

CIRCULAR TÉCNICA

n. 444 - julho 2026

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



Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Governo de Minas Gerais

Otimização de temperaturas de anelamento para *primers* ISSR em acessos de mangarito¹

Luciana Cardoso Nogueira Londe², Maria Fernanda Leal Lacerda³, Débora Ferreira de Souza⁴,
Demerson Arruda Sanglard⁵, Izabela Cristina Pires Gomes⁶,
Joana D'Ark Nunes da Silva Lima⁷, Emerson Brito Ribeiro⁸

INTRODUÇÃO

O mangarito (*Xanthosoma riedelianum* Schott) é uma Planta Alimentícia Não Convencional (PANC), pertencente à família Araceae (Kinupp; Lorenzi, 2014), com ocorrência em regiões tropicais que se estendem do México ao Brasil. Esta espécie de valor histórico e cultural é tradicionalmente cultivada para o consumo de suas folhas e rizomas, representando grande importância para as populações rurais brasileiras. Entretanto, a redução de seu uso, associada principalmente à urbanização e à substituição por outras culturas, contribuiu para sua desvalorização (Madeira *et al.*, 2015).

O mangarito apresenta grande potencial agromônico e nutricional. Segundo Madeira *et al.* (2015), os rizomas apresentam elevado teor energético, com proporção de matéria seca (MS) entre 17% e 20% e conteúdo proteico variando de 3,0% a 3,5%. O mangarito também se destaca pelo baixo custo de produção e pelo potencial de geração de renda, evidenciando, assim, sua importância para a agricultura familiar.

Apesar de suas características promissoras, estudos sobre a espécie ainda são incipientes, principalmente os relacionados com a caracterização genética. Nesse contexto, ferramentas moleculares podem contribuir na geração de informações e subsidiar futuras estratégias de conservação e utilização desse recurso genético.

Os marcadores moleculares Inter Repetições de Sequências Simples – Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), dentre as ferramentas utilizadas para caracterização genética de espécies vegetais, têm sido amplamente empregados por sua facilidade de aplicação, baixo custo e capacidade de detectar polimorfismos em diferentes regiões do genoma, mesmo em espécies com poucas informações genéticas (Ng; Tan, 2015). Entretanto, é necessário padronizar as condições da Reação em Cadeia da Polimerase – Polymerase Chain Reaction (PCR), especialmente para identificar a temperatura de anelamento dos *primers*, otimizando, assim, tempo e recursos da pesquisa.

¹Circular Técnica produzida pela EPAMIG Norte - CEGR (38) 2040-0053, cegr@epamig.br.

²Bióloga, D.Sc., Pesq. EPAMIG Norte - CEGR/Bolsista BIPDT-A FAPEMIG, Nova Porteirinha, MG, luciana@epamig.br.

³Engenheira Florestal, Mestranda Ciências Florestais UFMG - ICA, Bolsista BDCTI-II FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, lacerda.fernanda@hotmail.com.

⁴Engenheira-agrônoma, Mestranda Produção Vegetal UNIMONTES, Campus Janaúba, Bolsista BDCTI-III FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, deboraagrofs@gmail.com.

⁵Engenheiro-agrônomo, D.Sc., Prof. Associado UFMG - ICA, Montes Claros, MG, demerson.ufmg@gmail.com.

⁶Engenheira-agrônoma, Doutoranda Produção Vegetal UNIMONTES, Campus Janaúba, Bolsista BCTI-I FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, belapgomes@yahoo.com.br.

⁷Engenheira-agrônoma, Bolsista CNPq/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, joanadark93_@hotmail.com.

⁸Técnico Química, Mestrando Biotecnologia UNIMONTES, Campus Montes Claros, EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, emersondireito1@hotmail.com.

Esta Circular Técnica tem como objetivo determinar as temperaturas de anelamento de *primers* ISSR em acessos de mangarito, visando subsidiar estudos futuros de caracterização molecular da espécie.

CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (Labbiotec), da EPAMIG Norte - Campo Experimental do Grotuba (CEGR), Nova Porteirinha, MG, e no Laboratório de Biotecnologia, do Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias (CPCA), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), campus Montes Claros, MG.

Foram testados 36 *primers* ISSR da coleção oligonucleotídica desenvolvida pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canadá). Testes de gradiente com os respectivos *primers* foram desenvolvidos para determinação das condições ideais de anelamento do DNA. Amostras de tecido foliar coletadas foram armazenadas em freezer a -20 °C para conservação do material. O DNA dos acessos foi extraído seguindo o protocolo Doyle e Doyle (1990) com adaptações e, em seguida, realizou-se a quantificação em espectrofotômetro (TECAN, modelo Infinite M Plex). As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 25 µL (12,4 µL de H₂O ultrapura; 3,5 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) 2,8 mM; 2,5 µL de Tris/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 *Taq* Polimerase 1,0 U/µL e 3,0 µL de DNA 10 ng/µL).

