

VALIDAÇÃO IN SILICO DE MARCADORES SSR DE EUGENIA UNIFLORA E TRANSFERIBILIDADE PARA SETE ESPÉCIES DE EUCALYPTUS

Clariane da Silva ¹

Clariane da Silva ²

Valdir Marcos Stefenon ³

Resumo:

Com o avanço das técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS), tem-se possibilitado o sequenciamento do genoma de espécies de interesse econômico, com custos relativamente baixos, desenvolvendo primers capazes de amplificar regiões ricas em microssatélites. A validação dos marcadores é de extrema importância, pois, é através dela que se obterá resultados confiáveis e adequados. Em relação aos testes de transferibilidade in silico, os quais requerem um banco de dados que possua informações de sequências gênicas da espécie em estudo, sendo ele o banco de dados de Sequências Expressas (EST). ESTs são marcadores de interesse pois controlam características fenotípicas importantes economicamente e permitem avaliar a distribuição de marcadores moleculares microssatélites em regiões transcrita e não transcrita. Espécies economicamente importantes da família Myrtaceae foram escolhidas para o estudo, sendo elas *Eugenia uniflora* e *Eucalyptus* spp. O presente estudo teve como objetivo validar primers de *E. uniflora* e testar sua transferibilidade para sete espécies de *Eucalyptus*. Para tal, foram utilizados dados obtidos no sequenciamento, montagem do rascunho do genoma de *E. uniflora*, prospecção de microssatélites e desenho de primers. A validação dos primers foi realizada através de uma simulação de eletroforese em gel. Após, obteve-se os bancos de dados de ESTs do Taxonomy browser, no site do NCBI, para sete espécies de *Eucalyptus*, sendo necessária a retirada de redundância, pois o banco de dados não possui curadoria e isso implica na possibilidade de muitas de suas sequências serem repetidas. As sequências repetidas foram excluídas e, por fim, realizou-se a simulação da PCR in silico. Da validação dos primers através dos géis, de um total de 111 primers testados, 80 primers amplificaram apenas um locus na região avaliada, demonstrando ser viáveis para a amplificação em laboratório. Dezoito primers apresentaram amplificação de dois loci na região avaliada e necessitam ser analisados em laboratório para ajustes na concentração de reagentes e temperaturas de anelamento. Contudo, 13 primers apresentaram amplificação de loci sobrepostos ou acima de três loci na região avaliada, tornando assim sua avaliação inviável. Para a transferibilidade através da comparação dos primers SSR de *Eugenia uniflora* (111) com os bancos de dados de EST de *Eucalyptus* por PCR virtual, obtivemos o número de primers transferíveis para cada espécie. O maior número de primers transferíveis foi para *E. gunni* (95), seguido de *E. camaldulensis* (94), *E. globulus* (89), *E. pellita* (86) e *E.*

grandis (84), *E. urophylla* (76) e *E. tereticornis* (35). A transferibilidade de primers foi relativamente alta quando comparada com dados presentes na literatura, obtendo sucesso. Porém, o fato de algumas espécies terem uma transferibilidade baixa, pode se dar também pelo baixo número de sequências disponíveis no banco de dados. Esses marcadores apresentam um alto custo para seu desenvolvimento e, por isso, uma alternativa de barateamento é de extremo interesse. Conclui-se que através da validação dos primers houve redução nos custos laboratoriais, e havendo possibilidade de transferibilidade dos primers SSR de *Eugenia uniflora* para as sete espécies de *Eucalyptus*.

Palavras-chave: Pitangueira. EST-SSR. Bioinformática.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

VALIDAÇÃO IN SILICO DE MARCADORES SSR DE EUGENIA UNIFLORA E TRANSFERIBILIDADE PARA SETE ESPÉCIES DE EUCALYPTUS

¹ Aluno de graduação. clariane.dasilva19@gmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. clariane.dasilva19@gmail.com. Apresentador

