

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS MICROSSATÉLITES DE *Miconia calvenscens* DC. PARA *Miconia albicans* (Sw.) Triana (MELASTOMATACEAE)

Gabriella da Silva Mendonça Dickel

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Julho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS MICROSSATÉLITES DE *Miconia calvenscens* DC. PARA *Miconia albicans* (Sw.) Triana (MELASTOMATACEAE)

Gabriella da Silva Mendonça Dickel

Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira
Instituto de Biologia
Ma. Ana Carolina Cordeiro Dias
Instituto de Genética e Bioquímica

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia - MG
Julho - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS MICROSSATÉLITES DE *Miconia calvenscens* DC. PARA *Miconia albicans* (Sw.) Triana (MELASTOMATACEAE)

Gabriella da Silva Mendonça Dickel

Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira
Instituto de Biologia

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em __/__/__

Profª. Dr. Celine de Melo

Uberlândia - MG
Julho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS MICROSSATÉLITES DE *Miconia calvenscens* DC. PARA *Miconia albicans* (Sw.) Triana (MELASTOMATACEAE)

Gabriella da Silva Mendonça Dickel

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

RESUMO

O gênero *Miconia*, é o maior nas Melastomataceae, um dos maiores gêneros neotropicais, com mais de 60% de espécies apomíticas. *Miconia albicans* é uma planta arbustiva, característica do Cerrado, as savanas do Brasil Central, onde é observada em alta densidade em áreas de regeneração. A espécie é apomítica diplospórica obrigatória. A transferibilidade de marcadores microssatélites é conferida a espécies relacionadas, em razão das sequências que antecedem as regiões microssatélites, serem altamente conservadas entre espécies de um mesmo gênero ou de uma mesma família. Embora ainda não existam primers microssatélites desenvolvidos para *M. albicans*, os primers desenvolvidos para *M. calvencens* podem ser usados como uma alternativa para o estudo da diversidade genética dessa espécie. Este trabalho teve então como objetivo avaliar o potencial de transferibilidade de marcadores microssatélites de *M. calvecens* para *M. albicans*. O DNA total de *M. albicans* foi extraído a partir do tecido foliar com o kit DNeasy Plant e quantificado com a utilização em NanoDrop (Thermo Fisher). Os primers microssatélites selecionados (loci: B2, B9, B102(a), B109, B117, C103, D101, D114 e D118) desenvolvidos para *M. calvences* foram previamente testados em 6 indivíduos de *M. albicans* de uma população da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia-MG. Os fragmentos foram amplificados em termociclador PTC-200 (MJ Research) com diferentes temperaturas de anelamento e, posteriormente os testes foram realizadas com 20 indivíduos de uma população. Os produtos de amplificação foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 3% com a tensão de 110 V por 2 horas e 30 minutos, em seguida, foram fotodocumentados. Os géis apresentaram bandas dentro do padrão esperado de peso molecular e ocasionalmente bandas inespecíficas. Obtivemos 88 % de transferabilidade dos primers testados em *M. albicans* e evidências de heterozigozidade e efeito de poliploidia.

Palavras-chave: *Melastomataceae*; *SSR*; *Marcador Molecular*; *Transferibilidade*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	07
2 MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1 Áreas de estudo e amostragem	10
2.2 Procedimentos Laboratoriais	11
2.3 Análise de dados	12
3 RESULTADOS	12
4 DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO	24
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 INTRODUÇÃO

O modo de reprodução de uma espécie tem implicações nas taxas de endogamia e grau de parentesco das futuras gerações, pois determina a constituição dos conjuntos genotípicos, a extensão em que os genes são trocados entre indivíduos e as taxas de migração. Atua, também, na estruturação genética populacional, na heterogeneidade espacial dentro das populações e no grau em que as populações podem ser geneticamente subdivididas em decorrência da seleção e da deriva genética (HAMRICK, SCHNABEL, 1985).

O sistema reprodutivo em plantas pode ser classificado, de forma simplificada, em reprodução sexuada e assexuada. As formas sexuadas exibem diferentes sistemas de cruzamento, como autógamas (plantas com autofecundação), alógamas (plantas com fertilização cruzada) e sistema misto (apresentam autofecundação e fertilização cruzada), sendo que esses mecanismos diminuem ou aumentam a divergência genética entre populações (SEBBEN, 2006).

A reprodução assexuada abrange todos os mecanismos que geram plantas sem a existência de fertilização e teoricamente clones da planta mãe (SILVERTOWN, 2008). Entre esses mecanismos, a apomixia é o termo utilizado para se referir à ocorrência de formação de sementes viáveis sem que haja fecundação da oosfera, ou seja, de forma assexuada. Desta maneira, o embrião formado será oriundo de tecidos maternos, explicando a formação de clones (BICKNELL & KOLTUNOW, 2004).

Apesar de serem geneticamente idênticos a planta mãe, plantas apomíticas apresentam diversidade genética relativamente alta. A diversidade genética dentro das populações apomíticas estaria presente devido, por exemplo, à presença da meiose reconstitucional, mesmo com viabilidade polínica zero e reprodução por apomixia obrigatória (CAETANO, et al. 2013). Mesmo em taxas muito baixas, esta diversidade, promovida pelos eventos que ocorrem durante a meiose, resulta numa diversidade genética não esperada, ou seja, os indivíduos não são clonais (HÖRANDL & PAUN 2007).

Estudos sobre a biologia reprodutiva das espécies de Melastomataceae mostram que na tribo Miconieae mais de 60% das espécies são apomíticas (GOLDENBERG & SHEPHERD 1998). A família Melastomataceae, pertencente à ordem Myrtales, apresenta cerca de 4.570 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais de todo o globo (RENNER, 1993), cerca de um quarto destas espécies pertencem ao gênero *Miconia*, que

ocorre desde o sul do México até o Norte da Argentina e Uruguai. O gênero possui formas de vida/hábito e biologia reprodutiva extremamente variadas (GOLDENBERG, 2004), e um grande número de espécies importantes ecologicamente, principalmente em florestas de estágio secundário de regeneração. É frequente a utilização deste gênero para estudos ecológicos de população, a fim de uma melhor contribuição para fins de conservação e manejo.

Miconia albicans (Figura 1), é uma planta arbustiva, com floração entre setembro e novembro, com ocorrência desde o sul do México até o Paraguai, com características do Bioma Cerrado, mas também encontrada em vegetação litorânea (CARREIRA, 2003). Sendo um arbusto que atinge até 3 m de altura, ocorre em vegetação secundária do cerrado, afloramentos rochosos e formações costeiras (GOLDENBERG, 2004). Neri e colaboradores (2005) observaram alta densidade de *M. albicans* em áreas de regeneração de cerrado. As folhas da espécie apresentam efeitos alelopáticos (GORLA e PEREZ, 1997) e antimicrobianos (CELOTTO et al., 2003).

