

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**DALVAN CARLOS BEISE**

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA A AMPLIFICAÇÃO VIA PCR DE  
MARCADORES SSR EM *Eugenia uniflora* L. (MYRTACEAE)**

**São Gabriel  
2018**

**DALVAN CARLOS BEISE**

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA A AMPLIFICAÇÃO VIA PCR DE  
MARCADORES SSR EM *Eugenia uniflora* L. (MYRTACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal  
do Pampa, como requisito parcial  
para obtenção do Título de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

Orientador: Valdir Marcos Stefenon.

**São Gabriel  
2018**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

B423o Beise, Dalvan Carlos  
Otimização de protocolo para a amplificação via PCR de marcadores SSR em *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) / Dalvan Carlos Beise.  
50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-- Universidade Federal do Pampa, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2018.

"Orientação: Valdir Marcos Stefenon".

1. Biologia molecular. 2. Estudos genéticos. 3. Marcadores moleculares. 4. Pitangueira. I. Título.

**DALVAN CARLOS BEISE**

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA A AMPLIFICAÇÃO VIA PCR DE  
MARCADORES SSR EM *Eugenia uniflora* L. (MYRTACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 14 de dezembro de 2018.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Valdir marcos Stefenon  
Orientador  
Unipampa

---

Dra. Marícia Fantinel D'Ávila  
Unipampa

---

MSc. Patrícia de Oliveira Neves  
Unipampa

## **AGRADECIMENTOS**

A concretização deste trabalho não seria possível sem a ajuda de determinadas pessoas que demonstraram todo seu apoio e consideração. Este momento simboliza o resultado final oriundo de certas escolhas e mudanças de planos que possibilitaram minha chegada até aqui.

Primeiramente agradeço aos meus pais, Alceu e Maria Beise, pelo apoio e carinho, pelo esforço durante todos esses anos trabalhando de sol a sol. Espero um dia lhes retribuir todo o suporte e amor recebido.

Não posso esquecer dos meus avós, especialmente a dona Eleondina (Vó Mosa), que sempre esteve presente na minha vida. Certamente não esquecerei as “varadas” de guanxuma recebidas, com certeza elas contribuíram para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

A minha irmã mais velha Daiane, por servir de referência como pessoa desde que me conheço por gente. Ao meu irmão mais novo Deivid, por viver perguntando quando eu vou para casa, seja para matar a saudade ou para brigar um pouquinho.

Aos amigos e colegas do grupo PET Ciências Biológicas, pela troca de saberes, pelas práticas de aprender e conviver em grupo.

Aos amigos e colegas do Herbário Bruno Edgar Irgang, em especial a Patrícia, por todos os momentos compartilhados, sendo eles botânicos ou não.

Ao Rafael e Cristiane, como colegas e parceiros do laboratório NEMMIP, que me acolheram e ensinaram muito do que hoje eu sei.

Em especial a minha amiga Renata, a qual considero uma irmã, presente desde o início desta caminhada. Posso dizer que todo este trabalho é por sua “culpa”, pois foi quem me motivou e mostrou esta porta aberta. E, não menos importante, obrigado pelos muitos momentos compartilhados e pela parceria de bebedeiras, elas foram e são muito importantes.

Ao meu orientador Valdir, pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos e atenção desprendida, pelo exemplo de como ser professor. Obrigado pela parceria sendo meu orientador em dose dupla.

A Universidade Federal do Pampa, por toda a formação acadêmica e pessoal, através de seus professores e técnicos.

Por fim, gostaria de reforçar o meu... **MUITO OBRIGADO!**

“Nossas vidas são definidas pelas oportunidades. Até mesmo aquelas que perdemos”.

Benjamin Button

## RESUMO

A espécie *Eugenia uniflora* L., popularmente conhecida como pitangueira, pertence à família Myrtaceae e apresenta ampla distribuição pela América do Sul, sendo nativa para os biomas Mata Atlântica e Pampa. A pitangueira possui importância significativa pela grande apreciação de seus frutos tanto pelo homem quanto pela fauna em geral. Tendo sido empregada pela medicina popular há várias gerações, atualmente o setor econômico tem notado sua qualidade para a confecção de produtos alimentícios, farmacológicos e cosméticos. Devido essa possibilidade de exploração, conseqüentemente haverá redução das áreas onde a mesma ocorre naturalmente. Estudos com base genético-molecular são fundamentais para compreensão dos efeitos causados pela da fragmentação e degradação do ambiente, refletidos no comportamento populacional das espécies como um todo. Para isso, é necessário desenvolver ferramentas capazes de elucidar as variações de indivíduos em nível populacional. Por esses motivos, o presente trabalho teve como objetivo testar e avaliar a eficiência da amplificação dos *locus* microsatélites específicos para a espécie *E. uniflora*, previamente caracterizados e validados *in silico*. Para amplificação dos 24 *loci* avaliados, utilizou-se indivíduos pertencentes a uma população natural de um fragmento florestal de Mata Atlântica. Dentre os *loci* avaliados, 12 mostraram-se eficientes, podendo ser diretamente indicados para aplicações futuras. Para os que não apresentaram bons resultados, é necessária a realização de novos testes e ajustes em relação aos protocolos adotados. Por fim, apenas sete foram descartados por não apresentarem amplificação. Esta avaliação foi baseada na amplificação dos *loci* visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2%. Ainda, buscou-se otimizar um protocolo de PCR (Reação em cadeia da polimerase) visando o aumento do número de *loci* amplificados. A origem genômica dos *loci* foi caracterizada por meio de um BLAST (Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local) realizado no banco de dados online NCBI, demonstrando uma alta similaridade das sequências alinhadas com a espécie *Eucalyptus grandis*, também pertencente à família Myrtaceae.

Palavras-chave: Myrtaceae, pitangueira, marcadores SSR, variação individual, fragmentação de ambiente.

## ABSTRACT

The species *Eugenia uniflora* L., popularly known as pitangueira, belongs to the Myrtaceae family and is widely distributed throughout South America, being native to the Mata Atlântica and Pampa biomes. The pitangueira has significant importance for the great appreciation of its fruits for both the man and the fauna in general. Having been employed by popular medicine for several generations, nowadays the economic sector has noticed its quality for the manufacture of food, pharmacological and cosmetic products. Due to this possibility of exploitation, consequently there will be reduction of the areas where it occurs naturally. Genetic-molecular studies are fundamental to understanding the effects of fragmentation and degradation of the environment, reflected in the population behavior of the species as a whole. For this, it is necessary to develop tools capable of elucidating the variations of individuals at the population level. For these reasons, the present work had as objective to test and to evaluate the efficiency of the amplification of the microsatellite locus specific for the species *E. uniflora*, previously characterized and validated in silico. For amplification of the 24 loci evaluated, we used individuals belonging to a natural population of a forest fragment of Atlantic Forest. Among the evaluated loci, 12 were efficient and could be directly indicated for future applications. For those that did not present good results, it is necessary to perform new tests and adjustments in relation to the adopted protocols. Finally, only seven were discarded for lack of amplification. This evaluation was based on amplification of loci visualized by 2% agarose gel electrophoresis. In addition, a PCR (Polymerase Chain Reaction) protocol was optimized aiming at increasing the number of amplified loci. The genomic origin of the loci was characterized by a BLAST (Basic alignment search tool) performed in the online database NCBI, demonstrating a high similarity of the sequences aligned with the species *Eucalyptus grandis*, also belonging to the family Myrtaceae.

Key words: Myrtaceae, pitangueira, SSR markers, individual variation, environmental fragmentation.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Caracterização do porte de <i>E. uniflora</i> L. ....	16
Figura 2 – Ramo foliar de <i>E. uniflora</i> L.....	17
Figura 3 – <i>E. uniflora</i> L. em floração .....	18
Figura 4 – <i>E. uniflora</i> L. em frutificação.....	19
Figura 5 – Localização geográfica da população de <i>E. uniflora</i> L. amostrada.....	28
Figura 6 – Perfil eletroforético do teste de gradiente .....	34
Figura 6.1 – <i>Locus</i> testados Pit 26, Pit 32, Pit 34 Pit 38, Pit 48 e Pit 53.....	34
Figura 6.2 – <i>Locus</i> testados Pit 57, Pit 64, Pit 66, Pit 71, Pit 72 e Pit 77.....	35
Figura 6.3 – <i>Locus</i> testados Pit 78, Pit 84, Pit 88, Pit 98, Pit 105 e Pit 115.....	35
Figura 6.4 – <i>Locus</i> testados Pit 119, Pit 123, Pit 125, Pit 138, Pit 139 e Pit 140.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Indivíduos utilizados na avaliação .....	27
Tabela 2 – Gradiente de temperatura para cada <i>loci</i> .....	30
Tabela 3 – Lista dos marcadores avaliados .....	32
Tabela 4 – Resultados do alinhamento na plataforma BLASTn .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Celsius

AFLP – Amplified fragment length polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado)

BSA - Bovine Serum Albumin (Albumina de soro bovino)

BLAST - Basic local alignment search tool (Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local)

CTAB - Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide (Catiônico de hexadecil trimetil amônio)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Trifosfato desoxinucleotídeos

NCBI - National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

NGS - Next generation Sequencing (Sequenciamento de nova geração)

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

pb - Pares de base

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

RAPD - Polymerase Chain Reaction (DNA polimórfico amplificado ao acaso)

SSR - Polymerase Chain Reaction (Sequências Simples Repetidas)

UV - Ultravioleta

µL - Microlitro

µM - Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1 A FAMÍLIA MYRTACEAE</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2 O GÊNERO EUGENIA L</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3 <i>Eugenia uniflora</i> L</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4 FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL E DIVERSIDADE GENÉTICA POPULACIONAL</b> .....	<b>20</b>
<b>1.5 MARCADORES MOLECULARES</b> .....	<b>21</b>
<b>1.6 MARCADORES SSR</b> .....	<b>22</b>
<b>1.7 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>26</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1 AMOSTRAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2 TESTE AMPLIFICAÇÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3 AVALIAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>4.4 IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM DOS LOCI</b> .....	<b>31</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>5. 1 AMPLIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES</b> .....	<b>32</b>
<b>5. 2 IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM DOS LOCI</b> .....	<b>36</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>

**7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....43**

**REFERÊNCIAS.....44**

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A família Myrtaceae

A família Myrtaceae é citada como umas das mais importantes famílias botânicas devido ao seu vasto número de representantes. Apesar de sua ampla distribuição em diversas regiões do mundo (SOARES-SILVA, 2000), apresentando em torno de 130 a 150 gêneros, já foram descritas mais de 5650 espécies (GOVAERTS et al., 2008).

