

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA VIABILIDADE DE PRIMERS PARA MARCADORES MICROSSATÉLITES (SSR) EM EUGENIA UNIFLORA L.

Dalvan Carlos Beise ¹

Renata Machado Castro ²

Liana Bulcão Bittencourt ³

Cristiane Barbosa De Oliveira Matielo ⁴

Valdir Marcos Stefenon ⁵

Rafael Plá Matielo Lemos ⁶

Resumo:

Com o expressivo crescimento populacional e consequentemente o aumento da demanda por áreas de grande produção para alimentação, industrialização entre outros, vem causando efeitos negativos sobre o ambiente natural. Um dos maiores impactos é a fragmentação de florestas, a qual interfere diretamente no equilíbrio e na dinâmica ambiental, resultando na diminuição da biodiversidade. Este cenário é recorrente em praticamente todo país. No Rio Grande do Sul não é diferente, há uma grande preocupação em entender quais os processos e o efeitos causados que estão ocorrendo nos remanescentes florestais. Buscando entender estes processos, a aplicação de ferramentas de biologia molecular e estudos genéticos tem aumentado significativamente. Uma delas é o emprego de marcadores moleculares, os quais podem fornecer variadas informações a nível genético sobre a estrutura populacional das espécies. Nesta perspectiva, este trabalho objetivou avaliar a eficiência de primers para marcadores moleculares microssatélites (SSR), desenvolvidos especificamente para a espécie nativa *Eugenia uniflora* L. Utilizando-se da técnica de PCR e eletroforese foram testados 24 primers, dos quais 11 apresentaram sucesso de amplificação, desta forma mostrando-se eficientes para o emprego em estudos genéticos.

Palavras-chave: DNA, PCR, Marcadores Moleculares, Eletroforese, Amplificação

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA VIABILIDADE DE PRIMERS PARA MARCADORES MICROSSATÉLITES (SSR) EM EUGENIA UNIFLORA L.

¹ Aluno de graduação. dalvanbio@gmail.com. Autor principal

² Aluna de Graduação. reodacham@gmail.com. Co-autor

³ Aluna de Graduação. lianabttpetrarca@gmail.com. Co-autor

⁴ Aluna de Pós-Graduação. crixdoliveira@gmail.com. Co-autor

⁵ Docente. valdirstefenon@unipampa.edu.br. Orientador

⁶ Aluno de Pós-Graduação, Técnico de Laboratório. rafael.matielo@unipampa.edu.br. Co-orientador

AValiação PRELIMINAR DA VIABILIDADE DE PRIMERS PARA MARCADORES MICROSSATÉLITES (SSR) EM *EUGENIA UNIFLORA* L.

1 INTRODUÇÃO

O ambiente vem sofrendo ano após ano com a redução da cobertura vegetal devido ao intenso crescimento demográfico. A expansão das atividades antrópicas como agricultura, pecuária, industrialização e ocupação urbana vem resultando na alteração da paisagem natural e consequentemente em fragmentação florestal (SALGUEIRO et al., 2004). Este cenário é recorrente no Rio Grande do Sul e diversos estudos apontam a fragilidade dos biomas presentes neste estado. A fragmentação e redução de habitat contribui para a diminuição da biodiversidade e para o isolamento de populações remanescentes, podendo causar mudanças na história evolutiva das espécies (BIERREGAARD et al., 1992).

Como consequência do isolamento geográfico, pode ocorrer a diminuição do fluxo gênico entre as populações e o aumento da deriva genética, sendo esta última caracterizada pela variação aleatória das frequências gênicas ao longo das gerações e por ter como consequência a fixação ou extinção de alelos (FERREIRA et al., 2002), submetendo a espécie a um possível risco de extinção (LOVELESS & HAMRICK, 1984). Devido a isso, nos últimos anos houve um aumento significativo de metodologias na genética e biologia molecular, buscando resolver problemas e aumentar a eficiência dos programas de conservação e uso dos recursos genéticos vegetais, (FALEIRO, 2007).

Com o avanço das tecnologias, vários marcadores moleculares surgiram, detectando polimorfismo genético diretamente no DNA. Isso tem permitido estudos de evolução, de diversidade genética intra e interespecífica, de identidade, origem genética e identificação de novas variantes, gerando informações importantes para subsidiar diferentes ações de pesquisa. O marcador microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), consiste em sequências simples de 1-6 pares de bases repetidas em *tandem*, isto é, uma após a outra, e podem ser encontrados em grandes quantidades e uniformemente distribuídos pelo genoma das plantas. Além de serem codominantes, multialélicos e com o mais alto conteúdo de informação de polimorfismo (ZUCCHI, 2003), podem ser utilizados para avaliar e monitorar similaridade, variabilidade e relação genética entre genótipos.