A reprodução de *Miconia albicans* realiza-se por meio da ocorrência de apomixia diplospórica obrigatória (CORTEZ 2007, CAETANO, et al. 2013). A diversidade genética dentro das populações estaria presente devido à presença da meiose reconstitucional, mesmo com viabilidade polínica zero e reprodução por apomixia obrigatória (CAETANO, et al. 2013). Estes eventos de recombinação que ocorrem durante a meiose, mesmo que criem taxas baixas de heterogeneidade genética, fazem com que populações apomíticas não tenham estrutura genética idêntica (HÖRANDL & PAUN 2007).

Os marcadores dominantes são limitados em termos da caracterização da heterozigotidade e genotipagem precisa dos indivíduos. Marcadores codominantes permitiriam uma análise mais refinada da estrutura populacional destas espécies (MAIA, et al. 2017)

Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares existentes, os microssatélites ou sequências simples repetidas, do inglês *Single Sequence Repeat* (SSR), se destacam pela herança codominante e pelo seu elevado polimorfismo, sendo ainda de fácil interpretação. Marcadores SSR são sequências repetidas de um a seis nucleotídeos em tandem, sendo que os fragmentos de interesse são amplificados por meio de primers desenhados especificamente para a região em estudo e amplificados via reação de polimerase em cadeia (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores SSR, ao contrário de alguns outros marcadores como os *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), requerem o conhecimento prévio da sequência de

DNA desejada, portanto, os primers necessitam ser previamente desenhados para cada *locus* de cada espécie, o que encarece o uso desta técnica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

No entanto, é possível em muitos casos transferir marcadores SSR de uma espécie para outra e utilizá-los diretamente economizando os custos de construção. A transferibilidade de marcadores microssatélites é conferida à espécies relacionadas, e é possível devido dado que as sequências que antecedem as regiões microssatélites se encontrarem altamente conservadas entre espécies de um mesmo gênero ou mesmo de uma mesma família (ELLIS & BURKE 2007). A alta taxa de transferibilidade de marcadores microssatélites é um dos fatores que contribuem para que estes sejam empregados mais amplamente em estudos de genética de populações (AGARWAL *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2013).

Os marcadores microssatélites estão sendo amplamente produzidos e utilizados para aplicações de mapeamento genético tanto para espécies arbóreas florestais como para culturas anuais de larga produção como arroz, soja e trigo, além de frutíferas como *Citrus*, sendo amplamente utilizados na caracterização genética, detectando polimorfismos para alelos de um determinado gene ou de pequenos fragmentos de DNA, permitindo a distinção de indivíduos da mesma espécie, mesmo aqueles proximamente aparentados (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2003). A análise genética é capaz de nos proporcionar entendimento sobre os processos de diferenciação de populações naturais, além de melhoramento genético e programas de conservação de espécies (REIS 1996, BARBOSA NETO, *et al.* 2000).



Figura 1 – *Miconia albicans* em floração.

Fonte (MERCADANTE, 2016)

Apesar de não haver marcadores SSR construídos especificamente para *Miconia albicans*, existem marcadores microssatélites desenvolvidos para uma outra espécie de *Miconia*, *M. calvenscens*, uma planta invasora comum em ilhas do Oceano Pacífico e em outras partes do mundo (LE ROUX e WIECZOREK, 2008). Portanto, como não existem primers de microssatélites desenvolvidos para *M. albicans*, os primers desenhados para *M. calvenscens* podem ser usados como uma alternativa para o estudo da diversidade genética dessa espécie, uma vez que pertencem ao mesmo gênero.

O presente estudo teve como objetivo a transferibilidade e avaliar a qualidade de marcadores microssatélites de *Miconia calvenscens* para *Miconia albicans*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e amostragem

A trabalho foi realizado com amostras de indivíduos coletados na Estação Ecológica do Panga localizado nas coordenadas 19°11'S/48°19' W, em Uberlândia – MG. Foram coletadas e armazenadas amostras de folhas de 20 indivíduos, devidamente identificados, de *Miconia albicans*. As folhas foram armazenadas separadamente, secas

em sílica gel, e levadas para Laboratório de Morfologia Vegetal e Imagem – LAMОВI do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, para futura extração de DNA e realização das análises genéticas com uso de marcadores microsatélites.

2.2 Procedimentos laboratoriais

Os procedimentos laboratoriais foram baseados em LE ROUX e WIECZOREK, 2008. O DNA total foi extraído com o kit DNeasy Plant mini (QIAGEN), sendo o mesmo quantificado com a utilização de NanoDrop (Thermo Fisher). Os primers microsatélites selecionados (loci: B2, B9, B102(a), B109, B117, C103, D101, D114 e D118) desenvolvidos para *M. calvences* foram testados em 6 indivíduos de *M. albicans*. A amplificação dos fragmentos foi feita em termociclador (Thermo Fisher Scientific Oy) com diferentes temperaturas para realizar protocolo de anelamento, testando temperatura do artigo referencial e realizando alguns ajustes de temperatura para o mesmo primer. Posteriormente as reações foram realizadas com os demais indivíduos, totalizando 20 indivíduos. O ajuste da temperatura de anelamento foi realizada com o aumento ou diminuição da temperatura, até que a visualização das bandas no gel apresentasse a melhor resolução possível.

Para realizar as reações de PCR foi preparada uma solução com volume final de 10 µL contendo: água destilada deionizada estéril q.s.p. 5,4 µL, tampão para PCR 10x com MgCl₂ 1,6 µL, dNTPs 0,6 µL, Taq DNA Polymerase 0,2 µL, primer 1,2 µL, 1µL de DNA, totalizando 10 µL para cada reação. As seguintes condições de reação foram testadas no termociclador: desnaturação inicial a 95°C por 15 min; 35 ciclos de amplificação: desnaturação a 94°C por 1 min; anelamento otimizado para cada primer por 1 min e uma extensão a 72°C por 90 seg ; por fim uma extensão final a 72°C por 12 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose ultrapura a 3,0%, corados em solução de Brometo etídio 0.9 µg/mL e imersos em tampão TBE 0.5X (Tris base 121,1g, Boric acid 51,3g, EDTA 3,72g) com a tensão de 110 V por de 2 horas e 30 minutos, posteriormente, foram fotodocumentados. Os fragmentos de DNA foram analisados por visualização sob luz ultravioleta, comparando-se os indivíduos pela presença de alelos e peso molecular das bandas para produção de uma tabela de dados.

2.3 Análise dos Dados

A avaliação da transferibilidade foi feita, primeiramente, de forma visual com base em dois critérios: amplificação dos *loci* e nitidez das bandas. Para análise dos géis observou-se a ocorrência da amplificação de bandas em cada primer e se as mesmas possuíam tamanho esperado, conforme descrito em (LE ROUX, WIECZOREK e MEYER 2008). O tamanho das bandas foi estimado utilizando o marcador molecular DNA ladder 100 bp (Ludwig Biotec).

3 RESULTADOS

No estudo da transferibilidade de marcadores moleculares microssatélites de *M.calvecens* para *M. albicans* foram analisados nove locos: B2, B9, B102(a), B109, B117, C103, D101, D114, D118 (Tabela 1), sendo que oito deles (88%) tiveram alelos amplificados. Apenas o primer D114 não foi efetivo. Todos os indivíduos tiveram amplificação com alguns dos primers testados, exceto o indivíduo 5 que não amplificou em nenhum primer e temperatura testada.

