



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

XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2024**

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SSR POLIMÓRFICOS EM *Physalis angulata* L.

Francisco Gregório do Nascimento Neto¹; Erison Martins de Souza²; Luiz Cláudio Costa Silva³

1. Bolsista – Modalidade Bolsa/PVIC, Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, francisco.gregorio668@gmail.com
2. Doutorando em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, erisonms@hotmail.com
2. Luiz Cláudio Costa Silva, Departamento de Ciências Biológicas (DCBIO), Universidade Estadual de Feira de Santana, lccsilva@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Camapu; Marcadores moleculares; Melhoramento genético vegetal.

INTRODUÇÃO

Physalis angulata L., comumente conhecida como “camapu” ou “juá de capote”, é uma planta herbácea pertencente à família Solanaceae (SANTIAGO et al., 2019). Ocorre em diversas regiões do Brasil, possuindo pouca exploração econômica. No entanto, é detentora de grande potencial farmacêutico, devido à presença das fisalinas, assim como potencial alimentício para a produção de doces, geleias, fermentados alcoólicos e acéticos, ganhando espaço na comercialização no ramo das pequenas frutas (RAMOS, 2019).

Os marcadores moleculares são sequência de DNA que podem ser utilizadas para diferenciar dois indivíduos. Marcadores microssatélites (ou SSR) apresentam vantagens como a necessidade de pouca quantidade de DNA, herança codominante, alta informação, natureza multialélica. Além disso, são reprodutíveis a nível experimental e transferíveis entre espécies relacionadas (Souza, 2015). Portanto o objetivo deste trabalho é identificar marcadores SSR polimórficos em acessos de *P. angulata* para futuros estudos de diversidade genética.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Extração de DNA

As amostras foliares 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, serão

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 foram adicionados cerca de 400 µL de etanol 70% ao pellet.

Após leve agitação, os microtubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 6 min. O sobrenadante foi descartado e a etapa de lavagem será 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 será removido e serão 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 foram 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.

Identificação de primers polimórficos

As amplificações por PCR foram realizadas com as seguintes condições: 1X PCR tampão: 0,45 mM de MgCl₂; 0,2 µM de cada dNTPs; 1 µM de cada primer; 0,5 U de Taq polimerase e 30 ng de DNA genômico, em um volume de reação de 15 µL. A reação foi configurada do seguinte modo: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C para os 30s, T_m de anelamento de 50 °C por 45s e extensão a 72 °C por 1 min; e uma extensão final a 72°C por 10 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. Para visualização dos fragmentos, foi utilizado o protocolo de coloração com prata. Inicialmente, o gel foi submetido à solução fixadora (10% em etanol e 0,5% de ácido acético glacial) sob agitação por 10 min. Em seguida, a solução de nitrato de prata foi descartada, o gel foi lavado com água purificada, e foi adicionada a solução lavadora (NaOH 0,75 M e formaldeído 0,6%) sob agitação. Quando os fragmentos tornarem-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 50 pares de base, aplicado nas duas extremidades do gel, junto com as demais amostras.

Para a identificação dos marcadores polimórficos foram feitas análises nos géis, observando os tamanhos diferentes dos fragmentos entre os respectivos acessos: W21, Candeias, Lajedinho, Serra preta 1, Piauí, Feira de Santana, Rio de Janeiro, Anguera, W01, Itapetim e Serra Preta 2.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Entre os marcadores analisados na Tabela 1, SSR 1, SSR 2, SSR 13, SSR 18, SSR 126, SSR 9, SSR 107 e SSR 121 apresentaram polimorfismo, sendo os marcadores SSR 121 e SSR 18 monomórficos, identificando apenas 1 alelo. Para o número de alelos na Figura 1, foram identificados 2 alelos nos primers que mostraram polimorfismo, sendo alelos em homozigose. Em contrapartida foi identificado no primer SSR 9 alelos em heterozigose. A presença de 2 alelos demonstra o polimorfismo dos primers. Entretanto, por se considerar um número baixo de alelos, demonstra uma variabilidade genética reduzida entre os acessos que foram genotipados.

