

Universidade Federal do Pampa

Deise Schröder Sarzi

**SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENOMA DE *Eugenia uniflora* L. E
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação de Mestrado

São Gabriel

2017

DEISE SCHRÖDER SARZI

**SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENOMA DE *Eugenia uniflora* L. E
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Strito Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Valdir Marcos Stefenon

**São Gabriel
2017**

DEISE SCHRÖDER SARZI

**SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENOMA DE *Eugenia uniflora* L. E
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação
Stricto Sensu em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pampa, como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética e Ecologia
Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 17 de Fevereiro de 2017.
Banca examinadora:

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon
Orientador UNIPAMPA

Prof. Dr. Luiz Fernando Würdig Roesch
UNIPAMPA

Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victória
UNIPAMPA

Ao meu irmão Augusto e meu avô, José *in memoriam*, dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Leane e Anselmo, pela ajuda financeira e por me apoiarem nas minhas decisões mesmo quando não compreendiam, por terem me ajudado a ser o que sou hoje e por todas as oportunidades de aprendizado que me proporcionaram, desde os ensinamentos sobre uma plantinha até conhecimentos de medicina e mecânica. Foram vocês os primeiros professores que fizeram com que eu tivesse a curiosidade sobre todas as coisas.

Ao Ferdinando, por ter sido muito mais que um companheiro maravilhoso. Foi você que esteve junto em todos os momentos difíceis, sempre me dando todo o apoio que precisei, me incentivando e acreditando em mim. Aprendi e espero continuar aprendendo muito com você. Sem todo seu apoio tudo teria sido muito mais difícil. Obrigada por tudo.

Agradeço também aos que se tornaram familiares durante toda essa caminhada, principalmente à Dona Elsa, seu Edison, Zulma, Fabiano, Flaviana, Lucas, Rafinha, Brisa, Vitor e Gean. Vocês são os amigos que eu adotei como família e se tornaram imprescindíveis.

Às minhas coorientadas Natália, Clariane e Beatriz, pela companhia durante a pesquisa, pelos questionamentos científicos, pelo aprendizado e troca de experiências e principalmente por tornarem todos os dias de trabalho muito mais alegres e divertidos. Vocês colaboraram muito para o meu amadurecimento como pessoa, como profissional e também me fizeram perceber a importância e a beleza do ensinar/aprender.

Aos meus professores, que sempre me proporcionaram experiências, instigaram a curiosidade e presentearam com seu conhecimento, em especial ao professor Valdir, pela amizade, orientação, dedicação, por todos os seus ensinamentos e por toda a ajuda e compreensão sempre que precisei, não importando o tamanho das pilhas de documentos administrativos para assinar, horário ou dia da semana. Agradeço imensamente por ter tido essa oportunidade!

Ao Rafael pela coorientação em todos os momentos de perrengue e ensinamentos de laboratório e à Cristiane pelos ótimos momentos de discussão sobre assuntos científicos (e não científicos).

À minha professora da graduação Janaina, por ter sido uma das professoras mais especiais que já tive, tendo contribuído muito para minha formação.

Ao meu avô José Sarzi por me ensinar a enxergar a beleza das “insignificâncias” e das coisas “desimportantes” e ao meu irmão Augusto por ser sempre essa “coisinha mais linda da mana” que eu amo mais que tudo e que sempre estava com os ouvidos atentos e os olhinhos brilhando enquanto eu contava sobre algo que aprendi.

Aos técnicos que colaboraram na resolução de problemas que surgiram com o tempo, em especial ao Jardel, Jamerson, Adriano e Adriana.

À Lilian, minha coorientadora durante o período de graduação, que foi mais que fundamental para a realização deste trabalho.

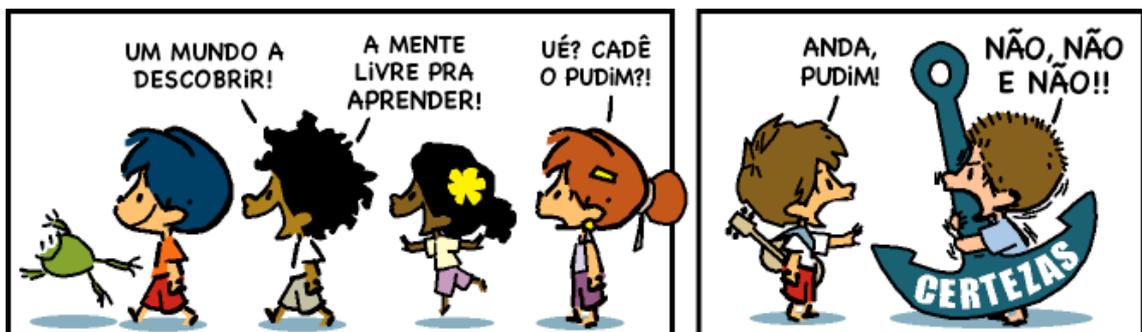
Aos professores Victor, Luiz e Filipe pelas contribuições para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Pampa, que foi como uma segunda (às vezes primeira) casa durante esses seis anos de jornada.

Aos membros do NuGEM e NCTV pelas diversas horas de aprendizado, apoio e descontração.

À mim mesma, por ter desafiado minhas inseguranças, por ter acreditado e resistido aos necessários momentos tempestades improdutivas e por ter abertura para evoluir.

A todos que de alguma forma colaboraram para este trabalho, deixo o meu **MUITO OBRIGADA**, pois o que consta nestas páginas é a soma de todos vocês!



Fonte: Armandinho.

"Crer é muito monótono. A dúvida é apaixonante."

Oscar Wilde

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA- Ácido desoxirribonucleico

NGS- Sequenciamento de nova geração

NCBI- National Center for Biotechnology Information

SSR- Sequências Simples Repetidas

pb- Pares de base

PCR- Reação em cadeia da polimerase

Sumário

AGRADECIMENTOS	5
1. Introdução	13
1.1. <i>Eugenia uniflora</i>	13
Figura 1: Flores (A – Fonte: José Lira Jr.); frutos (B – Fonte: Arnaldo Silva) e folhas (C – Fonte: Forest e Kim Starr) de <i>E. uniflora</i>	14
1.2. Sequenciamento de nova Geração.....	16
1.3. Marcadores SSR.....	18
1.4. Genética de populações.....	19
2. OBJETIVOS	20
3. SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENOMA DE <i>Eugenia uniflora</i> L.	21
RESUMO.....	21
INTRODUÇÃO	21
METODOLOGIA	22
<i>Amostragem e extração de DNA</i>	22
<i>Next Generation Sequencing</i>	22
<i>Análise de dados</i>	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
Figura 1. Melhores alinhamentos (hits) gerados por meio de Blastp por espécie, sendo <i>Eucalyptus grandis</i> a espécie que obteve os melhores alinhamentos.....	24
Figura 2. Resultados da anotação funcional através do software Blast2go com a utilização dos termos do Gene Ontology (GO) de nível 2 para os genes putativos preditos para <i>Eugenia uniflora</i> . As barras dos gráficos apresentam o número de sequências identificadas para cada uma das categorias funcionais de Processos Biológicos (PB), Funções Moleculares (MF) e Componentes Celulares (CC).....	26
Figura 3. Resultados da anotação funcional detalhada através do software Blast2go com a utilização de Blastp e dos termos GO de nível 2 para os genes putativos preditos para <i>Eugenia uniflora</i> . As barras dos gráficos apresentam o número de sequências identificadas para cada uma das categorias funcionais de Processos Biológicos (PB), Funções Moleculares (MF) e Componentes Celulares (CC). * Aproximadamente 960 sequências foram classificadas como ‘outras’. ** Aproximadamente 740 sequências foram classificadas como ‘outras’.....	27
Figura 4. Distribuição das classes enzimáticas Identificadas nos genes putativos anotados para <i>Eugenia uniflora</i>	28

Figura 5. Resultados da anotação funcional detalhada através do software Blast2go através de Blastn com a utilização dos termos GO de nível 2 para a categoria de Processos Biológicos para o genoma total de <i>Eugenia uniflora</i>	28
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS.....	29
Tabela 1. Primers desenvolvidos para <i>Eugenia uniflora</i> que apresentam similaridade com regiões gênicas de <i>Eucalyptus grandis</i> através de análise com o banco de dados do Blastn de alta similaridade.....	32
4. MICROSATELLITE MARKERS DISCOVERY AND CHARACTERIZATION IN <i>Eugenia uniflora</i> L. MYRTACEAE	34
Abstract.....	34
Resumo	34
Acknowledgements.....	38
References.....	38
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS	53
Anexo 1: Carta de Submissão do artigo – Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.....	53
Anexo 2: Lista de primers validados in silico com as respectivas sequencias forward e reverse, o tipo de motivo e o número de acesso ao GenBank. De acordo com a validação: (*)primers que necessitam de ajustes para testes em laboratório e (**)primers a serem descartados para testes em laboratório. Os demais primers foram considerados ótimos para testes em laboratório.....	54
Anexo3: Validação dos primers em gel virtual	59

RESUMO

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica amplamente explorada para fins farmacológicos e econômicos. Porém, existem poucos estudos sobre sua ecologia, diversidade genética e sobre seu genoma. Para uma espécie nativa ser explorada comercialmente são necessários conhecimentos básicos de ecologia e genética para não comprometer a espécie. O objetivo desse trabalho foi gerar conhecimentos básicos sobre o genoma de *E. uniflora* e desenvolver marcadores microssatélites que permitam ampliar a realização de estudos de genética de populações para esta espécie. Foi realizado o sequenciamento parcial do genoma de *E. uniflora* por meio da plataforma Ion Torrent PGM™, além da busca de marcadores microssatélite. Do sequenciamento obtivemos cerca de 1,4x de cobertura do genoma estimado de *E. uniflora*, com 1836 regiões gênicas preditas (incluindo genes parciais), sendo em sua maioria genes relacionados a atividades essenciais à célula, contudo algumas sequências mostraram estar relacionadas ao metabolismo secundário. Um total de 111 marcadores microssatélites foram caracterizados, sendo destes 12 validados em laboratório e 99 *in silico*. Os marcadores desenvolvidos e testados em laboratório mostraram ser eficientes na obtenção de dados genéticos de uma população natural testada. Dos marcadores validados *in silico*, 74 tem grande potencial para estudos de diversidade genética e podem ser testados em laboratório, apenas necessitando de ajustes na temperatura de anelamento. Os marcadores desenvolvidos neste trabalho mostram ser eficientes no fornecimento de dados de diversidade genética, sendo extremamente úteis em trabalhos futuros que visem avaliar a história evolutiva e a dinâmica das populações, permitindo assim a adoção de medidas corretas de manejo e conservação.

Palavras-chave: Pitanga; Genética de populações; SSR; Next Generation Sequencing.

ABSTRACT

Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) is a tree species native to the Atlantic Forest widely exploited for pharmacological and economic purposes. However, there are few studies about its ecology, genetic diversity and on its genome. Basic knowledge of ecology and genetics is needed for a native species being commercially exploited without compromising it. The aim of this study was to generate ground knowledge about the genome of *E. uniflora* and to develop microsatellite markers that allow increasing the studies on population genetics of this species. We performed the sequencing of the partial genome of *E. uniflora* through Ion Torrent PGM™ platform, beyond the search of polymorphic microsatellite markers. From the sequencing, we obtained about 1.4x coverage of *E. uniflora* estimated genome, with 1836 predicted genes (including partial genes) mainly related to essential cell activities, with some sequences related to secondary metabolism. A total of 111 microsatellite markers were characterized out of which 12 were validated in laboratory and 99 *in silico*. The markers developed and tested in laboratory showed to be efficient in assessing genetic information from the natural population evaluated. From the *in silico* validated markers, 74 have great potential for genetic diversity studies and have to be tested in laboratory, requiring adjustments in the annealing temperature. The markers developed in this work show to be efficient in providing genetic diversity data, being extremely useful in future works that aim to evaluate the evolutionary history and the dynamics of the populations, thus allowing the adoption of correct management and conservation measures.

Key-words: Brazilian cherry; Population genetics; SSR; Next Generation Sequencing.

1. Introdução

1.1. *Eugenia uniflora*

Eugenia uniflora L., popularmente conhecida como pitanga, pertence à família Myrtaceae e é uma espécie arbustiva com ampla distribuição em toda a América do Sul, estando presente nos biomas Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado e Pampa, distribuída nos mais diversos tipos de solo, tendo apenas baixo desenvolvimento em solos salinos (DONADIO *et al.*, 2002; COSTELLA *et al.*, 2013; DEMATTÊ, 1997; LIRA JÚNIOR *et al.*, 2007). Todos esses biomas apresentam alta taxa de desmatamento, e estima-se que reste apenas 12,5% da cobertura vegetal original da Mata Atlântica (SOS MATA ATLÂNTICA, 2016), menos de 20% para o cerrado (MYERS *et al.*, 2000), menos de 50% para a Caatinga (KILL *et al.*, 2007) e menos de 36,03% para o Pampa (CSR/IBAMA, 2010), o que pode configurar fragmentação florestal e risco à espécies nativas.

