

## Padronização do marcador molecular SSR para *Tropaeolum pentaphyllum* e alinhamento dos primers usando CLUSTAL Omega

## SSR molecular marker standardization for *Tropaeolum pentaphyllum* and alignment of primers using CLUSTAL Omega

### RESUMO

**Kevyn Zapelão**  
[kevyn.zap@hotmail.com](mailto:kevyn.zap@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Betty Cristiane Kuhn**  
[bettykuhn@utfpr.edu.br](mailto:bettykuhn@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

O objetivo deste trabalho é padronizar um protocolo para as reações de PCR com DNA da espécie *Tropaeolum pentaphyllum* utilizando o marcador molecular SSR, revelando assim a variação genética contida nesta espécie. Para tal, foram necessárias a extração e quantificação do DNA das populações obtidas nas cidades de Frederico Westphalen, Vacaria e Ipê, seguido de uma reação em cadeia de polimerase com o marcador molecular SSR, que é um microsatélite que possui alto grau de polimorfismo. Os resultados obtidos não foram de acordo com o esperado, pois a PCR gerou muitas bandas em cada um dos poços amostrais, fora necessário utilizar um software CLUSTAL O para verificar o alinhamento dos primers com o template. Após a análise bioinformática foi observado que os primers apresentavam pareamentos desuniformes, e isso pode ter gerado a perda de especificidade dos resultados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Batata crem. Marcadores moleculares. Alinhamento.

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

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



### ABSTRACT

The aim of this work is to standardize a protocol for DNA PCR reactions of *Tropaeolum pentaphyllum* using the SSR molecular marker, thus revealing the genetic variation contained in this species. therefore, DNA extraction and quantification of the populations obtained in the cities of Frederico Westphalen, Vacaria and Ipê were necessary, followed by a polymerase chain reaction with the SSR molecular marker, which is a microsatellite that has a high degree of polymorphism. the results were not as expected, as PCR generated many bands in each of the sample wells, it was necessary to use a CLUSTAL O software to verify the alignment of the primers with the template. after the bioinformatic analysis it was observed that the primers presented uneven pairings, and this may have generated the loss of specificity of the results.

**KEYWORDS:** Keyword one. Keyword two. Keyword three.

## INTRODUÇÃO

A *Tropaeolum pentaphyllum*, mais conhecida como batata-crem, é uma planta herbácea, da família Tropaeolaceae, que tem por característica permanecer subterrânea durante períodos desfavoráveis ao seu crescimento, sob a forma de tubérculo, rizoma e etc., além disso é uma planta trepadeira amplamente encontrada na América do Sul, no Brasil, pode ser vista em regiões dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

A importância desta planta nestas regiões, se deve pela apreciação de seus tubérculos na culinária tradicional, onde são produzidas conservas que são utilizadas como condimentos em carnes e sopas (KINUPP, 2007; SANTOS et al., 2013). Além disso, pesquisas apontam que a batata crem possui uma atividade antimicrobiana e uma redução no colesterol (SANTOS et al., 2013).

Os marcadores moleculares são tidos como ferramentas importantes no que tange a detecção de variações do genoma, dentre os quais se encaixam os microssatélites, denominados SSR (Simple Sequence Repeats) ou STR (Short Tandem Repeats), que consistem em sequências de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem, possuem alto grau de variação genética, multialélico, sendo de importante conteúdo informativo (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Um dos pilares da bioinformática é o alinhamento/comparação de sequências de proteínas, no qual são feitos múltiplos alinhamentos de sequências, dando a possibilidade de estudar os padrões de sequência, seu comprimento (alinhamento global) ou apenas certas regiões (alinhamento local). O alinhamento consiste em quatro domínios de ligação de NAD de oxidoredutase, a coloração ocorre devido a parâmetros físico-químicos, destacando as posições conservadas nas sequências (CHENNA et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi padronizar as reações com as 3 amostras de *T. pentaphyllum* utilizando o marcador molecular SSR, revelando assim a variação genética tida na espécie, caso não ocorresse tal padronização, serão utilizados o CLUSTAL O para verificar o alinhamento dos primers com o template.

## METODOLOGIA

As espécies de batata crem foram colhidas durante o mês de setembro na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos, foram extraídas 10 amostras de cada população, provenientes das cidades de Frederico Westphalen, Vacaria e Ipê, que foram guardadas em frascos devidamente identificados.

## EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE TECIDOS VEGETAIS

O procedimento de extração e purificação da *T. pentaphyllum* necessitou de uma lavagem de cada uma das amostras, foi utilizado para extração e purificação do DNA o Kit universal Wizard Promega, que tivera algumas modificações necessários para o progresso do experimento.

## QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A quantificação de DNA consistiu na preparação de um gel de agarose 2% para eletroforese e a preparação de 200 mL de solução tampão 1X. Foram escolhidas 5  $\mu$ L das amostras de DNA das populações de Frederico Westphalen, Ipê e Vacaria, que foram colocados em um eppendorf cada, que seguiu na adição de 2  $\mu$ L de azul de metileno e gel Red. 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 as imagens foram fotografadas e editadas no programa LPix.

## AMPLIFICAÇÃO DO DNA COM PRIMERS SSR

Os experimentos em relação a PCR consistiram na preparação de um máster mix de solução padrão, devidamente modificado conforme a quantidade de amostras e primers utilizados para o experimento, como tal, para o preparo de 1 amostra x 1 primer, fora utilizado para a formação do Mix, 2  $\mu$ L de buffer, 0,8  $\mu$ L de dNTP, 1,6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ L de Taq polimerase, 12,2 de água miliQ, 0,6  $\mu$ L dos primers forward e reverse do SSR e 2  $\mu$ L de DNA de cada uma das amostras.

A configuração padrão do termociclador consistiu em uma 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.

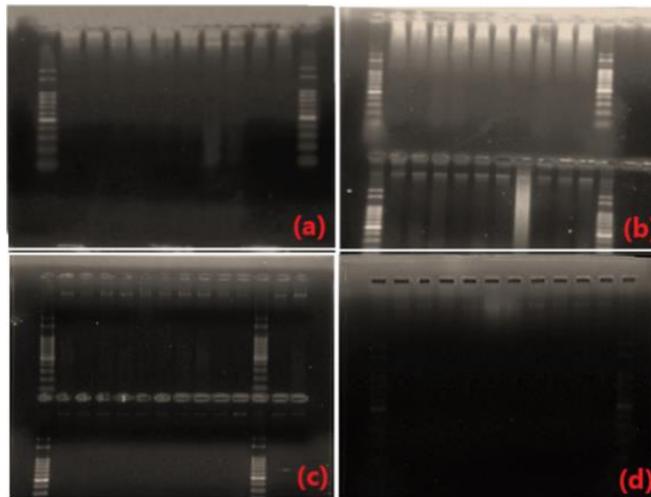
Análise bioinformática consistiu com a utilização do CLUSTAL O, que é um software de alinhamento múltiplo de sequências amplamente utilizado, podendo identificar regiões de similaridade que podem indicar relações funcionais, estruturais e/ou evolutivas entre duas sequências biológicas. Logo, foi utilizado o CLUSTAL O para averiguar o emparelhamento dos primers com o template, quantificando se o comprimento, correspondiam com as características do SSR.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do DNA genômico consistiu na utilização do kit universal Wizard Promega, tal kit tivera modificações, no qual fora utilizado 2000  $\mu$ L de Cell Lysis Solution, para o rompimento da parede e membrana celular e o tempo de centrifugação fora acrescentado mais 2 minutos, para garantir uma melhor centrifugação do material amostral.

Na etapa de quantificação de DNA das amostras extraídas, foi utilizado para a visualização das amostras no gel de agarose cerca de 4  $\mu$ L brometo de etídeo na solução de TBA 1X, os resultados podem ser observados na figura 1.

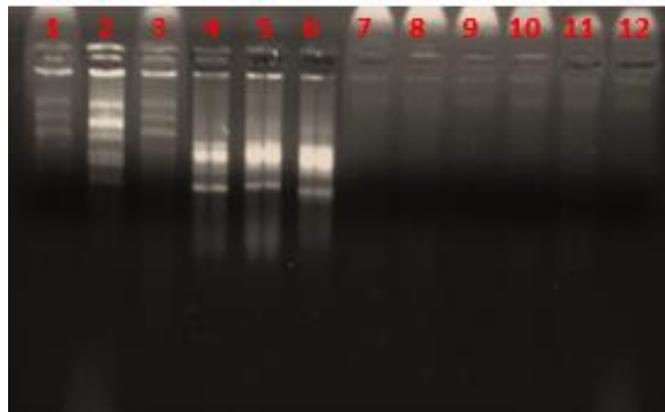
Figura – 1: (a) Quantificação de DNA da população de Vacaria 1 – 5. (b) Vacaria 6 – 10 superior e Frederico Westphalen inferior. (c) Ipê 1 – 10. (d) Frederico Westphalen 6 – 10.



Fonte: Autoria própria (2019).

A configuração inicial do termociclador consistiu em uma 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, como é apresentado na figura 2.