A caracterização e validação de marcadores SSR é de extrema importância para espécies nativas pouco estudadas e que estejam sendo exploradas sem medidas de manejo ou que estejam sofrendo com a fragmentação florestal. Com esta perspectiva, este trabalho objetivou avaliar a eficiência dos primers desenvolvidos por SARZI, D. et al. (no prelo), específicos para *Eugenia uniflora* L. (pitangueira), espécie nativa pertencente à família Myrtaceae, amplamente distribuída no Brasil, e que apresenta grande interesse econômico e alto potencial para emprego em processos de restauração e conservação ambiental.

2 METODOLOGIA

Os primers analisados neste trabalho foram desenhados por SARZI, D. et al. (no prelo). Os mesmos foram sintetizados pela empresa Canadense Alpha DNA. Foram avaliados 24 conjuntos de primers, sendo eles: Pit 26, Pit 32, Pit 34, Pit 38, Pit 48, Pit 53, Pit 57, Pit 64, Pit 66, Pit 71, Pit 72, Pit 77, Pit 78, Pit 84, Pit 88, Pit 98, Pit 105, Pit 115, Pit 119, Pit 123, Pit 125, Pit 138, Pit 139 e Pit 140. A amplificação foi realizada via PCR (reação em cadeia da polimerase), em uma mistura de reação com um volume final de 12,5 µL, contendo cerca de 50 ng de DNA, 0,25 µM de tampão, 0,5 µM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA-Polymerase 0,05 µM de cada dNTP, 0,125 µM de primer *foward*, 0,125µM de primer *reverse*, e 0,125 µM do

iniciador M-13 (50-TGTAAAACGACGGCCAGT-30) marcado com fluorescência AlexaFluor 680 (Invitrogen®).

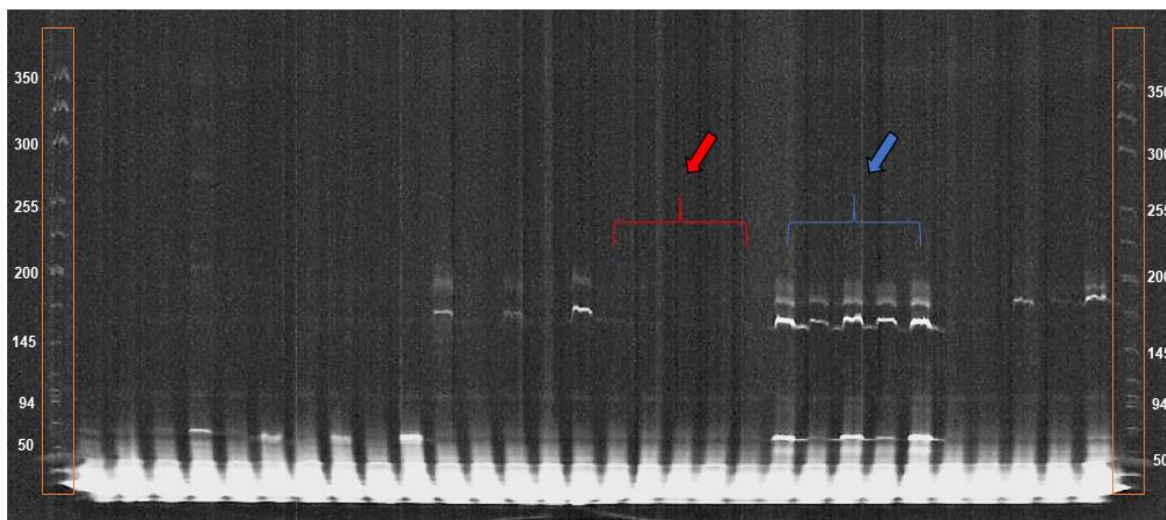
As amplificações foram realizadas em um termociclador BIO-RAD C1000 Touch. Com uma etapa inicial de 94 °C por 3 minutos, seguido de um período de desnaturação com 94 °C por 45 segundos. A temperatura de anelamento foi ajustada conforme indicações dos primers utilizados, variando de 47 °C a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, para um total de 34 ciclos, com uma extensão final de 72 °C durante 10 minutos. A conferência de amplificação foi através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, utilizando o sequenciador de DNA automático Li-Cor 4300 S. Com o auxílio do *software* SAGA^{gr} (LiCor Inc.) foi possível visualizar e confirmar a eficiência dos primers, visualizando a presenças de bandas de amplificação dos locos.