As características morfológicas da pitangueira incluem folhas opostas simples, pecioladas e de coloração verde escuro, e consistência subcoriácea quando adultas e de cor avermelhada quando jovens (Figura 1) e com a presença de idioblastos secretores de compostos fenólicos (CARDOSO e SAJO, 2006; ROMAGNOLO e SOUZA, 2006). As flores são hermafroditas, de coloração branca (Figura 1), suavemente perfumadas, melíferas e abundantes em pólen. A polinização é feita por insetos, sendo as abelhas os mais comuns e, dentre elas, *Apis mellífera* é a mais frequente sendo também considerada como polinizadora efetiva (CARDOSO e SAJO, 2006; ROMAGNOLO e SOUZA, 2006; SILVA e PINHEIRO, 2007). Há divergências entre estudos de autopolinização, sendo que Pelacani *et al.* (2000) afirmam que *E. uniflora* é totalmente autoincompatível e Franzon (2008) afirma que a autopolinização ocorre, mas com uma baixa taxa de frutificação efetiva (cerca de 6,4%). Sua floração é anual e em massa, ocorrendo de agosto a outubro (PELACANI *et al.* 2000).

O fruto é uma baga, globosa a elipsoide com sulcos longitudinais (Figura 1) com coloração podendo variar de vermelho a quase negro (ROMAGNOLO e SOUZA, 2006; BEZURA *et al.*, 2002), sendo sua dispersão zoocórica. Apesar de haverem poucos estudos sobre seus dispersores o estudo de Budke *et al.* (2005) relata a dispersão por aves e o estudo de Castro e Galetti (2004), por lagartos Teiú.



Figura 1: Flores (A – Fonte: José Lira Jr.); frutos (B – Fonte: Arnaldo Silva) e folhas (C – Fonte: Forest e Kim Starr) de *E. uniflora*.

Essa espécie apresenta plasticidade aos mais diversos tipos de ambientes, podendo se adaptar a diferentes níveis de geada, ventos fortes e temperaturas abaixo de zero graus Celsius, sem desenvolver sintomas característicos de danos. Quando cultivada em situações de déficit hídrico apresenta perdas apenas na frutificação (LIRA JÚNIOR *et al.*, 2007).

No âmbito ecológico, *E. uniflora* é utilizada para recuperação de áreas degradadas (KNAPICK e MARANHO, 2007), além de apresentar potencial como bioinseticida (CUNHA *et al.*, 2016) e servir como fonte de alimento para diversos animais (BUDKE *et al.*, 2005; CASTRO e GALETTI, 2004).

Seus frutos são consumidos *in natura* ou na forma de sucos, sorvetes, geleias, licores e vinhos (LEDERMAN *et al.*, 1992; BEZERRA *et al.*, 1995). Não há dados oficiais sobre a produção e comercialização dos frutos, mas estima-se que o Brasil seja o maior produtor mundial, tendo cerca de 300 hectares cultivados em Pernambuco (LIRA JÚNIOR *et al.*, 2007). Seus frutos apresentam sabor exótico e vêm ganhando atenção de outros países (RIBEIRO, 1998). Porém, atualmente existe apenas uma cultivar para esta espécie, denominada “Tropicana” que foi desenvolvida pela Empresa Pernambucana de Pesquisas Agropecuárias – IPA.

Eugenia uniflora foi introduzida na medicina popular pelos índios Guaranis no século XV, e desde então vem sendo amplamente utilizada no Brasil como alternativa terapêutica para o tratamento de diarreia não infecciosa, tendo suas propriedades reconhecidas pela resolução RDC N.º 10, de 09 de março de 2010 (ALONSO, 2004; BRASIL, 2010). Em países em desenvolvimento como o Brasil, a utilização de fitoterápicos é importante e bastante

difundida, em parte pela grande biodiversidade e pelo difícil acesso da população ao sistema médico (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2016).

Os principais compostos químicos de interesse já identificados nas folhas de pitanga são óleos essenciais sesquiterpenos, germacreno e selina trienona (MORAIS *et al.*, 1996; MAIA *et al.*, 1999; ADEOYE, 2006), eugeniflorinas D1 e D2, pentahidroxiindolizidina (LEE *et al.*, 1997; AURICCHIO E BACCHI, 2003), β -caroteno, vitamina C e vitamina E, licopeno, rubixantina, cis-rubixantina, α -criptoxantina, cis-licopeno, zeaxantina, luteína (WANG *et al.*, 1996; RICE-EVANS *et al.*, 1996; AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2004), antocianinas (WANG *et al.*, 1997; BAGETTI, 2009), violaxantina, miricitrina e quercetina (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1987). Essa ampla gama de compostos evidencia o potencial de *E. uniflora* para exploração farmacológica e biotecnológica.

Diversos estudos tem comprovado a ação antioxidante (CUNHA *et al.*, 2016; DENARDIN *et al.*, 2015; FORTES *et al.*, 2015; SOBRAL-SOUZA *et al.*, 2014), antimicrobiana e antifúngica, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, apresentando atividade contra *Trypanosoma congolense* e sendo eficiente na redução do biofilme causador da gengivite em crianças (ADEWUNMI *et al.*, 2001; BIASI-GARBIN *et al.*, 2016; JOVITO *et al.*, 2016). Estudos também indicam a inibição das enzimas α -glicosidase, maltase e sucrase, que fazem com que haja uma diminuição da digestão e absorção de açúcares e gorduras, revelando assim um possível potencial de emprego dessa espécie no tratamento de diabetes e obesidade (ARAI *et al.*, 1999; MARGIS *et al.*, 2000; MATSUMURA *et al.*, 2000).

Apesar do amplo conhecimento sobre seu potencial farmacológico, agrônomo e de exploração econômica, os estudos voltados para ecologia e genética de *Eugenia uniflora* até o ano de 2012 eram muito limitados, correspondendo à aproximadamente apenas 11% do total de trabalhos para a espécie (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Descrever e estudar a diversidade genética é um ponto crucial para a conservação de espécies sendo também fundamental para o estabelecimento de estratégias conservacionistas efetivas e para a manutenção da saúde de uma população (YEEH *et al.*, 1996), visto que a seleção natural atua nas variações existentes dentro das populações, sendo que quanto maior a

variabilidade existente entre os indivíduos, maiores as chances de perpetuação da espécie (TORGGLER et al, 1995). Também ressaltamos a importância de conhecer o genoma de espécies nativas, pois além de servir como documentação da biodiversidade, pode ser útil na busca de sequências gênicas que possam estar relacionadas com o potencial biotecnológico e farmacológico. Nesse panorama, o Sequenciamento de Nova Geração surge como uma ótima ferramenta provedora de informação, além de ter se tornado cada vez mais acessível.

1.2. Sequenciamento de nova Geração

Durante muito tempo, a obtenção de informações sobre a sequência genômica dos organismos vivos foi difícil e custosa, o que se deve em grande parte à falta de tecnologia.

No ano de 1977, houve a publicação de uma técnica que revolucionou os estudos em genética: a química dideoxi, ou método de Sequenciamento de Sanger (SANGER *et al.*, 1997). Por quase três décadas essa metodologia, também conhecida por “Primeira Geração de Sequenciamento”, se estabeleceu como o padrão de sequenciamento de material genético. Apesar da revolução para a área de genética ainda haviam muitas limitações, tais como o alto valor por base, número baixo de sequências e tempo elevado para o sequenciamento (DAVIES, 2010).

Com todas essas limitações associadas à necessidade de sequenciamento de genomas cada vez maiores e mais complexos, em 2001, surgiu a corrida chamada “genoma de mil dólares”, a qual foi promovida pelo laboratório particular de Craig Venter, para promover o desenvolvimento de químicas de sequenciamento que fossem capazes de sequenciar qualquer genoma com um custo reduzido e em pouco tempo (DAVIES, 2010).

A partir de 2006 surgiram então os sequenciadores de Segunda Geração (também chamados de Next Generation Sequencing - NGS), com uma capacidade operacional maior, maior número de dados de alta qualidade e custos reduzidos (DAVIES, 2010).

As plataformas de segunda geração se dividem em dois tipos principais: as primeiras com sequenciamento por detecção de luz, onde cada base incorporada no *read* emite um sinal de luz (454 e Illumina) (METZKER, 2010) e as de variação de pH, onde a enzima DNA polimerase libera como subproduto um íon H⁺, realizando injeções sucessivas dos quatro

nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), fazendo a limpeza do sistema após cada base injetada. Essas plataformas são Ion Torrent e Ion Proton (ROTHERBERG *et al.*, 2011).

A terceira geração de sequenciadores já está disponível e surgiu com a plataforma PACBIO, com *reads* de até 10.000 pb, um aumento enorme quando comparado à cerca de 500 pb das outras plataformas de segunda geração (PACIFIC BIOSCIENCES, 2015). Porém, essa plataforma ainda apresenta muitas desvantagens, como sua baixa confiabilidade, que pode variar entre 84,2% a 97,8%. O sequenciamento de genomas *de novo* com esta técnica não é muito indicado (RASKO *et al.*, 2011).

Outra plataforma de sequenciamento de terceira geração já disponível é a MinION, da Oxford nanopore. Essa plataforma promete o sequenciamento de polímeros intactos de DNA através do nanoporos de uma proteína sintética, tudo isso disponível em dispositivos portáteis do tamanho de pendrives e com tamanho esperado de *reads* semelhante ao da química SMRT da plataforma PACBIO (OXFORD NANOPORE, 2015).

Devido aos dados gerados pelas plataformas de terceira geração ainda não apresentarem um alto grau de confiabilidade, há uma tendência da utilização da combinação de sequenciadores de segunda e de terceira geração, sendo os últimos mais utilizados para o fechamento de *gaps* das sequências e para resolver problemas de montagem.

Comparando-se as diferentes plataformas de sequenciamento, todas apresentam vantagens e desvantagens. A plataforma Ion Torrent PGM™ por exemplo, apresenta um baixo custo e o tempo de corrida rápido, de aproximadamente 2 horas (HAMILTON e BUELL, 2012). Contudo, essa plataforma não é indicada para o sequenciamento de genomas completos, pois são necessárias inúmeras corridas para gerar dados suficientes para completar todos os *gaps* de um genoma completo. As sequências geradas em grande número pelo sequenciamento podem ser utilizadas para os mais diversos fins, tais como análise de transcriptomas, predição gênica, expressão diferencial de genes, melhoramento genético e desenvolvimento de marcadores SSR.

1.3 Marcadores SSR

Marcadores moleculares são ferramentas utilizadas para acessar características a nível molecular herdadas geneticamente, responsáveis por diferenciar organismos (MILACH, 1998).

Antes do surgimento das tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração, o desenvolvimento de marcadores microssatélites era trabalhoso e com alto custo, pois envolvia a construção de bibliotecas genômicas, isolamento e sequenciamento de clones, seguido do desenho de *primers* flanqueadores (LI, 2008).

Os marcadores SSR ou microssatélites são sequências simples de 1- 6 pares de bases repetidas em *tandem* e podem ser encontrados em grandes quantidades e uniformemente distribuídos pelo genoma das plantas, além de serem codominantes, multialélicos e com o mais alto conteúdo de informação de polimorfismo (ZUCCHI, 2003), sendo usados para avaliar e monitorar similaridade, variabilidade e relação genética entre genótipos, construir mapas genéticos e encontrar marcadores para características de interesse (MEHLENBACHER, 1995; PIGATO e LOPES, 2001; SALLA *et al.*, 2002; UPADHYAY *et al.*, 2004).

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 (CHODHARY e TRIVEDI, 2010; WANG *et al.*, 2009), assim como *indels*.

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).

Sendo assim, as regiões não codificantes ou “neutras”, expressam melhor a variabilidade entre os indivíduos de populações, enquanto marcadores de regiões gênicas podem servir para fins de melhoramento genético, por estarem associados à expressão de fenótipos que podem ter interesse econômico (GUPTA *et al.*, 2003).

A caracterização e validação de marcadores SSR é de extrema importância para espécies nativas pouco estudadas, que estejam sendo exploradas sem medidas de manejo ou que estejam sofrendo com a fragmentação florestal, como é o caso de *Eugenia uniflora*.

A partir do desenvolvimento dos marcadores microssatélites é possível a realização de estudos de diversidade genética de populações.

1.4 Genética de populações

Sabe-se que para a manutenção da saúde de uma população é necessário que haja diversidade genética, para que os organismos tenham uma melhor adaptabilidade às forças de seleção natural atuantes. A capacidade de adaptação é essencial para a sobrevivência da espécie, principalmente em um cenário de mudanças climáticas e interferência humana nos ambientes (MÁTYÁS, 2005).

O grande crescimento das populações humanas provoca um aumento significativo na degradação ambiental, pois demanda recursos que muitas vezes são explorados sem conhecimento, o que inclui a fragmentação de florestas pela agricultura e exploração dos recursos naturais existentes (GEBUREK, 2005).

Eugenia uniflora encontra-se presente em biomas que foram muito devastados sem conhecimento prévio. Isso pode acarretar na perda de diversidade genética, aumento de endogamia pela redução do número de indivíduos, colaborar para a deriva genética e em longo prazo pode acarretar até mesmo em especiação.

Por isso, enfatizamos a importância de estudos que abram portas para o conhecimento da genética de populações para esta espécie nativa com amplo potencial econômico e tão pouco estudada nos âmbitos genético e ecológico. Compreender sua dinâmica populacional permite que as medidas corretas de manejo e conservação sejam tomadas para evitar ameaças à espécie.

2. OBJETIVOS

Objetivamos realizar o sequenciamento parcial do genoma de *Eugenia uniflora* e o desenvolvimento de marcadores SSR altamente polimórficos que possam ser utilizados para estudos de genética de populações e melhoramento genético, colaborando para a preservação dessa espécie.

