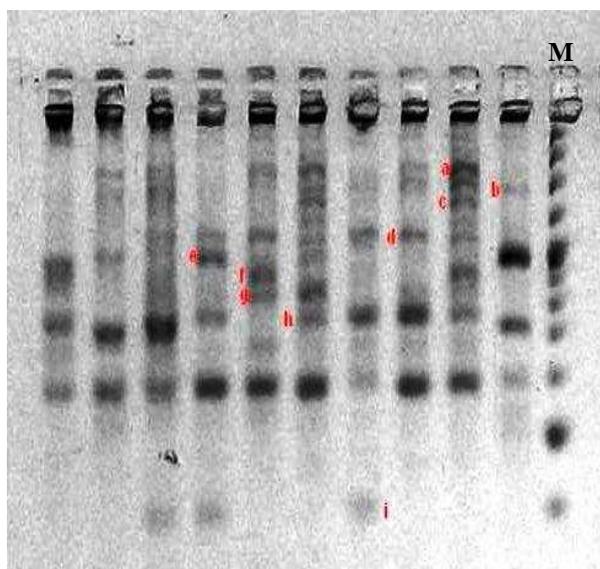


Figura 2: Fragmentos de DNA obtidos nas reações de PCR utilizando o *primer* UBC 890 em *P. Flammea*.

M - marcador de peso molecular (100 pb); letras indicam polimorfismos.

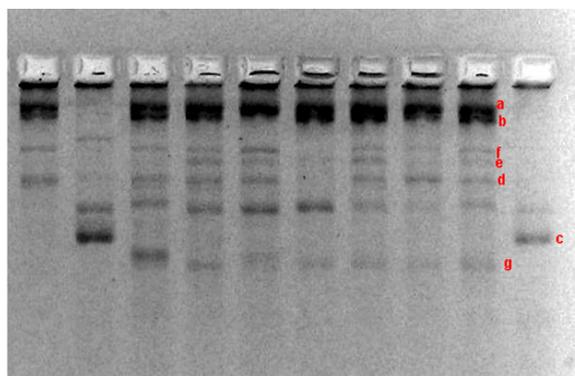


Figura 3: Fragmentos de DNA obtidos nas reações de PCR utilizando o *primer* UBC 859 em *P. flammea*; letras indicam polimorfismos.

Discussão

Os fragmentos amplificados com *primers* ISSR apresentaram tamanhos variando entre 250 a 1400 pb (pares de base) em *P. flammea*, como é visto na tabela 3. Almeida et al. (2006) trabalhando com espécies de bromélias, obtiveram fragmentos de DNA em reações de PCR, gerados pelos mesmos *primers* ISSR, com tamanhos entre 350 a 2000 pb e polimorfismos de 94% para o *primer* UBC 808 (17 bandas polimórficas de 18 amplificadas), 90% para o *primer* UBC 810 (15 fragmentos polimórficos de 17 amplificadas) e 88% para o *primer* UBC 890 (7 bandas polimórficas de 8 amplificadas). Os resultados encontrados no presente estudo mostram que marcadores ISSR desenvolvidos para outras espécies podem ser utilizados em análises moleculares de *P. flammea*.

Tabela 3: Número de bandas polimórficas e amplificadas, assim como o intervalo em pares de base (bp) que se encontram as bandas com seus respectivos *primers* utilizados.

Primers	Bandas Polimórficas	Bandas Amplificadas	Tamanho (bp)
UBC 810	2	4	300-1000
UBC 834	8	11	250-1300
UBC 890	10	12	300-1400
UBC 841	2	5	-

UBC 849	1	2	-
UBC 854	0	0	-
UBC 855	3	8	-
UBC 857	3	8	-
UBC 859	7	10	-
UBC 862	4	7	-
UBC 880	3	11	-
UBC 895	0	0	-

Alguns dos *primers* utilizados neste trabalho foram avaliados em estudos por outros autores para diferentes espécies; Pharmawati et al. (2004), trabalhando com *Grevillea* (Proteaceae); Xiao et al. (2004), trabalhando com *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). Nesses trabalhos o número de fragmentos variou de 8-23 (UBC 808), 7-10 (UBC 842) e 8-24 (UBC 890). Pharmawati et al. (2004) obtiveram fragmentos, para os iniciadores UBC 808 (359-1558 pb) e UBC 890 (369-1385 pb), com tamanhos próximos aos encontrados nesse estudo, os quais variaram de 250-1400 pb. A redução no percentual médio de polimorfismo gerado (57,69%) deve-se a não amplificação de alguns primers testados (UBC 854 e UBC 895). Neste caso a ausência de produtos de amplificação pode ser um indicativo do não “anelamento” do *primer* à cadeia molde de DNA.

Melo (2009) em tese de mestrado utilizou marcadores ISSR para caracterização molecular e agrônômica de maracujá azedo obtendo fragmentos polimórficos dos primers UBC 810 (03), UBC 857 (08), UBC 834 (14), sendo a porcentagem de polimorfismo dos primers a seguinte: 60%, 47% e 60,8% respectivamente, sendo os valores de porcentagem de polimorfismo próximos do encontrado pelo autor.

Conclusão

Foi verificada a ocorrência de amplificação cruzada de *primers* ISSR em *P. flammea*, o que sugere sua utilização em trabalhos futuros de caracterização molecular de populações naturais desta Bromeliaceae.

Referências

-ALMEIDA, C. M. A. Diversidade genética em populações de *aechmea fulgens* brongn.