Tabela 01- Identificação de marcadores SSR polimórficos em *Physalis angulata*.

| MARCADOR | TAMANHO ESPERADO DO MARCADOR (pb) | POLIMORFISMO | Nº DE ALELOS |
|----------|---|--------------|-----------------|
| SSR 121 | 189 | MONOMÓRFICO | 1 |
| SSR 18 | 179 | MONOMÓRFICO | 1 |
| SSR 1 | 206 | POLIMÓRFICO | 2 |
| SSR 2 | 237 | POLIMÓRFICO | 2 |
| SSR 9 | 193 | POLIMÓRFICO | 2 |
| SSR 13 | 190 | POLIMÓRFICO | 2 |
| SSR 20 | 270 | POLIMÓRFICO | 2 |
| SSR 107 | 206 | POLIMÓRFICO | 2 |
| SSR 126 | 202 | POLIMÓRFICO | 2 |
| SSR 54 | 197 | - | - |
| SSR 77 | 216 | - | - |
| SSR 123 | 216 | - | - |
| SSR 146 | 187 | - | - |
| SSR 68 | 187 | - | - |
| SSR 138 | 138 | - | - |

A maioria dos alelos identificados se encontram em homozigose, o que é indicado para trabalhos de melhoramento, no intuito de explorar o vigor híbrido e heterobeltiose, para o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e resistentes a ataques de patógenos. Embora o efeito da endogamia, pode gerar atributos negativos em futuros cruzamentos. Outro aspecto, seria a presença de alelos homozigotos o que evidencia uma diversidade genética reduzida, o que auxilia no processo de formação de híbridos. No trabalho de Sadyah et al 2021, foram identificados 16 marcadores, onde 15 foram polimórficos e 1 monomórfico, demonstrando alta diversidade genética, isso devido a

utilização de espécies diferentes, o que mostrou alta diversidade entre as espécies do gênero *Physalis*. Já no trabalho atual, mostrou uma baixa diversidade genética, isso pode ser derivado da utilização de apenas uma espécie. Ademais, Garzón-Martínez et al. (2015) estudaram a diversidade genética e a estrutura populacional de 47 acessos de *P. peruviana* provenientes da coleção in vitro da Corporación Colombiana de Investigación Agrícola (CORPOICA), e analisaram 642 marcadores SNP e 24 loci InDels (inserção ou deleção). Concluíram que a diversidade genética estava relacionada com o estado de cultivo (silvestre ou cultivado) e não com a origem geográfica. Em consonância, como ambos trabalhos tiveram estados distintos de cultivo, logo, a variância dessa diversidade pode ser derivada dessas casualidades.

Figura 1 – Avaliação do polimorfismo entre os acessos de *Physalis angulata* L. usando os marcadores SSR13 e SSR18.

Foram identificados 8 marcadores polimórficos para acessos de *Physalis angulata*. Foi observada a presença de diversidade entre os acessos, sendo evidenciado pelo número de alelos. No entanto, essa diversidade genética não apresentou valores elevados, pois entre a maioria dos marcadores utilizados, foram identificados apenas dois alelos, e em homozigose. Os resultados poderão contribuir para futuros trabalhos de melhoramento e desenvolvimento de cultivares.

- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. ***Focus***, v. 12, p. 13-15, 1990.
- GARZÓN-MARTÍNEZ, G. A. et al. Genetic diversity and population structure in *Physalis peruviana* and related taxa based on InDels and SNPs derived from COSII and IRG markers. ***Plant Gene***, v. 4, p. 29-37, 2015.
- RAMOS, C. A. S. ***Maturidade fisiológica e dessecação de sementes de Physalis angulata L. 2019. 91 f.*** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2019.
- SADIYAH, H. et al. Genetic diversity and relationship of husk tomato (*Physalis* spp.) from East Java Province revealed by SSR markers. ***Biodiversitas***, v. 22, p. 184–192, 2021.
- SANTIAGO, W. R. et al. Physiological maturity of *Physalis angulata* L. seeds. ***Revista Ciência Agronômica***, 50: 431-438, 2019a.
- SOUZA, D. ***Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Campinas***, v. 17, n. 3, p. 495-503, jul./set. 2015.