Tabela 1 – Primers e temperaturas utilizadas com tamanho de bandas e provável ocorrência de heterozigosidade, bandas inespecíficas e polimorfismo.

<i>Primers</i>	<i>TeA</i> <i>Referencial</i>	<i>TeA</i> <i>Testada</i>	<i>TeA</i> <i>Recomendada</i>	<i>TaB</i>	<i>Trans</i>	<i>Ht</i>	<i>B.I</i>	<i>Pol</i>
<i>B2</i>	56°C	57°C	56°C	226-264	X	X	X	
<i>B9</i>	60°C	62°C	60°C	226-304	X	X		X
<i>B102(a)</i>	60°C	62°C	60°C	363-379	X			
<i>B109</i>	62°C	63°C	62°C	315-363	X	X	X	
<i>B117</i>	55°C	56°C	55°C	322-410	X	X		X
<i>C103</i>	56°C	57°C	56°C	200-251	X	X	X	X
<i>D101</i>	64°C	64,5°C	64°C	432-444	X	X		
<i>D114</i>	60°C	62°C	60°C	201-248				
<i>D118</i>	55°C	56°C	55°C	204-244	X		X	

TeA = Temperatura de anelamento; TaB = Tamanho de banda; Trans = Transferibilidade; B.I = Bandas Inespecífica e Pol = Polimorfismo.

Para os nove primers de *Miconia calvecens* testados ocorreram amplificação para *Miconia albicans* na temperatura referencial, porém apresentaram em alguns indivíduos bandas inespecíficas fora do tamanho das bandas proposto por em (LE ROUX, WIECZOREK e MEYER 2008).

Para determinar prováveis evidências de heterozigosidade foram consideradas as bandas diferentes dentro do intervalo de tamanho de bandas referencial ou primers que foram amplificados em alguns indivíduos e em outros não. Conforme tabela 1, obteve-se evidencia de heterozigosidade para os primers B2, B9, B109, C103, D101. Bandas inespecíficas foram observadas para todos os primers exceto D114. A resolução relativamente baixa do gel de agarose nem sempre permitiu uma diferenciação clara entre as bandas.

Para os *loci* em que as bandas inespecíficas foram visualizadas, a PCR foi repetida com a temperatura de anelamento acrescida em 1 grau. Como resultado os primers B109, B117, D14 e D118 não amplificaram e para os B2, B9, C103 e D101 foram obtidas bandas com pouca clareza (Tabela 1).

No primeiro teste de amplificação do primer B2 à 56°C com seis indivíduos (Figura 2), ocorreu amplificação dos indivíduos 2, 3 e 6 com duas bandas entre 200 e 300 pb. Foi realizado um segundo teste na temperatura de 57°C, onde os indivíduos 1 e 3 continuaram apresentando possíveis bandas extras entre os números de pares de base esperados. Ao realizar o teste com os demais indivíduos totalizou-se 45% de amplificação de indivíduos dentro do esperado de 200 a 300 pb, porém com outras bandas entre 100 e 200 pb. Este primer possui uma provável heterozigosidade (Figura 3).

Verificou-se que para o primer B9 ocorreu amplificação em todas as temperaturas testadas com 6 indivíduos (Figura 4), na temperatura referencial de 60°C a amplificação ocorreu entre 200 e 300 pares de base. Ao repetir a temperatura de 60°C para os demais indivíduos (Figura 5), não houve amplificação apenas no indivíduo 19, todos os demais estavam com tamanho de bandas esperado (226-304) e com bandas bem expressas e possível heterozigosidade e polimorfismo.

O primer B102(a) à 60°C apresentou 70% de amplificação dos indivíduos testados (20 indivíduos), amplificando entre 300 à 400 pb, conforme esperado, e apresentando possível banda inespecífica apenas no indivíduo 12 (Figura 6). Ao aumentar a temperatura do primer B102(a) para 61°C, amplificaram os indivíduos 1 e 3, onde o

indivíduo 1 com duas bandas entre 300 à 400 pares de bases. Ao aumentar mais 1°C apenas o indivíduo 1 amplificou desaparecendo uma das bandas (Figura 7).

O gel de eletroforese do teste de seis indivíduos (Figura 8) do primer B109 à 62°C amplificou entre 300 e 400 pares de base, porém com várias bandas extras principalmente no indivíduo 2, já na temperatura de 63°C não houve amplificação. Identificou-se nos demais indivíduos do primer B109 (Figura 9), que ocorreu duas bandas bem expressas e próximas entre 300 e 400 pb em todos os indivíduos amplificados, indicando provável heterozigosidade.

Ao realizar um primeiro teste com seis indivíduos na temperatura referencial de 55°C para o primer B117, identificou-se amplificação exceto no indivíduo 5. Ao aumentar a temperatura para 56°C não houve amplificação (Figura 10). Ocorreu 60% de amplificação do primer B117 à 55°C ao testar 20 indivíduos (Figura 11), com o número de pb esperado (322-400), porém o indivíduo 12 e 19 apresentaram uma possível banda a mais entre 600 a 700 pb com potencial de heterozigosidade e polimorfismo.

No primeiro teste com seis indivíduos para o primer C103 (Figura 12) visualizou-se três bandas com boa nitidez no indivíduo 3 à 56°C, estas com 250 a 350 pares de base, já os indivíduos 1 e 2 apresentaram bandas com níveis de pares de base diferentes, ao aumentar a temperatura para 57°C visualiza-se amplificação para os indivíduos 1, 2 e 3 porém com deformidade no gel, não sendo possível a análise, sendo necessário a repetição do teste. As bandas do primer C103 à 56°C foram expressas em diferentes pesos moleculares entre os indivíduos, onde 8, 9, 10 e 16 com bandas dentro dos pb referenciais, mas com uma banda a mais perto dos 300 pb, já o indivíduo 10 possui também outra banda entre 600 pb e os indivíduos 11, 12 e 15 com uma banda aproximadamente 250 pb. Chamam a atenção as bandas polimórficas com aproximadamente 1000 pb nos indivíduos 17, 18 e 20 (Figura 13).

O gel de eletroforese do primer D101 (Figura 14) não apresentou diferenças consideráveis em relação ao número de amplificação ao aumentar a temperatura para 64,5°C, ambas em torno de 400 a 450 pb. Aparentemente o primer D101 apresentou heterozigosidade (Figura 15).

A amplificação referencial do primer D114 é de 201 a 248 pb na temperatura de 60°C, mas ao realizar o teste com 6 indivíduos não foram visualizadas nenhuma banda. Quando aumentou-se a temperatura para 61°C e posteriormente para 62°C continuou não havendo ampliação (Figura 16). Na repetição da temperatura de 60°C com os demais indivíduos o primer D114 confirmou a não amplificação (Figura 17).