Myrtaceae é uma das famílias com maior representatividade de espécies lenhosas em várias formações vegetais brasileiras, em especial no bioma Mata Atlântica, onde há a ocorrência de mais de 50 espécies (PEIXOTO & GENTRY, 1990; TABARELLI & MANTOVANI, 1999; GUILHERME et al., 2004). No Brasil, em geral, as espécies dessa família não produzem madeiras valiosas. Inclusive, algumas são utilizadas apenas para o fornecimento de lenha e/ou confecção de pequenas peças e objetos (MARCHIORI & SOBRAL, 1997).

Por outro lado, há uma enorme variedade de espécies frutíferas muito apreciadas e exploradas comercialmente (GRESSLER, 2006), como é o caso da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Berg) Mattos), goiabeira (*Psidium guajava* L.), dentre outras. Entretanto, essas consistem em apenas uma pequena amostra do grande potencial econômico da Myrtaceae, visto que há diversos frutos comestíveis dentro família que ainda não foram explorados comercialmente (LANDRUM & KAWASAKI, 1997).

### 1.2 O gênero *Eugenia* L.

O gênero *Eugenia* pertence a subfamília Myrtoideae e possui mais de 1050 espécies (MAZINE et al., 2014), dessas, 400 são encontradas no Brasil (HENRIQUES et al., 1993). Morfologicamente este grupo é caracterizado como subarbustos ou árvores, com inflorescências axilares ou em partes dos ramos sem folhas, corimbos, glomérulos ou flores isoladas. As flores tetrâmeras possuem pétalas presentes e lobos do cálice individualizados persistentes nos frutos. Possui

um ou dois frutos seminados; sementes com embrião eugenióide, com cotilédones soldados sem radícula evidente (MARCHIORI & SOBRAL, 1997).

Dentro deste gênero estão abrigadas espécies nativas reconhecidas pela produção de frutos consumidos pelo homem e outros animais, como *E. uniflora* L. *E. involucrata* DC. *E. pyriformis* Cambess e *E. neosilvestris* Sobral (ROMAGNOLO & DE SOUZA, 2006).

### 1.3 *Eugenia uniflora* L.

*E. uniflora* é conhecida popularmente como pitangueira, pitanga-vermelha, pitanga-roxa, pitanga-lagarto, dentre outros nomes populares. Seu epíteto específico *uniflora* significa “uma flor em cada pedúnculo”; na língua tupi-guarani é conhecida como *yba-pitanga* que significa “fruto-vermelho” (LONGHI, 1995). Consiste em uma espécie nativa da Mata Atlântica, com grande capacidade de ocorrência e estando presente também nos biomas Caatinga, Cerrado e Pampa. Distribui-se nos mais diversos tipos de solo, apresentando uma enorme plasticidade em relação aos mais variados ambientes e podendo adaptar-se a diferentes níveis de geada, ventos e temperaturas abaixo de zero graus Celsius, sem demonstrar sintomas característicos de dano. Contudo, apresenta baixo desenvolvimento em solos salinos (DONADIO et al., 2002; COSTELLA et al., 2013; DEMATTÊ, 1997; LIRA JÚNIOR et al., 2007).

É caracterizada por seu porte arbustivo-arbóreo, tronco reto e delgado ou um pouco tortuoso e irregularmente acanalado, com casca fina que se descama em placas, apresentando aspecto malhado de cor acinzentada (Figura 1). Semidecídua, possuindo folhas simples, oposto-cruzadas, glabras semi-coriáceas e pecioladas (Figura 2). Varia a coloração conforme sua idade, sendo avermelhada quando jovem e verde-escuro quando adulta. Apresenta um odor característico e inconfundível de pitanga quando suas folhas são maceradas (CARDOSO & SAJO, 2006).

Figura 1: Indivíduos de *E. uniflora* L. de porte arbustivo-arbóreo, em mata ciliar localizada na cidade de Vale do Sol - RS.



Fonte: do Autor, 2018.

Figura 2: Ramo foliar de *E. uniflora* L., coletado de um indivíduo localizado em passeio público na cidade de Santana do Livramento - RS.





Fonte: do Autor, 2018.

Suas flores são hermafroditas, muito vistosas, de coloração branca e com estames numerosos. Podem estar solitárias ou em grupos de duas a três nas axilas e nas extremidades dos ramos (Figura 3). Florescem duas vezes ao ano, nos meses de janeiro e de agosto a setembro. A frutificação ocorre em fevereiro e de outubro a novembro. Esses períodos são variáveis conforme a região geográfica (SALGUEIRO et al., 2004). O fruto é uma drupa globosa (Figura 4) e quando maduro adquire cor vermelha ou até quase preta, com uma polpa carnosa e agridoce e com uma a duas sementes (CARVALHO, 2006).

Figura 3: Indivíduo de *E. uniflora* L. em plena floração, localizado no *campus* São Gabriel da Universidade Federal do Pampa.



Fonte: do Autor, 2018.

Figura 4: Ramo de um indivíduo de *E. uniflora* L. apresentando frutificação com diferentes estágios de maturação, localizado em passeio público na cidade de Santana do Livramento - RS.



Fonte: do Autor, 2018.

A *Eugenia uniflora* tem grande importância econômica, sendo aplicada a diversos fins, como a utilização da madeira para confecção de cabos de ferramentas e outros instrumentos agrícolas, além de ser considerada ótima para a produção de energia a partir de lenha e carvão (LEGRAND & KLEIN, 1969; LOPEZ et al., 1987). No setor farmacológico tem um grande apelo devido a seus componentes fitoquímicos, pois são encontrados óleos essenciais tanto nas folhas como nos

frutos, vários sesquiterpenos, além de taninos, pigmentos flavonóides e antociânicos, também saponinas, sais minerais e vitamina C (LORENZI & MATOS, 2002).

No ramo alimentício seus frutos são muito apreciados *in natura*, sendo amplamente cultivados em pomares domésticos. O Nordeste é considerado um dos maiores centros de cultivo, fornecendo matéria-prima para produtos como geleias, sorvetes, sucos, etc. Embora não exista comprovação científica, a pitangueira é muito utilizada na medicina popular em várias regiões do país. As folhas e os frutos são procurados por serem considerados febrífugas, aromáticos, antirreumáticos e anti desentericos (LORENZI & MATOS, 2002; CARVALHO, 2006).

Em relação ao ambiente, é considerada uma espécie secundária inicial (LONGHI, 1995) e/ou secundária tardia (FERRETTI et al., 1995). Apresenta um papel ecológico significativo, abundante nos capões situados em solos úmidos, principalmente no estrato intermediário da floresta, por vezes formando agrupamentos quase puros em planícies bastante úmidas ao longo dos rios (LEGRAND & KLEIN, 1969). Devido à grande apreciação de seus frutos pela fauna, esses têm fácil dispersão de suas sementes, e suas flores muito melíferas atraem diversos insetos. Por esse motivo, é recomendada para arborização de represas com piscicultura (BICUDO, 1973), para o enriquecimento de áreas em processos de restauração e para recuperação ambiental.

Baseado em sua grande importância econômica e principalmente ecológica, é necessário realizar maiores estudos inclusive genéticos que possibilitem a compreensão do como a *E. uniflora* L. se comporta em seu habitat, visto que a mesma se encontra em ambientes degradados, estando por muitas vezes limitada a pequenos fragmentos florestais.

#### **1.4 Fragmentação Florestal e Diversidade Genética Populacional**

A fragmentação florestal é uma ameaça presente em todos os ecossistemas florestais do planeta. Um número reduzido de indivíduos, o declínio nos tamanhos populacionais médios e a separação de remanescentes florestais por áreas não



florestadas afetam diretamente os processos genéticos fundamentais ocorrentes nas populações (YOUNG & BOYLE, 2000).

O efeito dessa fragmentação provoca a diminuição de indivíduos de uma população, favorecendo a perda de variação genética. Então, esta população remanescente passa a ter um tamanho menor que o mínimo adequado ( $N_e$  mínimo) para que o mesmo possa ter sua normal continuidade e evolução. Nessa população pequena pode ocorrer, em curto prazo, deriva genética, o que significa ter as frequências de seus genes afastadas daquelas da população original, inclusive chegando a perder alelos. Em longo prazo, pela falta de fluxo gênico pode haver um aumento da endogamia, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e acasalamento entre indivíduos aparentados, e, por fim, extinção da espécie (KAGEYAMA et al., 1998).