CAPÍTULO I

3. SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENOMA DE *Eugenia uniflora* L.

RESUMO

Eugenia uniflora (pitanga), é uma espécie nativa amplamente utilizada na medicina popular, possuindo ação antimicrobiana, antifúngica e antioxidante comprovadas, além de apresentar potencial para o tratamento de diabetes e obesidade. Apesar de todo seu potencial farmacológico, pouco se sabe sobre seu genoma. Conhecer o genoma de espécies nativas amplamente exploradas é importante tanto para a documentação da biodiversidade quanto para a abertura de portas para encontrar sequências com potencial econômico. Este trabalho teve como objetivo fornecer conhecimentos básicos sobre o genoma total de *Eugenia uniflora* e prospectar sequências com potenciais fins biotecnológicos e de melhoramento genético. O sequenciamento foi realizado na plataforma Ion Torrent, a montagem através do software SPAdes e a anotação através do software Augustus. A anotação funcional foi realizada a partir do software Blast2go. Do sequenciamento obtivemos um total de 7 milhões de pares de bases, que após montados corresponderam a uma cobertura de cerca de 1.4x do genoma estimado para *Eugenia uniflora*. Um total de 1836 genes hipotéticos foram preditos, sendo em sua maioria relacionados a funções essenciais para as células. Porém, alguns estão relacionados ao metabolismo secundário, podendo apresentar potencial econômico. Este trabalho possibilitou ampliar os conhecimentos sobre o genoma de *Eugenia uniflora*, além de conhecer genes putativos relacionados ao metabolismo secundário e possíveis sequências regulatórias de condições de estresse.

INTRODUÇÃO

Eugenia uniflora, também conhecida como pitangueira é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica, amplamente utilizada para fins econômicos e farmacológicos. É utilizada na medicina popular para o tratamento de diarreia não infecciosa (BRASIL, 2010), além de possuir ação antimicrobiana, antifúngica e antioxidante comprovadas por diversos estudos, sendo eficiente no combate ao biofilme causador da gengivite e também podendo ser uma

potencial alternativa para o tratamento de diabetes e obesidade, atuando na inibição das enzimas α -glicosidase, maltase e sucrase, o que reduz a absorção de açúcares e gorduras. No âmbito ecológico apresenta potencial bioinseticida (ADEWUNMI *et al.*, 2001; ARAI *et al.*, 1999; BIASI-GARBIN *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2016; DENARDIN *et al.*, 2015; FORTES *et al.*, 2015; JOVITO *et al.*, 2016; MARGIS *et al.*, 2000; MATSUMURA *et al.*, 2000; SOBRAL-SOUZA *et al.*, 2014), sendo amplamente distribuída nos mais diversos tipos de ambientes e apresentando suscetibilidade apenas à solos salinos (LIRA JÚNIOR *et al.*, 2007).

Apesar de sua importância econômica e farmacológica, pouco se sabe sobre seu genoma. Antes do surgimento do sequenciamento de nova geração, conhecer o genoma de qualquer espécie era difícil e custoso. Atualmente isso não constitui um problema, pois as plataformas de Nova Geração como Ion Torrent produzem milhões de *reads* por preços cada vez mais acessíveis e em um tempo relativamente curto, permitindo assim conhecer o genoma de espécies tão importantes economicamente (RASKO *et al.*, 2011).

Nesse trabalho objetivamos fornecer conhecimentos básicos sobre o genoma de *Eugenia uniflora* e prospectar marcadores SSR e sequências que possam ser úteis para fins biotecnológicos e de melhoramento genético.

METODOLOGIA

Amostragem e extração de DNA

Amostras foliares de um indivíduo de *Eugenia uniflora* foram coletadas em uma população natural do bioma Pampa (30°20'05.00"S, 054°21'44.00"W), Rio Grande do Sul – Brasil. O *voucher* foi depositado sob numeração HBEI1150 no herbário Bruno Edgar Irgang, da Universidade Federal do Pampa. O DNA total foi isolado de folhas saudáveis através do kit de extração DNeasy Plant Mini kit (Quiagen®) e a qualidade verificada por meio de NanoVue™ (GE Healthcare).

Next Generation Sequencing

O DNA foi fragmentado utilizando o equipamento Biorruptor® para gerar fragmentos de cerca de 300 pares de bases. As bibliotecas genômicas foram construídas e o

sequenciamento foi realizado na plataforma Ion Torrent PGM™, usando um *chip* 318 de acordo com as especificações do fabricante.

Análise de dados

Os *reads* foram montados a partir do software SPAdes v. 3.5.0 (BANKEVICH *et al.*, 2012), com tamanho mínimo de 1000 pares de bases para cada *contig* e com tamanho de *k-mers* de 21. A predição gênica foi feita com o *software* Augustus (STANKE e WAAK, 2003) e as sequências de proteínas foram obtidas com o *script* getAnnoFasta.pl e a anotação funcional foi realizada a partir do *software* Blast2go v. 4.0 (CONESA *et al.*, 2005), com base no banco de dados do Blastp e Gene Ontology.

Prospecção de marcadores SSR

O *software* SSRLocator (MAIA *et al.*, 2008) foi utilizado para encontrar motivos SSR di-, tri- e tetrâmeros nos *reads* montados, com o mínimo de seis repetições cada. *Primers* para os *loci* SSR encontrados foram desenhados utilizando o *software* Primer3 (UNTERGASSER *et al.*, 2012). Os *primers* foram testados por amplificação *in silico* usando o *software* SPCR (CAO *et al.*, 2005) e, sabendo que os dados de montagem obtidos a partir do sequenciamento é feita em apenas um cromossomo, não sendo possíveis heterozigotos e conseqüentemente não sendo possíveis dois alelos, foram seguidos os seguintes critérios para a validação:

- Não apresentar *loci* sobrepostos;
- Os alelos devem estar entre 90 e 280 pb;
- Quando dois *loci* estiverem no tamanho desejado e não sobrepostos, eles devem ser testados em laboratório;
- *Primers* ótimos devem ter apenas um loco na região desejada;
- Mais que dois *loci* na região avaliada, são desconsiderados para análises em laboratório.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento gerou cerca de 7.0 milhões de pares de bases, as quais após a montagem e exclusão de regiões redundantes corresponderam à aproximadamente 3.15 milhões de bases distribuídos em 2601 *contigs*, correspondendo a uma cobertura de cerca de

1.4x o genoma estimado para *Eugenia uniflora*, com base em dados acessado por citometria de fluxo (COSTA *et al.*, 2008). A porcentagem de guanina e citosina para o draft do genoma foi de 41,17%.

Foram preditos um total de 1836 genes putativos, incluindo regiões gênicas parciais. Destas, cerca de 1400 sequências tiveram grande semelhança com as sequências disponíveis no banco de dados para *Eucalyptus grandis* (top hits) (Figura 1).

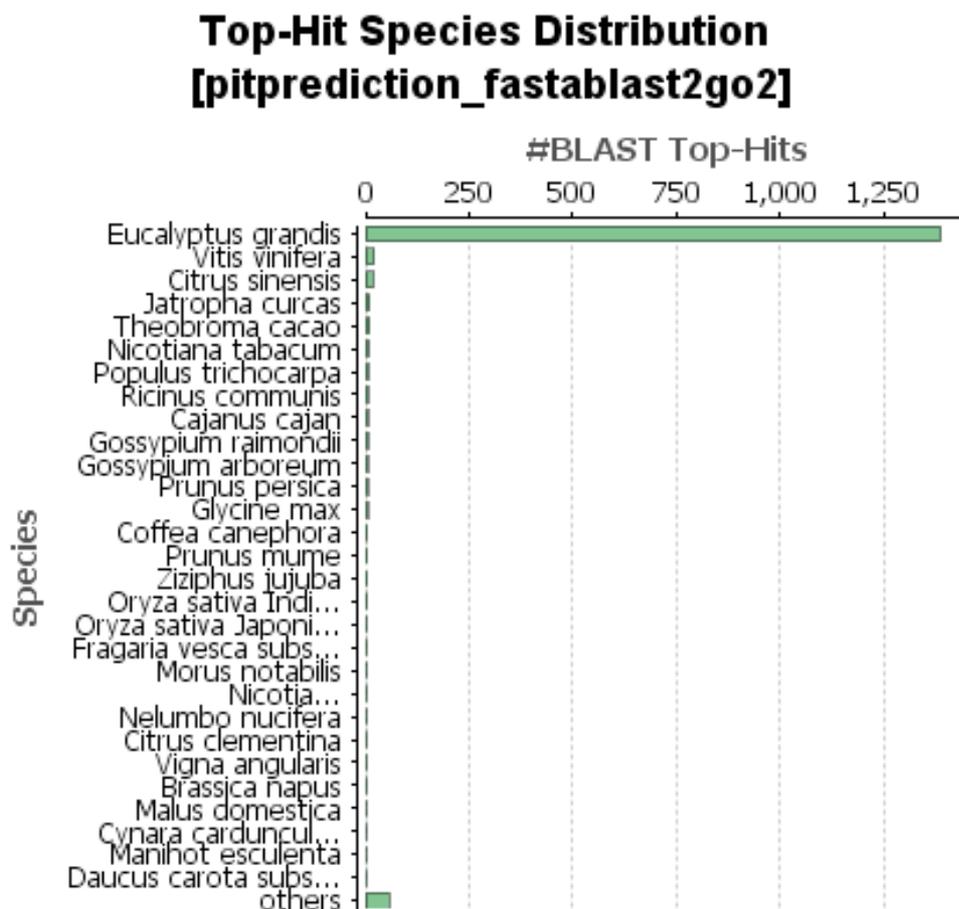


Figura 1. Melhores alinhamentos (hits) gerados por meio de Blastp por espécie, sendo *Eucalyptus grandis* a espécie que obteve os melhores alinhamentos.

As figuras 2 e 3 mostram a subdivisão das sequências anotadas em 3 categorias, sendo elas: Processos Biológicos (PB), Função Molecular (MF) e Componente Celular (CC). O gráfico de processos biológicos mostra que a maioria das sequências gênicas estão relacionadas a funções essenciais à célula, tais como metabolismo e processos celulares.

Ambos ocorrem no interior das células, sendo que o metabolismo corresponde a todas as reações químicas essenciais à manutenção da vida e os processos celulares englobam todos os processos que visam o crescimento e manutenção. Algumas dessas sequências estão relacionadas ao sistema de defesa, resposta ao estresse e ação antioxidante (Figura 3), podendo ser de interesse econômico, pois estão associadas à via de produção de metabólitos secundários.

Dentro de função molecular, os termos mais frequentes estão associados à atividade catalítica e à ligação ou acoplamento em geral (binding). A atividade catalítica remete a atividade enzimática realizada por proteínas (enzimas) e também por RNA (ribozimas). Estas enzimas estão distribuídas em seis principais classes: Oxidoredutares; Transferases; Hidrolases; Liases; Isomerases e Ligases (Figura 4).

Em componente celular a maioria das sequências mostrou estar relacionada a formação da célula, sendo a maioria das sequências (~370) correspondentes ao componente integral da membrana e ao núcleo (~100) (Figura 3).

Apesar de, em sua maioria, as sequências gênicas putativas estarem relacionadas com funções basais essenciais à célula, em uma breve anotação que realizamos para o Draft total dos 2601 *contigs*, observamos que existem várias sequências que estão associadas a processos de defesa e de resposta. Essas sequências podem ser regiões que conferem vantagens adaptativas e que podem ser regiões regulatórias ativadas em situação de estresse. Entre essas regiões, destacamos as que demonstram estar associadas à resposta ao estresse salino, resposta ao metal pesado cádmio, resposta ao frio e resposta a fungos (Figura 5). Essas regiões do genoma total de *Eugenia uniflora* demonstram potencial tanto para programas de recuperação de áreas degradadas, de melhoramento genético, como para fins farmacológicos, merecendo assim de um estudo mais aprofundado.