Para o primer D118 à 55°C, a amplificação esteve dentro do esperado de até 250 pares de base, mas com possíveis bandas inespecíficas entre 100 a 200 pares de base. Ao se tentar o ajuste de temperatura para 56°C verificou-se que não houve amplificação (Figura 18). A temperatura referencial de 55°C é eficiente na amplificação do primer D118 (Figura 19), ocorrendo para todos os indivíduos testados na 2ª etapa com bandas bem marcadas dentro do número de pb esperado, com uma banda bem nítida no indivíduo 11 acima do número pb esperado.

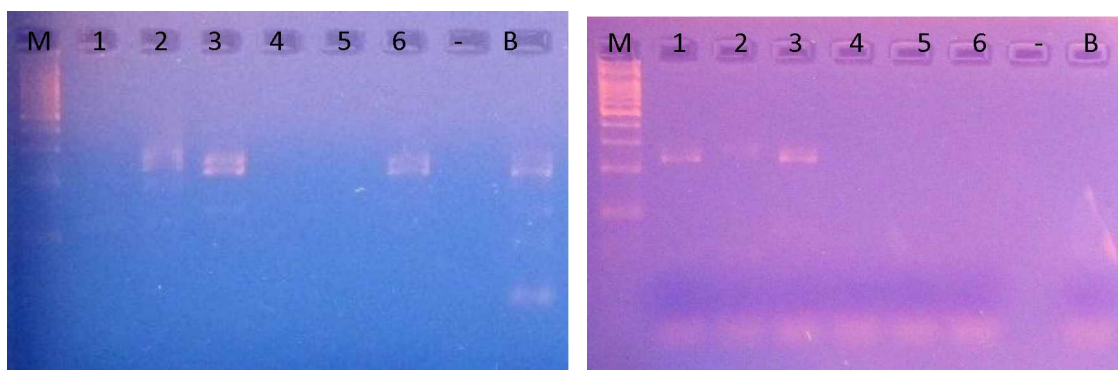


Figura 2 – Gel de agarose 3% com seis indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer B2 à temperatura de anelamento de 56 °C e 57°C. M - Marcador de 100pb. B- controle negativo.

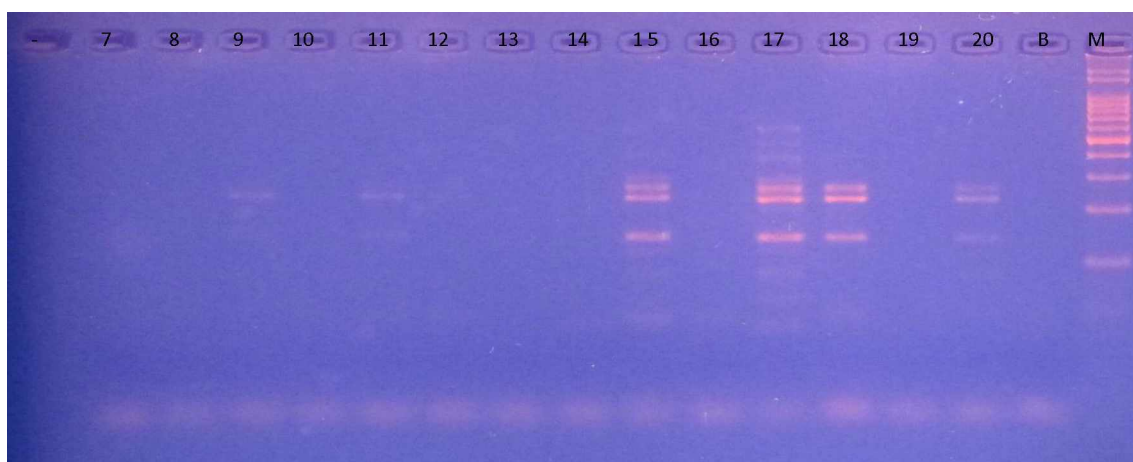


Figura 3 – Gel de agarose 3% com quatorze indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer B2 à temperatura de anelamento de 56 °C. M - Marcador de 100pb. B- controle negativo.

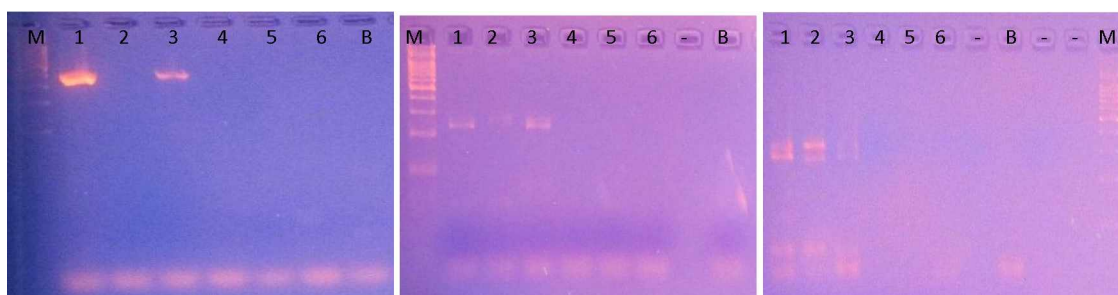


Figura 4 – Gel de agarose 3% com seis indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer B9 à temperatura de anelamento de 60 °C, 61°C, 62°C. M - Marcador de 100pb. B- controle negativo.

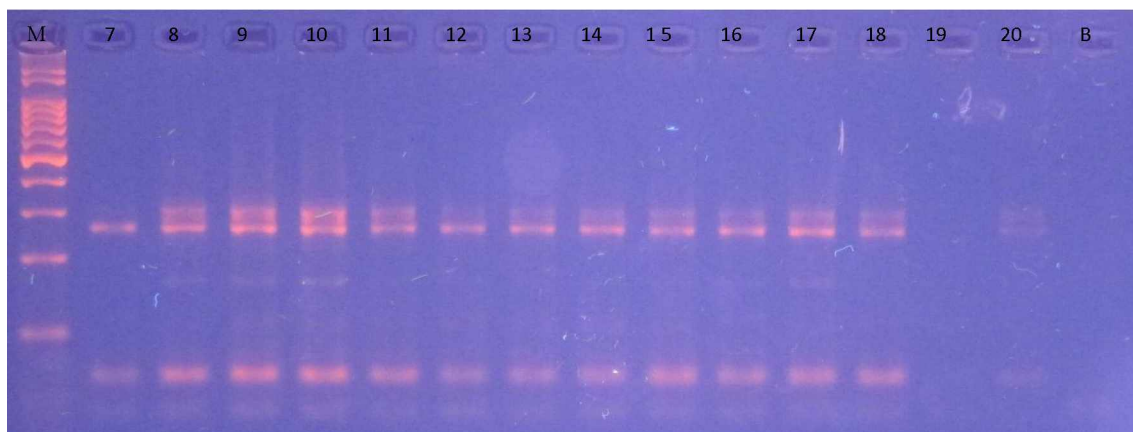


Figura 5 – Gel de agarose 3% com quatorze indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer B9 à temperatura de anelamento de 60 °C. M - Marcador de 100pb. B- controle negativo.