³ Docente. valdirstefenon@unipampa.edu.br. Orientador



VALIDAÇÃO *IN SILICO* DE MARCADORES SSR DE *EUGENIA UNIFLORA* E TRANSFERIBILIDADE PARA SETE ESPÉCIES DE *EUCALYPTUS*

1. INTRODUÇÃO

Com o avanço das técnicas de sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing - NGS), tem-se possibilitado o sequenciamento do genoma de espécies de interesse econômico, com custos relativamente baixos, desenvolvendo *primers* capazes de amplificar regiões ricas em microssatélites (MACHADO & SILVA 2013). A validação dos marcadores é de extrema importância pois, é através dela que se obterá resultados confiáveis e adequados para dar continuidade aos experimentos em laboratório, evitando gastos desnecessários. Características importantes a se considerar durante a validação de marcadores microssatélites de indivíduos heterozigotos, é que estes apresentam duas bandas de gel, enquanto que indivíduos homozigotos apresentam apenas uma banda (WEISING et al., 2005). Assim, isto pode se tornar uma influência durante a interpretação de dados da validação, podendo gerar falsos resultados (KIJAS et al., 1997; DEWOODY et al., 2004). Entretanto, a ocorrência desses alelos não amplificados são menos frequentes em marcadores SSR se for comparado aos microssatélites genômicos (LEIGH et al., 2006; LIEWLAKSANEEYANAWIN et al., 18 2004; RUNGIS et al., 2004). *In silico* temos que ter apenas uma banda devido à montagem, que não é feita em 2 cromossomos, mas em apenas 1 deles. Em relação à transferibilidade de marcadores pode se definir como a propriedade de determinados pares de *primers*, conseguirem flanquear regiões microssatélites de duas espécies filogeneticamente relacionadas, porém não idênticas (KULEUNG et al., 2004). A informação genética desses marcadores pode ser realizada através da conservação da ordem e conteúdo gênico que existem entre estas espécies (MUDGE et al., 2005), sendo isto possível devido ao fato de os genomas vegetais possuírem esta característica de conservação (KUMAR, 1999), porém deve-se levar em consideração a distância filogenética entre as espécies sob análise (KUMAR, 1999; KALÓ et al., 2004). Os marcadores SSR tem como principal característica o seu potencial de transferibilidade (VARSHNEY et al., 2005). Estes marcadores exibem maior mobilidade interespecífica do que os marcadores genômicos pelo fato deles serem derivados de regiões transcritas (SCOTT et al., 2000). Espécies economicamente importantes da família Myrtaceae foram escolhidas para este estudo, sendo elas *Eugenia uniflora* (L.) e *Eucalyptus* spp. O presente estudo teve como objetivo validar *primers* de *E. uniflora* e testar sua transferibilidade para sete espécies de *Eucalyptus*.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados dados obtidos no sequenciamento, montagem do rascunho do genoma de *E. uniflora*, prospecção de microssatélites e desenho de *primers*. A validação dos *primers* foi realizada através de uma simulação *in silico* de

eletroforese em gel. Após, obteve-se os bancos de dados de ESTs do *Taxonomy browser*, no site do NCBI, para sete espécies de *Eucalyptus*, sendo necessária a retirada de redundância, pois o banco de dados não possui curadoria e isso implica na possibilidade de muitas de suas sequências serem repetidas. As sequências repetidas foram excluídas e, por fim, realizou-se a simulação da PCR *in silico*. Os *primers* de *Eugenia uniflora* passaram por um processo de validação antes de serem submetidos a testes de transferibilidade. Durante a validação alguns *primers* não passaram pelos critérios impostos sendo assim descartados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da validação dos *primers* através dos géis, de um total de 111 pares de *primers* testados, 80 pares de *primers* amplificaram apenas um *loco* na região avaliada, demonstrando ser viáveis para a amplificação em laboratório. Dezoito pares de *primers* apresentaram amplificação de dois *loci* na região avaliada e necessitam ser avaliados em laboratório para ajustes na concentração de reagentes e temperaturas de anelamento. Contudo, 13 pares de *primers* apresentaram amplificação de *loci* sobrepostos ou acima de três *loci* na região avaliada e foram considerados inviáveis para testes em laboratório. Através do primeiro PCR *in silico* pôde-se obter um grande número de marcadores SSR para cada espécie, seguindo especificações de temperatura de anelamento e porcentagem de Guanina e Citosina. Como demonstra a Figura 1, foram obtidos 933 marcadores para *E. grandis*, 573 para *E. globulus*, 495 para *E. camaldulensis*, 244 para *E. pellita*, 179 para *E. gunnii*, 174 para *E. urophylla* e 47 para *E. tereticornis*, sendo que para *Eugenia uniflora* foram encontrados 111 marcadores. Após o número total de marcadores ser definido foi realizada uma segunda PCR *in silico* mostrando o número de amplicons redundantes, dos *primers* obtidos dos bancos de dados, quando comparados com os *primers* de *Eugenia uniflora*, obtivemos o número de *primers* transferíveis para cada espécie. A quantidade destes *primers* é demonstrado na Figura 2, onde observa-se um maior número de *primers* transferíveis para *E. gunnii* (95), seguido de *E. camaldulensis* (94), *E. globulus* (89), *E. pellita* (86) *E. grandis* (84), *E. urophylla* (76) e *E. tereticornis* (35). A transferibilidade de *primers* foi relativamente alta quando comparada com dados presentes na literatura, obtendo sucesso. De acordo com Brondani et al., (1998) isto ocorre pelo fato dos níveis de conservação das sequências entre as espécies testadas serem altas e terem similaridade com as sequências disponíveis no banco de dados. Através disso, pode-se dizer que os resultados observados sejam devido ao fato de algumas espécies terem uma transferibilidade baixa, ou também pelo baixo número de sequências disponíveis no banco de dados, contrário ao ocorrido nos dados anteriormente demonstrados.

