



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76  
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

## **XXVII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMIC - 2023**

### **Padronização das condições de amplificação de marcadores SSR em *Physalis angulata* L.**

**Francisco Gregório do Nascimento Neto<sup>1</sup>; Luiz Cláudio Costa Silva<sup>2</sup>; Erison  
Martins Souza<sup>3</sup> e Adriana Rodrigues Passos<sup>4</sup>**

1. PVIC, graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [francisco.gregorio668@gmail.com](mailto:francisco.gregorio668@gmail.com)
2. Luiz Cláudio Costa Silva, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [lccsilva@uefs.br](mailto:lccsilva@uefs.br)
3. Participante do projeto, doutorando em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [erisonms@hotmail.com](mailto:erisonms@hotmail.com)
4. Coorientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [adrianarpassos@yahoo.com.br](mailto:adrianarpassos@yahoo.com.br)

**PALAVRAS-CHAVE:** Melhoramento; Camapu; Diversidade.

## **INTRODUÇÃO**

O gênero *Physalis* possui na América do Sul seu principal centro de diversidade e endemismo (SOUZA e LORENZI, 2012). O gênero é bastante distribuído em todas as regiões do Brasil, ocorrendo nos domínios fitogeográficos Amazonas, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. A *Physalis* é pouco cultivada no Brasil, apesar de seu fruto ser rico em nutrientes muito importantes para a alimentação humana, como ferro, fósforo, vitamina A e C, e substâncias como carotenoides e flavonoides, que apresentam ação antioxidante contra o envelhecimento, além de ter lugar de destaque pela presença de substâncias às quais possuem várias atividades farmacológicas, como os metabólitos polioxigenados e vitaesteroides (TOMASSINI et al., 2000).

Os estudos de diversidade genética entre populações ou entre indivíduos são relevantes em programas de melhoramento genéticos que envolvem hibridações, uma vez que tais estudos auxiliam na identificação de progenitores que possibilitem a formação de progênes com maior efeito heterótico, bem como com características superiores (RÊGO et al., 2010). Os marcadores moleculares são segmentos de DNA que estão localizados em uma posição específica do cromossomo e tem como característica a habilidade em detectar a variação natural na sequência de DNA entre esses indivíduos. São utilizados para estudar a divergência genética entre as populações (SCHULMANN, 2007), dentre diversos outros usos.

A padronização das condições de amplificação de marcadores SSR é uma das primeiras etapas para se realizar estudos com marcadores SSR. Determinar as melhores temperaturas de anelamento, bem como ajustar as concentrações dos reagentes que melhoram a qualidade de visualização dos produtos de amplificação, são ações necessárias para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis, conferindo maior validade aos estudos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é padronizar as condições de amplificação de 15 marcadores SSR para estudos genéticos na espécie *P. angulata*.

## **MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA**

### **Extração de DNA**

As amostras foliares de cada acesso de *P. angulata* foram submetidas ao protocolo de extração de DNA de Doyle e Doyle (1990), com modificações. As amostras foliares foram congeladas na presença de nitrogênio líquido, maceradas, agitadas e transferidas para microtubos com 750 µL de tampão de extração. Este tampão foi composto por CTAB 2% (m/v), NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris HCl 100 mM (pH=8,0), PVP 2% e β-mercaptoetanol 0,2%. As amostras foram deixadas em banho-maria por no mínimo 30 min, em temperatura de 65 °C, sendo agitadas de 10 em 10 min. Após serem retiradas do banho-maria, foram adicionadas 750 µL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitadas por cerca de 10 min e centrifugadas a 14.000 rpm por 6 min. Os sobrenadantes foram removidos e transferidos para novos microtubos, e em seguida adicionados 600-700 µL de isopropanol gelado. O material foi precipitado em freezer a -75 °C por cerca de duas horas, e centrifugado a 14.000 rpm por 6 min. O sobrenadante foi descartado, e logo adicionados cerca de 400 µL de etanol 70% ao pellet.