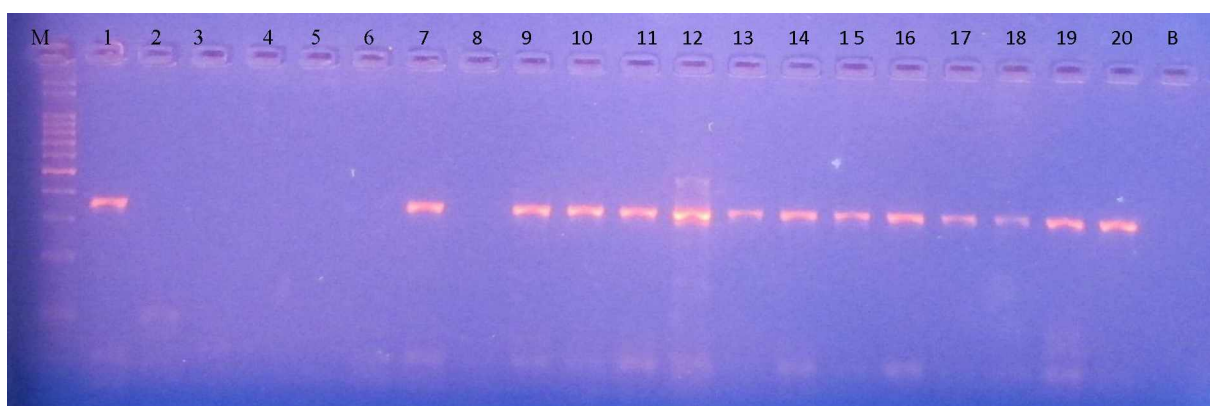


Figura 6 – Gel de agarose 3% com vinte indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer B102(a) à temperatura de anelamento de 60 °C. M - Marcador de 100pb. B- controle negativo.

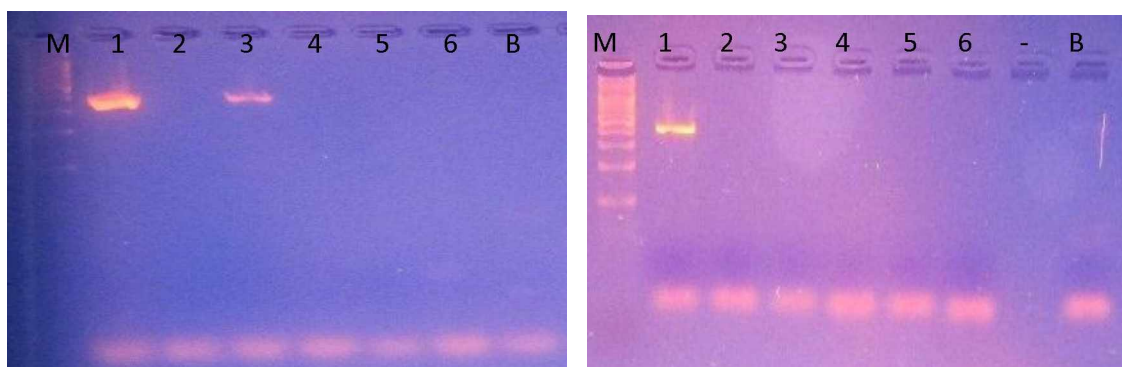


Figura 7 – Gel de agarose 3% com seis indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer B102(a) à temperatura de anelamento de 61 °C e 62°C. M - Marcador de 100pb. B- controle negativo.

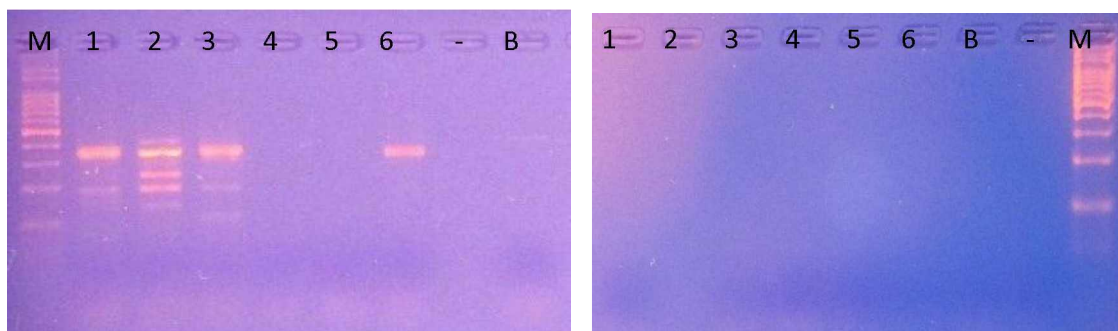


Figura 8 – Gel de agarose 3% com seis indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer B109 à temperatura de anelamento de 62 °C e 63°C. M - Marcador de 100pb. B- controle negativo.

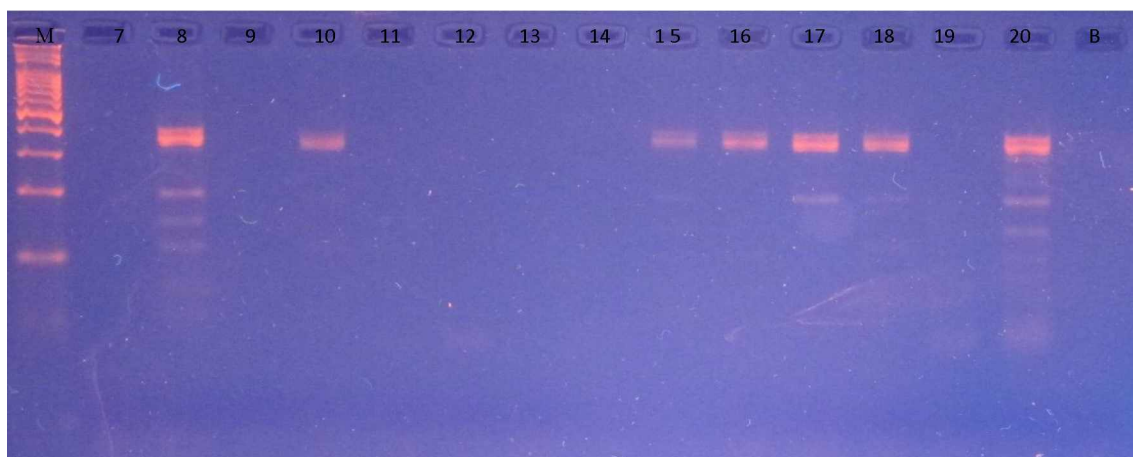


Figura 9 – Gel de agarose 3% com quatorze indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer B109 à temperatura de anelamento de 62 °C. M - Marcador de 100pb. B- controle negativo.