(bromeliaceae) em fragmentos de mata Atlântica em Pernambuco. 2006, p. 60. Dissertação (Pós-Graduação em Agronomia –Melhoramento Genético de Plantas)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Recife, 2006.

-BATISTA, E. C.; TELLES, M. P. de C.; RAMOS, J. R.; SOARES, T. N.; DINIZ FILHO, J. A.; FERREIRA, H. D. Variabilidade genética intrapopulacional utilizando marcadores ISSR em *Tibouchina papyrus*. 2008. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/download/437/t>> Acesso em: 04 maio 2010.

- BEKESSY, S. A. ALLNUTT, T. R., PREMOLI, A. C., LARA, A., ENNOS, R. A. BURGMAN, M. A., CORTES, M. & NEWTON, A. C. Genetic variation in the vulnerable and endemic Mokey Puzzle tree, detected using RAPDs. **Heredity**, 88, 243-249, 2002.

-BENNETT, B.C. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: BENZIG, D. H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University, 690 p. 2000.

-CASTRO, N. K.; AVANZI, V. M.; GUEDES, A. A. de S.; OLIVEIRA, A. V. de. Análise genética de espécies do gênero *hypostomus* sp. do Rio Ivaí, através de marcadores moleculares ISSR. 2009. Disponível em: <http://www.cesumar.br/epcc2009/anais/natascha_karoline_castro.pdf>. Acesso em 04 maio 2010.

-CAVALLARI, M.M. *Estrutura genética de populações de Encholirium (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação*. Piracicaba, 2004, 92p. (Dissertação) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

-FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3a. Ed. Brasília: CNARGEM-EMBRAPA, 220p, 1998.

-HODKIN, T.; ROVIGLIONI, R.; DE VICENTE, M.C.; DUDNIK, N. Molecular methods in the conservation and use of plant genetic resources. *Acta Horticulture*, v. 546, p.107-118, 2001.

-KATZIR, N.; DANIN-POLEG, Y.; TZURI, G.; KARCHI, Z.; LAVI, U.; CREGAN, P. B. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1282-1290. 1996.

- LEME, E.M.C.; MARIGO, L.C. Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual, Rio de Janeiro, p.183. 1993.
- LIU, B.; WENDEL, J.F. Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, 1:205-208, 2001.
- LORIEUX, M.; NDJIONDJOP, M-N; GHESQUIÈRE, A. A first interespecific *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 593-601, 2000.
- LUGO, A.E.; SCATENA, F.N. Epiphytes and climate change research in the Caribbean: a proposal. *Selbyana*, v.13, p.123-130. 1992.
- LUTHER, H.E. An alphabetical list of bromeliad binomial. 10.ed. Sarasota: The Marie Selby Botanical Gardens, 119p. 2006.
- MATSUOKA, Y.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; GOODMAN, M.; DOEBLEY, J. Microsatellites in Zea-variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.* 104: 436-450. 2002.
- MELO, F. de M. e R. de . Caracterização agrônômica e molecular de oito genótipos de maracujá azedo no agreste meridional pernambucano. 2009. 58p. Dissertação (mestrado em Agronomia)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.
- PAULA, C.C. de; SILVA, H.M.P. da. Cultivo prático de bromélias. Viçosa, MG: UFV, 2000.
- PHARMAWATI, M.; YAN, G; MCFARLANE, I..J. Application of RAPD and ISSR markers to analyse molecular relationships in *Grevillea* (Proteaceae). *Australian Systematic Botany* n.17, 2004, p.49–61.
- PINTO, L.R.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P. Isoenzimas e Microsatélites em Plantas. *Biocologia e Desenvolvimento*, n.20, p.16-19, 2001.
- PLIESKE, J.; STRUSS, D. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica* L. development in *Brassica napus* and abundance in Brassicaceae species. *Theor. Appl. Genet.* 102: 689-694. 2001.
- RATNAPARKHE, M. B; TEKEOGLU, M; MUEHLBAUER, F. J. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 515-519, 1998.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIG, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 129:9-17, 2002.
- SAHA, C. M., COOPER, J. D.; ROUF MIAN, M. A.; CHEKHOVSKIY, K.; MAY THEOR, G. D. Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species. *Appl. Genet.* 113: 1449-1458. 2006.
- SMITH, L.B. e DOWNS, R.J. Pitcairnoideae. (Bromeliaceae). **Fl. Neotrop. Monagr.** 14 (1): 1-658. The New York Botanical Garden, New York. 1974.
- _____. Tillandsioideae. **Fl. Neotrop. Monagr.** 14 (2): 663-1492. The New York Botanical Garden, New York. 1977.
- _____. Bromelioideae. (Bromeliaceae). **Fl. Neotrop. Monagr.** 14 (3): 1493-2142. The New York Botanical Garden, New York. 1979.
- SOUZA, G. A. de; CARVALHO M. R. de O.; MARTINS E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. de. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus* . *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.43, n.7, p.843-849, jul. 2008. Disponível em: <<http://webnotes.sct.embrapa.br/pdf/pab2008/07/43n07a08.pdf>> Acesso em 30 abr 2010.
- WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZONGH, G.; TANKSELY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 1-6, 1994.
- XIAO, L.Q.; GE, X. J.; GONG, X; HAO, G.; ZHENG, S.X. ISSR Variation in the Endemic and Endangered Plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany*, n.94, p.133-138, 2004.
- ZUCCHI, M.I. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. 2002. 130p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

XIV INIC

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

X EPG

Encontro Latino Americano
de Pós Graduação

IV INIC Jr

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior