

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

CAROLINE WENCESLAU DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE PRIMERS MICROSSATÉLITES PARA *Campomanesia
adamantium* (CAMBESS.) O. BERG**

**PATOS DE MINAS-MG
JULHO DE 2019**

CAROLINE WENCESLAU DA SILVA

VALIDAÇÃO DE PRIMERS MICROSSATÉLITES PARA *Campomanesia adamantium* (CAMBESS.) O. BERG

“Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia”

Orientadora: Prof. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira

PATOS DE MINAS – MG

JULHO DE 2019

CAROLINE WENCESLAU DA SILVA

VALIDAÇÃO DE PRIMERS MICROSSATÉLITES PARA *Campomanesia adamantium* (CAMBESS.) O. BERG

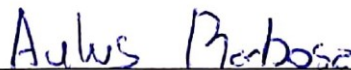
“Monografia apresentada ao Instituto de biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia”

Banca examinadora:



Prof. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira – UFU

Presidente



Prof. Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa – UFU

Membro



Me. Diego Cerveira de Souza – Ministério Público do Estado de Minas Gerais

Membro

Patos de Minas, 03/07/2019

RESUMO

O Cerrado é considerado a savana mais rica do planeta abrigando mais de 10.000 espécies de plantas. Uma das espécies presente nesse bioma é a *Campomanesia adamantium*, conhecida popularmente como gabirobeira, guavira ou gabiroba pertencente à família Myrtaceae. Seu fruto com sabor específico e seu alto teor de açúcar e vitamina C tem grande apreciação da população, podendo ser consumido *in natura*, ou na forma de doces, sorvetes e bebidas. Embora apresente grande potencial econômico, são escassos os estudos com marcadores moleculares na espécie *C. adamantium* para programas de melhoramento genético. Nesse contexto, o trabalho foi realizado com o objetivo de validar primers de *Eucalyptus sp* para a amplificação de microssatélites em *C. adamantium*. Foram coletadas quatro plantas em uma população da espécie no município de Coromandel - MG e o DNA foi extraído a partir de folhas jovens e saudáveis. A PCR foi realizada com doze primers de *Eucalyptus spp* em temperaturas de anelamento descritas na literatura e temperaturas de anelamento reais dos primers. Os fragmentos amplificados foram analisados a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida 8 %. A concentração de DNA de cada amostra teve uma média de 617,46 ng/ μ L. Dos 12 primers, quatro iniciadores não apresentaram produtos de amplificação, nas duas temperaturas avaliadas; um não amplificou na temperatura de anelamento descrita na literatura e amplificou fragmentos inespecíficos na temperatura de anelamento real; um amplificou fragmentos inespecíficos nas duas temperaturas de anelamento; três amplificaram fragmentos específicos e inespecíficos nas duas temperaturas; e dois, em que a temperatura descrita na literatura e a temperatura real do primer foi a mesma, amplificaram fragmentos inespecíficos. O presente estudo indicou que não houve transferibilidade dos primers de *Eucalyptus spp*. para *C. adamantium*, demonstrando a necessidade de novas avaliações com primers de microssatélites de espécies mais próximas de *C. adamantium*.

Palavras-chaves: marcadores moleculares, SSR, Cerrado, fruteiras nativas

ABSTRACT

Cerrado is considered the richest savannah on the planet sheltering more than 10,000 species of plants. One of the species present in this biome is *Campomanesia adamantium*, known as gabirobeira, guavira or gabiropa belongs to the family Myrtaceae. Its fruit with specific flavor and its high content of sugar and vitamin C has great appreciation of the population, and can be consumed in natura, in the form of sweets, ice cream and drinks. Although it presents great economic potential, studies with molecular markers in the *C. adamantium* species for breeding programs are scarce. In this context, the work was carried out with the objective of validating *Eucalyptus* sp primers for the amplification of microsatellites in *C. adamantium*. Four plants were collected in a population of the species in the municipality of Coromandel and the DNA was extracted from young and healthy leaves. PCR was performed with twelve *Eucalyptus* spp primers at annealing temperatures described by literature and the actual annealing temperature of the primers. Amplified fragments were analyzed from 8 % polyacrylamid gel electrophoresis. The DNA concentration of each sample had a mean of 617.46 ng / μ L,. Of the 12 primers, four primers did not present amplification products at the two evaluated temperatures; one did not amplify at annealing temperature of literature and amplified non-specific fragments at the actual annealing temperature; one amplified non-specific fragments at the two annealing temperatures; three amplified specific and non-specific fragments at the two temperatures; and two, in which the temperature described by literature and real primer temperature is similar amplified non-specific fragments.. The present study indicated that there was no transferability of *Eucalyptus* spp. for *C. adamantium*, demonstrating the need for new evaluations with microsatellite primers of species closer to *C. adamantium*.

Keywords: molecular markers, SSR, Cerrado, native fruit trees

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REFERENCIAL TEÓRICO	8
2.1 <i>Campomanesia adamantium</i> e sua importância econômica	8
2.2 Marcadores moleculares em plantas	10
2.3 Marcadores moleculares microssatélites	11
2.4 Transferibilidade de marcadores microssatélites	12
3 OBJETIVOS	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Material biológico	14
4.2 Extração do DNA	15
4.3 Amplificação do DNA	15
4.4 Eletroforese e revelação de gel de poliacrilamida	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6 CONCLUSÕES	21
REFERENCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui ampla variedade de plantas, distribuída em seus ecossistemas, o que representa uma grande variabilidade genética.

Um dos principais biomas brasileiros, em extensão, é o Cerrado, que ocupa 22 % do território nacional, abrangendo os estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, São Paulo e Tocantins, além do Distrito Federal (HENRIQUES, 2005), sendo considerado um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade (SILVA, 2009). Devido a sua diversidade biológica é reconhecido como a savana mais rica do mundo e abriga mais de 10.000 espécies nativas de plantas já catalogadas (BRASIL, 2018).

A gabirobeira (*Campomanesia adamantium*) é uma espécie nativa do Cerrado, com predominância em Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (VIEIRA et al., 2011). Essa espécie tem um grande potencial econômico e aceitação popular devido ao seu fruto possuir sabor específico e alto teor de açúcar, sendo possível obter vários produtos, como geleias, sorvetes e até vinhos (OLIVEIRA, 2009). Porém, há poucos estudos sobre o melhoramento genético dessa fruta e seus genótipos, para obter uma maior produção e melhora na qualidade. O maior número de estudos disponíveis sobre a espécie está relacionado com a análise física e química dos frutos (VALLILO; BUSTILLOS; AGUIAR, 2006).

A avaliação da diversidade genética é essencial para programas de melhoramento genético que têm como objetivo desenvolver cultivares com maior produtividade, maior qualidade nutricional e também resistência a estresses bióticos e abióticos. Os melhores genótipos são selecionados e ocorre o cruzamento de indivíduos de desempenho superiores (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

Para a análise da variabilidade genética uma das técnicas bastante utilizada é o marcador molecular, que detecta polimorfismos em sequências de DNA. Essa tecnologia é um processo simples e rápido que pode auxiliar na detecção de genes de interesse de forma objetiva e precisa, viabilizando a caracterização genética (BERED et al., 1997).

Um dos marcadores utilizado é o microssatélite, sendo explorado de várias maneiras e possui uma grande importância no melhoramento de plantas. Conhecido também como SSR, são abundantes, codominantes e multialélicos, além de ser uma

técnica rápida e de baixo custo. Ocorrem frequentemente, porém suas frequências variam significativamente entre os diferentes organismos (GUPTA; VARSHNEY, 2000).

Nesse contexto, a partir do potencial econômico da gabioba e dos poucos estudos realizados, o presente estudo visa validar os marcadores SSR descritos por Miranda et al. (2016), quanto a capacidade de amplificação e detecção de polimorfismo, para posteriores estudos genéticos da espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Campomanesia adamantium* e sua importância econômica

A família Myrtaceae possui mais de 3600 espécies, distribuídas em 150 gêneros, sendo estas, de porte arbustivo e arbóreo, geralmente com flores brancas (MARTINS, 2018).

A espécie *C. adamantium* (Camb.) O. Berg (Myrtaceae) é uma espécie frutífera, nativa do Cerrado, conhecida popularmente como gabioba, guabioba-do-campo, guabioba-do cerrado, guabioba-lisa e guabioba-branca (VIEIRA et al., 2011).

A planta da gabioba é arbustiva, podendo chegar a até 2 m de altura, sendo bastante ramificada. Suas folhas têm tamanho de aproximadamente 3 a 10 cm, possui flores na cor branca formadas de setembro a outubro (MIRANDA, 2014) (Figura 1).

O fruto possui formato arredondado, com coloração de verde a amarelo (Figura 2), exala aroma cítrico e tem um alto teor de açúcar e vitamina C. As principais substâncias minerais encontradas nestes frutos são K, Ca, P, Mg, Fe e Al. O valor energético dos frutos de gabioba está intimamente relacionado com os carboidratos totais (11,6 %) (VALLILO et al., 2006).

Os frutos possuem grande potencial econômico devido as suas características, sendo utilizados na indústria de alimentos e de bebidas, sendo consumidos na forma *in natura*, em sorvetes, geleias, vinhos, licores entre outros (MUGNOL et al., 2012). As folhas e os frutos também são utilizados no tratamento de gripe, e segundo Vieira et al.

(2011), atuam no intestino reconpondo-o, devido a atividade vaso relaxante testada em ratos.

Figura 1 – Floração de *C. adamantium*.



Fonte: Autora

Figura 2 - Frutos de *C. adamantium*.



Fonte: Autora

Estudo realizado com as folhas de *C. adamantium* identificou nove substâncias com atividade antioxidante (COUTINHO et al., 2008). Suas sementes também servem de alimentos para grande número de aves e pequenos mamíferos (LORENZI et al., 2006).

2.2 Marcadores moleculares em plantas

O desenvolvimento de marcadores moleculares de DNA tem contribuído para novos avanços no melhoramento genético vegetal. A principal colaboração dos marcadores moleculares de DNA é a possibilidade de investigar o genótipo de um indivíduo sem a necessidade da ocorrência da expressão do gene e, conseqüentemente, excluindo-se a influência do ambiente (MILLACH, 2013). Os marcadores têm sido utilizados para marcação de genes de resistência a doenças, insetos e pragas, avaliação e caracterização de germoplasma, seleção de genitores, seleção assistida por marcadores, estudos de interação genótipo-ambiente, entre outras aplicabilidades (PRECZENHAK, 2013).

Os principais tipos de marcadores moleculares de DNA podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e Minissatélites ou locos VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”); SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions”) ou ASA (Amplified Specific Amplicon); Microsatélite (ou SSR - “Simple Sequence Repeats”); e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Cada marcador possui princípios e metodologias diferentes, requerendo uma cuidadosa consideração na escolha, de acordo com a aplicação e os recursos disponíveis (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

O uso dos marcadores moleculares está substituindo ou complementando a caracterização morfológica e agrônômica tradicional. A utilização de marcadores de DNA, particularmente para espécies frutíferas, que em geral apresentam período juvenil longo, por ser uma técnica simples e rápida, pode reduzir o tempo para o desenvolvimento de uma nova cultivar (TOPPA et al., 2013).

2.3 Marcadores moleculares microssatélites

Os microssatélites, conhecidos como repetições curtas em tandem (STRs) ou repetições de sequência simples (SSRs) têm uma grande importância no melhoramento genético vegetal por possuírem elevado conteúdo informativo e por serem amplamente distribuídos no genoma (GUIMARAES et al., 2009).

Em relação a outros marcadores, o microssatélite apresenta diversas vantagens. Em comparação com RFLP tem um menor custo, menos laborioso, não demanda de radioatividade e geralmente é mais polimórfico. É mais robusto do que o RAPD e mais versátil do que AFLP (GUIMARÃES et al., 2009).

Os microssatélites são sequências curtas, de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas em tandem e flanqueadas por sequências altamente conservadas. As suas principais características são: alto grau de polimorfismo, codominância, variação multi-alélica e alta reprodutibilidade. Podem ser classificados pelo tamanho, localização e tipo de unidade de repetição, denominada motivo de repetição, podendo se repetir de 5 a 50 vezes (ELLEGREN, 2004). Quanto ao número de nucleotídeo podem ser: mononucleotídeo, dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos (KALIA et al., 2011).

Wang et al. (2009) organizaram os microssatélites em classes, baseadas no número de nucleotídeos: simples perfeito quando não há interrupções entre as repetições (CA)_n, simples imperfeito em que há interrupções de uma base entre as repetidas (AAC)_n, composto no qual as sequencias repetidas são formadas ao lado (CA)_n(GA)_n e interruptos que observa-se interrupção na sequência (CCA)_nTT(CGA)_n.

Com base na sua localização no genoma, os microssatélites podem ser classificados como SSRs nucleares (nuSSR), mitocondriais (mtSSR) ou cloroplásticos (cpSSR) (KALIA et al., 2011). Nos últimos anos, os cpSSRs têm sido extensivamente utilizados para estudar variações genômicas em populações de plantas e fluxo gênico (PROVAN, POWELL, HOLLINGSWORTH, 2001) devido à sua herança uniparental.

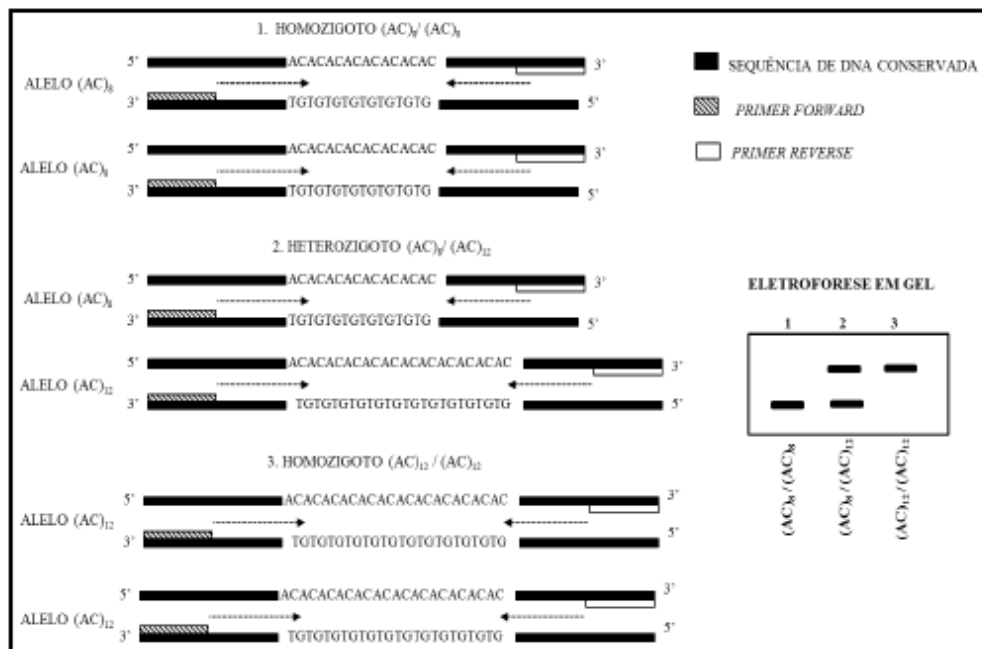
As regiões genômicas que flanqueiam as sequências repetidas são conservadas dentro de uma espécie, permitindo o desenho de pares de primers, entre 20 e 30 pb, que são utilizados para amplificar os microssatélites (GUIMARÃES et al., 2009).

O polimorfismo é devido a diferentes números de repetições nas regiões de microssatélites. Portanto, podem ser facilmente e reprodutivamente detectados pela

reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplifica os locos em diferentes genótipos. Para a separação dos fragmentos amplificados necessita de géis de alta resolução, uma vez que estes diferem por poucos pares de base (Figura 3) (ELLENGREN, 2004).

As possíveis explicações para a gênese do marcador incluem deslizamentos de DNA fita simples, crossing over e retrotransposição. Além disso, o DNA danificado pelo estresse externo, como irradiação UV, irradiação e estresse oxidativo, pode induzir mutações e aumentar as taxas de mutação em SSRs. Durante a replicação do DNA, a interação de recombinação também pode afetar a estabilidade do SSR (KALIA et al., 2011).

Figura 3 - Bases genéticas e detecção de polimorfismo de microssatélite.



Fonte: FERRÃO (2013)

2.4 Transferibilidade de marcadores microssatélites

Uma grande limitação dos marcadores microssatélites é o desenvolvimento de primers, que necessitam ser desenhados para cada loco. Apenas de 10 a 20 % dos primers isolados são informativos. A construção de biblioteca genômica envolve um processo trabalhoso, de alto custo e especialização nas técnicas para a caracterização do

marcador. Porém, após os testes e obtenção dos primers para uma espécie, o custo e trabalho são reduzidos (GUPTA et al., 2002 apud VASCONCELOS, 2016).

Existem, basicamente, dois tipos de bibliotecas gênicas: a biblioteca genômica e a biblioteca de cDNA. Uma biblioteca genômica representa um conjunto de clones individuais, totalizando o genoma inteiro de um organismo. São utilizadas para a identificação de genes ou fragmentos de DNA específicos (PINTO, 2019). Esse método baseia-se no DNA genômico de alta qualidade e fragmentado usando enzimas de restrição. A enzima depende do comprimento médio desejado de fragmentos de DNA, da repetição de microssatélites a ser encontrada e do tipo de extremidades (coesivas ou contudentes) dos fragmentos de restrição. O DNA fragmentado é, então, selecionado por tamanho, preferencialmente, obtendo pequenos fragmentos (300-700 pb). Dependendo do método de fragmentação, os fragmentos de DNA são ligados em um vetor plasmídeo comum, diretamente ou após a ligação a adaptadores específicos, para a identificação das regiões microssatélites (ZANE, BARGELLONI, PATARNELLO, 2002).

Enquanto a biblioteca de cDNA contém apenas os genes que codificam produtos proteicos, se diferenciando da biblioteca genômica por usar mRNA, que a partir da transcriptase reversa é convertida em cDNA. Este tipo de biblioteca é utilizado com a finalidade de obter EST (*Expressed Sequence Tags*) (ZANE, BARGELLONI, PATARNELLO, 2002).

Atualmente existe um grande número de marcadores microssatélites para genomas de plantas completamente sequenciados. Usando alguns programas de computador, os dados de sequências para os genes e os clones de cDNA podem ser baixados do GenBank e digitalizados para identificação de SSRs, que são tipicamente referidos como EST-SSRs ou microssatélites gênicos (VARSHNEY, GRANER, SORRELLS, 2005; ZANE, BARGELLONI, PATARNELLO, 2002).

Os microssatélites genômicos e gênicos podem ser transferidos para outras espécies baseados na homologia entre estas espécies (VARSHNEY, GRANER, SORRELLS, 2005), utilizando primers específicos heterólogos. Assim, facilitando a obtenção de dados em relação a espécies que não tem primers desenvolvidos. Os já desenvolvidos podem ser usados na identificação de espécies filogeneticamente próximas (VARSHNEY, GRANER, SORRELLS., 2005).

Tanto marcadores microssatélites gênicos como os genômicos podem ser transferidos entre espécies. Porém, devido a uma maior conservação evolutiva e por estarem localizados em regiões expressas, estudos revelam que marcadores gênicos tendem a apresentar uma maior taxa de transferibilidade (KALIA et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O trabalho teve como objetivo principal validar primers de *Eucalyptus spp* para a amplificação de microssatélites em *C. adamantium*.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar amostras de DNA de gabirobeiras coletadas em uma população natural do município de Coromandel - MG;
- Avaliar a amplificação a partir de primers microssatélites para *C. adamantium* em diferentes temperaturas de anelamento;
- Analisar marcadores microssatélites polimórficos para posteriores estudos de diversidade genética de *C. adamantium*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico

Foram coletadas folhas jovens e sadias de quatro gabirobeiras de uma população natural localizada no município de Coromandel, em Minas Gerais, Brasil.

As folhas coletadas foram congeladas a -80 °C por 24 h e levadas ao liofilizador por 48 h, para a desidratação por sublimação, sob baixa pressão e temperatura, para a

preservação dos constituintes celulares. O material seco foi utilizado para extração do DNA genômico.

4.2 Extração do DNA

A extração foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Souza e Teixeira (2019), com modificação na utilização de tubos eppendorf de 15 mL para 2 mL. As folhas desidratadas das quatro plantas de gabirobeiras foram trituradas com um pistilo em almofariz, transferidas para tubo eppendorf de 2 mL e posterior adição de tampão de extração (1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCL pH 8, 20 Mm EDTA, 5 % Triton X-100, 5 % SDS), previamente aquecido. Em seguida o tubo foi agitado em vortex por 30 segundos e levado ao banho maria a 65 °C por 15 minutos.

Após a retirada do banho maria houve rápida agitação em vortex, descanso por alguns segundos e o sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo de eppendorf de 2 mL. O tubo foi levado a centrífuga por 7 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo eppendorf de 2 mL e adicionado igual volume de álcool etílico absoluto, invertendo o tubo até a precipitação do DNA. Feito isso, o tubo foi colocado na centrífuga por 7 min a 13000 rpm, o sobrenadante descartado, o pellet secado em temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL de água ultrapura.

A quantificação das amostras e a análise de pureza de DNA realizou-se em espectrofotômetro de microvolumes – L – Quant Loccus por leitura em absorbância a 230, 260 e 280 nm. A relação A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} foi utilizada para avaliar a pureza do DNA extraído.

Após a quantificação as amostras de DNA foram diluídas em água ultrapura para uma concentração final de 2,5 ng/ µL e armazenadas a -20 °C até a amplificação.

4.3 Amplificação do DNA

Foram utilizados 12 pares de primers (Tabela 1) derivados de *Eucalyptus spp.* e validados em *C. adamantium* por Miranda et al. (2016). Para cada par de primer foram avaliadas duas temperatura de anelamento, uma de acordo com Miranda et al. (2016) e a

outra obtida a partir da ferramenta Oligo analyzer (www.idtdna.com), definida aqui como temperatura de anelamento real do primer.

Tabela 1 - Sequências dos pares de *primers* desenvolvidos para *Eucalyptus* sp. que amplificaram locos microssatélites em *C. adamantium*, com as respectivas temperaturas de anelamento (Ta) e a quantidade de pares de bases encontradas por Miranda et al. (2016).

Identificação	Marcador	Sequências	Ta	Ta*	Pb (MIRANDA et al., 2016)
1	EMBRA 809	F-5' CCTCACGCCAAAAGAAGAAG3' R-5' GGGAAATCGAAGAAACGATGA3'	54° C	58.5 °C	201/227
2	EMBRA1076	F-5' GCTGAACCTGATGGACCAGT3' R-5' CTTAGGGACCACCACCTTGA3'	56° C	61° C	376/331
3	EMBRA1335	F-5' TTGCTCCCATGATTACTCCC3' R-5' GTCTTCATCCTGGCAAGAGC3'	56° C	60° C	314/318
4	EMBRA1362	F-5' ACTTGATGGGTTCTCATCGC3' R-5' GGAAATCCTTACCACCAGCA3	59° C	60° C	274/296
5	EMBRA1363	F-5' CCATAGCCCTCTGCTGATTC3' R-5' AATGGAAAATGGGTTCTCC3	58° C	58° C	304/318
6	EMBRA1364	F-5' CGTTTTGCTCCTCTCTCTC3' R-5' GTAGAGATCGGGTCCCTTG3'	59° C	59° C	305/345
7	EMBRA1374	F-5' GTCTGAACTCGGCTTCCTTG3' R-5' TTCTCCCGTTGTAAATCCG3'	55° C	58.5 °C	354/384
8	EMBRA1470	F-5' GCCAACCCTCTAAAAGACC3' R-5' CAACTGCTACGACGTCCAAA3'	56° C	60° C	321/325
9	EMBRA1811	F-5' GTCGAGTTGAGTTCGCTTCC3' R-5' AGTGAATCGGGAGAGGAGGT3	62° C	60,5 °C	199/203
10	EMBRA1868	F-5' TGTGGAGCATGGAGTAGCAG3' R-5' CAAATCTCAGAGACGCCACA3'	62° C	60,5 °C	269/297
11	EMBRA1939	F-5' AGATCTCATCCATGGCGTTC3' R-5' ACATCGCGATCTTCTCGAC3'	58° C	60° C	228/250
12	EMBRA2011	F-5' AAAATACGACCGCCATGAAG3' R-5' TTGTGAGAGACGGAGACGTG3'	58° C	59° C	266/298

Ta: Temperatura de anelamento do primer de acordo com Miranda et al. (2016);

Ta*: Temperatura de anelamento real do primer.

A reação de amplificação foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Miranda et al. (2016), com modificação na concentração de dNTPs, adição de MgCl₂ e não utilização de BSA. As concentrações da reação foram: 7,5 ng de DNA, 0,22 uM de

cada primer, 0,23 mM dNTPs, 1 X tampão da enzima, 1,5 mM MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e o volume completando para 10 uL com água ultrapura. Foi utilizado termociclador Amplitherm modelo TX 96 com a seguinte programação: 5 min a 94 °C para a desnaturação, 35 ciclos de amplificação (30 segundos a 94 °C, 1 min para o anelamento dos primers com a temperatura específica para cada primer, 1 min a 72° para extensão do DNA) e 45 min a 72 °C para a extensão final. Os produtos amplificados foram armazenados a -20 °C.

4.4 Eletroforese e revelação de gel de poliacrilamida

Após a reação de PCR foi realizada a desnaturação do DNA. Foram adicionados à amostra 4 µL do tampão desnaturante de formamida 98 % (EDTA 10 mM pH 8,0, 1 mg/mL de xileno cianol e 1 mg/mL de azul de bromofenol), seguida da completa desnaturação a 94 °C por 5 min em termociclador.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 8 % [acrilamida/bisacrilamida (19:1), 7,5 M de uréia e tampão TBE 5x], preparado em placa de vidro tipo sanduíche com capacidade para 16 poços. As placas de vidro foram limpas com o auxílio de um lenço de papel embebido com etanol. A placa grande (de adesão do gel) foi limpa com 550 µL de uma solução contendo 95 % de Etanol + 0,5 % de Ácido Acético e 1 µL de *Bind silane*. Essa solução foi espalhada em toda a superfície da placa com um auxílio de um lenço de papel. A placa pequena (repulsão do gel) foi tratada da mesma maneira com etanol e *Sigmacote*.

Foram aplicados 8 µL da reação de PCR desnaturada no gel de poliacrilamida 8 %, sendo a corrida de eletroforese realizada por um período de aproximadamente 2 h, com potência constante de 100 W. Marcador de peso molecular Ladder 50 pb e 100pb foi carregado nas extremidades laterais de cada gel.

Os géis foram corados com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Creste, Tulmann e Figueira (2001), com algumas modificações: 1) a placa contendo o gel foi imersa em solução de fixação contendo etanol absoluto 10 % e ácido acético 1 % por 20 min sob leve agitação, 2) lavagem com água destilada sob agitação por 1min, 3) pré-coloração foi realizada em solução de ácido nítrico 0,2 mol.L⁻¹ por 3 min, seguida de nova lavagem do gel com água destilada por 1 min, sob lenta agitação, e lavagem do recipiente, 4) a coloração do gel foi realizada com solução de nitrato de prata 0,2 % por

20 min, seguida de duas lavagens de 30 s com água destilada sob leve agitação, 5) o gel foi imerso em solução de revelação contendo carbonato de sódio 2,4 % e formaldeído 37 %, sendo utilizada metade da solução reveladora na primeira lavagem, até o início do aparecimento das bandas. Posteriormente essa solução foi descartada, sendo adicionado o restante da solução ao gel, que foi corado até o aparecimento do padrão das bandas desejado, 6) uma nova lavagem do gel foi realizada com ácido acético 5 % por 3 min. seguida de uma lavagem final com água por 1 min, sob agitação lenta. A placa com o gel corado foi colocada em posição vertical até a secagem em temperatura ambiente para análise dos fragmentos.

A estimativa do tamanho, em pares de base (pb), para cada alelo foi obtida pelo método da mobilidade inversa baseada em regressão de produtos de tamanho conhecido do marcador molecular de 50 pb e 100 pb, aplicado ao gel de poliacrilamida.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os resultados obtidos da quantificação através do espectrofotômetro de microvolumes – L- Quant Loccus (Tabela 2), observa-se que as relações A260/280 (concentração de DNA em relação as proteínas) e A260/230 (concentração de DNA em relação a metabolitos secundários e componentes do tampão) estão dentro do padrão desejado, para a maioria das amostras. Segundo Brown (2003), o padrão desejado para a relação A260/280 é de 1,8 a 2,2 e o obtido esteve entre 1,6 e 2,0, o que significa que não tem contaminação por proteína. Para a relação A260/230 o desejado é de 2,0 a 2,2 (FANG et al., 1992), pois, relações inferiores a 2 significam contaminação por polissacarídeos, sais ou solventes orgânicos. Os resultados obtidos neste trabalho ficaram entre 1,4 e 1,9, portanto, um pouco abaixo do ideal, mas, que não compromete as análises moleculares. A concentração de DNA de cada amostra teve uma média de 617,46 ng/ μ l, Capeloto et al. (2005) comparando métodos de extração de DNA concluíram que DNA de boa qualidade para análises moleculares foi obtido quando a relação 260/280 situou-se entre 1,8 e 2,0.

As espécies do Cerrado possuem alta quantidade de polifenóis e polissacarídeos que durante a extração podem acabar contaminando as amostras. Esses compostos fenólicos se ligam firmemente ao ácido nucleico durante o isolamento do DNA e interferem direta ou indiretamente nas reações enzimáticas e são os agentes de oxidação

presente em muitas espécies da planta que reduz o rendimento e a qualidade de DNA extraído (SILVA, 2010). De acordo com os resultados deste estudo verifica-se que o DNA tem qualidade para as análises moleculares.

Tabela 2 – Resultado da quantificação de DNA em espectrofotômetro, apresentando as razões 260/280 nm e 260/230 nm e concentração do DNA ([]) em ng/ μ L

Amostra	260/280	260/230	[]
1	2,0	1,7	826,49
2	1,9	1,7	933,64
3	1,9	1,9	279,95
4	1,6	1,4	429,75

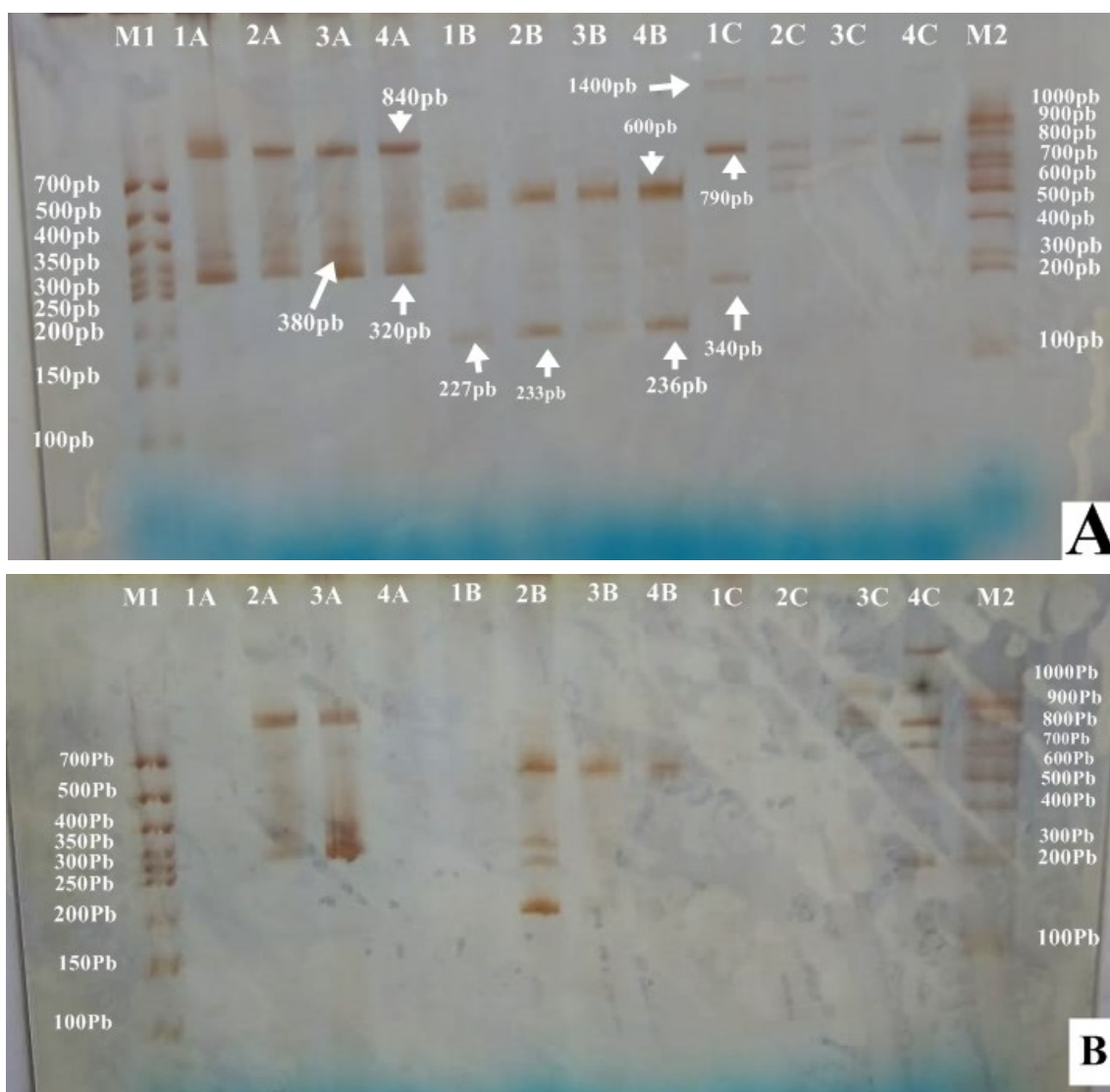
Entre os doze pares de primers de *Eucalyptus sp.* analisados a partir de um único protocolo de PCR e nas temperaturas de anelamento descritas por Miranda et al. (2016) e temperaturas de anelamento real dos primers, quatro iniciadores (2, 3, 7 e 10) não apresentaram produtos de amplificação, nas duas temperaturas avaliadas. Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que a porcentagem de amplificação do DNA de *C. adamantium* com os primers para *Eucalyptus spp* foi de 67 %.

O tamanho dos fragmentos descritos por Miranda et al. (2016), variou de 227 a 1400 pares de base nos *loci* analisados (Tabela 1). Dos 12 primers, oito (primers 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11 e 12) possuem temperaturas de anelamento superiores as descritas por Miranda et al. (2016). Desses, três (2, 3 e 7) não amplificaram nas duas temperaturas de anelamento avaliadas, um (4) não amplificou na temperatura de anelamento de Miranda et al. (2016) e amplificou fragmentos inespecíficos na temperatura de anelamento real, um (12) amplificou fragmentos inespecíficos nas duas temperaturas de anelamento (Figuras 4A e 4B) e os outros três (1, 8 e 11) amplificaram fragmentos específicos e inespecíficos nas duas temperaturas. Com o aumento da temperatura de anelamento não houve diminuição de fragmentos não específicos e ocorreu falha na amplificação de alguns indivíduos (Figuras 4A e 4B).

Os primers 9 e 10 possuem temperaturas de anelamento reais inferiores as descritas por Miranda et al. (2016), sendo que, o primer 10 não amplificou nas duas

temperaturas e o primer 9 não amplificou na temperatura descrita por Miranda et al. (2016), com amplificação de bandas inespecíficas na temperatura real.

Figura 4 – Perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida, de quatro genótipos de *C. adamantium*, obtido com os primers EMBRA1470, EMBRA1939 e EMBRA2011: (A) com temperaturas de anelamento descrita por Miranda et al. (2016) e (B) com temperaturas de anelamento do primer. Da esquerda para a direita: M1 - DNA marcador de peso molecular 50 pb Ladder; 1A, 2A, 3A e 4A – plantas 1, 2, 3 e 4 com o primer EMBRA1470; 1B, 2B, 3B e 4B – plantas 1, 2, 3 e 4 com o primer EMBRA1939; 1C, 2C, 3C e 4C – plantas 1, 2, 3 e 4 com o primer EMBRA2011; M2 - DNA marcador de peso molecular 100 pb Ladder.



Fonte: Autora

As temperaturas de anelamento dos primers 5 e 6 são as mesmas, descrita por Miranda et al. (2016) e temperatura de anelamento real. Os dois primers amplificaram fragmentos inespecíficos nessas temperaturas de anelamento.

A intensidade de amplificação dos fragmentos específicos e inespecíficos é semelhante, fazendo com que em análises de muitos indivíduos ocorra dificuldade na interpretação dos resultados. Verificou-se também que os resultados das amplificações não se repetem, quando se utiliza o mesmo primer e as mesmas condições, devido aos fragmentos inespecíficos.

A temperatura de anelamento do primer é responsável pela amplificação de fragmentos específicos e inespecíficos. Temperaturas mais altas de anelamento aumentam a especificidade do primer e, portanto, resultam em fragmentos específicos. Em oposição, temperaturas mais baixas resultam em fragmentos não específicos (BUSO et al., 2003).

Embora *Eucalyptus spp.* e *C. adamantium* sejam da mesma família, é possível que essas espécies tenham pouca homologia entre seus genomas, pois, o eucalipto é originário da Austrália (PRYOR, 1976) e a gabirobeira da América do Sul. Sendo assim, sugere-se que a não transferibilidade de primers entre *Eucalyptus spp.* e *C. adamantium* deve-se a essa distância genética. Como existe maior taxa de transferibilidade entre espécies do mesmo gênero, estudos devem ser realizados com primers desenvolvidos para o gênero *Campomanesia*.

6 CONCLUSÕES

O protocolo de extração de DNA utilizado neste estudo foi eficiente na obtenção de DNA em quantidade e qualidade para análises moleculares para a espécie *C. adamantium*.

Os primers de microssatélites avaliados não amplificaram fragmentos específicos conforme descrito por Miranda et al. (2016), portanto sugere-se que não houve transferibilidade dos primers de *Eucalyptus spp.* para *C. adamantium*.

Levando em consideração que a espécie *C. adamantium* não possui iniciadores microssatélites específicos, é preciso realizar novos testes com primers desenvolvidos

para espécies mais próximas, se possível do mesmo gênero, com a obtenção de bandas específicas que poderão ser utilizadas para estudos posteriores da espécie.

A validação de iniciadores de microssatélites para *C. adamantium* é promissora para programas de melhoramento genético da espécie e de espécies do mesmo gênero, podendo reduzir custos e tempo.

REFERENCIAS

- BERED, F.; BARBOSA, J.F.N; CARVALHO, F. I.F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, Aug. 1997.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006.
- BRASIL, Ministério do meio ambiente. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 03 maio 2018.
- BROWN, T.A. Clonagem Gênica e Análise de DNA – Uma introdução. 4 e d. Porto Alegre: **Artmed**, 2003. p 376.
- CAPELATO, A.; et al. Análise quali-quantitativa de métodos de extração de DNA genômico em melancia. **Revista Ceres**, v.52, n.299, p. 1-12, 2005.
- COUTINHO, I.D. **Estudo químico e atividades biológicas de Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae)**. 2008. 159p. Dissertação (Mestrado em Química, área de concentração química orgânica), Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 9, p. 299-306. 2001.
- CRUZ, C.D. **Princípios de genética quantitativa**. Viçosa: Editora UFV, 2012. 394 p.
- DINIZ, M.C. **Associação de marcadores (aflp) com caracteres de interesse agrônomico em clones elite de cana-de-açúcar**. Disponível em:<http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/6440/arquivo6214_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 04 maio. 2018.
- ELLEGREN, H. Microssatélites: sequências simples com evolução complexa. **Nature Reviews Genetics**, v.5, p. 435-445. 2004.

FANG, G.; HAMMAR, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genome DNA. **BioTechniques**, v. 13, p. 52-54, 1992.

FERRÃO, L. F. V. **Marcadores microssatélites em estudo de diversidade, mapeamento genético e análises de QTLs em *Coffea canephora***. 2003. Dissertação (Pós-graduação em genética e melhoramento) - Universidade federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

GUIMARÃES, C. T. *et al.* **Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético**. Belo Horizonte: [s. n.], 2009. Disponível em: www.ufv.br/. Acesso em: 24 abr. 2019.

GUPTA, P.K. ; VARSHNEY, R.K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, 2000. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1003910819967>. Acesso em: 18 mar

HENRIQUES, R.P.B. **Influência da história, solo e fogo na distribuição e dinâmica das fitofisionomias no bioma do Cerrado**. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Org.). Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 73-92.

KALIA, R. J.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, p.309–334, 2010.

KOTHE, S. C. M. **Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas**. 2013. 37 f. Dissertação (Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, PORTO ALEGRE, 2013.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. 1ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 672p.

MARTINS, C. **Aspectos botânicos da família Myrtaceae**. Disponível em: <<https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/10007/2/Martins%20Cerqueira%20Parte%202.pdf>>. Acesso em: 03 maio 2018.

MIRANDA E. A. G. C. **Transferibilidade e validação de marcadores microssatélites derivados de EST para duas espécies de *Campomanesia* (Myrtaceae) do Cerrado**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.1

MIRANDA, E. A. G. C. *et al.* Validation of EST-derived microsatellite markers for two Cerrado-endemic *Campomanesia* (Myrtaceae) species. **Genetics and molecular research: GMR**, 2016.

MUGNOL, D.D et al. Germinação de sementes de *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg em diferentes temperaturas e umidades do substrato. **Scientia Forestalis**, Piracicaba. 2012.

OLIVEIRA, M.C. . **Biometria de frutos e sementes, crescimento e produção de mudas de *Campomanesia adamantium* BLUME E *Campomanesia pubescens* O. BERG** . 2009. 35 p. Dissertação (Mestrado, área de concentração em Fitotecnia)- Universidade Federal de Uberlândia, [S.l.], 2009.

PINTO, N. C.. **Tecnologia do DNA Recombinante**. [S. l.], 2019. Disponível em: http://www2.iq.usp.br/docente/nadja/QBQ3401_aula9.pdf. Acesso em: 4 jun. 2019.

PRECZENHAK, A.P. **Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfológicos em acessos de mini-tomate**. Guarapuava: UNICENTRO, 2013. 77p. (Dissertação - Mestrado em Produção Vegetal).

PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P.M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends Ecol Evol**, 16:142–147, 2001.

PRYOR, L. **Biology of *Eucalyptus***. London: Edward Arnold, 1976. 82p.

SALLES, G. et al. Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais. Revista **Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento**, v.30, p. 46-50, 2003.

SILVA, E., RODRIGUES, L, SIQUEIRA, H. Caracterização física, química e fisiológica de gabirola (*Campomanesia pubescens*) durante o desenvolvimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 29 (4): 803-809, 2009.

SILVA, M. N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. **Revista Árvore**, v.34, n.6, p.973-978, 2010.

SOUZA, D.C; TEIXEIRA, T.A. A simple and effective method to obtain high DNA quality and quantity from Cerrado plant species. **Molecular Biology Reports**, 2019.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, CLÉBER JUNIOR. **O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas**. 2013. 37 f. Dissertação (Agronomia) – UNESP, SAO PAULO, 2013.

TURCHETTO-ZOLET, A. et al. **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. E-book.

VARSHNEY, R., GRANER, A., SORRELLS, M. (2005). Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. **Trends in biotechnology**. 23. 48-55. 10.1016/j.tibtech.2004.11.005.

VALLILO, M. I. et al. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 805-810, Dec. 2006.

VALLILO, M.I.; BUSTILLOS, O.V.; AGUIAR, O.T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambess) O.Berg – Myrtaceae. **Revista do Instituto Florestal**, v. 18, p. 15-22, 2006.

VASCONCELOS, A. **Análise de diversidade genética em populações de *Campomanesia Adamantium* (Cambess.) O.Berg. Myrtaceae por meio de marcadores microssatélites transferíveis**. 2016. Monografia (Biotecnologia) – Universidade federal da grande Dourados, Dourados, 2016.

VIEIRA, M.C. et al. Nitrogênio e fósforo no desenvolvimento inicial da guavira [*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg] cultivada em vasos. **Rev. bras. Plantas med.**, Botucatu, v. 13, n. spe, p. 542-549, 2011.

WANG, X. A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles. **Afr. J. Biotechnol.** 8: 2432-2436, 2009.

ZANE, L. BARGELLONI, L., PATARNELLO, T., Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n.1, p. 1–16, 2002.