Cada primer foi testado para as mesmas amostras de DNA, sendo cinco indivíduos de uma população natural de *Eugenia uniflora* L. pertencente a um remanescente florestal de Mata Atlântica, localizado na região central do estado do Rio Grande do Sul. As amostras foliares coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel até o momento da extração de DNA. A extração foi realizada através do método CTAB 2%, (DOYLE & DOYLE, 1987) com modificações, quantificadas em gel de agarose 0,8 % e via espectrofotômetro NanoVueTM, purificadas com o reagente Agencourt® AMPure® XP.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

A confirmação da eficiência dos primers foi obtida por meio de eletroforese em gel como apresentado na Figura 1. Nesta é possível visualizar o sucesso de amplificação através da presença de bandas (seta azul), e a inexistência de amplificação (seta vermelha), e em ambas as laterais é observado o *ladder* (retângulo laranja), seguido das variações do tamanho do produto de amplificação.

Figura 1- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% indicando os resultados de amplificação.



Fonte: do autor, 2018.

Desta forma, 24 primers avaliados apenas 11 apresentaram amplificação para os locos desenhados (Tabela 1), seguida das informações como temperatura de anelamento (recomendado pela fabricante), região de amplificação de pares de base e motivo de repetição, sendo dímeros ou trímeros, (ambos obtidos no momento de seu desenho).

Tabela 1- Primers que apresentaram amplificação e suas características.

Anais do 10º SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO - SIEPE
Universidade Federal do Pampa | Santana do Livramento, 6 a 8 de novembro de 2018

Locos	Primers Forward/Reverse	T _M °C	Tamanho do produto (estimado)	Motivo
Pit_26	GCAGTAAGGTAACAAGAGAA TCCTGTTTTACAATGAAAGT	52	259	AC
Pit_34	TTGAAACTACTCCTGAGAAA TGGAAGATTTTTGTTATTGT	50	242	TC
Pit_38	GTAGGTATGTCTTCTTGGCT TAAAGAAGCTTTCTAACGAC	54	273	AG
Pit_48	ACATGTTATCTAAACCGAAA ATTTGCAGATTAATGTTGTT	50	123	AAG
Pit_53	AATAGCTTGGTAAACAAGTG AGTCTTAAGCTGTTTCCAGT	56	165	AGC
Pit_57	TGATTTTTATGCTAGTGGAT TTTTGGCTTAATAAATATGG	50	276	CTC
Pit_71	TTGGTTTAGATTAAAAATCG AGTTAATGTCACAAGATCCA	54	173	ATT
Pit_72	GTTGAATGAGAAGAGTGATG GTAAC TAGATAAACGCCACA	56	279	CT
Pit_84	ACAATCGAAACAAGAAGAG AGTCATGGCCTCTCAAT	50	259	TCG
Pit_98	ACACATTAATCTTCTGCAAC CATAAACAGATTTTACAGGG	54	167	CAG
Pit_115	CTGGATTTCATCATACCTTTA AGGAGGTCACATTTCTTTAT	54	211	AT

Fonte: do autor, 2018.

A partir do resultado obtido nesta análise pode-se inferir possíveis fatores que influenciaram o não sucesso de alguns primers, como a utilização de diferentes reagentes, temperaturas não ideais para a amplificação, a qualidade do DNA utilizado para a amplificação, ou ainda a inexistência de determinado loco para a população testada. Por isso, ressaltamos a importância de ajustes destas variáveis para um maior número de primers válidos para aplicações futuras. Contudo, estes 11 primers que obtiveram sucesso pode-se indicar para estudos genéticos, onde visam descobrir a estrutura genética das populações naturais remanescentes, uma vez que estes estudos podem mostrar a dinâmica ecológica e os efeitos causados pela degradação ambiental.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados desta avaliação, foi possível confirmar a eficiência dos primers através da presença de amplificação, e estes podem ser diretamente recomendados para aplicações em estudos genéticos. Entretanto, os demais primers devem ser investigados quanto aos possíveis motivos para o não funcionamento, realizando novos testes em laboratório.

REFERÊNCIAS

BIERREGAARD, R. O.; LOVEJOY, T. E.; KAPOV, V.; SANTOS, A. A.; HUTCHINGS, W. The biological dynamics of tropical rainforest fragments. **BioSciences** 42: p. 859-866. 1992.

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

FERREIRA, M. A. J, QUEIROZ, M. A. De.; VENCovsky, R.; BRAZ, L. T, VIEIRA, M. L. C. R.; BORGES, M. E.; Sexual expression and mating system of watermelon: implications in breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 75: p. 171-177 2002.

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

LOVELESS, M. .; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics** 15: p. 65-95. 1984.

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

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

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