

## ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA ESPÉCIE *TROPAEOLUM PENTAPHYLLUM* COM MARCADOR ISSR

### Analysis of genetic diversity of the species *Tropaeolum Pentaphyllum* with ISSR marker

Sabrina Kuhn

[sabrinakuhn@alunos.utfpr.edu.br](mailto:sabrinakuhn@alunos.utfpr.edu.br)

Universidade Federal do Paraná,  
Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Betty Cristiane Kuhn

[bettykuhn@utfpr.edu.br](mailto:bettykuhn@utfpr.edu.br)

Universidade Federal do Paraná,  
Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

#### RESUMO

A *Tropaeolum Pentaphyllum* conhecida como batata-crem, é encontrada na região sul do Brasil, se destaca em sua principal aplicação na culinária local, ademais possui propriedades antibacterianas, antifúngicas e ainda auxilia na redução do colesterol, está entre as espécies vulneráveis a extinção e possui dados genéticos escassos. O presente trabalho teve como objetivo padronizar as reações de PCR para o marcador molecular ISSR. O processo iniciou-se com amostras provenientes do estado do Rio Grande do Sul, sendo das cidades de Ipê, Frederico Westphalen e Vacarias. Vários ensaios foram realizados, desde a quantificação quanto o anelamento dos primers e concentrações de  $MgCl_2$ . Contudo pode-se verificar que os melhores primers até o momento foram ISSR2, ISSR4, ISSR6 ISSR8 E CCA. Contudo se faz necessário mais experimentos para melhorar e refinar os resultados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Batata-crem. Marcador ISSR. PCR.

#### ABSTRACT

*Tropaeolum Pentaphyllum*, known as potato-crem, is found in the southern region of Brazil, stands out in its main local culinary application, in addition it has antibacterial, antifungal and cholesterol reduction benefits, is among the species vulnerable to extinction and has data genetic diseases. The present work had as objective to standardize the reactions of PCR for molecular marker ISSR. The process began with samples from the state of Rio Grande do Sul, from the cities of Ipê, Frederico Westphalen and Vacarias. Several assays were performed, from quantification to primer annealing and  $MgCl_2$  concentrations. However, it can be seen that the best primers to date have been ISSR2, ISSR4, ISSR6 ISSR8, and CCA. Further experiments are needed to improve and refine the results.

**KEYWORDS:** Cream potato. ISSR Scoreboard. PCR.

**Recebido:** 04 set 2018

**Aprovado:** 04 out 2018

#### Direito autoral:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

A *Tropaeolum pentaphyllum*, possui o nome popular de batata-crem, é uma planta trepadeira, encontrada no Brasil, principalmente na região sul nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, onde sua principal forma de cultivo é via tubérculos e não semente, o que causa em teoria um declínio na variabilidade genética, colocando-a enquadrada na categoria vulnerável da lista de espécies ameaçadas de extinção (KINUPP, 2007. SANTOS et al, 2013. ROGALSKI et al, 2013). A principal aplicabilidade da mesma vem da sua utilização cultural na culinária, onde se produzem conservas de seus tubérculos apreciadas como condimento (KINUPP, 2007. SANTOS et al, 2013). Ademais pesquisas recentes encontraram evidências de que a batata-crem possui atividade antimicrobiana, antifúngica e pode auxiliar na redução do colesterol (SANTOS et al, 2013).

Devido as suas características morfológicas e fisiológicas tem sido utilizada como planta ornamental em jardins, entre outros, atendendo propostas peculiares de seus consumidores (KINUPP, 2007. PRESTES, 2015). Além de que através de pesquisas na literatura é possível constatar que se trata de uma espécie pouco estudada possuindo dados genéticos escassos, verifica-se a disposição de somente quatro sequências de nucleotídeos no GenBank sobre os números de acesso AF254035.1, AF254036.1, AF254037.1, DQ007274.1 (ANDERSSON et al, 2000). Como meio de caracterizar e detectar variações no genoma são aplicados na atualidade marcadores moleculares que correspondem à amplificação da análise genética das plantas (CAIXETA et al, 2009).

Dentre as variedades de marcadores moleculares encontra-se o ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), que é indicado para indivíduos com regiões genômicas de 100 a 3.000pb, utilizados para amplificar sequências via PCR (Polymerase Chain Reaction), sendo esses genomas flanqueados por sequências microssatélites, que obtém como benefício um alto grau de polimorfismos salientados por esse marcador, sucedendo em uma melhor evidência de variedade e cultivares através dessas técnicas (FALEIRO et al, 2001. FALEIRO, 2007. SERENO et al, 2006).