Após leve agitação, os microtubos passaram novamente para serem centrifugados a 14.000 rpm por 6 min. O sobrenadante foi descartado e a etapa de lavagem foi repetida. Após a secagem das amostras em capela de exaustão, foram adicionados 300 µL de solução, contendo Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM e 40 µg/mL da enzima RNase. Após permanecerem em banho-maria a 37 °C por 30 min, foram adicionados 30 µL de NaCl 5 M e 220 µL de isopropanol gelado, e precipitadas a cerca de -5 °C overnight. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 6 min, o sobrenadante foi removido e adicionados 400 µL de etanol 70%. Após leve agitação, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido, e foram adicionados 400 µL de etanol 95%. Uma última centrifugação foi realizada, o sobrenadante foi descartado, e as amostras foram secadas em capela de exaustão. Por fim, foram adicionados 100 µL de água ultra pura e as amostras sucederam-se deixadas em banho-maria a 37 °C por 30 min, e acondicionadas em freezer a -20 °C.

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000c, Uniscience, e sua qualidade foi verificada em gel de agarose 0,8%, corado com corante do tipo GelRed, submetido a uma tensão de 120 V por cerca de 1 h. As amostras foram diluídas em soluções de trabalho, concentração de 10 ng/µL.

### **Padronização das condições de PCR**

Foram selecionados 9 primers, desenvolvidos por Simbaqueba et al. (2011). Para a determinação da melhor temperatura de anelamento, foi realizada a PCR do tipo gradiente, com variação de temperatura entre 50 e 60 °C. As reações de amplificação foram realizadas em volume de 15 µL, contendo inicialmente 30 ng de DNA, tampão-PCR 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de cada desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,67 µM de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase. A reação de PCR foi programada para uma etapa inicial a 94 °C por 4 min, 35 ciclos compostos por três etapas (94 °C por 40 seg, T<sub>m</sub> por 40 seg e 72 °C por 1 min), seguidos por uma etapa final a 72 °C por 7 min.

Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 10% em tampão de corrida TAE 1X a 130 V por 4h.

Após isso, inicialmente, o gel é submetido à solução fixadora (10% em etanol e 0,5% de ácido acético glacial) sob agitação por 10 minutos. Para visualização dos fragmentos, foi utilizado o protocolo de coloração com prata sob agitação por 10 min. Em seguida, a solução de nitrato de prata foi descartada, o gel é lavado com água purificada, e é adicionada a solução reveladora (NaOH 0,75 M e formaldeído 0,6%) sob agitação.

Quando os fragmentos tornaram-se visíveis, foi adicionada solução de etanol 60% para interromper a reação. Por fim, os géis foram fotografados para análise. As determinações do tamanho dos fragmentos gerados foram feitas através da aplicação de um marcador de 100 pares de base, aplicado nas duas extremidades do gel, junto com as outras amostras. A temperatura ideal de anelamento foi aquela que produziu as bandas mais fortes e nítidas, e com a menor presença de bandas inespecíficas.

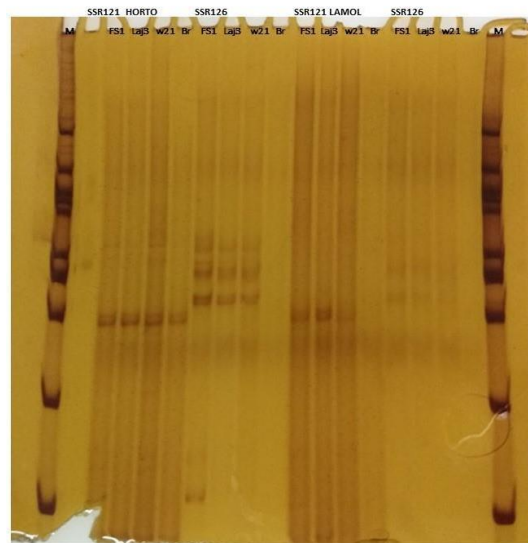
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi possível visualizar as bandas para o marcador SSR138, assim foi necessário reduzir a temperatura de anelamento para poder amplificar. Na temperatura de 50 °C, o primer SSR18 apresentou duas bandas de mesmo padrão. Já o marcador SSR20 obteve bandas muito fracas. Os primers SSR138 e SSR123 mostraram muitas bandas inespecíficas, assim foi feito um gradiente com temperaturas mais altas (50, 52, 54 e 56 °C), afim de aumentar a especificidade do primer com a sequência de DNA de interesse no intuito de diminuir as bandas inespecíficas (Tabela 01).