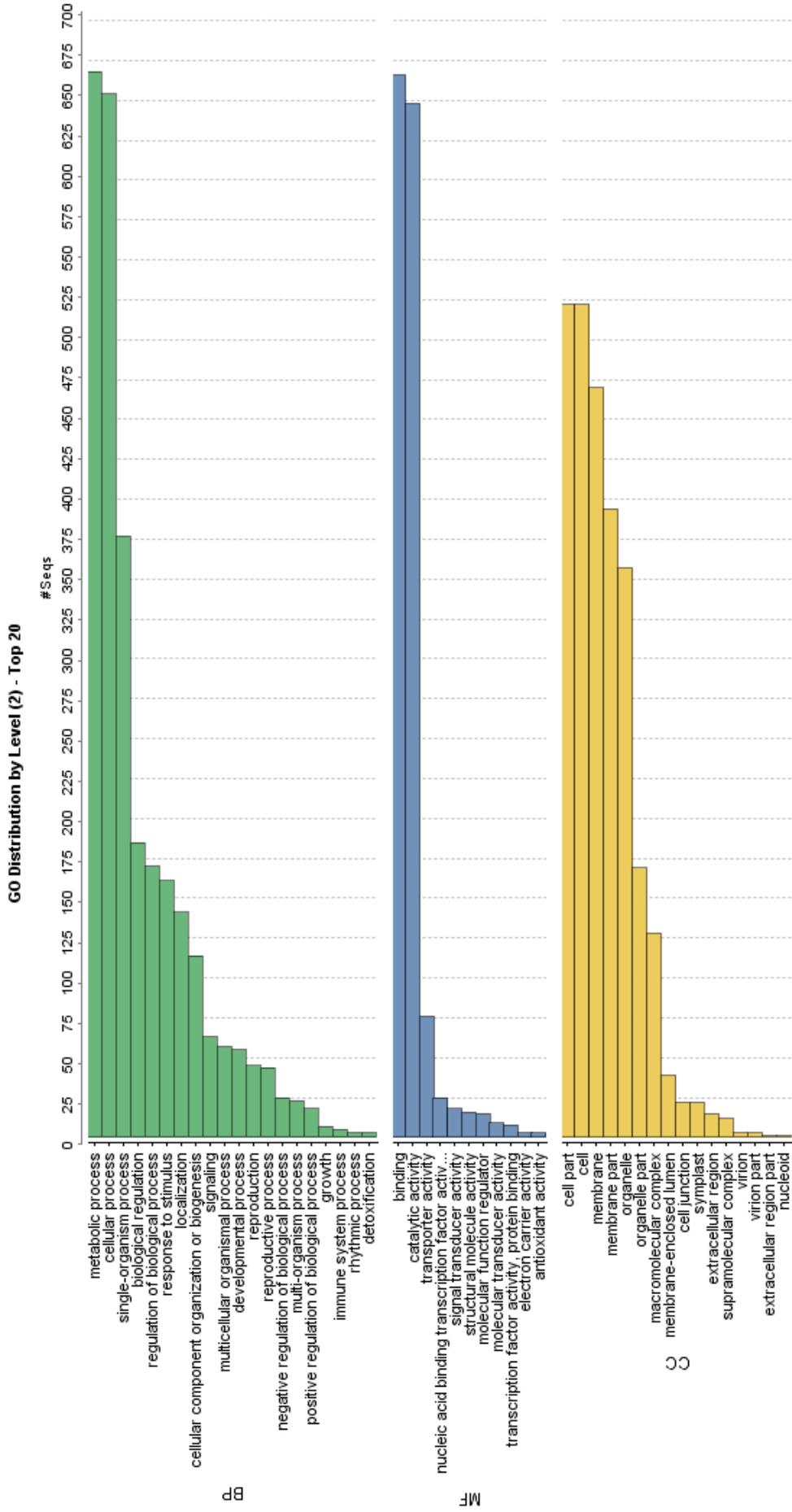


Figura 2. Resultados da anotação funcional através do software Blast2go com a utilização dos termos do Gene Ontology (GO) de nível 2 para os genes putativos preditos para *Eugenia uniflora*. As barras dos gráficos apresentam o número de seqüências identificadas para cada uma das categorias funcionais de Processos Biológicos (BP), Funções Moleculares (MF) e Componentes Celulares (CC).

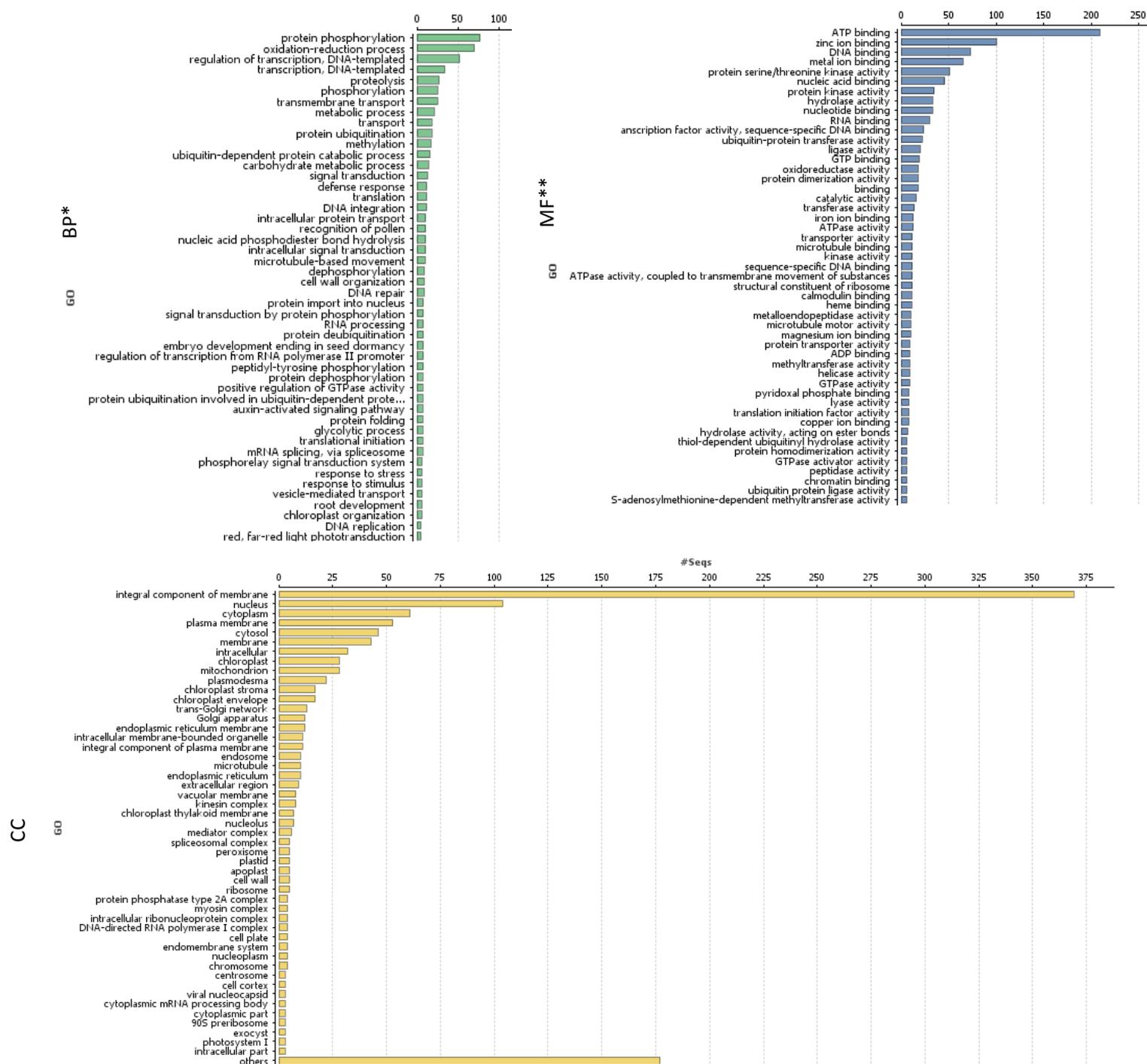


Figura 3. Resultados da anotação funcional detalhada através do software Blast2go com a utilização de Blastp e dos termos GO de nível 2 para os genes putativos preditos para *Eugenia uniflora*. As barras dos gráficos apresentam o número de sequências identificadas para cada uma das categorias funcionais de Processos Biológicos (PB), Funções Moleculares (MF) e Componentes Celulares (CC). * Aproximadamente 960 sequências foram classificadas como ‘outras’. ** Aproximadamente 740 sequências foram classificadas como ‘outras’.

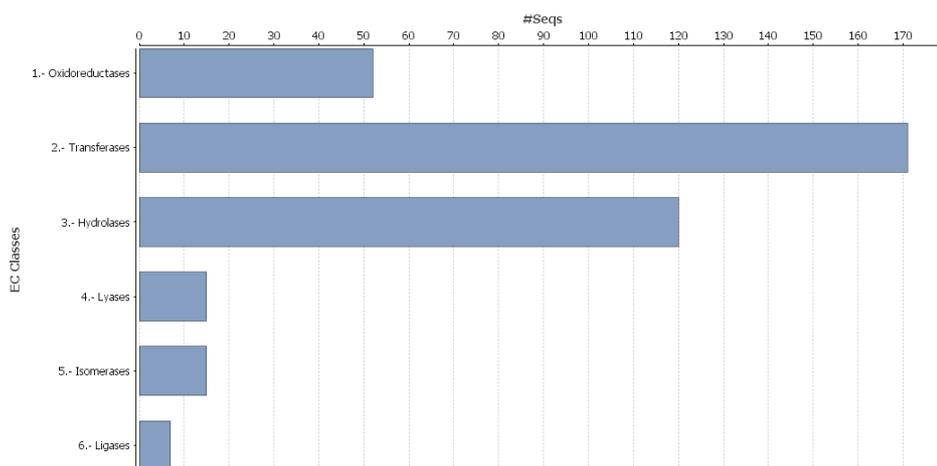


Figura 4. Distribuição das classes enzimáticas Identificadas nos genes putativos anotados para *Eugenia uniflora*.

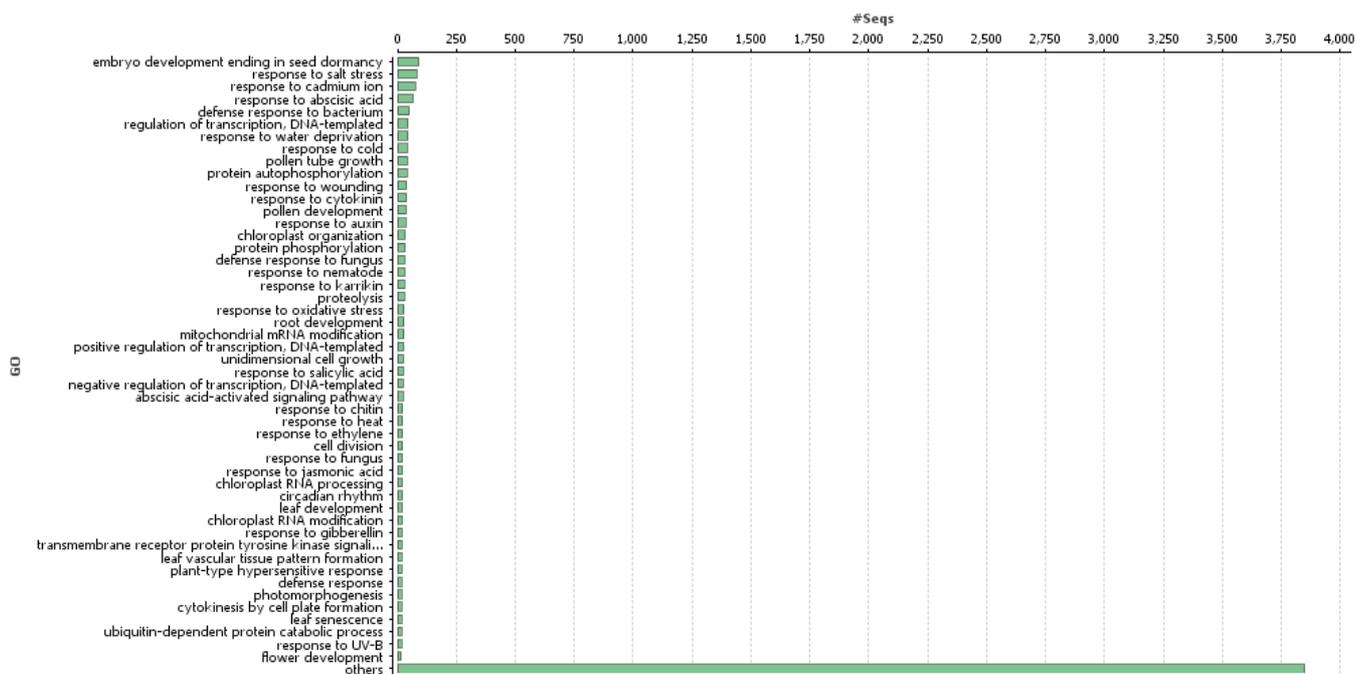


Figura 5. Resultados da anotação funcional detalhada através do software Blast2go através de Blastn com a utilização dos termos GO de nível 2 para a categoria de Processos Biológicos para o genoma total de *Eugenia uniflora*.

Dos *primers* validados *in silico*, um total de 80 *primers* foram considerados viáveis, 18 necessitam de ajustes em laboratório por apresentarem mais de um *loci* na região avaliada e 13 foram descartados das análises por apresentarem mais de dois *loci* ou *loci* sobrepostos

(Anexo II e Anexo III). Grande parte dos marcadores validados *in silico* apresentam potencial para estudos de diversidade genética, necessitando apenas de ajustes na temperatura de anelamento durante a PCR. Destes *primers*, avaliamos quais apresentam alta similaridade com regiões gênicas de *Eucalyptus grandis*, por meio de Blastn de alta similaridade. Conforme a Tabela 1, percebemos que 52 dos *primers* apresentam similaridade com regiões gênicas de *Eucalyptus grandis*, sendo que os *primers* Pit7, Pit8, Pit44, Pit91 e Pit97 estão em regiões gênicas do cloroplasto. Os *primers* encontrados em regiões gênicas podem ser interessantes para programas de melhoramento genético, pois estão associados à caracteres expressos que podem conferir características fenotípicas de interesse.

CONCLUSÃO

A maioria dos genes anotados representam funções basais comuns presentes em plantas em geral, sendo muitos deles expressos constitutivamente. Porém, as regiões associadas ao sistema de defesa, estresse e ação antioxidante podem estar associadas à produção de fitoquímicos de interesse biotecnológico, além de possíveis sequências regulatórias que podem conferir características de interesse econômico às regiões gênicas.

Os *primers* SSR desenvolvidos e validados *in silico* demonstraram em sua maioria alto potencial para testes de amplificação em laboratório e podem ser úteis tanto para estudos de diversidade genética como para programas de melhoramento genético, por apresentarem alta similaridade com regiões gênicas.

REFERÊNCIAS

ADEWUNMI, C. O.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEBAJO, A. C.; ALADESANMI, A. J.; MURPHY, N.; WANDO, J. **Reening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties.** Journal Ethnopharmacol, v. 77, n. 2, p.19-24, 2001.

ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y. **Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora***

on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. Journal of Ethnopharmacology, v. 68, n.1-3, p.307-314, 1999.