Com a destruição e fragmentação de áreas, muitas interações importantes podem desaparecer, uma vez que muitas espécies não conseguem se alimentar ou se reproduzir adequadamente nos fragmentos remanescentes. Estes apresentam uma quantidade de recursos geralmente menor que a floresta original. Além disso, organismos que dependem de interações altamente especializadas podem se extinguir rapidamente com o desaparecimento ou diminuição da abundância de um dos organismos que participa dessa interação (MMA, 2003).

Com este intuito, estudos de diversidade genética populacional vêm aumentando significativamente, pois são importantes para conhecer como ocorre desenvolvimento destes processos em populações no meio natural. Por isso atualmente existem variadas ferramentas e tecnologias da genética molecular, as quais são utilizadas para fornecer informações úteis para programas de conservação e recursos genéticos. Uma delas é o uso de marcadores moleculares que são ferramentas essenciais para a caracterização da diversidade genética.

## **1.5 Marcadores Moleculares**

Entre os diferentes marcadores moleculares largamente utilizados na análise da diversidade genética populacional de espécies naturais, alguns merecem destaque e são apresentados a seguir.

Isoenzimas – grupo de múltiplas formas moleculares de uma enzima, resultante de variações alélicas dos genes codificantes. É um marcador considerado vantajoso pelo baixo custo, facilidade e rapidez da metodologia. Como desvantagem é apontado o baixo número dos sistemas enzimáticos polimórficos e a influência das condições ambientais e dos tecidos vegetais (KEPHART, 1990; MAY, 1992; ALFENAS, 1998).

AFLP – fragmentos de DNA (80 a 500 pb) obtidos com a digestão do DNA com enzimas de restrição, seguidos da ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos via PCR. Tem como vantagens a geração de grande número de polimorfismos por reação e o fato de não haver necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção de iniciadores utilizados (FALEIRO et al., 2001). Tem como desvantagem o alto custo de reagentes e várias etapas necessárias para obtenção dos marcadores (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

RAPD – fragmentos de DNA amplificados via PCR, utilizando iniciadores curtos (geralmente dez nucleotídeos) de sequência aleatória (WILLIAM et al., 1990). É considerado vantajoso pela facilidade e pela rapidez para obtenção de produtos amplificados, a necessidade de quantidades mínimas de DNA e a universalização das análises; como desvantagem: são dominantes e apresentam baixa reprodutibilidade (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO et al., 2004).

Por fim, outro marcador muito utilizado é o microssatélite ou SSR. Devido às suas características, os microssatélites têm sido muito empregados em pesquisas que visam entender a dinâmicas populacionais. Por esta razão, o método é apresentado mais detalhadamente na sequência.

## 1.6 Marcadores SSR

Os marcadores SSR ou microssatélites, são sequências simples de 1 a 6 pares de bases repetidas em *tandem*, isto é, uma após a outra, e podem ser

encontrados em grandes quantidades e uniformemente distribuídos pelo genoma das plantas. São codominantes, multialélicos e possuem o mais alto conteúdo de informação de polimorfismo (ZUCCHI, 2003), sendo usados para avaliar e monitorar similaridade, variabilidade e relação genética entre genótipos, assim como para construir mapas genéticos e encontrar marcadores para características de interesse (MEHLENBACHER, 1995; SALLA et al., 2002).

O polimorfismo deste marcador é baseado nos diferentes números de repetições de determinado motivo. O principal mecanismo responsável pelas variações no número destas repetições é o processo de *Slippage*, caracterizado por erros durante a replicação do DNA (CHOUDHARY & TRIVEDI, 2010; WANG et al., 2009). Esse tipo de marcador pode estar presente em regiões codificantes e não codificantes, sendo seu grau de polimorfismo consideravelmente menor em regiões codificantes. Isso é explicado pela menor pressão seletiva sofrida pelas regiões não codificantes que vão acumulando as mudanças durante o processo de replicação e pela alta conservação das regiões codificantes (KIMURA, 1968).

A obtenção dos marcadores envolve a amplificação dos microssatélites via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se iniciadores específicos (geralmente de 20 a 25 pb) para as regiões do DNA que flanqueiam os microssatélites. Isto requer a construção de bibliotecas genômicas, seleção e sequenciamento dos clones positivos e por fim o desenho dos iniciadores. Em alguns casos, estes podem ser utilizados para a obtenção de marcadores microssatélites em espécies geneticamente relacionadas (FALEIRO et al., 2003).

As principais vantagens deste marcador estão relacionadas ao seu caráter codominante, o alto nível de polimorfismo que pode ser detectado, a alta reprodutibilidade das marcas e a possibilidade de detecção de vários microssatélites (multiplex) no mesmo gel, facilitando a operacionalização das análises, principalmente quando é necessária a análise de grande número de acessos.

A principal desvantagem deste marcador está relacionada ao alto custo requerido no desenvolvimento de iniciadores específicos, quando estes não estão disponíveis para a espécie a ser estudada. Porém, este cenário vem mudando no decorrer do tempo conforme avançam novas tecnologias de sequenciamento, como o NGS (*Next Generation Sequencing* ou Sequenciamento de Nova Geração),

tornando o desenvolvimento mais fácil e barato (LITT & LUTY, 1989; MORGANTE & OLIVIERI, 1993; QUELLER et al.;1993; FALEIRO et al., 2004).

## **1.7 Sequenciamento de Nova Geração**

Por muitos anos, os estudos baseados em sequências genômicas eram de difícil acesso por conta de tecnologias limitadas e alto investimento financeiro. Como resultado, sua utilização tornava-se inviável. Este cenário começou a mudar com o surgimento de tecnologias para sequenciamento de genomas. Neste ponto surge um sequenciamento de primeira geração, conhecido como sequenciamento de Sanger, desenvolvido por SANGER et al. (1997). Décadas mais tarde foram surgindo novas tecnologias mais eficazes e com custos mais acessíveis, chamados de sequenciamento de segunda geração ou sequenciamento de nova geração (NGS) (DAVIES, 2010).

Com essas inovações houve um aumento significativo nas metodologias e ferramentas de biologia molecular, visando aplicações em programas de conservação e uso de recursos genéticos vegetais. Essas metodologias podem ser empregadas para detectar e analisar a variabilidade genética em nível molecular, oferecendo informações adicionais a outros estudos relativos à conservação e ao uso de bancos de germoplasma. Uma das ferramentas utilizadas são os marcadores moleculares, os quais detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA. Isso tem permitido estudos de evolução, de diversidade genética inter e intraespecífica, de identidade, origem genética e identificação de novas variantes, gerando informações importantes para subsidiar diferentes ações de pesquisa desde a coleta até o uso dos recursos genéticos em programas de melhoramento (FALEIRO, 2007).



## 2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a vasta importância de *Eugenia uniflora* L, tanto para a indústria alimentícia, farmacológica, medicina popular, arborização de praças e jardins, e, principalmente no âmbito ecológico, torna-se de extrema importância a realização de mais estudos sobre esta espécie. Com essa perspectiva, a obtenção de ferramentas para estudos genéticos é cada vez mais importante. Por isso, há a necessidade do desenvolvimento e validação de marcadores moleculares SSR, visto que estes apresentam uma grande empregabilidade e eficiência para estudos dos quais buscam compreender melhor a estrutura e o comportamento populacional das espécies vegetais em relação com o meio natural, o que é extremamente importante para espécies nativas pouco estudadas, principalmente para aquelas que são exploradas sem medidas de manejo, e que estejam sofrendo com a constante fragmentação florestal, como é o caso de *E. uniflora* L.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar em indivíduos de uma população natural utilizando a amplificação dos *locus* microssatélites prospectados para a espécie nativa *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) e validados *in silico* por SARZI (2017).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar as melhores temperaturas de anelamento dos iniciadores para amplificação via PCR dos *loci* microssatélites prospectados para *E. uniflora* L.
- Otimizar um protocolo de amplificação via PCR para os *loci* validados *in silico*.
- Caracterizar a origem genômica (nuclear ou organelar) dos *loci* microssatélites testados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os *loci* microssatélite avaliados neste trabalho foram prospectados por meio do sequenciamento parcial do genoma de *E. uniflora* L. por SARZI (2017), utilizando-se a tecnologia de sequenciamento de nova geração. Estes *loci* foram caracterizados e validados *in silico* pela mesma autora. Dentre os *loci* validados *in silico*, iniciadores foram sintetizados para 36 destes, sendo 12 já testados em populações naturais. (Sarzi et al. no prelo). No presente trabalho foram avaliados os 24 *loci* restantes: Pit 26, Pit 32, Pit 34, Pit 38, Pit 48, Pit 53, Pit 57, Pit 64, Pit 66, Pit 71, Pit 72, Pit 77, Pit 78, Pit 84, Pit 88, Pit 98, Pit 105, Pit 115, Pit 119, Pit 123, Pit 125, Pit 138, Pit 139 e Pit 140.