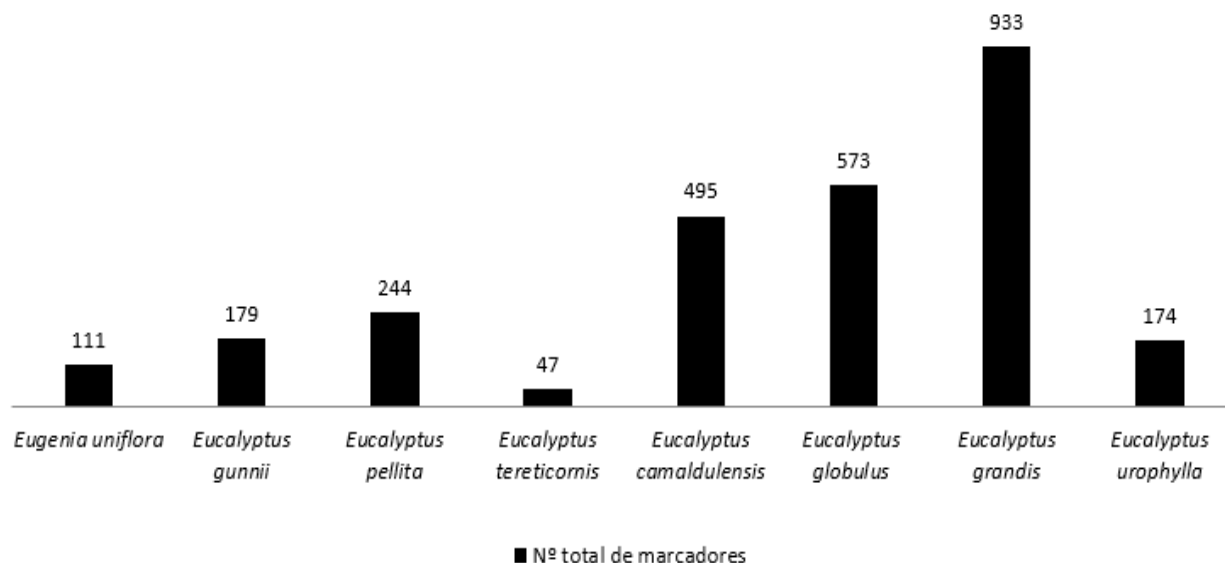


FIGURA 1: Número total de marcadores obtido para cada espécie, utilizando as especificações de temperatura de anelamento e porcentagem de Guanina/Citosina empregados para *E. uniflora*. A figura demonstra um maior número de marcadores para *Eucalyptus grandis* em um total de 933 SSR para a espécie. (Fonte: Autor, 2016)