BIASI-GARBIN, R.P.A.C, DEMITTO, F.O.A, DO AMARAL, R.C.R.A, FERREIRA, M.R.A.B, SOARES, L.A.L.B, SVIDZINSKI, T.I.E.A, BAEZA, L.C.A, YAMADA-OGATTA, S.F **Antifungal potential of plant species from brazilian caatinga against dermatophyte.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.58, p. 18, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** RESOLUÇÃO - RDC Nº 10, DE 9 DE MARÇO DE 2010, dispõe sobre a notificação de drogas vegetais e dá outras providências.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; OBLES, M. **Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.** Bioinformatics v.21, p.3674-3676, 2005.

COSTA, I.R.; DORNELAS, M.C.; FORNI-MARTINS, E.L. **Nuclear genome size variation in fleshy-fruited Neotropical Myrtaceae.** Plant Systematics and Evolution, v.276, p.209-217, 2008.

CUNHA, F.A.B.; PINHO, A.I.; SANTOS, J.F.S.; SOBRAL-SOUZA, C.E.; ALBUQUERQUE, R.S.; MATIAS, E.F.F.; LEITE, N.F.; TINTINO, S.R.; COSTA, J.G.M.; BOLIGON, A.A.; WACZUK, E.P.; ROCHA, J.B.T.; POSSER, T.; COUTINHO, H.D.M.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; FRANCO, J. **Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant mercury chloride** Arabian Journal of Chemistry, 2016.

DENARDIN, C.C.A.; HIRSCH, G.E.B.; DA ROCHA, R.F.A.; VIZZOTTO, M.C.; HENRIQUES, A.T.D.; MOREIRA, J.C.F.A.; GUMA, F.T.C.R.A.; EMANUELLI, T. **Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits** Journal of Food and Drug Analysis v.23, p.387-398, 2015.

FORTES, G.A.C.A.; CARVALHO, A.G.A.; RAMALHO, R.R.F.A.; DA SILVA, A.J.R.B.; FERRI, P.H.A.; SANTOS, S.C. **Antioxidant Activities of Hydrolysable Tannins and Flavonoid Glycosides Isolated from *Eugenia uniflora* L.** Records of Natural Products, v.9, p.251-256, 2015.

JOVITO, V.C.; FREIRES, I.A.; FERREIRA, D.A.H.; PAULO, M.Q.; DE CASTRO, R. ***Eugenia uniflora* dentifrice for treating gingivitis in children: Antibacterial assay and randomized clinical trial** Brazilian Dental Journal Volume, v.27, n.4, p.387-392, 2016.

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.

MARGIS, R.; FELIX, D.; CALDAS, J. F.; SALGUEIRO, F.; DE ARAUJO, D. S. D.; MOMOSE, Y. **Pentahydoryndolizidine and a-glucosidase inhibitors containing products of *Eugenia uniflora*.** Japan Kokai Tokkyo Koho, v. 72, p.770, 2000.

MATSUMURA, T.; KASAI, M.; HAYASHI, A.; ARISA WA, M.; MOMOSE, Y.; ARAI, I.; AMAGA YA-KOMATSU Y. **A-Glucosidase inhibitors from Paraguayan Natural Medicine, Ñangapiry, the leaves of *Eugenia uniflora*.** Pharmaceutical Biology, v.38, n.4, p.302-307, 2000.

SOBRAL-SOUZA, C.E., LEITE, N.F., CUNHA, F.A.B., PINHO, A.I., COSTA, J.G.M., COUTINHO, H.D.M. **Evaluation of cytoprotective and antioxidant activity of the extracts of *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium sobleleanum* Proença & Landrum against heavy metals.** Revista Ciencias de la Salud, v.12, n.3, p.401-409, 2014.

STANKE, M.; WAACK, S. **Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel.** Bioinformatics v.19, p.215-225, 2003.

Tabela 1. Primers desenvolvidos para *Eugenia uniflora* que apresentam similaridade com regiões gênicas de *Eucalyptus grandis* através de análise com o banco de dados do Blastn de alta similaridade.

Primer	Região de similaridade com <i>Eucalyptus grandis</i>
Pit 6	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis autophagy related protein 18b (LOC104436009), mRNA</i>
Pit 7 e 8	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis cytochrome P450 97B2, chloroplastic (LOC104433683), mRNA</i>
Pit 12	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis TMV resistance protein Nlike (LOC104437590), mRNA</i>
Pit 15	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis probable splicing factor 3A subunit 1 (LOC104421588), transcript variant X1, mRNA</i>
Pit 19	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis ubiquitin conjugating enzyme E2 2 (LOC104433606), mRNA</i>
Pit 20	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis probable galactinol sucrose galactosyl transferase 1 (LOC104450392), mRNA</i>
Pit 24	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis serine/threonine protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform (LOC104449952), transcript variant X2, mRNA</i>
Pit 25	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis pleiotropic drug resistance protein 2 (LOC104421273), mRNA</i>
Pit 26	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis protein FRIGIDA (LOC104456157), mRNA</i>
Pit 27	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis CCAAT/enhancer binding protein zeta (LOC104422905), mRNA</i>
Pit 33	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis betaDglucosyl crocetin beta1,6glucosyltransferase (LOC104423526), mRNA</i>
Pit 34	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis mannose1phosphate guanyl transferase alpha (LOC104419311), transcript variant X2, mRNA</i>
Pit 38	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis AT hook motif nuclear localized protein 15 (LOC104421912), transcript variant X1, mRNA</i>
Pit 44	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis pentatricopeptide repeat containing protein At1g30610, chloroplastic (LOC104441234), mRNA</i>
Pit 45	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis probable trehalase (LOC104444090), transcript variant X3, mRNA</i>
Pit 53	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis delta1pyrroline5carboxylate synthase (LOC104454339), mRNA</i>
Pit 55	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis fatty acid amide hydrolase (LOC104419842), transcript variant X2, mRNA</i>
Pit 59	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis Fbox/LRRrepeat protein 4 (LOC104425162), mRNA</i>
Pit 60	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis probably inactive leucine rich repeat receptor like protein kinase At5g06940 (LOC104445429), mRNA</i>
Pit 61	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis constitutive photomorphogenesis protein 10 (LOC104433783), mRNA</i>
Pit 63	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis nucleo base ascorbate transporter 7 (LOC104432918), transcript variant X4, mRNA</i>
Pit 65	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis GDSL esterase/lipase At5g45960 (LOC104440967), mRNA</i>
Pit 72	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis probable receptor like protein kinase At2g42960 (LOC104425048), transcript variant X2, mRNA</i>
Pit 73	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis histidinetRNA ligase, cytoplasmic (LOC104449799), transcript variant X3, mRNA</i>
Pit 74	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 (LOC104445303), mRNA</i>
Pit 75	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis zinc finger protein CONSTANSLIKE 6 (LOC104421639), mRNA</i>
Pit 76	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis protein DEHYDRATIONINDUCED 19 homolog 3 (LOC104432440), mRNA</i>
Pit 78	<i>PREDICTED: Eucalyptus grandis protein CROWDED NUCLEI 1 (LOC104422081), mRNA</i>

- Pit 89** *PREDICTED: Eucalyptus grandis ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 12 (LOC104454073), mRNA*
- Pit 91** *PREDICTED: Eucalyptus grandis pentatricopeptide repeat containing protein At3g18110, chloroplastic (LOC104450263), mRNA*
- Pit 95** *PREDICTED: Eucalyptus grandis LMBR1 domain containing protein 2 homolog A (LOC104418320), mRNA*
- Pit 96** *PREDICTED: Eucalyptus grandis probable low specificity L threonine aldolase 1 (LOC104415370), transcript variant X4, mRNA*
- Pit 97** *PREDICTED: Eucalyptus grandis zeaxanthin epoxidase, chloroplastic (LOC104418568), mRNA*
- Pit 98** *PREDICTED: Eucalyptus grandis transcriptional corepressor SEUSS (LOC104450883), transcript variant X2, mRNA*
- Pit 108** *PREDICTED: Eucalyptus grandis ras related protein RABA4d (LOC104445522), mRNA*
- Pit 110** *PREDICTED: Eucalyptus grandis probable 26S protease regulatory subunit 10B (LOC104445675), transcript variant X3, mRNA*
- Pit 111** *PREDICTED: Eucalyptus grandis ras GTPase activating protein binding protein 1 (LOC104425708), mRNA*
- Pit 115** *PREDICTED: Eucalyptus grandis DNA mismatch repair protein MSH6 (LOC104426818), mRNA*
- Pit 116** *PREDICTED: Eucalyptus grandis phytochrome associated serine/threonine protein phosphatase (LOC104421192), mRNA*
- Pit 119** *PREDICTED: Eucalyptus grandis zinc finger CCCH domain containing protein 45 (LOC104441828), transcript variant X4, mRNA*
- Pit 120** *PREDICTED: Eucalyptus grandis Fbox protein At1g30790like (LOC104440635), mRNA*
- Pit 122** *PREDICTED: Eucalyptus grandis transcription factor MYB44 (LOC104443385), mRNA*
- Pit 123** *PREDICTED: Eucalyptus grandis Nalphaacetyltransferase 50 (LOC104437074), mRNA*
- Pit 125** *PREDICTED: Eucalyptus grandis zinc finger protein 598 (LOC104424638), mRNA*
- Pit 126** *PREDICTED: Eucalyptus grandis piezo type mechano sensitive ion channel homolog (LOC104457039), transcript variant X4, mRNA*
- Pit 128** *PREDICTED: Eucalyptus grandis E3 ubiquitin protein ligase SINAT3 (LOC104443358), mRNA*
- Pit 129** *PREDICTED: Eucalyptus grandis nuclear transcription factor Y subunit A3 (LOC104450006), transcript variant X1, mRNA*
- Pit 133** *PREDICTED: Eucalyptus grandis glucose6phosphate isomerase, cytosolic (LOC104448748), mRNA*
- Pit 138** *PREDICTED: Eucalyptus grandis probable Ltype lectin domain containing receptor kinase S.7 (LOC104434067), mRNA*
- Pit 139** *PREDICTED: Eucalyptus grandis E3 ubiquitin protein ligase listerin (LOC104422342), transcript variant X3, misc_RNA*
- Pit 141** *PREDICTED: Eucalyptus grandis BTB/POZ domain containing protein At2g30600 (LOC104448924), transcript variant X5, mRNA*
-

CAPÍTULO II

4. MICROSATELLITE MARKERS DISCOVERY AND CHARACTERIZATION IN *Eugenia uniflora* L. MYRTACEAE ¹

Deise Schröder Sarzi¹, Beatriz Justolin¹, Clariane da Silva¹, Luiz Fernando Wurdig Roesch¹, Filipe de Carvalho Victoria¹, Rafael de Plá Matielo Lemos¹, Valdir Marcos Stefenon^{1*}

¹ Federal University of Pampa – Campus São Gabriel, Av. Antonio Trilha, 1847 – 97300-000 – São Gabriel, RS –Brazil.

*Corresponding author: Valdir Marcos Stefenon <valdirstefenon@unipampa.edu.br>

Abstract: *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) is a tree species widely distributed in South America and is suffering with the effects of the exploitation of natural populations. In this study, we sequenced the partial genome of *E. uniflora* and developed twelve highly polymorphic microsatellite loci for genetic analysis of populations. A total of 73 alleles were detected, with an observed and expected heterozygosity ranging from 0.000 to 0.567 and 0.569 to 0.906, respectively. These new microsatellites are valuable to obtaining genetic data needed in conservation and in genetic improvement programs.

Key words: Next Generation Sequencing; Pitanga; Population Genetics; SSR; Surinam-cherry.

Resumo: *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) é uma espécie arbórea amplamente distribuída no Sul da América e está sofrendo com os efeitos da exploração de populações naturais. Neste estudo nós sequenciamos o genoma parcial de *E. uniflora* e desenvolvemos doze loci microssatélites altamente polimórficos para análises de genética de populações. Um total de 73 alelos foram detectados, com uma heterozigosidade observada e esperada variando de 0.000 à 0.567 e de 0.569 à 0.906, respectivamente. Estes novos microssatélites são de grande

¹ Short Note submitted for publication in *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (Anexo I).

valor para a obtenção de dados genéticos necessários na conservação e em programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: Next Generation Sequencing; Pitanga; Population Genetics; SSR; Surinam-cherry.

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae) is an important economic and ecological genetic resource native to the Atlantic Forest, Pampa and Cerrado biomes in Brazil. It is used in the pharmaceutical and cosmetic industries with proved anti-inflammatory functions (Auricchio et al. 2003; Costa et al. 2010). Popularly, the infusion of its leaves is used to treat gastrointestinal illnesses, while its fruits are consumed fresh and as juice and ice cream (Lederman et al., 1992; Ferreira et al., 1987). This species is also used in the recovery of degraded areas by mining and is an important feed source to bees (Silva and Pinheiro, 2007), while its wood is widely used by the population of rural areas for heating residences and manufacturing poles for fencing (Costella et al. 2013).

Currently, there are few cultivated orchards to economic use of this species (Almeida et al. 2012) and it may be suffering from unsustainable exploitation of natural populations (Costella et al. 2013). Forest devastation can result in loss of biodiversity, affecting population dynamics and changing the inbreeding processes, gene flow and genetic drift, being fundamental the maintenance of genetic diversity for the survival of endangered species (Holsinger and Gottlieb, 1991; Kageyama, 1998). This emphasizes the need for studies to assess the status of natural populations of *E. uniflora*.

Our study aimed to develop molecular markers for this important resource, allowing to access genetic diversity data from natural populations to better understand population

dynamics, to plan reliable conservation measures and to advance programs of genetic improvement of this species.