O SSR 18 amplificou em quatro acessos na temperatura de 50 °C, logo foi testado em todos, no entanto não ocorreu a amplificação nas demais amostras, assim sendo, foi preciso utilizar o gradiente de temperaturas, o mesmo usado nos primers SSR138 e SSR123. Nos primers SSR18, SSR54 e SSR123 foi utilizado quatro acessos e um gradiente de temperatura, em seguida observou-se que houve amplificação das amostras utilizadas. Foi feita a repetibilidade do primer SSR123 e houve a amplificação, mostrando bandas visíveis em uma temperatura de 54 °C. Foram testados os outros primers SSR1, SSR2, SSR121 e SSR126, com um gradiente de temperatura em quatro acessos, logo quando avaliados não se percebeu amplificação. A amplificação dos primers SSR138, SSR1, SSR2, SSR121 e SSR126 não amplificaram por problemas com os reagentes, tempo para encontrar as temperaturas de anelamento e por em alguns casos o primer se auto pareava.

Tabela 01- Primers e as respectivas temperaturas ideais de anelamento em *P. angulata*.

Primer	Sequência	Temperatura ideal	Amplificação
SSR138	TCCGATCACTACTTCAGCACG		Não amplificou
SSR18	CAGAGTGATTACCTTGGACGAA	50 e 54 °C	Amplificou
SSR123	TCAGTGGAGCGCGTATATCT	54 °C	Amplificou
SSR20	GCACATCACATAAAGTATCTTTCTCA	54 °C	Amplificou
SSR54	CGGCTGGTATGCTTACAAAGAT	50, 52, 54 e 56 °C	Amplificou
SSR1	AGAGGACTCCATTTGTTTGCT		Não amplificou
SSR2	CATTGGGTTTCGCATCCAT		Não amplificou
SSR121	AGCAACCTCCCAATCAGCTA		Não amplificou
SSR126	TCCAAAAGAAAACAAAACACT		Não amplificou



**Figura 1:** Resultado da amplificação dos primers SSR121, SSR126 e SSR121. Todos os marcadores apresentaram bandas fracas, ou seja, baixa amplificação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível identificar a temperatura ideal de anelamento dos marcadores SSR18, SSR123, SSR20 e SSR54. Novos estudos são necessários para padronizar as condições de anelamento dos demais marcadores, para posterior genotipagem de todos acessos da coleção de germoplasma do LAGEM.

## REFERÊNCIAS

- DOYLE, J.J.; J.L. DOYLE. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12:13–15.
- RÊGO E.R. et al. 2010. Diversidade entre linhagens e importância de caracteres relacionados à longevidade em vasos de linhagens de pimenteiras ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, 16:165-168.
- SCHULMANN, A. H. 2007. Molecular markers to assess genetic diversity. **Euphytica**, v. 158 (3), p. 313-321.
- SIMBAQUEBA, J.; et al. 2011. Development and Characterization of Microsatellite Markers for the Cape Gooseberry *Physalis peruviana*. **PLoS One** 6:e26719.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. 2012. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3ª ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, p. 768.
- TOMASSINI T. C. B, et al. 2000. Gênero *Physalis*: uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova** 23: p. 47-57.