## METODOLOGIA

Amostras de batata-crem provenientes do Rio Grande do Sul, respectivamente das cidades de Frederico Westphalen, Ipê e Vacaria são cultivadas na fazenda experimental do campus da UTFPR. Amostras foram coletadas no mês de setembro, sendo feita a extração do DNA com uma pequena amostra, e devidamente armazenado e identificado o restante do material vegetal para demais procedimentos, onde foi feita a liofilização e colocadas no freezer.

## EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE TECIDOS VEGETAIS

O procedimento de extração e purificação da *T. pentaphyllum* necessitou primeiro de uma lavagem de cada uma das folhas extraídas. Depois, com auxílio de um almofariz e um pistilo, as folhas foram maceradas e foi adicionado 1000 µL de CellLysisSolution e homogeneizado a solução, que recebera adicionalmente mais 1000 µL da mesma solução. Logo após foi retirado 300 µL da solução e adicionado em um eppendorf de 2000 µL e adicionado mais 500 µL de



celllysisolution em cada. Logo após foram adicionados 600 µL de NucliLysisSolution em cada eppendorf e levado ao vortex por cerca de 3 segundos para homogeneizar, seguido de uma adição de 5 µL de proteinase K 20 mg/mL e levado para banho maria a 65 °C por cerca de 15 minutos, passados esse tempo, foram adicionados 3 µL de RNaseSolution e incubados novamente no banho maria em temperatura de 37 °C por 15 minutos, depois foi retirado do local e esperado 5 minutos para atingir temperatura ambiente. Após este processo, foram adicionados 200 µL de ProteinPrecipitationSolution e levado a vortex por 20 segundos para homogeneização, seguido logo após para a centrifuga por 7 minutos a 15000 rpm para a precipitação e formação dos pellets. Cuidadosamente, foi removido cerca de 200 µL do sobrenadante contendo o DNA, deixando o pellet de proteína e transferindo para um tubo limpo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente, que polidamente foi invertido até a formação de uma massa visível e depois foi levado a centrifuga a 15000 rpm por 1 minuto, que depois foi devidamente descartado o sobrenadante e adicionado 600 µL de etanol absoluto e invertido o tubo para lavar o DNA e levado para a centrifuga a 15000 rpm por 1 minuto. Logo após foi retirado o etanol e deixado invertido o tubo por cerca de 15 minutos e depois foi adicionado 100 µL de DNA e incubado a 65 °C por cerca de 1 hora e depois fora estocado em um freezer para evitar a perca do material.

#### QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A quantificação de DNA fundamentou-se na preparação do gel de agarose a 2%, onde foram pesados em uma balança analítica 2,04 g de agarose para 170 mL de água destilada, que depois foram colocados em erlenmeyer e levados para o micro-ondas por cerca de 2 minutos para homogeneização da solução, logo após fora retirado e colocado em uma cuba com um pente alinhado para a formação dos poços amostrais, além disso, foram preparados 200 mL de tampão TBE 1X. Foram escolhidas amostras da Frederico Westphalen (FW), Ipê (I) e Vacaria (V), cerca de 5 µL de DNA de cada uma e colocados em um eppendorf, onde foram adicionados logo em seguida 2 µL de azul de metileno e gel Red e misturados. Com auxílio de uma micropipeta, as soluções de cada uma das amostras foram colocadas em cada poço amostral e foi ligado a fonte elétrica a 80 Volts e corrente de 30 mA por cerca de 1 hora. Após o tempo transcorrido, o gel foi levado a transluminador e fotografado. Os Primers testados para a marcação e amplificação foram respectivamente os da tabela 1.

Tabela 1. Relação de primers ISSR utilizados.

Primer	Sequência	Primer	Sequência
ISSR1	(AC) 8TT	ISSR9	(TG) 8GG
ISSR2	(AC) 8AG	ISSR10	(CTC) 6
SSR5	(AC) 8AA	ISSR11	(AC) 8CA
ISSR6	(AG) 8TA	ISSR12	(AG) 8GCT
ISSR7	(AG) 8GA	ISSR13	(AC) 8CC
ISSR8	(ACTC) 4	ISSR15	(AC) 8GA

### PCRS

Os experimentos em relação a PCR consistiram na preparação de um mix de solução padrão, modificado de acordo com a quantidade de amostras e primers utilizados para o experimento, para o preparo de 1 amostra x 1 primer, fora utilizado para a formação do Mix, 2 µL de buffer, 0,8 µL de dNTP, 1,6 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µL de Taq polimerase, 12,2 de água miliQ, 1,2 µL dos primers ISSR e 2 µL de DNA de cada uma das amostras. A configuração do termociclador resumiu-se em desnaturação a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, com anelamento a 55 °C, alongamento a 72 °C por 1 minuto e extensão a 72°C por cerca de 5 minutos.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir dos géis de quantificação pode-se perceber que os métodos de extração aplicados foram eficientes como mostra a figura 1.