Total DNA was isolated from healthy leaves of one single individual using the DNeasy Plant mini kit (Quiagen®). Sequencing was performed in an Ion Torrent PGM™ Next Generation Sequence system, using a 318 chip, following manufacturers' specifications. A voucher of the sequenced individual was deposited in the Herbarium Bruno Edgar Irgang (HBEI) of the Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel (voucher HBEI1150). The software SSRLocator (Maia et al., 2008) was used to find di-, tri- and tetramer SSR motifs in the obtained reads, with the minimum of 6 repetitions each. Primers for SSR loci were designed using the Primer3 software (Untergasser et al., 2012). Potentially amplifiable SSR loci identified were tested for amplification *in silico*, using the software SPCR (Cao et al., 2005). Loci with dimer motifs that revealed virtual amplification of a single locus with alleles within the expected size range were tested in 36 individuals collected from a natural population of *E. uniflora* located in the Pampa biome, Rio Grande do Sul State, Brazil. SSR markers were amplified through PCR in a final volume of 25µL reaction mix, containing about 30 ng of DNA, 0.25µM of buffer, 0.5 µM of MgCl₂, 1U of Taq DNA-Polymerase (Invitrogen®), 0.05µM of each dNTP, 0.125µM of each primer and 0.2 µg/µL of BSA. Amplifications were carried out with 95°C for 5 min, annealing temperature ranging from 48°C to 51.4°C (see Table 1) for 1 min and extension at 72°C for 1 min, for a total of 30 cycles, with a final extension step of 72°C for 20 min. Alleles of each individual were resolved through electrophoresis on 6% polyacrylamide gels. Allele sizing was performed by comparison to 100 bp ladder (Ludwig Biotecnologia Ltda.). The genetic diversity indexes and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were tested with GenAlEx 6.4 software (Peakall and Smouse 2006, 2012).

A total of 7,000,000 base pairs were obtained in the sequencing run, corresponding to about 1.4x coverage of the estimated genome of *E. uniflora*. Sixty potentially amplifiable dimer SSR loci were identified and tested *in silico*. Twelve loci with virtual amplification of a single allele (Figure 1) were tested in the sampled population. The twelve SSR markers tested were polymorphic and generated a total of 73 alleles, ranging from 3 (Pit2, Pit9 and Pit25) to 12 (Pit1) alleles per locus (Table 1). Estimations of H_o ranged from 0.0 (Pit3) to 0.567 (Pit1), while H_e measures ranged from 0.569 (Pit6) to 0.906 (Pit7). The effective number of alleles (N_e) ranged from 2.270 (Pit6) to 8.494 (Pit7). The Wright fixation index (F_{IS}) ranged from 0.339 (Pit1) to 1.000 (Pit3). A significant deviation of HWE ($p < 0.05$) was observed in all loci, except for Pit13.

The genetic diversity parameters estimated for these 12 loci are within the range observed by Ferreira-Ramos et al. (2008), for seven SSR loci developed for *E. uniflora*. The comparatively low estimations seem to be intrinsic to the species, linked to its selfing rate, reducing H_o and increasing F (Almeida et al. 2012). However, the fragmentation and small size of natural populations of tree species in the Pampa biome may also contribute for such results.

In conclusion, these 12 SSR markers developed for *E. uniflora* are sufficiently variable and informative to enable wide studies to characterize the genetic diversity, gene flow and demographic history of natural populations of this species, as well as advancing the programs of genetic improvement of the species.

Acknowledgements: We would like to thank CAPES for financial support and scholarships and CNPQ for provide funds to research trough the process 442995/2014-8 and PROPESQ/UNIPAMPA.

References

Almeida DJ, Faria MV, Silva PR. 2012. Effect of forest fragmentation on microsporogenesis and pollen viability in *Eugenia uniflora*, a tree native to the Atlantic Forest Genet. Mol. Res. 11: 4245-4255.

Auricchio MT, Bacchi EM. 2003. Folhas de *Eugenia uniflora* L (pitanga): Revisão. Rev Inst Adolfo Lutz 62:55-61.

Costa DP, Filho EGA, Silva LMA, Santos SC, Silva MRR, Seraphin JC and Ferri PH. 2010. Influence of fruits biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essencial oils of *Eugenia uniflora* leaves. J. Braz. Chem. Soc. 21:851-858.

Cao Y, Wang L, Xu K, Kou C, Zhang Y, Wei G, He J, Wang Y and Zhao L. 2005. Information theory-based algorithm for in silico prediction of PCR products with whole genomic sequences as templates. BMC Bioinformatics 6:190.

Costella E, Garcia LSC, Corneleo NS, Schünemann AL and Stefenon VM. 2013. Anthropogenic use of gallery forests in the Brazilian Pampa. Biological Sciences 35:211- 217.

Lederman IE, Bezerra JEF and Calado G. 1992. A pitangueira em Pernambuco. IPA. 19: 20.

Maia LCD, Palmieri DA, Souza VQD, Kopp MM, Carvalho FIFD and Oliveira ACD. 2008. SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation. Int J of Plant Genomics 1-9.

- Ferreira FR, Ferreira SAN and Carvalho JEU. 1987. Espécies frutíferas pouco exploradas, com potencial econômico e social para o Brasil. *Rev Bras de Fruticultura*, 9:11-22.
- Ferreira-ramos R, Guerrieri A, Klaus A, Rossi A, Guidugli MC, Mestriner MA, Martinez CA and Alzate-marin AL. 2014. Genetic diversity assessment for *Eugenia uniflora* L., *E. pyriformis* Cambess., *E. brasiliensis* Lam. and *E. francavilleana* O. Berg neotropical tree species (Myrtaceae) with heterologous SSR markers. *Genet Resour Crop Ev* 61:267-272.
- Holsinger KE and Gottlieb LD. 1991. Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: *GENETICS AND CONSERVATION OF RARE PLANTS*. Oxford University Press, New York: Falk DA & Holsinger KE, p. 95–124.
- Kageyama PY, Gandara FB and Souza LMI. 1998. Consequências genéticas da fragmentação sobre espécies arbóreas. *IPEF* 12:65-70.
- Knapik P and Maranhão LT. 2007. Avaliação da Revegetação em Área de Mineração, Região de Inundação do Rio Iguaçu, Araucária. *Brazilian Journal of Biosciences* 5:507-509.
- Peakall R and Smouse PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes*. 6:288-295.
- Peakall R and Smouse PE. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28; 2537-2539.
- Silva ALG and Pinheiro MCB. 2007. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Acta Botanica Brasiliensi* 21:235-247.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M AND Rozen SG. 2012 1. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 40:1-12.

Figure 1: Virtual electrophoresis gel of loci Pit1, Pit6 and Pit10, which revealed a single amplification within the expected size range (grey arrows). MW = molecular weight in base pairs.

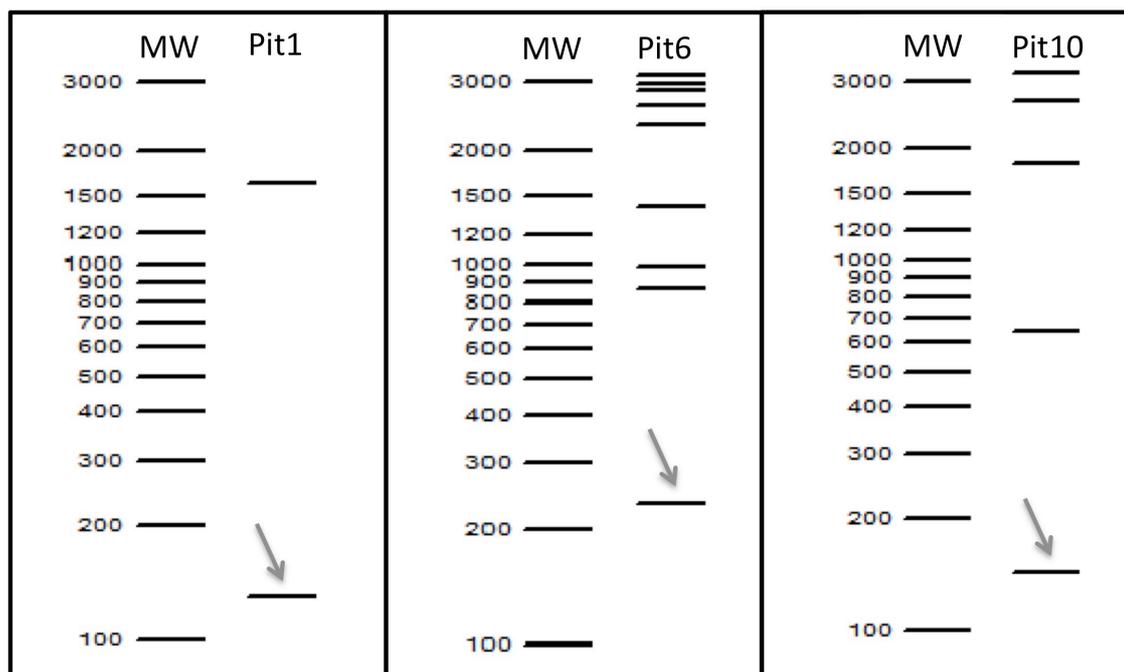


Table 01. Microsatellite markers for *Eugenia uniflora*, including primers sequence (forward and reverse), repeat motif, annealing temperature (T_a), length of the amplified fragment based on Next Generation Sequence data (product), Number of individuals with alleles (N), number of allele per locus (N_a), effective allele number (N_e), Wright Fixation Index (F), observed (H_o) and expected (H_e) heterozigosity and GenBank accession number.

Locus	Primer sequence (5' → 3')	Repeat motif	T_a and product (bp)	N	N_a	N_e	H_o	H_e	F	Deviation from HW Equilibrium	GenBank number
Pit1	AAACCAAATCACATGCTAA ATGTCTGTGAGGAGTAGACA	(AAC)7	51,4°C - 129	30	12	7,004	0,567	0,872	0,339	$p < 0.01$	KT768349
Pit2	TTTTAAAATAACGTCAAACC TCAAGTTTAAATTGGATTGT	(GAA)6	48°C - 244	16	3	2,510	0,250	0,621	0,584	$p < 0.001$	KT873889
Pit3	CATATTTTCCAATGTCAACT TCCACTCTGTCTATGCTAAT	(GAG)6	48°C - 280	29	4	2,776	0,000	0,651	1,000	$p < 0.001$	KT873890
Pit6	GCAAAAAGCAAACATTTA CATTAGTTTCTGCTATCCAG	(AG)12	48°C - 235	30	4	2,270	0,300	0,569	0,464	$p < 0.05$	KT873892
Pit7	AATTGTATTGACAGAATTGG TGAAAAAGACCGTAAATAG	(AAT)8	48°C - 142	19	11	8,494	0,316	0,906	0,642	$p < 0.001$	KT873893
Pit8	TTGACAATTCTTAGCTTCAT TTTTCTCGTATTTGAATGAT	(GA)6	48°C - 129	18	8	5,226	0,111	0,832	0,863	$p < 0.001$	KT873894
Pit9	GTAAC TTCAAACGAAAA GACTATGGACAAACTTGAGA	(TTG)6	48°C - 263	28	3	2,416	0,071	0,597	0,878	$p < 0.001$	KT873895
Pit10	CTCAAATTTTGT TAGCAAT TATATTTGGACTCTGACCTG	(AT)6	48°C - 144	35	8	6,110	0,257	0,848	0,693	$p < 0.001$	KT873896
Pit12	ATTCCTAACAAAATTGGAAC GAGATAGAGCATGAGACAGA	(AT)8	48°C - 242	36	9	2,621	0,333	0,627	0,461	$p < 0.001$	KT873897
Pit13	CTTGCCCTTAGGGTTT AATGACACCATGAGTAAGAT	(AAG)6	48°C - 228	13	4	2,504	0,385	0,625	0,360	$p > 0.05$	KT873898
Pit20	CTCTCAACTCAACCACG ACTGCTTCTCTCCATACAC	(CAC)6	48°C - 159	34	4	2,916	0,206	0,667	0,687	$p < 0.001$	KT873904
Pit25	ATCTATAGGTGTGAAACGTG TCTTGGTGATTCTATTTGT	(AG)6	48°C - 280	24	3	2,554	0,042	0,621	0,932	$p < 0.001$	KT873907

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O sequenciamento, além de documentação da biodiversidade, permitiu a identificação de sequências com potencial econômico que merecem atenção, principalmente devido às inúmeras potenciais aplicações de *Eugenia uniflora* para fins biotecnológicos. Com um trabalho mais sofisticado sobre a atuação das sequências em rotas metabólicas é possível identificar as regiões de produção de substâncias específicas que possam ser clonadas em organismo transgênico e utilizadas para fins farmacológicos e biotecnológicos.

Os *primers* desenvolvidos e testados em laboratório podem ser utilizados para testes de diversidade genética de *Eugenia uniflora* e os demais *primers* validados, considerados ótimos ou que necessitam de ajustes podem ser testados para gerar um maior conjunto de marcadores altamente polimórficos para a espécie.

REFERÊNCIAS

ADEOYE, A. O. **Volatile constituents of *Eugenia uniflora* L. leaf oil.** Food Chemistry, v.99, n. 1, p. 1-5, 2006.

ADEWUNMI, C. O.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEBAJO, A. C.; ALADESANMI, A. J.; MURPHY, N.; WANDO, J. **Reening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties.** Journal Ethnopharmacol, v. 77, n. 2, p.19-24, 2001.

ALMEIDA D.J., FARIA M.V., SILVA P.R. **Da Biologia experimental em Pitangueira: uma revisão de cinco décadas de publicações científicas.** Revista Ambiência v.8 p.159-175, 2012.

ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina. Bases Clínicas y Farmacológicas.** Buenos Aires: Isis Ediciones, 1998.

ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y. **Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice.** Journal of Ethnopharmacology, v. 68, n.1-3, p.307-314, 1999.

ARAÚJO, A. I. F. DE; DE LIMA, É. P.; DA SILVA, G. A.; DOS SANTOS, O. H.; SOARES, T. F. **Plantas nativas do Brasil empregadas em Fitocosmética.** In: Jornada de Ensino Pesquisa e extensão – JEPEX, UFRPE. p. 1-3, 2010.

AURICCHIO M.T.; BACCHI E.M. **Folhas de *Eugenia uniflora* L (pitanga): Revisão.** Revista Instituto Adolfo Lutz v.62, p.55-61, 2003.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS.** Journal of Food Composition and Analysis, v.17, n. 3-4, p.385-396, 2004.

BAGETTI , M. **Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, et al. **SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing**. Journal of Computational Biology, v.19, p.455-477, 2012.

BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; PEDROSA, A. C.; DANTAS, A. P.; FREITAS, E. V. de. **Performance of Surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.) in Pernambuco, Brazil**. Acta Horticulturae, v. 370, p. 77-81, 1995.

BEZERRA , J. E. F; SIL VA JUNIOR, J. F.; LEDERMAN , I. E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Jaboticabal: FUNEP, 30 p., 2002.

BIASI-GARBIN, R.P.A.C, DEMITTO, F.O.A, DO AMARAL, R.C.R.A, FERREIRA, M.R.A.B, SOARES, L.A.L.B, SVIDZINSKI, T.I.E.A, BAEZA, L.C.A, YAMADA-OGATTA, S.F **Antifungal potential of plant species from brazilian caatinga against dermatophyte**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.58, p. 18, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RESOLUÇÃO - RDC Nº 10, DE 9 DE MARÇO DE 2010, dispõe sobre a notificação de drogas vegetais e dá outras providências.

BUDKE , J. C.; HETT WER GIEHL , E. L.; ATHA YDE, E. A.; EISINGER , M. A.; ZÁCHIA , R. A. **Composição florística e estratégias de dispersão de espécies lenhosas em uma floresta ribeirinha, arroio Passo das Tropas, Santa Maria, RS, Brasil**. Iheringia, Porto Alegre, v. 60, n. 1, p. 17-24, 2005.

CASTRO , E. R.; GALETTI , M. **Frugivory and seed dispersal by the tegu lizard *Tupinambis merianae* Reptilia: Teiida**. Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo, v.44, n.6, p. 91-97, 2004.

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.

CAO, Y.; WANG, L.; XU, K.; KOU, C.; ZHANG, Y.; WEI, G.; HE, J.; WANG, Y.; ZHAO, L. **Information theory-based algorithm for in silico prediction of PCR products with whole genomic sequences as templates**. BMC Bioinformatics, v.6, p.190, 2005.

CHOUDHARY, O.M. e 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.

CSR/IBAMA. **Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite**. Ministério do meio ambiente, 2010.

CUNHA, F.A.B.; PINHO, A.I.; SANTOS, J.F.S.; SOBRAL-SOUZA, C.E.; ALBUQUERQUE, R.S.; MATIAS, E.F.F.; LEITE, N.F.; TINTINO, S.R.; COSTA, J.G.M.; BOLIGON, A.A.; WACZUK, E.P.; ROCHA, J.B.T.; POSSER, T.; COUTINHO, H.D.M.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; FRANCO, J. **Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant mercury chloride** Arabian Journal of Chemistry, 2016.

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.

DENARDIN, C.C.A.; HIRSCH, G.E.B.; DA ROCHA, R.F.A.; VIZZOTTO, M.C.; HENRIQUES, A.T.D.; MOREIRA, J.C.F.A.; GUMA, F.T.C.R.A.; EMANUELLI, T. **Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits** Journal of Food and Drug Analysis v.23, p.387-398, 2015.

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

FORTES, G.A.C.A.; CARVALHO, A.G.A.; RAMALHO, R.R.F.A.; DA SILVA, A.J.R.B.; FERRI, P.H.A.; SANTOS, S.C. **Antioxidant Activities of Hydrolysable Tannins and Flavonoid Glycosides Isolated from *Eugenia uniflora* L.** Records of Natural Products, v.9, p.251-256, 2015.

FRANZON, R. C. **Propagação vegetativa e modo de reprodução da pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2008. 100 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

GEBUREK, T. **Genetic diversity in forest trees – its importance and potential human impact**. In: GEBUREK, T.; TUROK, J. Conservation and management of forest genetic resources in Europe. Zvolen: Arbora Publishers, 2005. p. 437-463. (cap. 5).

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L. H.; WILSON, P; G.; LUCAS, E. **World Check-List of Myrtaceae**, 2012. Facilitado pelo Royal Botanic Gardens, Kew. Publicado na internet; <http://apps.kew.org/wcsp/>. Acessado em 03/01/2017.

GUPTA P.K.; RUSTGI S.; SHARMA S.; SINGH R.; KUMAR N.; BALYAN H.S. **Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and diversity in bread wheat.** *Molecular Genetics and Genomics*, v.270, n.4 p.315-323, 2003.

JOVITO, V.C.; FREIRES, I.A.; FERREIRA, D.A.H.; PAULO, M.Q.; DE CASTRO, R. ***Eugenia uniflora* dentifrice for treating gingivitis in children: Antibacterial assay and randomized clinical trial** *Brazilian Dental Journal* Volume, v.27, n.4, p.387-392, 2016.

KIILL, L.H.; DRUMOND, M.A.; LIMA, P.C.; ALBUQUERQUE, S.G.; OLIVEIRA, R.V. **Preservação e uso da Caatinga.** *ABC da agricultura familiar*, v. 16, p.1-39, 2007

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

KNAPIK, P.; MARANHO, L.T. **Avaliação da Revegetação em Área de Mineração, Região de Inundação do Rio Iguaçu, Araucária,** *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, p. 507-509, 2007.

LEDERMAN, I. E.; BEZERRA, J. E. F; CALADO, G. **A pitangueira em Pernambuco.** Recife, PE. IPA. Documentos, v. 19, p. 20, 1992.

LEE, M. .; NISHIMOTO, S.; YANG, L. L.; YEN, K. Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, Y. **Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*.** *Phytochemistry*, v. 44, n.7, p. 1343-1349, 1997.

LI, L.; WANG, J.; GUO, Y.; JIANG, F.; XU, Y.; WANG, Y.; PAN, H.; HAN, G.; LI, R.; LI, S. **Development of SSR markers from ESTs of gramineous species and their chromosome location on wheat.** *Progress in Natural Science*, v.18, p.1485–1490, 2008.

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.

LUCAS, E.J.; HARRIS, A.S.; MAZINE, F.F.; BELSHAM, S.R.; NICLUGHADHA, E.M.; TELFORD, A.; GASSON, P.E.; CHASE, M.W. **Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales)**. *Taxon*, v.56, p.1105–1128, 2007.

MAIA , J. G. S.; ANDRADE , M. H. L.; DA SIL VA, M. H. L.; ZOGHBI , M. G. B. A. **New chemotype of *Eugenia uniflora* L. from North Brazil**. *Journal of Essential Oil Research*, v.11, p.727-729, 1999.

MAIA, L.C.D.; PALMIERI, D.A.; SOUZA, V.Q.D.; KOPP, M.M.; CARVALHO, F.I.F.D. e OLIVEIRA, A.C.D. **SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation**. *International Journal of Plant Genomics* p.1-9, 2008.

MARGIS, R.; FELIX, D.; CALDAS, J. F.; SALGUEIRO, F.; DE ARAUJO, D. S. D.; MOMOSE, Y. **Pentahydoryndolizidine and a-glucosidase inhibitors containing products of *Eugenia uniflora***. *Japan Kokai Tokkyo Koho*, v. 72, p.770, 2000.

MÁTYÁS, C. **Expected climate instability and its consequences for conservation of forest genetic resources**. In: GEBUREK, T.; TUROK, J. *Conservation and management of forest genetic resources in Europe*. Zvolen: Arbora Publisher, 2005. p. 465-476. (cap. 5)

MATSUMURA , T.; KASAI, M.; HAYASHI , A.; ARISA WA, M.; MOMOSE, Y.; ARAI , I.; AMAGA YA-KOMATSU Y. **A-Glucosidase inhibitors from Paraguayan Natural Medicine, Ñangapiry, the leaves of *Eugenia uniflora***. *Pharmaceutical Biology*, v.38, n.4, p.302-307, 2000.

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

METZKER, L.M. **Sequencing technologies - the next generation**. *Nature Reviews Genetics*, v.11 p.31-46, 2010.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities**. Nature, v. 403, p. 853-858, 2000.

MILACH, S.C.K. **Marcadores de DNA**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v.5, p.14-17, 1998.

MORAIS, S.M.; BRAZ FILHO, R.; MACHADO, M.I.L.; ALENCAR, J.W.; MATOS, J.A.A. **Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil**. Journal of Essential Oil Research, v.8, p.449- 451, 1996.

OXFORD NANOPORE. 2015. Disponível em: < <https://nanoporetech.com/>> Acesso em 30/12/2016

PACIFIC BIOSCIENCES. 2015. Disponível em: <<http://www.pacificbiosciences.com/>>Acesso em 30/12/2016.

PELACANI, M. G. N.; JESUS, A.R.G.; SPINA, S.M.; FIGUEIREDO, R.A. **Biología floral da pitangueira (*Eugenia uniflora* L., Myrtaceae)**. Argumento, n. 4, p. 17-20, 2000.

RASKO, D.A.; WEBSTER, D.R.; SAHL, J.W. **Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany**. The New England Journal of Medicine v.365, p.709–717, 2011.

RIBEIRO, A. V. Várzea de Sousa: Oportunidades de Investimentos na Paraíba. Secretário de Agricultura/PB. Palestra na FrutInvest-PB. 17 a 20/Nov, João Pessoa. 1998.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids**. Free Radical Biology and Medicine, v.20, n.7, p.933-956, 1996.

ROMAGNOLO, M. B.; Sousa, M. C. O. **Gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil.** Acta Botanica Brasilica, v. 20, n.3, p.529-548, 2006.

ROTHBERG, J.M.; HINZ, W.; REARICK, T.M.; SCHULTZ, J.; MILESKI, W.; DAVEY, M.; LEAMON, J.H.; JOHNSON, K.; MILGREW, M.J.; EDWARDS, M.; HOON, J.; SIMONS, J.F.; MARRAN, D.; MYERS, J.W.; DAVIDSON, J.F.; BRANTING, A.; NOBILE, J.R.; PUC, B.P.; LIGHT, D.; CLARK, T.A.; HUBER, M.; BRANCIFORTE, J.T.; STONER, I.B.; CAWLEY, S.E.; LYONS, M.; FU, Y.; HOMER, N.; SEDOVA, M.; MIAO, X.; REED, B.; SABINA, J.; FEIERSTEIN, E.; SCHORN, M.; ALANJARY, M.; DIMALANTA, E.; DRESSMAN, D.; KASINSKAS, R.; SOKOLSKY, T.; FIDANZA, J.A.; NAMSARAEV, E.; McKERNAN, K.J.; WILLIAMS, A.; ROTH, G.T. e BUSTILLO, J. **An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing.** Nature, v.475, p.348-352, 2011.

SANGER F.; NICKEN, S.; COULSON, A.R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proceedings of the National Academy of Sciences v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

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.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULO, C.; FRANCO, L; FERRO, E. **Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity.** Journal Ethnopharmacol, v.21, p.183-186, 1987.

SILVA, A. L. G.; PINHEIRO, M. C. B. **Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae)** Acta Botanica Brasiliensi, Brasilica, v.21, n.1, p.235-247, 2007.

SOBRAL-SOUZA, C.E., LEITE, N.F., CUNHA, F.A.B., PINHO, A.I., COSTA, J.G.M., COUTINHO, H.D.M. **Evaluation of cytoprotective and antioxidant activity of the**

extracts of *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium sorafricanum* Proença & Landrum against heavy metals. *Revista Ciências de la Salud*, v.12, n.3, p.401-409, 2014.

SOS Mata Atlântica, disponível em <https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/dados-mais-recentes/>, acessado em 31 de dezembro de 2016.

TEIXEIRA, M.P.; CRUZ, L.; FRANCO, J.L.; VIEIRA, R.B.; STEFENON, V.M. **Ethnobotany and antioxidant evaluation of commercialized medicinal plants from the Brazilian Pampa**. *Acta Botanica Brasilica*, v.30, p.47-59, 2016.

TORGGLER, M G F; CONTEL, E P B; TORGGLER, S. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. [S.l: s.n.], 1995.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. **Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42 n.2, p.289-306, 2006.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. **Total antioxidant capacity of fruits**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.44, p.701-705, 1996.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. **Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.304-309, 1997.

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.

WILSON, P.G.; O'BRIEN, M.M.; GADEK, P.A.; QUINN, C.J. **Myrtaceae revisited: a reassessment of intrafamilial groups**. *American Journal of Botany* v.88, p.2013-2025, 2001.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. **Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on allozyme studies.** Botanical Bulletin of Academia Sinica, v.37, n.1, p.141-146, 1996.