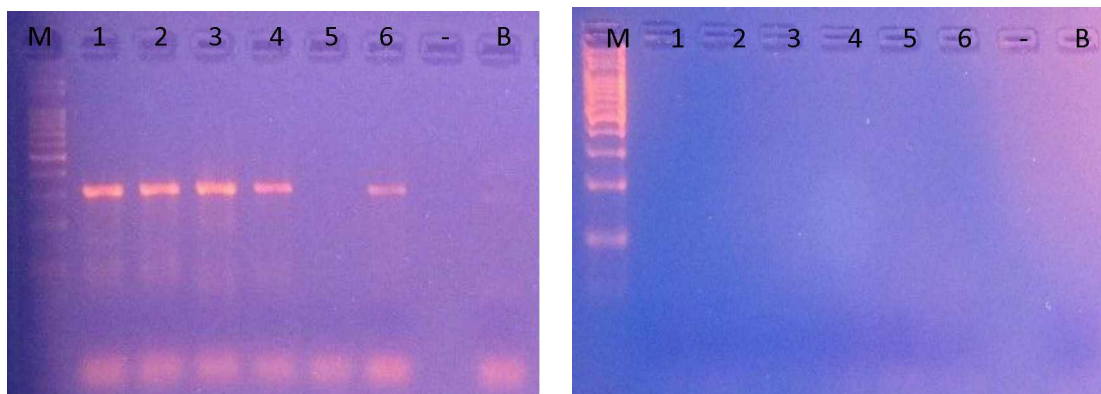


Figura 10 – Gel de agarose 3% com seis indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer B117 à temperatura de anelamento de 55 °C e 56°C. M - Marcador de 100pb. B- controle negativo.

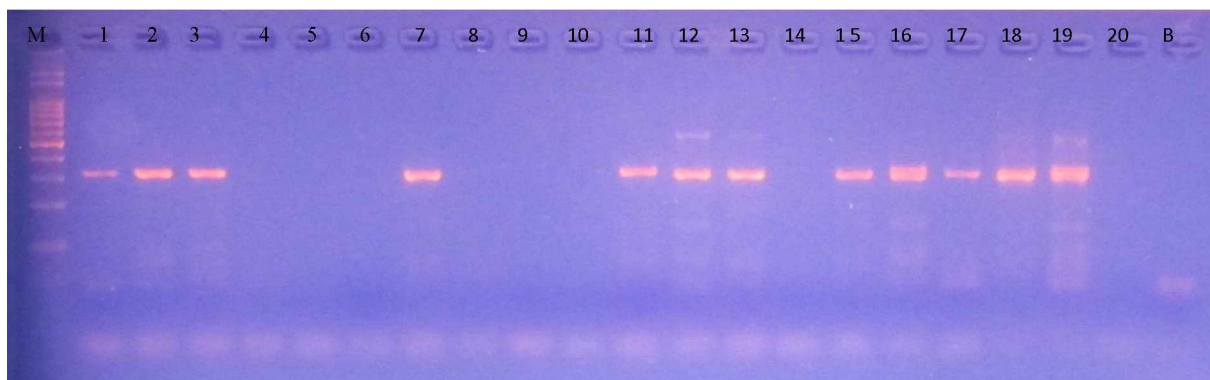


Figura 11 – Gel de agarose 3% com vinte indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer B117 à temperatura de anelamento de 55 °C. M - Marcador de 100pb. B- controle negativo.

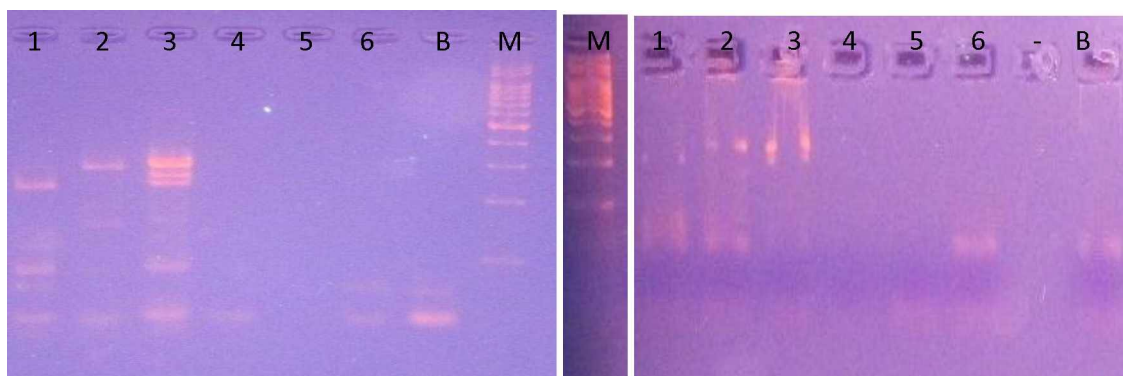


Figura 12 – Gel de agarose 3% com seis indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer C103 à temperatura de anelamento de 56 °C e 57°C. M - Marcador de 100pb. B- controle negativo.

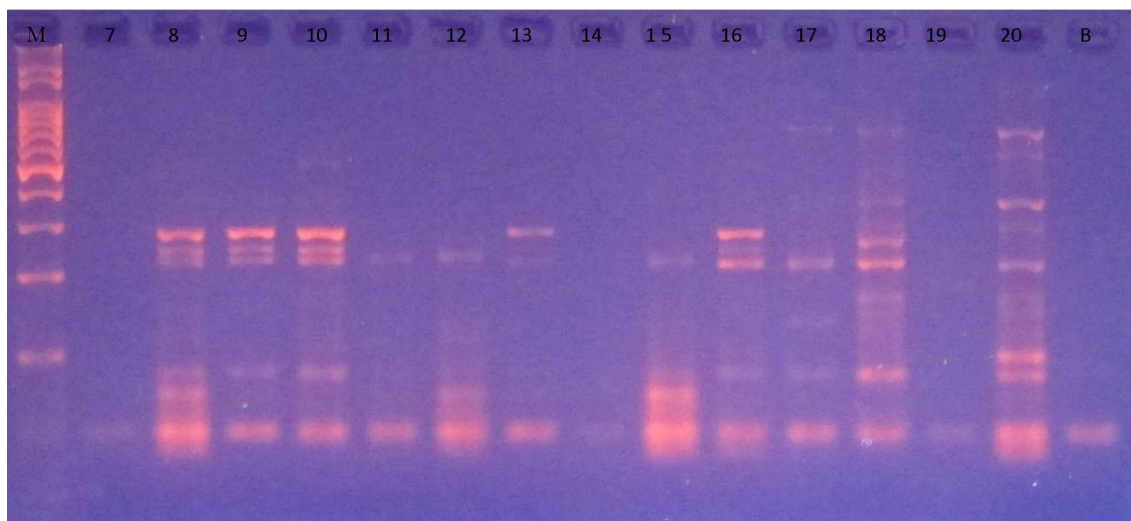


Figura 13 – Gel agarose 3% com quatorze indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer C103 à temperatura de anelamento de 56 °C . M - Marcador de 100pb. B- controle negativo.