### 4.1 Amostragem e extração de DNA

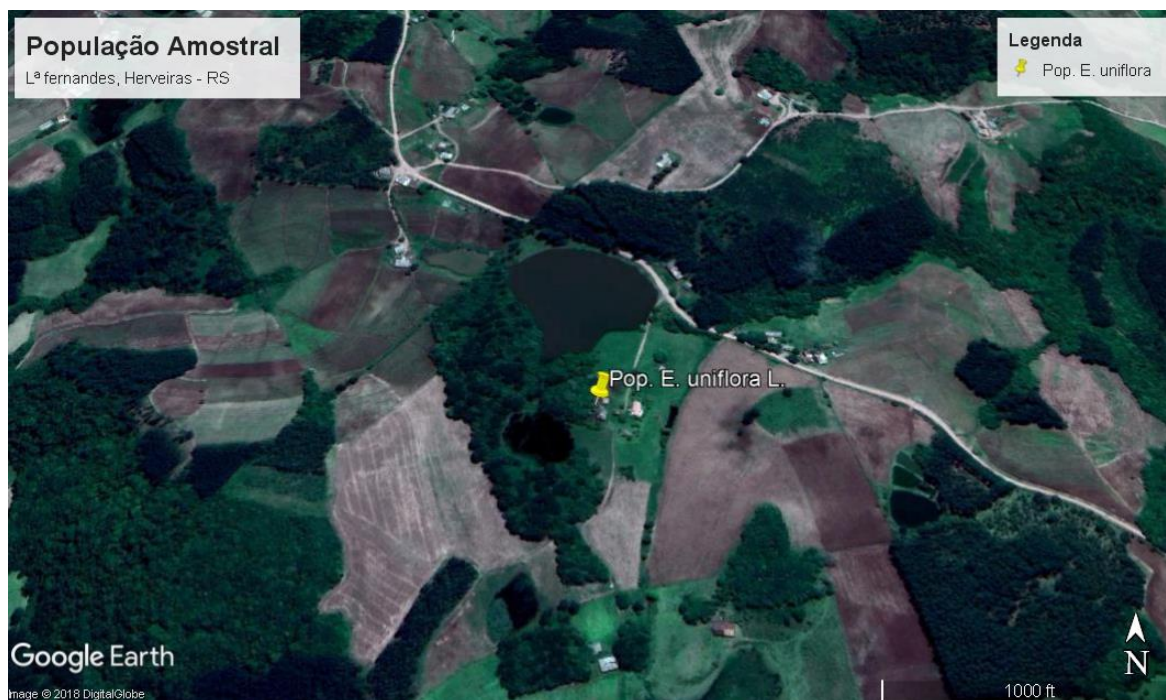
As amostras foliares dos cinco indivíduos utilizados foram coletadas em uma população natural de *E. uniflora* L. (Tabela 1) pertencentes a um fragmento florestal de Mata Atlântica, localizado na cidade de Herveiras (Figura 5), região central do estado do Rio Grande do Sul. As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel (CHASE et al., 2007) para desidratação até o momento da extração de DNA.

Tabela 1. Indivíduos utilizados na PCR.

Indivíduo	Coordenadas geográficas	
60	S29°26'42.7"	W052°41'52.3"
61	S29°26'42.8"	W052°41'52.7"
62	S29°26'42.9"	W052°41'52.8"
63	S29°26'42.6"	W052°41'52.9"
64	S29°26'42.5"	W052°41'52.3"

Fonte: do Autor, 2018.

Figura 5: Localização geográfica da população de *E. uniflora* L., coletada em fragmento florestal em área rural localizada no município de Herveiras - RS.



Fonte: Google Earth, 2018.

A extração do DNA total foi realizada de acordo com o método CTAB 2%, (DOYLE & DOYLE, 1987) com modificações. A qualidade do DNA isolado foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, e visualizada sob luz Ultra Violeta no L-PIX Molecular Imaging (Loccus®). A quantificação foi realizada a partir da razão de absorbância 260 nm a 280 nm (SAMBROOK & RUSSELL, 2001), em espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). As amostras foram purificadas com o reagente Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), seguindo especificações do fabricante, e armazenadas a temperatura de - 20°C a fim de evitar a degradação.

## 4.2 Teste amplificação

Para primeira avaliação dos 24 *loci*, foi realizada uma PCR em uma reação com volume final de 12,5 µL, contendo cerca de 50 ng de DNA, 0,25 µM de tampão, 0,5 µM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq DNA-Polymerase, 0,05 µM de cada dNTP, 0,125 µM de iniciador *forward*, 0,125µM de iniciador *reverse*, e 0,125 µM do iniciador M-13 (5'-

TGTAAAACGACGGCCAGT-3') marcado com fluorescência AlexaFluor 680 (Invitrogen®).

As amplificações foram realizadas em um termociclador BIO-RAD C1000 Touch™ Thermal Cycler (BioRad Co., Hercules, CA, USA). A etapa inicial foi a 94°C por 3 minutos, seguido de um período de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento foi por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, para um total de 34 ciclos, com uma extensão final de 72°C durante 10 minutos. A temperatura de anelamento foi ajustada reduzindo 4°C da temperatura determinada para os iniciadores, baseada nos comprimentos dos iniciadores e no conteúdo de bases C+G, através da fórmula:  $T_a = [2^\circ\text{C} (A + T) + 4^\circ\text{C} (G + C)] - 5^\circ\text{C}$ , afim de tornar a reação menos específica para visualização dos resultados.

Em um segundo momento, todos os *loci* foram submetidos a uma nova avaliação, desta vez realizando um teste de gradiente de temperatura. Com a finalidade de identificar a temperatura ótima de anelamento para cada *locus*, foram utilizadas as mesmas concentrações de reagentes da primeira avaliação, com adição de BSA 0,01% (Invitrogen®) para cada amostra. Desta vez utilizou-se a seguinte programação do termociclador: uma etapa inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de um período de desnaturação a 95°C por 45 segundos. Cada *locus* foi testado um gradiente contendo oito temperaturas de anelamento distintas, conforme o indicado na Tabela 2. Essa etapa ocorreu por 45 segundos, e a extensão a 72°C por 1 minuto, para um total de 39 ciclos com uma extensão final de 72°C durante 5 minutos, em um termociclador Biorad C1000 Touch™.

Tabela 2. Gradiente de temperatura de anelamento utilizada para cada *locus* avaliado, variando a intensidade de temperatura de A até H.

	Pit 26	Pit 32	Pit 34	Pit 38	Pit 48	Pit 53	Pit 57	Pit 64	Pit 66	Pit 71	Pit 72	Pit 77	
Gradiente de Temperatura °C	A	56	60	54	58	54	60	54	62	58	58	60	58
	B	55,6	59,6	53,6	57,6	53,6	59,6	53,6	61,6	57,6	57,6	59,6	57,6
	C	54,7	58,7	52,7	56,7	52,7	58,7	52,7	60,7	56,7	56,7	58,7	56,7
	D	53,1	57,1	51,1	55,1	51,1	57,1	51,1	59,1	55,1	55,1	57,1	55,1
	E	51,2	55,1	49,1	53,2	49,1	55,1	49,1	57,2	53,2	53,2	55,1	53,2
	F	49,6	53,6	47,6	51,6	47,6	53,6	47,6	55,6	51,6	51,6	53,6	51,6
	G	48,5	52,5	46,5	50,5	46,5	52,5	46,5	54,5	50,5	50,5	52,5	50,5
	H	48	52	46	50	46	52	46	54	50	50	52	50

	Pit 78	Pit 84	Pit 88	Pit 98	Pit 105	Pit 115	Pit 119	Pit 123	Pit 125	Pit 138	Pit 139	Pit 140	
Gradiente de Temperatura °C	A	60	54	56	58	60	58	58	58	56	58	62	60
	B	59,6	53,6	55,6	57,6	59,6	57,6	57,6	57,6	55,6	57,6	61,6	59,6
	C	58,7	52,7	54,7	56,7	58,7	56,7	56,7	56,7	54,7	56,7	60,7	58,7
	D	57,1	51,1	53,1	55,1	57,1	55,1	55,1	55,1	53,1	55,1	59,1	57,1
	E	55,1	49,1	51,2	53,2	55,1	53,2	53,2	53,2	51,2	53,2	57,2	55,1
	F	53,6	47,6	49,6	51,6	53,6	51,6	51,6	51,6	49,6	51,6	55,6	53,6
	G	52,5	46,5	48,5	50,5	52,5	50,5	50,5	50,5	48,5	50,5	54,5	52,5
	H	52	46	48	50	52	50	50	50	48	50	54	52

Fonte: do autor,

2018.

### 4.3 Avaliação de amplificação

A checagem de amplificação da primeira avaliação foi em eletroforese com gel de poliacrilamida 6%, utilizando sequenciador de DNA automático Li-Cor 4300 S (LiCor Inc., Lincoln, NB, USA). Os fragmentos amplificados foram visualizados com o auxílio do software SAGA GT (LiCor Inc.) Mais tarde para uma melhor avaliação a mesma reação foi conferida e avaliada em eletroforese horizontal com gel de agarose 2%, utilizando como referência um ladder de 100 pb (Ludwig Biotecnologia Ltda.), e as amostras foram coradas utilizando uma solução intercalante de DNA Gel Red, para visualização em transluminador de luz UV. (Figura 6).

### 4.4 Identificação da Origem dos loci

Para identificar a origem genômica de cada *locus* microssatélite foi realizada uma busca por sequências correspondentes no banco de dados *online* NCBI. As regiões contendo os *loci* microssatélites foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados utilizando da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). A plataforma *BLASTn 2.8.1* foi utilizada com a configuração (*Highly similar sequences - megablast*) para uma maior confiabilidade nos alinhamentos obtidos. Para determinar a origem genômica foram consideradas as seguintes informações: a porcentagem de identidade (*identities*) e a porcentagem de cobertura de consulta (*query cover*).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Amplificação dos microssatélites

A primeira avaliação feita com o gel de poliacrilamida sequenciador Li-Cor não permitiu obter uma leitura clara dos resultados, após a mesma reação foi conferida em gel de agarose, em que foi possível verificar uma má qualidade de amplificação. A partir disso foi realizada a segunda avaliação.