Figura – 2: Reação de PCR com os primers de 6 e 7

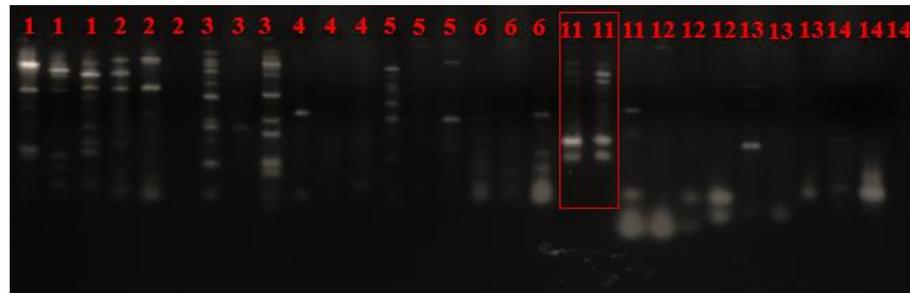


Fonte: Autoria própria (2019).

Os resultados obtidos nos poços amostrais foram de 20 ng/μL nos poços 1-3 e 4-6 referente aos primers 6 e 7, respectivamente. Nos poços 7-9 e 10-12 foram obtidos cerca de 30 ng/μL referente aos primers citados anteriormente.

Contudo, percebeu-se que era necessário efetuar modificações no processo de amplificação dos primers, para tal, foram feitas modificações na configuração do termociclador, especificamente no tempo de anelamento, etapa que corresponde ao pareamento entre o primer e o template. Inicialmente efetuou-se o abaixamento da temperatura em 5 °C e utilizou-se os primers 1-6 e 11-14, os resultados podem ser vistos na figura 3.

Figura – 3: Reação de PCR das populações de I, FW e V com Ta à 50 °C



Fonte: Autoria própria (2019).

Observa-se nos resultados, especificamente na figura demarcada em vermelho, o surgimento de polimorfismo nas amostras de Ipê e Frederico Westphalen, utilizando o primer 11. Contudo, nas demais amostras, é visto uma quantidade superior de bandas, o que não era esperado, visto que a batata crem é uma planta diploide e o primer SSR é um primer específico, era esperado duas bandas em cada poço amostral.

Devido aos resultados obtidos não serem o esperado, mesmo após os testes em diferentes temperaturas de anelamento, foi utilizado um software CLUSTAL OMEGA para verificar o alinhamento de cada um dos primers com o template, como pode ser visto na figura 4.

Figura – 4: Alinhamento do primer 4 com o template

Reverse	-----CCAAAGTGGCTCCATAAGTG-----	20
Reverseok	-----	0
G04	TGCCACTAAAGTCTTAACATAACCAGGGGAGATCCACAGTCACTCCATCATTGGTCCAA	420
Foward	-----ACGTCACTCCATCATTGGTC-----	20
Reverse	-----	20
Reverseok	-----	0
G04	CTCTCCGGGAGTCGCCCTAGAGTCAACAGTAAACTGAGGAGAGAGAGAGAGAGTGTGT	480
Foward	-----	20
Reverse	-----	20
Reverseok	-----	0
G04	GTGTGTGTGTTCAAGTCTGCTGCTGAATGGGTACCGACTAAATAGAGAGTAAAAACAG	540
Foward	-----	20
Reverse	-----	20
Reverseok	-----CACTTATGGAGCCACTTTGG-----	20
G04	TTAGAGATCTTAAGCGTCAAGACARTGAATTTCTGAGGCCACTTATGGAGCCACTTTGGA	600
Foward	-----	20
Reverse	-----	20
Reverseok	-----	20
G04	TACTACGGAGTTCAAATCCACCTTGGCCCAATCACTAATTGATAACTCCCATCC	656
Foward	-----	20

Fonte: Autoria própria (2019).

Com a utilização do CLUSTAL O, é possível verificar o alinhamento entre as sequências de interesse, neste caso, foi possível verificar que o número de pares de bases da sequência amplificada foi de 94 pb, sendo um fragmento inferior para primers do tipo SSR, que possuem valores acima de 200 pb, o que pode ser um dos motivos que levaram a ter em cada poço amostral uma alta taxa de bandas, visto que as sequências amplificadas são pequenas, o que leva a serem inespecíficas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço brevemente a UTFPR pelo apoio e disponibilização do espaço e material para estudo e a minha orientadora, do qual me auxiliou no desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; Brasília, DF: Embrapa Café, 2009. 532 p.

Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3497-500. doi: 10.1093/nar/gkg500. PubMed PMID: 12824352; PubMed Central PMCID: PMC168907.

DOS SANTOS TEIXEIRA, Cristhian et al. 13556 - Ocorrência e multiplicação do crem (*Tropaeolum pentaphyllum* Lam.) na Serra Gaúcha e Planalto Sul Catarinense. **Cadernos de Agroecologia**, [S.l.], v. 8, n. 2, dec. 2013. ISSN 2236-7934.

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.

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.