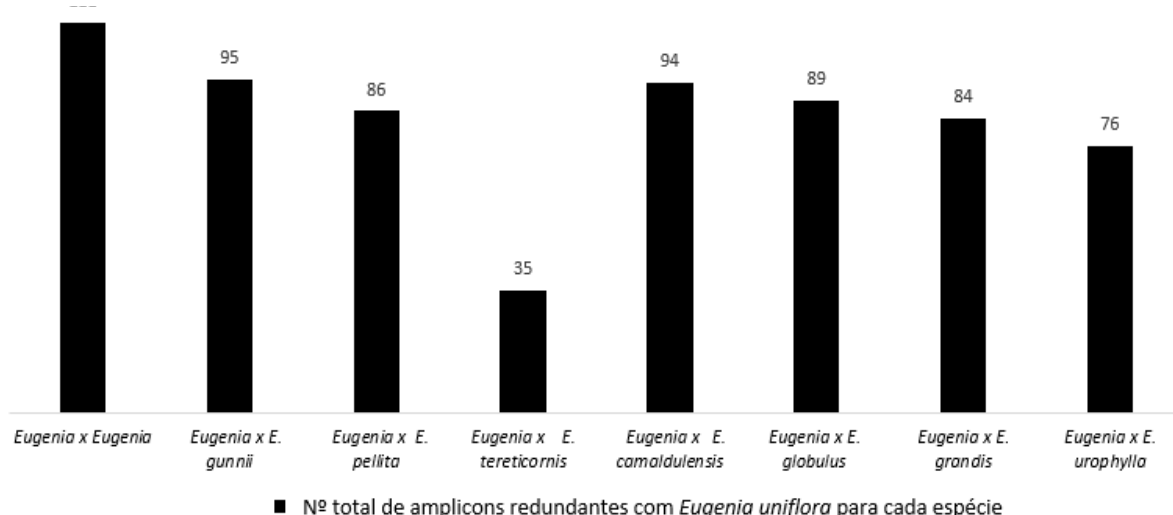


FIGURA 2: Número total de amplicons redundantes com *Eugenia uniflora* para cada espécie de *Eucalyptus*. (Fonte: Autor, 2016)

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente trabalho foi possível observar que a bioinformática com a melhoria dos programas facilitou a realização de tarefas laboriosas e exaustivas, economizando reagentes, comparando sequências de DNA e gerando resultados potencialmente significativos. Através dos resultados obtidos pode-se concluir que há possibilidade de transferibilidade dos *primers* SSR de *Eugenia uniflora* para as sete espécies de *Eucalyptus*, tendo a validação *in silico* de *primers* SSR como uma alternativa de barateamento de extremo interesse, pois permite excluir previamente marcadores que não seriam ideais.

Como perspectivas, após os *primers* validados *in silico*, estes deverão ser testados em laboratório e poderão ser utilizados para estudos de genética de populações, evolução e melhoramento genético.

5. REFERÊNCIAS

- BRONDANI, R.P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. **Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* e *E.urophylla***. Theoretical and Applied Genetics, v.97, p.816-827, 1998.
- DEWOODY, J.; NASON, J.D.; SMITH, M. **Inferring demographic processes from the genetic structure of a metapopulation of *Boltonia decurrens* (Asteraceae)**. Conserv Genet, v.5, p.603–617, 2004.
- KALÓ, P.; SERES, A.; TAYLOR, S.A.; JAKAB, J.; KEVEI, Z.; KERESZT, A.; ENDRE, G.; ELLIS, T.H.N.; KISS, G.B. **Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum***. Molecular Genetics and Genomics, v.272, p.235-246, 2004.
- KIJAS, J. M. H.; THOMAS, M. R.; FOWLER, J. C. S.; ROOSE, M. L. **Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus***. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 94, p. 701-706, 1997.
- KUMAR, L.S. **DNA markers in plant improvement: An overview**. Biotechnology Advances, v.17, p.143-182, 1999.
- LEIGH, T. W.; PETERS, C.; AND SHELTON, J. **The consumer quest for authenticity: The multiplicity of meanings within the MG subculture of consumption**. Academy of Marketing Science. Journal v.34, n.4, p.481-493, 2006.
- LIEWLAKSANEEYANAWIN, C.; RITLAND, C.E, EL-KASSABY, Y.A and RITLAND. **Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs**. Theor Appl Genet v.109, p.361-369, 2004.
- MACHADO, E.L., SILVA, S.A. **Design And validation of SSR Microsatellite primers for castor bean**. Pesq. Agropec. Bras. v.48, p.1457–1463, 2013.
- MUDGE, M., VOUTAZ, J., SCHROER, C. & LUM, M. **Reflection Transformation Imaging and Virtual Representations of Coins from the Hospice of the Grand St. Bernard**. In The 6th International Symposium on Virtual Reality, Archaeology and Cultural Heritage (VAST2005). Eurographics Association, p. 29–39, 2005.
- RUNGIS, D., BERUBE, Y., ZHANG, J., RALPH, S., RITLAND, C.E., ELLIS, B.E., DOUGLAS, C., BOHLMANN, J. & RITLAND, K. **Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp) from expressed sequence tags**. Theor. Appl. Genet., v.109, p.1283–1294, 2004.
- SCOTT, K. D.; EGGLER, P.; SEATON, G.; ROSSETO, M.; ABLETT, E. M.; LEE, L. S.; HENRY, R. J. **Analyses of SSRs derived from grape ESTs**. Theoretical and Applied Genetics, v.100, p.723-726, 2000.
- VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. **Genic microsatellites markers in plants: features and applications**. Trends in Biotchnology, v.23, n.1, 2005.

WEISING, K.; NYBOM.; H, WOLFF, K. e KAHL G. **DNA fingerprinting in plants: Principles, Methods, and Applications.** 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, p.444, 2005.