Dentre os 24 *loci* avaliados (Tabela 3), 12 apresentaram ótima amplificação, sendo eles: Pit 26, Pit 34, Pit 38, Pit 53, Pit 57, Pit 71, Pit 98, Pit 115, Pit 119, Pit 123, Pit 138 e Pit 140. Já os *loci* Pit 32, Pit 77, Pit 78, Pit 84 e Pit 105, apresentaram algumas observações, como bandas mais fracas e não tão evidentes, ou ainda amplificações inespecíficas, diferindo do tamanho do produto esperado, como é observado claramente no caso do Pit 48, Pit 84 e Pit 105 (Figuras 6.1, 6.3 e 6.4 respectivamente). É possível visualizar no gel a formação de várias bandas em temperaturas mais elevadas, especificamente nos géis do Pit 84 e 105, conforme Figura 6.3.

Por fim, conforme a análise realizada, foram descartados, por não apresentar sucesso de amplificação, os Pit 64, Pit 66, Pit 72, Pit 88, Pit 125 e Pit 139.

Tabela 3. Lista de marcadores avaliados com as respectivas sequências *Forward* e *Reverse*, temperatura de anelamento, tamanho do produto de amplificação estimado e, por fim, o motivo de repetição. De acordo com os resultados da análise: (\*) iniciadores que não apresentaram amplificação e (\*\*) iniciadores que necessitam de ajustes. Os demais foram considerados eficientes para utilização.

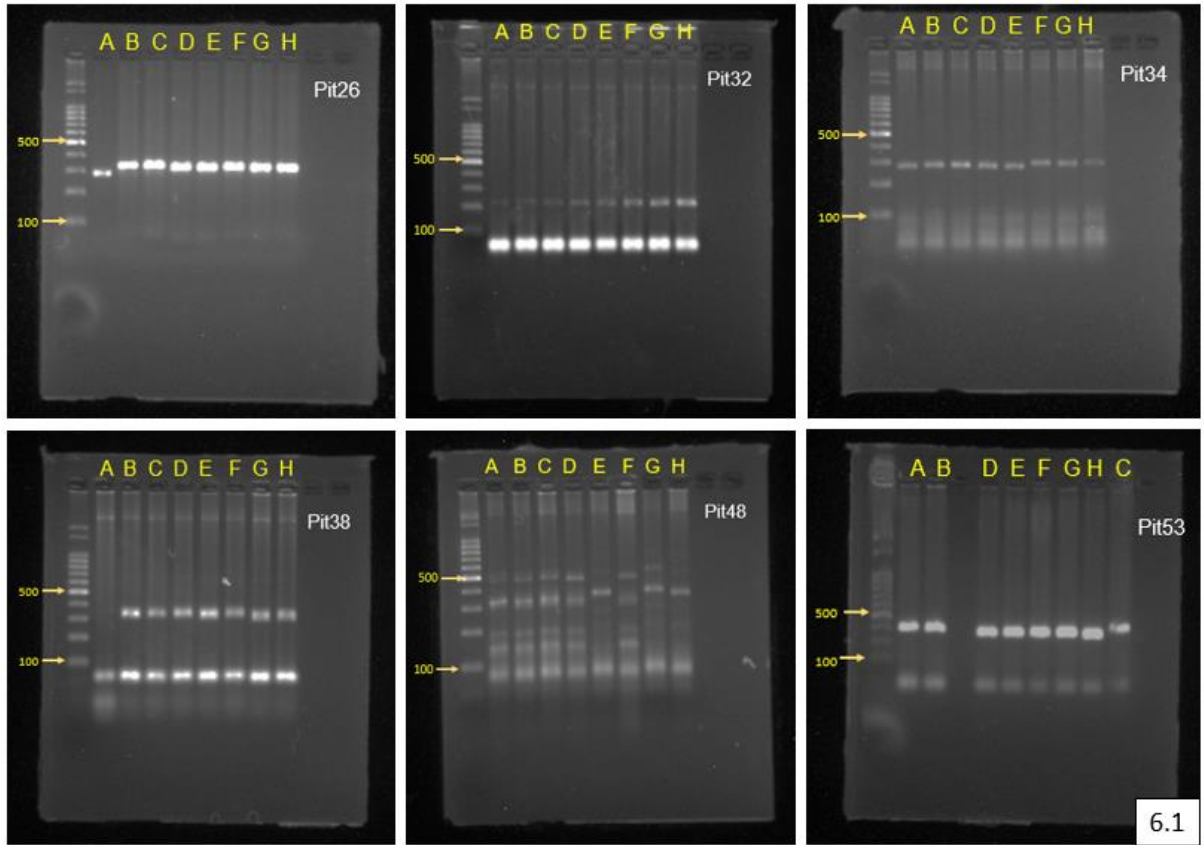
<i>Locus</i>	Iniciadores Forward/Reverse	TM °C	Tamanho do produto (prospectado)	Motivo de repetição
Pit 26	GCAGTAAGGTAACAAGAGAA TCCTGTTTTACAATGAAAGT	52	259	(AC)7
Pit 32**	TTCCAAGTTTCTATTTTCTG TGTGTGTGAGTACTTTTGTG	56	189	(TTC)7
Pit 34	TTGAACTACTCCTGAGAAA TGGAAGATTTTGTATTGT	50	242	(TC)6
Pit 38	GTAGGTATGTCTTCTTGGCT TAAAGAAGCTTTCTAACGAC	54	273	(AG)6
Pit 48**	ACATGTTATCTAAACCGAAA	50	123	(AAG)7