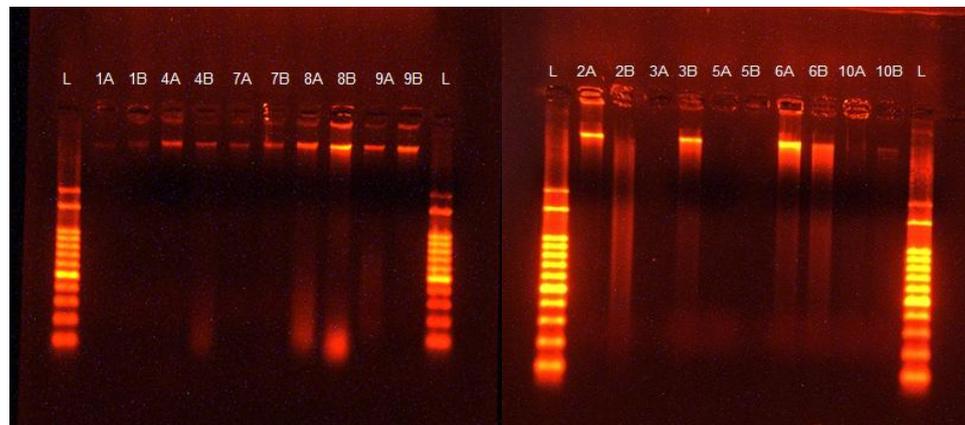


Figura1. Gel de quantificação da extração do DNA das amostras.

Um dos primeiros experimentos realizados, foi testada a utilização de um Master mix pronto com os primers ISSR2 e ISSR4, como pode-se notar pela figura 2, manteve-se a preparação de máster mix, pois o gel sem o máster mix pronto apresentou melhor resultado.



Figura 2. Gel teste na utilização do máster mix pronto.

Os ensaios seguintes se basearam em testar primers e temperatura de anelamento, os primers são CCA ISSR2 ISSR6 ISSR8, amostras Ipê 2b, Vacaria 8a, Frederico 5b. De início não houve a amplificação com o programa universal, logo modificamos a PRC baixando a temperatura com base nos primers usados e a concentração de MgCl em 1,6. Pode-se notar pela figura 3 que os melhores primers foram o ISSR2 para Ipê e Vacaria e o CCA para Ipê e Frederico e ISSR6 para Vacaria e Frederico.



Figura 3. Gel de primers testados.

No experimento subsequente realizou-se o teste de primers em relação a temperatura de anelamento, como podemos notar na figura 4 os melhores foram para amostra Frederico ISSR10, ACA. Já para Vacarias foi ISSR1, ISSR3 e ISSR4. Porém não foram muito bons para amostra Ipê.

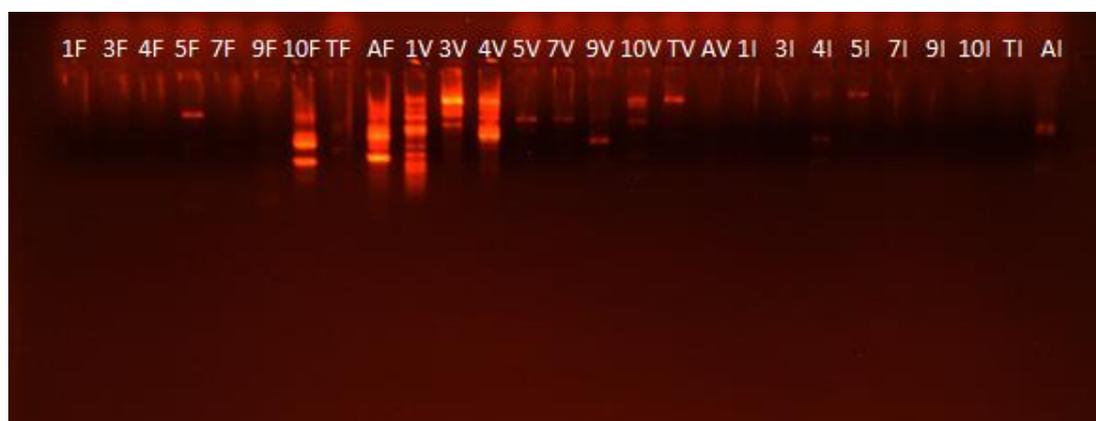


Figura 4. Teste de primers.