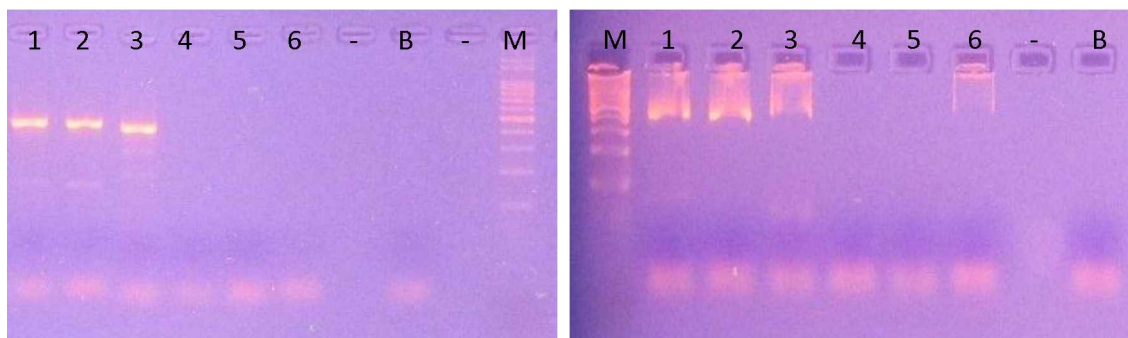


Figura 14 – Gel agarose 3% com seis indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer D101 à temperatura de anelamento de 64 °C e 64,5 . M - Marcador de 100pb. B- controle negativo

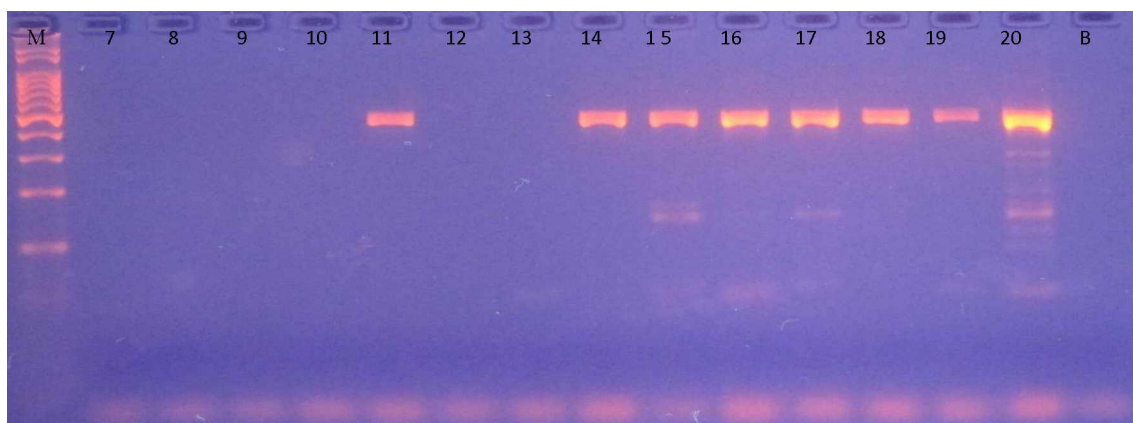


Figura 15 – Gel agarose 3% com quatorze indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer D101 à temperatura de anelamento de 64 °C . M - Marcador de 100pb. B- controle negativo

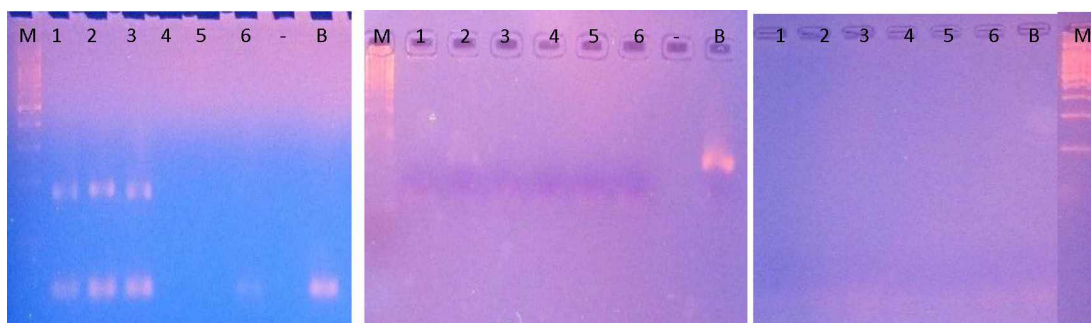


Figura 16 – Gel agarose 3% com seis indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer D104 à temperatura de anelamento de 60 °C, 61°C e 62°C . M - Marcador de 100pb. B- controle negativo



Figura 17 – Gel agarose 3% com vinte indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer D104 à temperatura de anelamento de 60 °C . M - Marcador de 100pb. B- controle negativo

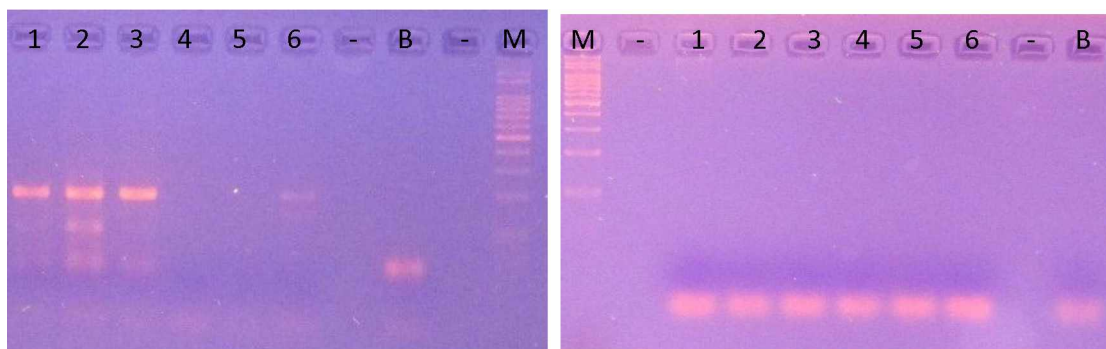


Figura 18 – Gel agarose 3% com seis indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer D118 à temperatura de anelamento de 55 °C e 56°C . M - Marcador de 100pb. B- controle negativo

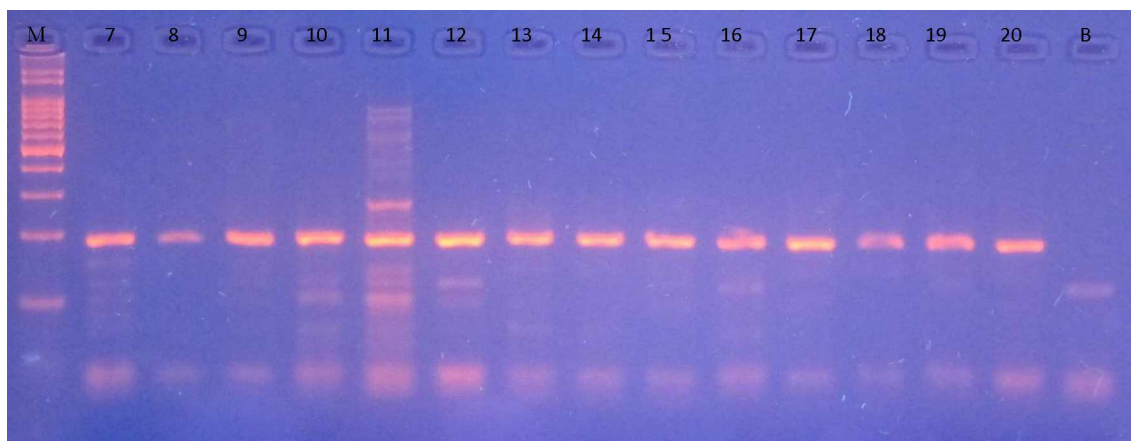


Figura 19 – Gel agarose 3% com quatorze indivíduos de *Miconia albicans*, amplificados com primer D118 à temperatura de anelamento de 55 °C . M - Marcador de 100pb. B- controle negativo

4 DISCUSSÃO

Obteve-se sucesso no experimento de transferibilidade para os primers B2, B9, B102(a), B109, B117, C103, D101 e D118 exceto primer D114, de maneira que o sucesso geral foi de 88% de transferibilidade, com ocorrência de polimorfismo nos primers B9 e D117, porém há necessidade de ajustes, seja em temperatura de anelamento ou resolução do gel de eletroforese para análises mais detalhadas.