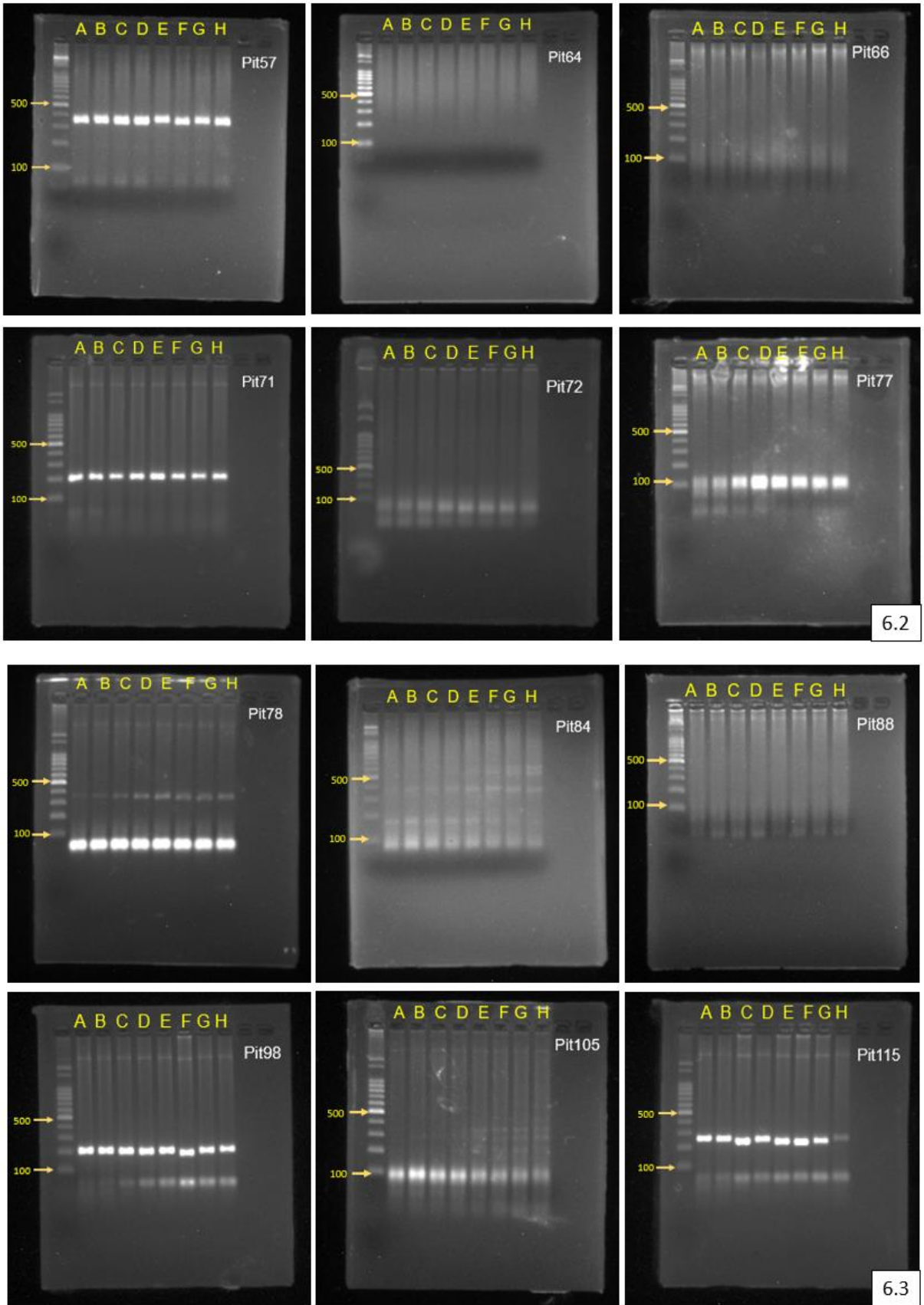


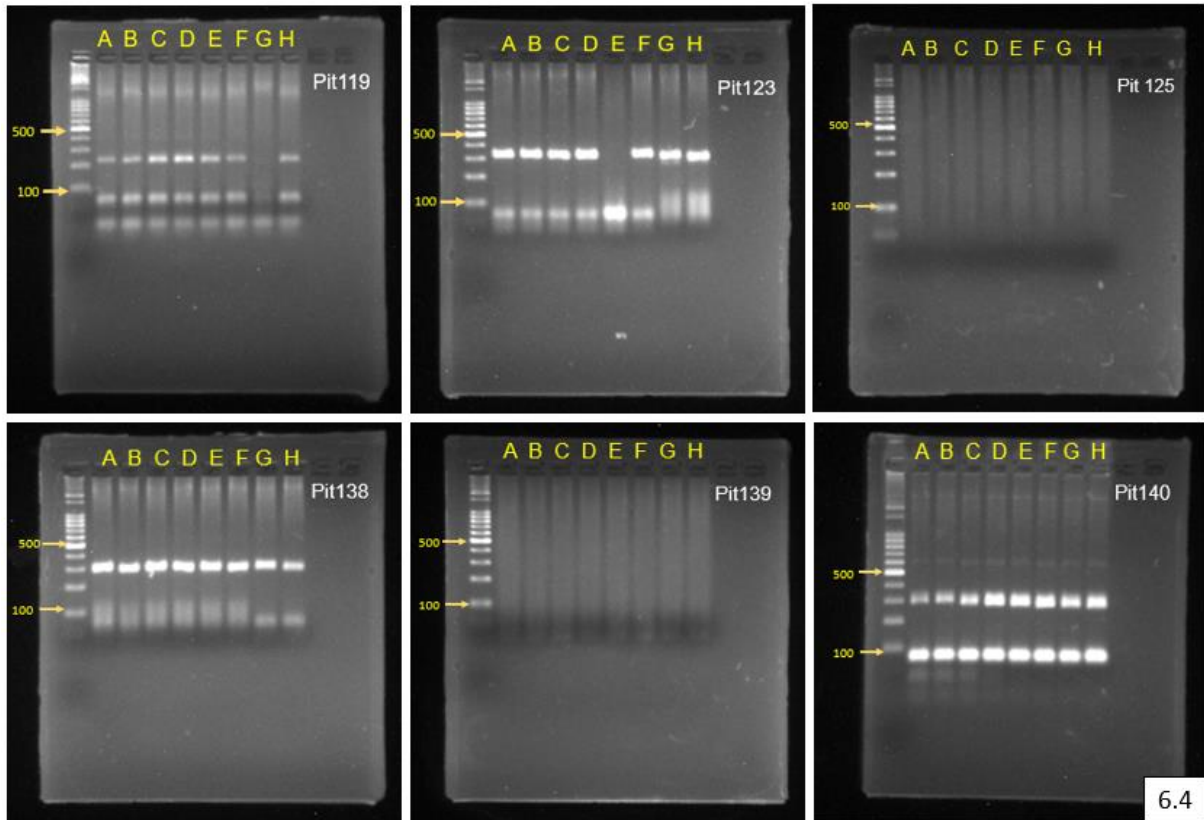
	ATTTGCAGATTAATGTTGTT			
Pit 53	AATAGCTTGGTAAACAAGTG AGTCTTAAGCTGTTTCCAGT	56	165	(AGC)8
Pit 57	TGATTTTTATGCTAGTGGAT TTTTGGCTTAATAAATATGG	50	276	(CTC)6
Pit 64*	AAAGCTAAAATTGAGCATAA CCACTCTTTCTCTCTCTCTT	58	259	(CT)7
Pit 66*	TTTCAAAGGAGTAAGAGTCA CTCAGTATTTGAAAGCAACT	54	269	(AT)6
Pit 71	TTGGTTTAGATTA AAAATCG AGTTAATGTCACAAGATCCA	54	173	(ATT)7
Pit 72*	GTTGAATGAGAAGAGTGATG GTA ACTAGATAAACGCCACA	56	279	(CT)6
Pit 77**	ATATTAAATTGGGTTTCCTT GATGTTCTCAAGAATCAAGA	54	155	(TC)8
Pit 78**	G TTCAGGTCATTTGACATAC GTATGTATTTGTGGCTCAGT	56	280	(CA)6
Pit 84**	ACAATCGAAACAAGAAGAG AGTCATGGCCTCTCAAT	50	259	(TCG)6
Pit 88	ATTGATAAGTTCATGTCCTG TATCTCTTTTCAATTTGTCGTT	52	200	(CT)7
Pit 98	ACACATTAATCTTCTGCAAC CATAAACAGATTTTACAGGG	54	167	(CAG)6
Pit 105**	CTTGACGAACGTAGATAGG CTTCACATTAGATGCTAACC	56	266	(CA)7
Pit 115	CTGGATTCATCATACTTTA AGGAGGTCACATTTCTTTAT	54	211	(AT)10
Pit 119	GTTTGCTCTATAATCACTGC TTACCTATGCTATTGTGGTT	54	182	(AGA)6
Pit 123	GTA ACTCAGTTTTTCAGCAAC AAATTACAGACACAATCCAG	54	268	(GA)8
Pit 125*	GATGGAAGTGAAGAAATTG TTTTGACTAAAGTCATGGAT	52	224	(TTC)7
Pit 138	GACAAGTGTCTTCTTGAC CTATCAAACACCTTCACCT	54	267	(GAA)7
Pit 139*	CTTTGATATGTTTTCCATGT ACAGACGCTATGGTAGTAGA	58	266	(AAT)6
Pit 140	CAGTATTTAGTAGGTGGTCG CTAGGACATTAGCTCAAAGA	56	260	(TC)10

Fonte: do Autor, 2018.

Figura 6: Perfil eletorético referente ao teste de gradiente de temperatura utilizado para a avaliação de amplificação dos *loci* em gel de agarose 2%. Setas amarelas (*ladder*) indicam o tamanho estimado em pb, as letras de A até H referem-se às diferentes temperaturas, seguido do nome do *locus* avaliado.







Fonte: do Autor, 2018.

## 5. 2 Identificação da Origem dos *loci*

A busca através do BLAST por alinhamentos das regiões contendo os *loci* microsatélites apresentou alta similaridade com regiões gênicas de *Eucalyptus grandis*, conforme TABELA 4. Esses *loci*, portanto, estão ligados a regiões codificantes e podem ser utilizados para estudos relacionados à adaptabilidade de populações a diferentes fatores ambientais ou produção de compostos secundários peculiares. Algumas sequências não apresentaram nenhum alinhamento, como é o caso das sequências: Pit 32, Pit 64, Pit 66, Pit 71, Pit 77, Pit 87 e Pit 88, que estão em regiões não expressas ou neutras do genoma.

Por outro lado, os *loci* Pit 48, Pit 57 e Pit 140 obtiveram alinhamento com sequências com expressões gênicas ainda não caracterizadas. Por fim as demais sequências SRR apresentaram alta similaridade com regiões gênicas codificantes, as quais em trabalhos futuros podem ser estudadas mais detalhadamente.

Foi realizada de forma preliminar uma rápida busca sobre a função das regiões encontradas no alinhamento, uma vez que este não era o enfoque do estudo. Para isso foram utilizados os bancos de dados *online Uniprot* (<https://www.uniprot.org/>), Gene Ontology ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)) e o Interpro ([www.ebi.ac.uk/interpro](http://www.ebi.ac.uk/interpro)).

A respeito das funções, de uma forma geral, nossos dados são relevantes e parecer ir ao encontro de alguns dados interessantes encontrados na literatura. Por exemplo, para o locus Pit 26 a proteína (FRIGIDA (LOC104456157), mRNA) expressa em *Arabidopsis thaliana* (Agrião-de-rato-orelha), é descrita como proteína nuclear, estando envolvida na regulação do tempo de floração e no fenótipo de floração, sendo um dos principais determinantes da variação natural no tempo de floração em plantas (JOHANSON et al., 2000).

Já para o Pit 34, o produto alinhado (mannose-1-phosphate guanyltransferase alpha (LOC104419311), transcript variant X2, mRNA), está relacionado a biossíntese de açúcares, metabolismo de frutose e manose, e processos de regulação de plantas assim como o Pit 38 (AT-hook motif nuclear-localized protein 15 (LOC104421912), transcript variant X1, mRNA). O locus Pit 53 (elta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (LOC104454339), mRNA), desempenha um papel fundamental na biossíntese da prolina, participando da osmorregulação nas plantas. O locus Pit 98 (transcriptional corepressor SEUSS (LOC104450883), transcript variant X2, mRNA), está envolvido nos estágios iniciais do desenvolvimento de meristemas florais (FRANKS et al., 2002; SRIDHAR et al., 2004).

O locus Pit 115 (DNA mismatch repair protein MSH6 (LOC104426818), mRNA), componente do sistema de reparo de incompatibilidade de DNA pós-replicativo (MMR). E por fim, o locus Pit 138 (probable L-type lectin-domain containing receptor kinase S.7 (LOC104434067), mRNA) o qual merece uma atenção especial devido à possibilidade de estar envolvido na resposta de resistência aos oomicetos patogênicos *Phytophthora infestans* e *Phytophthora capsici*, em estudos também envolvendo *A. thaliana* (WANG et al., 2014).

Tabela 4. Resultados da busca por alinhamentos dos *loci* desenvolvidos para *E. uniflora* L. através de análise com o banco de dados do BLASTn de alta similaridade.