No próximo ensaio foram testadas as quantidades de DNAs 20ng e 30ng em relação aos primers ISSR2 e ISSR4, como pode-se notar pela figura 5, os melhores resultados foram com 30ng.

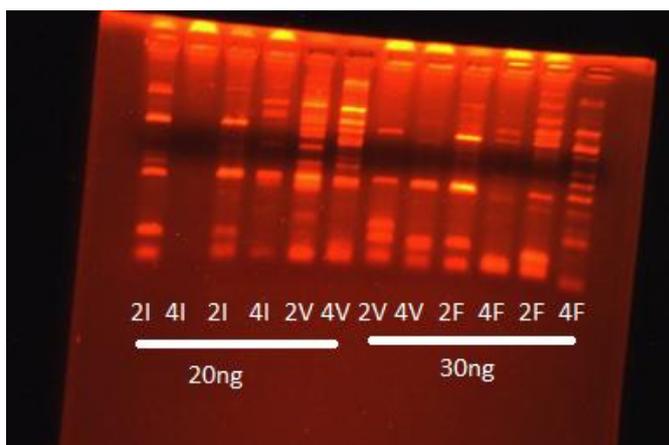


Figura 5. Teste de nanogramas de DNA.

Ademais dos ensaios realizados os primers que se mostraram mais eficientes foram ISSR2, ISS6, ISSR8 e o CCA. Sendo a melhor temperatura de anelamento entre 50 a 55°C. Sendo necessário realizar mais estudos para refinar melhor os resultados, mas já se pode ver que o estudo tem se mostrado eficiente no aspecto primers e amostras.

### CONCLUSÃO

É possível comprovar que os primers ISSR estão sendo eficientes em amplificar as amostras testadas, porém ainda se faz necessário mais experimentos para a obtenção de bandas mais nítidas.

## REFERÊNCIAS

KINUPP, V.F. **Plantas alimentícias não convencionais da região metropolitana de Porto Alegre**, RS. 2007. 562 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/12870> . Acessado em: 20 ago. 2018.

SANTOS, T.C.; BOFF, P.; BOFF, M.I.C.; VOLPATO, C. **Ocorrência e multiplicação do crem (Tropaeolum pentaphyllum Lam.)** na Serra Gaúcha e Planalto Sul Catarinense. Cadernos de Ecologia, 2013.

ROGALSKI, J.M.; Betto, A.S.; Lodi-Souza, T. **Germinação e persistência das sementes de Tropaeolum pentaphyllum (TROPAEOLACEAE)**. In: 64º Congresso Nacional de Botânica. Belo Horizonte, 2013.

PRESTES, Daniele Kiel Penteadado. **Potencial ornamental e variabilidade genética de Tropaeolum pentaphyllum LAM.** 2015. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/43544/R%20-%20D%20-%20DANIELE%20KIEL%20PENTEADO%20PRESTES.pdf?sequence=3&isAllowed=y> . Acesso em: 05 ago. 2018.

ANDERSSON, L.; Andersson, S. **A Molecular Phylogeny of Tropaeolaceae and Its Systematic Implications**. Golden Jubilee v. 49, n.4, p.721-736, 2000.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. **Tipos de Marcadores Moleculares**. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Org.). Marcadores moleculares. 2. ed. Viçosa: Editora Jard, 2009. v. 1. p.11-101.

FALEIRO, A.S.G.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; MELO, G.R.P.; YAMADA, M.M.; BAHIA, R.C.S.; CORRÊA, R.X. **Diversidade Genética de Acessos de Theobromacacao L. selecionados por produtores para resistência à vassoura-de-bruxa com base em marcadores microssatélites**. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2001, Goiania. Anais do Primeiro Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Goiania: Embrapa Arroz e Feijão, 2001.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

SERENO, M.L.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; VENCOVSKY, R.; FIGUEIRA, A. **Genetic diversity and natural population structure of cacao (Theobroma cacao L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers**. Conservation Genetics, 7:13-24, 2006.