

Otimização de locos de microssatélites para diferentes espécies de *Passiflora*

Juliana Leles Costa¹; Eder Jorge de Oliveira²; Gilmara Alvarenga Fachardo Oliveira¹; Fabiana Moraes de Carvalho³; Jorge Luiz Loyola Dantas²

¹Estudante de Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; ²Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura; ³Estudante de Biomedicina da Faculdade Maria Milza

INTRODUÇÃO

A variabilidade genética das inúmeras espécies do gênero *Passiflora* vem sendo caracterizada por meio de estudos fenotípicos e moleculares. Contudo, a caracterização molecular de passifloras, pode ser considerada incipiente, visto o grande número de espécies ainda não estudadas e o potencial inexplorado para essas espécies com marcadores moleculares (Cerqueira-Silva et al., 2008).

Os marcadores do tipo microssatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*) são sequências de 1 a 6 pares de bases repetidas em tandem. Suas principais vantagens são a co-dominância, o multialelismo, a geração de alto nível de polimorfismo, alta reprodutividade, rapidez e simplicidade da técnica, baixo custo de utilização e grande poder de resolução (Oliveira et al., 2006). Entre as dificuldades está o alto custo no desenvolvimento dos iniciadores e na difícil análise de polimorfismos em géis de alta resolução. Assim, esse trabalho teve como objetivo otimizar a amplificação de iniciadores de SSR desenvolvidos para *Passiflora edulis* Sims., em outras espécies do gênero.

METODOLOGIA

Baseado na qualidade de amplificação dos locos descritos por Oliveira (2006), foram selecionados 40 locos de microssatélites desenvolvidos para espécie *P. edulis*.

Para otimização das condições de reação e amplificação desses locos em outras espécies do gênero *Passiflora*, utilizaram-se os seguintes genótipos *P. ligularis*, *P. foetida*, *P. rubra*, *P. setacea*, *P. suberosa*, *P. cincinnata*, *P. morifolia*, *P. gibertii* e *P. muchronata* e *P. edulis*, como controle. Estes acessos

pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma de Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura. O DNA genômico total foi extraído seguindo protocolo adaptado de Doyle & Doyle (1990).

As amplificações foram feitas em termociclador PTC-100 (MJ Research), de acordo com o seguinte programa: 94 °C por 4 min; 30 ciclos a 94 °C por 50 s, temperatura de anelamento variando (52 a 60 °C) de acordo com o iniciador por 50 s, 72 °C por 60 s; e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1000 3 %.

RESULTADOS

Em função da qualidade de amplificação nas espécies analisadas (bandas nítidas, sem arraste e bandas inespecíficas) foram otimizados 21 locos de SSR.

As reações de amplificação foram otimizadas em volume final de 20 µL, concentração de DNA de 10 ng; 0,4 uM dos iniciadores e 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase. Os demais reagentes devem ser utilizados com diferentes concentrações para os locos analisados. O dNTP variou entre 0,2 mM (PE03, PE07, PE09, PE11, PE13, PE19, PE27, PE37, PE38, PE41, PE58, PE64, PE66, PE74 e PE90) e 0,35 mM (PE15, PE18, PE23, PE59, PE75 e PE88). A variação de MgCl₂ foi de 1,5 mM (PE03, PE07, PE09, PE11, PE13, PE15, PE18, PE23, PE37, PE58, PE59, PE64, PE75 e PE88); 2,0 mM para o loco PE74 e 2,5 mM para PE19, PE27, PE38, PE41, PE66 e PE90. A concentração do tampão foi de 1X (PE03, PE19, PE27, PE37, PE38, PE41, PE58, PE66, PE74 e PE90) e 2X (PE07, PE09, PE11, PE13, PE15, PE18, PE23, PE59, PE64, PE75 e PE88). Já a temperatura de anelamento variou de 52 °C (PE19), 56°C (PE09, PE23, PE38, PE59 e PE64), 60°C (PE03, PE07, PE11, PE13, PE15, PE18, PE27, PE37, PE41, PE58, PE66, PE75, PE88 e PE90) e 62°C para o iniciador PE74.

CONCLUSÃO

Vinte e um locos de microssatélites identificados para *P.edulis* foram otimizados para uso em outras espécies de *Passiflora*. Este resultado trará contribuições para novos estudos com a cultura do maracujazeiro, reduzindo

custos e tempo, por não ser necessário o desenvolvimento de outros marcadores específicos para essas espécies.

REFERÊNCIAS

DOYLE, J.J. & DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 13-15, 1990.

OLIVEIRA, E.J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.*)**. 2006. 152 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, Universidade de São Paulo, 2006.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microssatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.2, p. 294-307, 2006.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; CARDOSO-SILVA, C.B.; OLIVEIRA, A. C.; SOUZA, M. M.; CORRÊA, R.X. **Amplificação cruzada de marcadores microssatélites (SSR) entre espécies de Maracujazeiro (*Passifloraceae; Passiflora*)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54,2008, Salvador, Anais...Salvador: Hotel Bahia Othon Palace, 2008.

Palavras chave: SSR, maracujá, marcadores moleculares.