<i>Locus</i>	N <sup>o</sup> de acesso	Tamanho de pb	Região repetida pb	Blast – Alinhamento	N <sup>o</sup> de acesso	Query cover	Identidade
Pit26	KT873908	1044	176 - 189	Eucalyptus grandis protein FRIGIDA (LOC104456157), mRNA	XM_010070897.2	67%	636/719 (88%)
Pit32	KT873912	1052		não houve alinhamento			
Pit34	KT873914	1055	662 - 673	Eucalyptus grandis mannose-1-phosphate guanyltransferase alpha (LOC104419311), transcript variant X2, mRNA	XM_010030942.2	43%	395/465(85%)
Pit38	KT873917	1069	213 - 224	Eucalyptus grandis AT-hook motif nuclear-localized protein 15 (LOC104421912), transcript variant X1, mRNA	XM_018864558.1	20%	190/242(79%)
Pit48	KT873923	1093	89 - 109	Eucalyptus grandis uncharacterized protein At3g06530 (LOC104449943), mRNA	XM_010064278.2	25%	161/175(92%)
pit53	KT873925	1107	142 - 165	Eucalyptus grandis delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (LOC104454339), mRNA	XM_010069154.2	19%	72/74(97%)
Pit57	KT873929	1119	384 - 401	Eucalyptus grandis uncharacterized LOC104449898 (LOC104449898), transcript variant X3, mRNA	XM_010064204.2	24%	140/149(94%)
Pit64	KT873935	1135	1027 - 1040	não houve alinhamento			
Pit66	KT873937	1138	888 - 899	não houve alinhamento			
Pit71	KT873941	1150	333 - 353	não houve alinhamento			
Pit72	KT873942	1150	706 - 717	Eucalyptus grandis probable receptor-like protein kinase At2g42960 (LOC104425048), transcript variant X2, mRNA	XM_010037622.2	46%	172/179(96%)
Pit77	KU519441	1168	895 - 910	não houve alinhamento			
Pit78	KU519442	1174	244 - 255	Eucalyptus grandis protein CROWDED NUCLEI 1 (LOC104422081), mRNA	XM_010034307.2	73%	645/699(92%)

Pit84	KU519447	1222	1150 - 1167		não houve alinhamento			
Pit88	KU519451	1238	792 - 805		não houve alinhamento			
Pit98	KU519459	1281	90 - 107	Eucalyptus grandis transcriptional corepressor SEUSS (LOC104450883), transcript variant X2, mRNA	XM_018876218.1	52%	207/216(96%)	
Pit105	KU519462	1302	114 - 127		não houve alinhamento			
Pit115	KU519468	1377 bp	205 - 224	Eucalyptus grandis DNA mismatch repair protein MSH6 (LOC104426818), mRNA	XM_010039982.2	22%	101/102(99%)	
Pit119	KU519471	1408 bp	875 - 892	Eucalyptus grandis zinc finger CCCH domain-containing protein 45 (LOC104441828), transcript variant X4, mRNA	XM_010055071.2	4%	58/59(98%)	
Pit123	KU519474	1441 bp	346 - 361	Eucalyptus grandis N-alpha-acetyltransferase 50 (LOC104437074), mRNA	XM_010049954.2	49%	522/594(88%)	
Pit125	KU519476	1463 bp	431 - 448	Eucalyptus grandis zinc finger protein 598 (LOC104424638), mRNA	XM_010037108.2	20%	176/188(94%)	
Pit138	KU519487	1681 bp	1585 - 1605	Eucalyptus grandis probable L-type lectin-domain containing receptor kinase S.7 (LOC104434067), mRNA	XM_010047023.2	99%	1510/1681(90%)	
Pit139	KU519488	1697 bp	591 - 608	Eucalyptus grandis E3 ubiquitin-protein ligase listerin (LOC104422342), transcript variant X3, misc_RNA	XR_721189.2	59%	476/522(91%)	
Pit140	KU519489	1731 bp	779 - 798	Eucalyptus grandis uncharacterized LOC104433959 (LOC104433959), transcript variant X3, misc_RNA	XR_001984889.1	11%	176/196(90%)	

---

Fonte: do autor, 2018.

## 6 DISCUSSÃO

A primeira avaliação realizada com a amplificação no sequenciador Li-Cor com o gel de poliacrilamida, não permitiu obter uma leitura clara dos resultados. Por esta razão, a mesma reação foi conferida em eletroforese horizontal em gel de agarose, em que foi possível comprovar de forma mais evidente uma má qualidade de amplificação, tornando difícil a confirmação dos resultados e, por fim, até de forma dúbia e/ou incorreta sobre a qualidade dos marcadores testados.

A partir disso é importante inferir algumas possíveis causas para este resultado negativo, como: DNA degradado ou em concentrações inadequadas; presença de contaminantes; utilização de temperatura de anelamento desfavorável para a amplificação; troca de reagentes estoques ou diluições durante a realização do mix de reação; exposição a contaminantes externos; dentre outros (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). A importância destes pontos já foi reportada em certos estudos, como o de GRUNDMANN et al., (1997), que concluíram que utilizando reagentes padrão, de qualidade controlada, protocolos de extração de DNA e condições de amplificação padronizadas, é possível ultrapassar os problemas de reprodutibilidade em diferentes laboratórios.

Diferindo do resultado anterior, na segunda avaliação referente ao teste de gradiente de temperatura com adição de BSA (Albumina de soro bovino) houve uma maior qualidade da amplificação, pois foi possível perceber claramente a presença de bandas bem definidas e “brilhantes” no gel. Estando de acordo com FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1996), que afirmam que a adição de BSA resulta em amplificações com bandas mais intensas, em maior homogeneidade entre as amostras e principalmente na eliminação de reações falhas. Isto porque o BSA é utilizado como estabilizador de atividades enzimáticas contra a desnaturação durante o armazenamento, diluições ou reações *in vitro*. Quando há a presença de proteinases e de compostos fenólicos, o BSA atua como alvo e também age como estabilizador da DNA polimerase. Neste mesmo sentido CARVALHO & VIEIRA (2001) confirmaram a eficiência da adição de BSA em testes de PCR, com marcadores moleculares do tipo RAPD.

Ainda em relação a avaliação do gradiente de temperatura, havia a expectativa de obtenção de uma diferença significativa entre as bandas amplificadas



conforme a variação de temperatura aplicada. De modo geral, desde a temperatura mínima até a máxima utilizadas o padrão de bandas apresentou-se muito similar. Desta forma pode-se confirmar a eficiência da temperatura recomendada no momento da obtenção dos referidos marcadores.

Comparando a avaliação *in silico* realizada por SARZI (2017), e o teste de amplificação, houve uma certa correspondência entre ambos. Como no caso dos *loci* Pit 48, Pit 84 e Pit 105 que, em ambos os testes, apresentaram muitas bandas inespecíficas.

Esta análise torna-se de suma importância uma vez que os iniciadores prospectados para estes *loci* foram validados somente *in silico*, isto é, por meio do uso de softwares de computador específicos para isso, porém estes não conseguem retratar fielmente a prática laboratorial, onde há vários fatores que podem interferir ou atrapalhar no funcionamento adequado desta ferramenta.

Levando em considerando o número de 12 marcadores diretamente indicados como “aptos”, e ainda somado à possibilidade de testar novas estratégias, a fim de otimizar os outros seis que apresentaram necessidade de alguns ajustes, apresentamos aqui um número significativo de marcadores moleculares, indicando esta ferramenta como promissora para aplicações futuras, uma vez que se tem registros na literatura de estudos referentes à dinâmica populacional utilizando por volta de 10 marcadores moleculares.

Este resultado está de acordo com o trabalho realizado por LEMOS et al. (2018), onde foram utilizados praticamente as mesmas metodologias empregadas por SARZI (2017). Neste estudo foram desenvolvidos 69 marcadores SSR, dos quais, após avaliação *in silico*, foram prospectados 30 iniciadores. O resultado após validação em laboratório foi de 24 *loci* que obtiveram sucesso de amplificação.

Relacionando às buscas por alinhamentos com as sequências microssatélites, é importante ressaltar os resultados encontrados, ainda que de forma preliminar. Sugere-se uma alta similaridade entre as sequências da espécie *Eugenia uniflora* L. com as disponíveis de *E. grandis*. Isto mostra uma grande possibilidade da transferência desses marcadores para espécies correlacionadas, estando de acordo com trabalho realizado por SILVA (2016). Além disso, em nossa análise preliminar, as sequências tiveram suas funções relacionadas a rotas

bioquímicas e metabólicas que fazem parte dos processos de desenvolvimento das plantas, assim como descrito por SANTOS (2010), que encontrou a função de sequências microssatélites de aveia alinhadas com uma espécie de arroz e também *Arabidopsis thaliana*.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados deste estudo foi possível verificar a eficiência dos marcadores moleculares desenvolvidos, confirmando assim a possibilidade de seu uso como uma ferramenta eficiente para estudos genéticos, principalmente para entender de forma mais clara a biologia da espécie *E. uniflora* e de outras espécies nativas geneticamente aparentadas. É fundamental o desenvolvimento de mais estudos sobre as funções das regiões codificantes relacionadas às sequências alinhadas, a fim de atestar a funcionalidade dos marcadores avaliados. Para isso, devem ser realizados testes de transferibilidade para as demais espécies de interesse dentro da família Myrtaceae. Sendo assim, pode-se explorar as várias aplicações que os marcadores SSR apresentam, uma vez que se mostram ferramentas eficazes para pesquisas que visam compreender e explicar como ocorre a dinâmica populacional das espécies, quais os efeitos observados a partir dos processos de fragmentação de habitat e degradação ambiental.

## REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Editora UFV. 574 p. 1998.

BICUDO, L. P. B. Essências indicadas para margem de represa com piscicultura. **Brasil Florestal**, Rio de Janeiro, v 4, n. 13, p. 27-28. 1973.

CARDOSO, C. M. V.; SAJO, M. G. Nervação foliar em espécies brasileiras de Myrtaceae. Adans. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v.20, n.3, p. 657-669, 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. 1 ed. V. 2, Brasília: Embrapa, 627 p. 2006.