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

ANEXOS

Anexo 1: Carta de Submissão do artigo – Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências

20/01/2017 ScholarOne Manuscripts

 Anais da Academia Brasileira de Ciências

[Home](#)

[Author](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to
Anais da Academia Brasileira de Ciências

Manuscript ID
AABC-2017-0039

Title
Microsatellite markers discovery and characterization in *Eugenia uniflora* L. Myrtaceae

Authors
Sarzi, Deise
Justolin, Beatriz
da Silva, Clariane
Roesch, Luiz
Victoria, Filipe
Lemos, Rafael
Stefenon, Valdir

Date Submitted
20-Jan-2017

Author Dashboard

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2017. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.
[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

Anexo 2: Lista de primers validados in silico com as respectivas sequencias forward e reverse, o tipo de motivo e o número de acesso ao GenBank. De acordo com a validação: (*)primers que necessitam de ajustes para testes em laboratório e (**)primers a serem descartados para testes em laboratório. Os demais primers foram considerados ótimos para testes em laboratório.

Nome do Primer	Foward	Reverse	Sequência repetida	Número de acesso
Pit5	CATAATACTGCATTCGTGTA	TATCTGAAAATTTACCAAGC	(AT)8	KT873891
Pit15	ATTCACACAGTCTAATTTGG	GAAATATCCTGTTTGACAGA	(TC)6	KT873899
Pit16**	GTATCTTGCATAACCAAATC	AGAAGAAGAAGAAGATGAG G	(AG)7	KT873900
Pit17	TATCTTGCATAACCAAATCT	ATTGGTGAAACATACAACAC	(TCT)6	KT873901
Pit18	CAGAGAAATCTTAATGGTTG	TGAAATATCCCATAAAGAGA	(GA)7	KT873902
Pit19	TGGTTTAGTGAGTGAAAGTT	GAACTTTTTAATTTGTTGGA	(TC)11	KT873903
Pit21**	AATGTGGTCAAACAAATTAC	TTGGTACAGCTTCTTGTACT	(AC)9	KT873905
Pit24	GAGCATCATGATTACAGTTT	ACAATGTCAGAGAGTCAAAG	(GA)10	KT873906
Pit26*	GCAGTAAGGTAACAAGAGAA	TCCTGTTTTACAATGAAAGT	(AC)7	KT873908
Pit27	TAACAATAATGTAATGCCC	CTTAACTGGCTTTGAAGTA	(GA)6	KT873909
Pit28*	TGTTGTGCACTTGTATTAGA	CTCTTATCCTTCGAAAGTG	(GAA)7	KT873910
Pit29*	AAAATCATATTCCAAATTCA	GTTTAGTTTCCAAGCAGTAA	(ACC)7-(TC)7	KT873911
Pit32	TTCCAAGTTTCTATTTTCTG	TGTGTGTGAGTACTTTTGTG	(TTC)7	KT873912
Pit33	TGGATCCTCAAAGAGATAG	GAATACTTCTCAGGGATCTT	(GA)9	KT873913
Pit34	TTGAAACTACTCCTGAGAAA	TGGAAGATTTTTGTTATTGT	(TC)6	KT873914
Pit35	GAAGATTCTTGCACACTTAG	CTCCATATGAGGATCATAGA	(AT)10	KT873915

Pit36	AAGTGAATACCTCCTAGAGC	AATGATGAGACATATTTTGG (TTC)6	KT873916
Pit38	GTAGGTATGTCTTCTTGGCT	TAAAGAAGCTTTCTAACGAC (AG)6	KT873917
Pit42	TCAAGCTTTAATAGGATCTG	TTCCAAAATAGAGGATATGA (GT)6	KT873918
Pit44	AAACATTTATCCACTTGATG	AATAAGATCATTGCTTTTTG (AT)6	KT873919
Pit45	GAGGACTTAAACATCTCACA	GTTCTTGCTTCTATTTGCTA (TG)7	KT873920
Pit46**	TCATCTTTTCATTAGACCAC	GAAAATGAAAGAGAAAGAA (CT)8 A	KT873921
Pit47	TATGTACGTATCGAATCCTT	ATAGCATAGTTTCAGCACAT (ATC)6	KT873922
Pit48*	ACATGTTATCTAAACCGAAA	ATTTGCAGATTAATGTTGTT (AAG)7	KT873923
Pit49	GAGACAGAGAGGAGACAAG	AGAAGGGCACTGAATCT (CCT)6	KT873924
Pit53	AATAGCTTGGTAAACAAGTG	AGTCTTAAGCTGTTTCCAGT (AGC)8	KT873925
Pit54	AACATCTAATGGCACTACAG	CTCAGGATTTGTTCAAGTAG (GCA)7	KT873926
Pit55	CTCACATACCTTGAAAGAAG	TAATCAAGCATTTAATACGG (AG)6	KT873 927
Pit56	GACATCACTACTCCTTTCAA	TAATTTCAATGAACCAATTT (GAT)6	KT873928
Pit57	TGATTTTTATGCTAGTGGAT	TTTTGGCTTAATAAATATGG (CTC)6	KT873929
Pit59	GGTCAGATTGAATGTCTAAA	TCTTTTCATTTGAAGTTGTT (AG)6	KT873930
Pit60*	CGTGAGAAATTTTCAGTTAC	CGAGAGGTCTTATGTATTTG (TC)6	KT873931
Pit61	TGAACCATTAAGAAACATC	AATCTCTACCACTGGGTCT (GA)9	KT873932
Pit62**	TTTTTAAACAAAAAGAGCAC	AAATCATCCTTCTTCTCTTC (AG)8	KT873933
Pit63	CACTCCAGTCTGTAAAACAT	TCAATCTCAACAAGTTCTTC (GA)8	KT873934
Pit64*	AAAGCTAAAATTGAGCATAA	CCACTCTTTCTCTCTCTCTT (CT)7	KT873935
Pit65	TACATCGGGATTAAAGACTA	ATAGCTTTAAGGGTCTTGTT (TC)6	KT873936
Pit66	TTTCAAAGGAGTAAGAGTCA	CTCAGTATTTGAAAGCAACT (AT)6	KT873937

Pit67	GATTCTTCATGTCTTCTTCA	CCAATGTGAACTACTTTGTC (GA)6	KT873938
Pit69**	ACTTATGGGATACATTGACA	GCAATGAACAAAATAAAAAGT(TG)6	KT873939
Pit70	TGTCCAGATTAAACCTAAGA	GTGGGTTTAATGGTAATGTA (GA)8	KT873940
Pit71*	TTGGTTTAGATTAAAAATCG	AGTTAATGTCACAAGATCCA (ATT)7	KT873941
Pit72	GTTGAATGAGAAGAGTGATG	GTAAGTAGATAAACGCCACA (TC)6	KT873942
Pit73	GAGATTTTGAGAATTTTGTG	GAATTCTGTCCTTAATCAAT (AGA)7	KT873943
Pit74**	TCCCTATGAGCAGATACTAA	AAAAGAAGGACAAAGAGAA (CTT)6	KT873944
		T	
Pit75	CAAAGAGATGGGATATACA	GATTGCTATGAAGAGAATCA (TCT)6	KT873945
Pit76**	ACAATATAAGTCAAGAGGCA	AAAAGAGAGGTTGAAAAGA (GTA)7	KU519440
		T	
Pit77	ATATTAAATTGGGTTTCCTT	GATGTTCTCAAGAATCAAGA (TC)8	KU519441
Pit78	G TTCAGGTCATTTGACATAC	GTATGTATTTGTGGCTCAGT (CA)6	KU519442
Pit79	CTTTTCAGATCAACAGAGAG	ATACCAACAGATGACAGAAA(CT)7	KU519443
Pit80	CATCATTCTTTGTCTTGATT	AAAGATGATACATATGCCTG (AG)6	KU519444
Pit81	GGAGTGATCATCATGTAGAG	TTGGAAATTTGAAGAATTAG (AC)6	KU519445
Pit83	TTGGCAATAGTCTGTAATTT	GCTAAAATCATAACTTGCTC (TC)8	KU519446
Pit84	ACAATCGAAACAAGAAGAG	AGTCATGGCCTCTCAAT (TCG)6	KU519447
Pit85	TAATTAATGTTAATCTCGGG	GTTTACTCGATCACTTTCAC (AT)6	KU519448
Pit86	AGAATGTGATTAACCTCCAA	TTTATCACCTTACACACACC (GA)9	KU519449
Pit87	GCCTGACAATAACAATTAAC	GAACTTGAATAAAGCAAGAA(AG)7	KU519450
Pit88	ATTGATAAGTTCATGTCCTG	TATCTCTTTCATTTGTCGTT (CT)7	KU519451
Pit89*	GTAGCATCCTTCATAAAATG	TGTTTTAATGAGTGGAAGT (AG)6	KU519452

Pit90	TGAAATTATAGCACTTAGGG	CAACGAAAGGTAACAATATC (AT)7	KU519453
Pit91	TTGAAACTACACTATCCCAC	AAAACATAAGTTATAGAAGA (AG)7 ACTAA	KU519454
Pit94	GTATGGTGAATGAAGATGTC	CATATTGCTAAGAAATGACC (ATA)6	KU519455
Pit95	CAAGCACAAGAGTTTTTAAT	TAGCTAAATAAGATGGCATT (AG)10	KU519456
Pit96*	TAAACAAGATTAAAGGGCTA	ATCGAAGTATATCTGCTCAA (AT)8	KU519457
Pit97*	CTACCCAACCTATTTGAATG	AAGAGTTATGACCCTCAAGT (CT)7	KU519458
Pit98	ACACATTAATCTTCTGCAAC	CATAAACAGATTTTACAGGG (CAG)6	KU519459
Pit99*	TTTAGATGCTAGTTTTTCAGG	GACATACAGAAGTTCTTCCA (GT)6	KU519460
Pit101	TGAACACTTGTCGATCAT	GAAGAAGTAAGTTGAGACG (CT)6 A	KU519461
Pit105	CTTGACGAACGTAGATAGG	CTTCACATTAGATGCTAACC (CA)7	KU519462
Pit108	ACCCATATAACAATTTAGCA	GTACAATGGAGGAAGAAAG (CT)7 T	KU519463
Pit110	AGATGAAGAGTTGTGGTATG	TCCTAGATGAGGTATGTCTG (CT)9	KU519464
Pit111	CATCGATTTTATCAAGATGT	GTGGAGAGAAACACTAACA (CT)7 A	KU519465
Pit113*	CAGATATCTCGATTTTCTTG	CCATATTTCTACTCTCCACA (TCT)7	KU519466
Pit114	TATGCTTTTAAAGGAGCTAA	AAATATCATTGTTTAGACGC (AT)7	KU519467
Pit115	CTGGATTCATCATACTTTA	AGGAGGTCACATTTCTTTAT (AT)10	KU519468
Pit116	ACACAAAGTACCTGCATAAC	GATATTTGGCAGATTTGTAG (GA)7	KU519469
Pit117	TATATCAGCATGATCTCTCC	AAAATTTGTATTGCATTGTT (CT)8	KU519470
Pit119	GTTTGCTCTATAATCACTGC	TTACCTATGCTATTGTGGTT (AGA)6	KU519471
Pit120	TTAGAACCCTGTGAGATTTA	CTGACAAGTATGTTGAGGAT (CT)6	KU519472

Pit122	ATTATTACGAGAACTTGCTG	GTTGATCTGATTTCTCACAC (TC)7	KU519473
Pit123	GTAACCTCAGTTTTTCAGCAAC	AAATTACAGACACAATCCAG (GA)8	KU519474
Pit124	GGATTGTTTTCTACTCCTTT	AGAGTAGAATTATGGGGTTC (TC)9	KU519475
Pit125	GATGGAAGTGAAGAAATTG	TTTTGACTAAAGTCATGGAT (TTA)6	KU519476
Pit126	ATGTACTGTCTGTGGTTTGT	AGTTGGTTAGTCAGTCATTG (GA)9	KU519477
Pit127	TTTACGTCTAAACTTGCTTT	AGTAAGTAGCAATCGAAATG (TTA)7	KU519478
Pit128	CAGCATCCTTACAAAGTTAG	GATGGTCTAATTATACAGCG (GA)9	KU519479
Pit129**	CTTCGCTGTTAGTTCATACT	ATTCACACTAGCACATCTTC (CT)9	KU519480
Pit130*	TCCAAGTCATGGTCTATAAG	TCACTAATAACCAGACAACC (CT)8	KU519481
Pit131*	GTGATGATCTCTGTCAAATC	CTCATACTCAGCTCCAGATA (AG)9	KU519482
Pit133*	ATCTAATGTTTCGAGAGATGC	GAGAGATGAGATGAAAAAC (TC)7-(CGT)6 A	KU519483
Pit134	TGTTTTTCATCTCATCTCTC	TATCTAAACTGCTCAAAACC (CT)9	KU519484
Pit135**	CTCTCTCTTTTTGTGTTGAG	GAAAACCTACAAGTTAGGGGT (AG)7	KU519485
Pit137	ACATGTGATTTATTACTGGC	TGGAACCAGTGTTATTCTAC (GT)6	KU519486
Pit138	GACAAGTGTCCCTTCTTGAC	CTATCAAACACCTTCACCT (GAA)7	KU519487
Pit139	CTTTGATATGTTTTCCATGT	ACAGACGCTATGGTAGTAGA (AAT)6	KU519488
Pit140	CAGTATTTAGTAGGTGGTCG	CTAGGACATTAGCTCAAAGA (TC)10	KU519489
Pit141	CAGTCTCGTGTCTTGTAGAT	TGTCCATCTGTTTTACTTTT (GA)6	KU519490
Pit145	ATGTAATTGTGCATTTCTTT	TATTAGTTTCGTGGTCTTGT (TC)8	KU519491
Pit147	GTTAATCCGTTAACATCAG	AGATAACAACAGGAAACGT (GA)6 A	KU519492

Anexo3: Validação dos primers em gel virtual:

