POLIMORFISMO DE MARCADORES ISSR (*INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS*) EM PLANTAS DO GÊNERO *CEREUS* DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

Everaldo dos Santos, Sanny Damazio Domingues (PIBIC/AF/IS-CNPq-UEM), Maria de Fatima Pires da Silva Machado (Orientador), e-mail: mfpsmachado@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

Área: 20200005 - Genética. Subárea: 20203004 - Genética Vegetal

Palavras-chave: Diversidade genética, Cactos, População

Resumo:

O objetivo no presente estudo foi analisar o polimorfismo de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats* = segmentos entre sequências simples repetidas de DNA) em plantas do gênero *Cereus*, a fim de investigar o potencial destes marcadores para distinguir espécies de diferentes regiões brasileiras. Oito *primers* ISSR foram aplicados em amostras de onze estados brasileiros agrupados em quatro subpopulações de acordo com a região onde foram coletadas. Foram utilizadas técnicas moleculares de extração de DNA, PCR e eletroforese para o estudo. Os marcadores moleculares ISSR amplificaram um número expressivo de bandas no DNA, e são, portanto, ferramentas promissoras para a detecção de polimorfismo do DNA em plantas do gênero *Cereus*, permitindo estimar a diversidade genética das populações de diferentes regiões do Brasil.

Introdução

A Família Cactaceae apresenta cerca de 130 gêneros e 1.438 espécies divididas em quatro subfamílias: Pereskioideae, Opuntioideae, Cactoideae e Maihuenioideae (HUNT et al., 2006). O estudo com marcadores ISSR no gênero *Cereus* ainda é irrisório. Segundo Rodrigues (2010), os primers ISSR são recomendados para análises de espécies relacionadas evolutivamente, e também, para a diferenciação rápida entre indivíduos aparentados, pois apresentam resultados confiáveis, devido sua abundância e dispersão por todo o genoma. Além disso, o uso dos ISSR lista algumas vantagens, como de não haver a necessidade de conhecimento prévio de sequência de DNA para a construção do *primer* e mostram um alto grau de polimorfismo.
Em suma, o principal objetivo neste estudo é analisar o polimorfismo de marcadores ISSR em amostras de plantas de diferentes regiões brasileiras, e avaliar o potencial destes marcadores moleculares para serem utilizados na análise filogenética do gênero *Cereus* no território brasileiro.

Materiais e métodos

1. *Germinação das sementes:* As sementes foram preparadas e inoculadas em meio de cultura, descrito por Knudson (1946). Elas foram obtidas a partir de frutos coletados nos diferentes estados do Brasil (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Piauí, Rondônia e Ceará).
2. *Extração de DNA:* Após a germinação (cerca de quatro meses depois), o DNA foi extraído de caules frescos (40-80 mg) das plântulas e também do ápice caulinar de cactos adultos de *Cereus* sp. As amostras foram preparadas individualmente seguindo o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999).
3. *Quantificação do DNA:* A quantificação do DNA extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose, seguindo o protocolo de Hoisington et al. (1994).
4. *Amplificação de DNA:* Com base em Domingues (2017), foram destacados 8 *primers* ISSR e aplicados nas populações. Toda a reação da PCR seguiu a descrita por Domingues (2017).
5. *Análise dos dados:* Trinta e uma plantas do gênero *Cereus* foram analisadas neste estudo (Tabela 1). As subpopulações foram agrupadas de acordo com a região (Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Norte/Nordeste). Os produtos amplificados por cada *primer* no gel (bandas) foram lidos como presentes (1) ou ausentes (0) e listados em uma tabela comparando o grau de polimorfismo de cada subpopulação com cada *primer* (Tabela 2).

Tabela 1 Amostras (A) de *Cereus* sp. analisadas de diferentes regiões do Brasil.

A	Localidade	A	Localidade	A	Localidade
1	Ourinhos, Rod. Orlando Quagliato Km 31 – **SÃO PAULO (SP)**	12	Coleta Bethania Azambuja – **SANTA CATARINA (SC)**	37	Areia Branca, Silvianópolis – **MINAS GERAIS (MG)**
2	Amparo, Jardim Residencial – **SÃO PAULO (SP)**	16	Ratones, Florianópolis – **SANTA CATARINA (SC)**	38 39	Moita 8, Itapemirim – **ESPÍRITO SANTO (ES)**
3	Itaipava – **RIO DE JANEIRO (RJ)**	18	Fazenda Nhumirim, Ponto 5 – **MATO GROSSO DO SUL (MS)**	41	João Caproni, Machado – **MINAS GERAIS (MG)**
4	Mata Da Barranca Do Rio Paranapanema – **PARANÁ (PR)**	23	Balão Da UFPI, Teresina – **PIAUÍ (PI)**	42	Moita 6, Itapemirim – **ESPÍRITO SANTO (ES)**
5	Rod. Miguel Julloran Km 442, Ourinhos – **SÃO PAULO (SP)**	24	Fazenda Nhumirim, Ponto 4 – **MATO GROSSO DO SUL (MS)**	44	Rua Jangada – **PARANÁ (PR)**
6	Planta 1 – **RIO GRANDE DO SUL (RS)**	25	Bairro Horto Florestal, Teresina – **PIAUÍ (PI)**	47	Matelândia – **PARANÁ (PR)**
8	Planta 3 (Monstruosos) – **RIO GRANDE DO SUL (RS)**	26	Renato II, Machado – **MINAS GERAIS (MG)**	48	Paraipaba – **CEARÁ (CE)**