CARVALHO, ALFREDO O.R. DE CARVALHO. VIEIRA, LUIZ G. SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY Determinação das Condições Ótimas para Análises de PCR-RAPD em *Atta Sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae ). **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 593–600, 2001.

CHASE, M. W., HILLS, H. H., MAY, N. Silica Gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. **Taxon**, 40, p. 215-220, 2007.

CHOUDHARY, O.M. TRIVEDI, S. Microsatellite or Simple Sequence Repeat (SSR) instability depends on repeat characteristics during replication and repair. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v.8, n.2, p.21-34, 2010.

COSTELLA, E.; GARCIA, L.S.C.; CORNELEO, N.S.; SCHÜNEMANN, A.L.; STEFENON, V.M. Anthropogenic use of gallery forests in the Brazilian Pampa. **Biological Sciences**, v.35, p.211- 217, 2013.

DAVIES, K. **The \$1,000 Genome: The Revolution in DNA Sequencing and the New Era of Personalized Medicine**. 1 ed. New York: Free Press. 342p., 2010.

DEMATTE, M. E. R. P. Ornamental use of Brazilian Myrtaceae. **Acta Horticulturae**, v.452, p.143-179, 1997.

DOYLE J.D.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v19, p.11-15, 1987.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas Brasileiras**. Jaboticabal: Funep, 288 p., 2002.

FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIRES, J. L.; BAHIA, R. C. S.; SANTOS, R. S.; GOMES, L. M. C.; ARAÚJO, I. S.; FALEIRO, A. S. G.; GRAMACHO, K. P.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; VALLE, R. R. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores moleculares RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotópica**, Itabuna, v. 13. p 79-86, 2001.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotópica**, Itabuna, v. 15, p. 41-46, 2003.

FALEIRO, A. S. G. SANTOS, M. C. M. Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. Viçosa. v. 4. p. 227-233, 2004.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genéticos-moleculares: aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1 ed. Planaltina, DF: Embrapa, 102 p. 2007.

FERREIRA, M. E.; & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p. 1996.

FERREIRA, M. E.; & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p. 1998.

FERRETTI, A. R.; KAGEYAMA, P. Y.; ÁRBOCZ, G. de F.; SANTOS, J. D. dos.; BARROS, M. I. A. de.; LORZA, R. F.; OLIVEIRA, C. de. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecológicos para revegetação com nativas no Estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v.3, n. 7, p 73-84, 1995. ]

FRANKS, R. G.; WANG, C.; LEVIN, J. Z. LIU, Z. SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG. **Development** (Cambridge, England), [s. l.], v. 129, n. 1, p. 253–63, 2002.

GRESSLER, E. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.29, n.4, p.509-530, 2006.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM L. R.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C. E. B.; SILVA, L. H. S.; WILSON, P. G.; LUCAS, E. J. World checklist of Myrtaceae. Kew Publishing, **Royal Botanic Gardens**.2008.

GUILHERME, F.A.G., MORELLATO, L.P.C. & ASSIS, M.A. Horizontal and vertical tree community structure in a lowland Atlantic rain forest, Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** 27:725-737. 2004.

GRUNDMANN, H. J.; TOWNER, K. J.; DIJKSHOORN, L.; GERNER-SMIDT, P.; MAHER, M.; SEIFERT, H.; et al. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. **J Clin Microbiol**. Dec; 35 (12): 3071-7. 1997

HENRIQUES, A T.; SOBRAL, M.; CAUDURO, A. D.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.; LAMATY, G.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Aromatic plants from Brazil. II. The chemical composition of some *Eugenia* oils. **Journal of Essential Oil Research**, 5:501-505. 1993.

INTERPRO - Protein sequence analysis & classification. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> Acesso em: 20 nov. 2018.

JOHANSON, U. WEST, J. LISTER, C. MICHAELS, S, AMASINO, DEAN, C. Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. **Science** (New York, N.Y.), [s. l.], v. 290, n. 5490, p. 344–7, 2000.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. de. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica**, [s. l.], v. 12, n. 32, p. 65–70, 1998.

KEPHART, S. R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, Bronx, v. 77. p. 693-712. 1990.

KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature**, v.217, p. 624-626, 1968.

LANDRUM, L. R.; & KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil - an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* 49:508-536, 1997.

LEGRAND, C. D. & KLEIN, R. M. Mirtáceas. In: REITZ, P. R. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí - SC: **Herbário Barbosa Rodrigues**, p.46-216, 1969.

LEMOS, R. et al. Characterization of Plastidial and Nuclear SSR Markers for Understanding Invasion Histories and Genetic Diversity of *Schinus molle* L. **Biology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 43, 2018.

LIRA JÚNIOR, J. S.; BEZERRA, J. E.; LEDERMAN, I. E.; SILVA JÚNIOR, J. F. Pitangueira. **Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA**, v.2007, p.1-87, 2007.

LITT, M. & LUTH, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of human Genetics**, Atlanta, v. 44, p. 398-401, 1989.

LONGHI, R. A. **Livro das árvores arvoretas do sul**. Porto Alegre, L & PM. 174 p. 1995.

LOPEZ, J. A.; LITTLE, E. L.; RITZ, G. F.; ROMBOLD, J. S.; HAHN, W. J. Arboles Comunes del Paraguay: ñande yvyra mata Kuera. Washington: **Peace Corps**, 425p. 1987.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 512p. 2002.

MARCHIORI, J.N.C. & SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas – Myrtales**. Editora da UFSM, Santa Maria. 1997.

MAY, B. Starch gel electrophoresis of allozymes In: HOELZEL, A . R. (Ed.) Molecular genetic analysis of populations: a practical approach. **Oxford University**. p. 1-27. 1992.

MAZINE F. F.; SOUZA V. C.; SOBRAL, M.; FOREST, F. LUCAS, E. A preliminary phylogenetic analysis of *Eugenia* (Myrtaceae: Myrteae), with a focus on Neotropical species. **Kew Bull.** 69: 1-14. 2014. Doi: 10.1007/s12225-014-9497-x

MEHLENBACHER, S.A. Classical and molecular approaches to breeding fruit and nutcrops for disease resistance. **Hortscience**, Alexandria, v.30, n.3, p.466-477, 1995.

MMA (Ministério do Meio Ambiente) Fragmentação de Ecossistemas: Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas / Denise Marçal Rambaldi, Daniela Mérica Suárez de Oliveira (orgs.) Brasília: **MMA/SBF**, 2003. 510 p.

MORGANTE, M. & OLIVIERI, A. M. PCR - amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Hestington, v. 3, p. 175-182. 1993.

PEIXOTO, A.L. & GENTRY, A.H. 1990. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). **Revista Brasileira de Botânica** 13:19-25.

QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E. HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 8, p. 285-288, 1993.

ROMAGNOLO M. B. & SOUZA M.C.D. O Gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 20: 529-548. 2006.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.1, p.15-22, 2002.

SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J. F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from Brazilian coastal Atlantic forest. **Diversity and Distributions** 10: 201-210, 2004.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: a laboratory manual. Nova York: **cold Spring Harbor laboratory Press**, 3<sup>a</sup> ed.



SANTOS, F. F. dos. Validação de marcadores microssatélites derivados de regiões funcionais do genoma de aveia. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), da Universidade Federal de Pelotas, 2010.

SARZI, D. S.; JUSTOLIN, B.; DA SILVA, C.; LEMOS, R. P. M.; STEFENON, V.M. Discovery and characterization of SSR markers in *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) using low coverage genome sequencing. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. No prelo.

SARZI, D. S. Sequenciamento parcial do genoma de *Eugenia uniflora* L. e desenvolvimento de marcadores microssatélites. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2017.

SILVA, C. validação *in silico* de marcadores SSR de *Eugenia uniflora* e transferibilidade para sete espécies de *Eucalyptus*. 52f. Trabalho de conclusão de curso (Biotecnologia), Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2016.

SOARES-SILVA, L. H. A família Myrtaceae – subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na bacia hidrográfica do Rio Tibagi, estado do Paraná, Brasil. 2000. 462f. Tese. (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.

SRIDHAR, V. V.; SURENDRARAO, A.; GONZALEZ, D.; CONLAN, R. S.; LIU, Z. Transcriptional repression of target genes by LEUNIG and SEUSS, two interacting regulatory proteins for *Arabidopsis* flower development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 101, n. 31, p. 11494–9, 2004.

TABARELLI, M. & MANTOVANI, W. A riqueza de espécies arbóreas na floresta atlântica de encosta no estado de São Paulo (Brasil). **Revista Brasileira de Botânica** 22:217-223. 1999.

The Gene Ontology. Disponível em: <http://www.geneontology.org/> Acesso em: 20 de nov. 2018.

The UniProt Consortium UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Res.** 45: D158-D169. 2017.

WANG, M. L.; BARKLEY, N. A.; JENKINS, T. M. Microsatellite markers in plants and insects. Part I: Applications of biotechnology. **Genes, genomes and genomics** v.3, p.54-67, 2009.

WANG, Y.; BOUWMEESTER, K.; BESEH, P.; SHAN, W.; GOVERS, F. Phenotypic Analyses of Arabidopsis T-DNA Insertion Lines and Expression Profiling Reveal That Multiple L-Type Lectin Receptor Kinases Are Involved in Plant Immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. [s. l.], v. 27, n. 12, p. 1390–1402, 2014.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J.; Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Syst Evol**. 251:3–19. 2005.

YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. Forest fragmentation. In: YOUNG, A. G., BOSHIER, D.; BOYLE, T. J. Forest conservation genetics: principles and practice. Melbourne: **CSIRO Publishing**, p. 123-134. 2000.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genet. Mol. Biol**. 26: p. 449-457. 2003.