Para determinação das temperaturas de anelamento, o termociclador (Eppendorf, modelo Nexus Gradient) foi programado na função gradiente, no intervalo de 45 °C a 65 °C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,4% em tampão SB 1x; os géis foram corados com corante de carregamento tipo IV e GelRed®; e os fragmentos visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo fotodocumentador (Loccus Biotecnologia, modelo L-PIX).

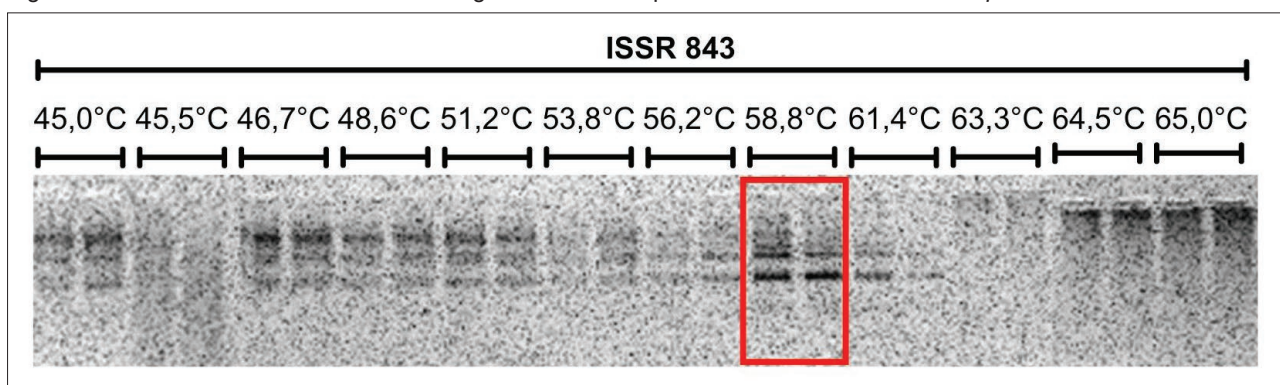
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a extração e quantificação, o DNA foi padronizado na concentração de 10 ng/µL, permitindo, assim, a realização dos ensaios de amplificação. A eficiência das reações nas temperaturas de 45 °C a 65 °C foi analisada por meio da intensidade e nitidez das bandas obtidas em gel de agarose (Fig. 1).

Observou-se variação do desempenho dos *primers* em função das temperaturas utilizadas. Dos 36 *primers* avaliados, dez apresentaram perfis de amplificação (Tabela 1), correspondendo a 27,8% do total analisado, o que evidencia a importância da otimização prévia das condições de PCR.

Os resultados obtidos demonstram a necessidade de testes preliminares de gradiente antes da aplicação dos marcadores na população, visto que a resposta dos *primers* precisa de uma temperatura específica para anelamento dos fragmentos de DNA.

Figura 1 - Corrida eletroforética do teste de gradiente de temperatura de anelamento com o *primer* 843



Fonte: Elaboração dos autores.

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

Tabela 1 - Resultado da temperatura de anelamento dos *primers* ISSR⁽¹⁾

<i>Primer</i>	Código do primer (Sequência 5'→3')	Temperatura de anelamento (°C)
806	TAT ATA TAT ATA TAT AG	56
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	54
813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	56
843	CTC TCT CTC TCT CTC TRA	59
848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	59
851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	65
857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	65
878	GGA TGG ATG GAT GGA T	46
880	GGA GAG GAG AGG AGA	51
884	HBH AGA GAG AGA GAG AG	49

Fonte: Elaboração dos autores.

Nota: R - (A, G); Y - (C, T); B - (C, G, T) (ou seja, qualquer base exceto A); H - (A, C, T) (ou seja, qualquer base exceto G).

(1) Oligonucleotídeos (*primers*) Inter Repetições de Sequências Simples – Inter Simple Sequence Repeat (ISSR).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização prévia dos testes de gradientes possibilitou a seleção de dez *primers* ISSR e a definição de temperaturas ideais de anelamento para amplificação do DNA em acessos de mangarito, viabilizando a otimização do uso de reagentes, tempo e recursos financeiros. Os resultados obtidos constituem base metodológica que pode subsidiar estudos futuros de caracterização molecular e conservação da espécie.

AGRADECIMENTO

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

REFERÊNCIAS

- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- KINUPP, V.F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil**: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014. 768p.
- MADEIRA, N.R. *et al.* Mangarito: sabor de tradição. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.33, n.3, jul./set. 2015. Artigo da capa. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-053620150000300023>.
- NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right? **ASM Science Journal**, v.9, n.1, p.30-39, 2015.