9	Jurerê, Florianópolis – **SANTA CATARINA (SC)**	**27**	Fazenda Nhumirim, Ponto 6 – **MATO GROSSO DO SUL (MS)**	**49**	Buritis – **RONDÔNIA (RO)**
10	Ortigueira – **PARANÁ (PR)**	**28**	Fazenda Nhumirim, Ponto 2 – **MATO GROSSO DO SUL (MS)**	**51**	Paraipaba – **CEARÁ (CE)**
11	Jardim Floripa – **SANTA CATARINA (SC)**	**29**	BSM 18, Pimenteiras – **PIAUÍ (PI)**	**52**	Buritis – **RONDÔNIA (RO)**

Resultados e Discussão

Os *primers* ISSR-3 e ISSR-4 (Figura 1) amplificaram o maior número de segmentos de DNA (11-12 bandas), enquanto o *primer* ISSR-17898B amplificou o menor número de segmentos de DNA (5) por subpopulação. A região Sul apresentou a maior taxa de polimorfismo com 91%, seguida da região Sudeste 68%, região Norte/Nordeste 67% e região Centro-Oeste 61%. O polimorfismo diferencial de ISSR evidenciado em cada região brasileira é sugestivo de que os referidos marcadores moleculares são promissores para diferenciar a variabilidade genética dentro e entre as plantas das 11 subpopulações (estados) analisadas (RS, SC, PR, SP, RJ, ES, MG, MS, RO, PI, CE), e poderão ser usados para uma análise filogenética do gênero *Cereus* no território brasileiro.

Tabela 2 Polimorfismos dos marcadores ISSR nas amostras de plantas de *Cereus* das quatro regiões brasileiras, obtidos a partir do total de segmentos de DNA amplificados (NT) e do número de segmentos polimórficos (NP) com os oito *primers* ISSR analisados.

Primers	Sudeste		Sul		Centro-Oeste		Norte/Nordeste	
	NT	NP	NT	NP	NT	NP	NT	NP
ISSR-3	11	7	11	11	12	8	11	9
ISSR-4	11	6	11	8	9	6	12	4
ISSR-8	10	6	10	10	10	4	8	4
ISSR-12	10	7	6	6	7	6	7	6
ISSR-15	9	8	10	10	9	5	7	5
ISSR-17898A	7	4	5	4	4	2	8	7
ISSR-17898B	5	4	5	4	6	3	2	2
ISSR-825	10	8	10	9	10	7	9	6
TOTAL	73	50	68	62	67	41	64	43
Polimorfismo	68%		91%		61%		67%	

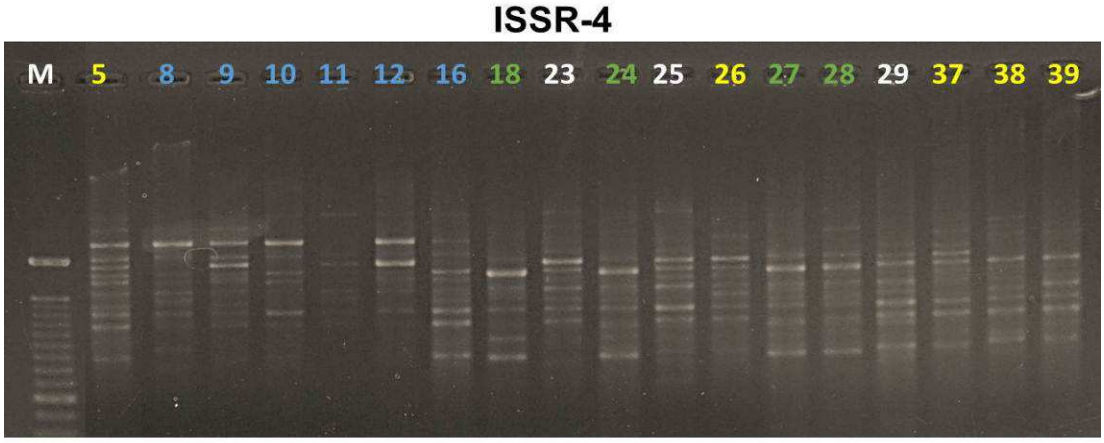

Figura 1 – Visualização em gel de agarose de uma parte das amostras de *Cereus* sp: 5, 26, 37, 38, 39 (Sudeste), 8, 9, 10, 11, 12, 16 (Sul), 18, 24, 27, 28 (Centro-Oeste) e 23, 25, 29 (Norte/Nordeste), amplificadas com o *primer* ISSR-4.

Conclusões

Os marcadores ISSR são ferramentas adequadas para a detecção de polimorfismo do DNA em plantas do gênero *Cereus*, e promissores para serem usados na análise filogenética do gênero *Cereus* no território brasileiro.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná - Fundação Araucária (Processo 5560/ 2017) pelo suporte financeiro para a realização deste estudo.

Referências

ALJANABI, S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. **An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-freesugarcane DNA**. Nucleic Acids Research, v. 17, p. 1–8, 1999.

DOMINGUES, S. D.; NEVES, A. F.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. **Seleção de *primers* para análise de *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) em *Cereus* sp. (Cactaceae)**. Revista Biotecnologia & Ciência, v.6, n.2, p. 46-54, 2017.

HUNT, D.; TAYLOR, N.P.E.; CHARLES, G. **The New Cactus Lexicon**. UK: DH books, 2006.

KNUDSON, L. **A new nutrient solution for germination of orchid seed**. American Orchid Society Bulletin, v.15, p. 214-217, 1946.

RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccínea* Lindl. eC. Mantiqueirae (Flowie) Van der Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR.** Dissertação de Mestrado, 81p. ESALQ/USP. Piracicaba, 2010.