O desenvolvimento de marcadores "*simple sequence repeat*" (SSR) ou microsatélites, muitas vezes, é a melhor opção para investigar polimorfismos de populações (FOSTER et al., 2010). A possibilidade de transferir tais primers pode agilizar estes estudos e reduzir custos de construção de primers específicos. Mas a transferibilidade dos marcadores depende do grau de parentesco genético das espécies analisadas (GONÇALVES et al., 2011). Portanto, há similaridade entre *M. calvecens* e *M. albicans*, mas os primers testados demonstraram especificidades diferentes podendo causar bandas inespecíficas.

O percentual de transferibilidade pode ser altamente variável dependendo das espécies em estudo. Alguns estudos apresentam elevadas taxas de transferências de marcadores de SSR em várias espécies, dentro de um gênero (GAITÁN - SOLÍS et al., 2002) e, por vezes, entre gêneros (VARSHNEY et al., 2005). Um exemplo é o estudos da transferibilidade de marcadores de *Cocos nucifera*, Linn para *Butia odorata*. Barb. Rodr., que mostrou 40% de transferibilidade efetiva (MISTURA et al.). Já a avaliação de 67 primers desenvolvidos para melão (*Cucumis, melo* L.) e testados em melancia (*Citrullus lanatus*, Thunb.) (MATSUM. & NAKAI), ambas espécies da família Cucurbitaceae, obteve apenas 23% de transferibilidade (RITSCHER et al. 2004). Um estudo com marcadores microsatélites desenvolvidos para *Oryza sativa* L. e testados em 21 espécies de Bambusoideae, mostrou 68,3% de transferibilidade (CHEN et al. 2010). Valores semelhantes, 63,9% de transferibilidade, foram encontrados para marcadores microsatélites de *Prunus* L. testados em outras espécies da família Rosaceae (MNEJJA et al. 2010). A transferabilidade dentro do mesmo gênero comumente resulta em valores mais altos, como os 83% obtidos para 14 pares de primers desenvolvidos para *Butia eriospatha* Mart. e testados em *B. catarinenses* Mart. (NAZARENO et al. 2011)

Os resultados obtidos não apresentaram homogeneidade nos indivíduos para todos os primers. Todos os primers amplificados apresentaram ser prováveis polimórficos, apresentando bandas extras, algumas dentro do tamanho de bandas esperado e outras não,

pode-se considerar uma possível heterozigosidade e provável diferença de ploidia na mesma população decorrente da ocorrência das bandas inespecíficas, não sendo evidenciada a confirmação devido a resolução do gel de agarose 3%, sendo necessário a utilização de gel de poliacrilamina para detecção de polimorfismo ou aumento do tempo de corrida da eletroforese em gel de agarose 3%. O gel de agarose tem uma maior extensão de separação para fragmentos longos de DNA, já o gel poliacrilamida tem a capacidade de separar fragmentos muito pequenos de DNA e que apresentam uma mínima diferença de massa (WALKER & RAPLEY, 1999). Não se fez uso do gel de poliacrilamida por estar testando inicialmente apenas a transferibilidade dos primers.

Todos os primers amplificados, exceto D114, ocorreram anelamento dentro da temperatura referencial, Para futuras análises de heterozigosidade recomenda-se mais testes em diferentes temperaturas de anelamento e eletroforese em menor voltagem e em mais tempo de corrida.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo são promissores e de grande valia para utilização dos primers transferíveis em estudos de variabilidade e filogenia da família Melastomataceae. Reduzindo os custos e tempo da pesquisa, por não ser necessário o desenvolvimento de outros marcadores específicos para *Miconia albicans*, pois ocorreu a transferibilidade dos primers microsatélites. Além, a eletroforese com gel de agarose 3% ser eficiente, porém com necessidade de ajustes em voltagem e tempo de corrida. Recomenda-se a utilização dos primers B9 e D117 por apresentarem polimorfismo e boa especificidade, porém não são recomendados D114 por não ocorrer amplificação e C103 por apresentar várias bandas inespecíficas.

6 REFERÊNCIAS

BENKO-ISEPPON, A. M., WINTER, P., HÜTTEL, B., STAGGINUS, C., MÜHLBAUER, F., ANDKAHL, G. (2003). Markers closely linked to *Fusarium* resistance genes in chickpea show homology to pathogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosome 5 and 1. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 379-286.

BICKNELL, R.A. & KOLTUNOW, A.M. 2004. Understanding apomixes: recent advances and remaining comundrums. *The Plant Cell* 16: 229-245.

CAETANO A.P.S, Simão D.G, Carmo-Oliveira R, Oliveira P.E. 2013. Diplospory and obligate apomixis in *Miconia albicans* (Miconieae, Melastomataceae) and an embryological comparison with its sexual congener *M. chamissois*. *Plant Systematics and Evolution* DOI 10.1007/s00606-013-0793-y

CARDOSO, EDIVANE; SCHIAVINI, I. V. A. N. Relação entre distribuição de espécies arbóreas e topografia em um gradiente florestal na Estação Ecológica do Panga (Uberlândia, MG). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 25, n. 3, p. 277-289, 2002.

CARREIRA, Rosana Cristina; ZAIDAN, Lilian Beatriz Penteado. Estabelecimento e crescimento inicial de *Miconia albicans* (Sw.) Triana e *Schizocentron elegans* Meissn., sob fotoperíodos controlados. *Hoehnea*, v. 30, p. 155-161, 2003.

CHO, R. J.; MINDRINOS, M.; RICHARDS, D. R.; SAPOLSKY, R. J.; ANDERSON, M. *et al.* Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, v. 23, p. 203–207, 1999.

DOS REIS, Claudia POENÇA Suzana Lucia, DAS GRAÇAS SAJO, Maria. Vascularização foliar e anatomia do pecíolo de Melastomataceae do Cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta bot. Bras*, v. 18, n.4 p. 987-999, 2004.

EDWARDS, Y. J. & ELGAR, G. The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses. *Journal Molecular Biology*, v. 278, 4, p. 843-854, 1998.

ELLIS, J.R.; BURKE, J.M. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*, v.99, p. 125–132, 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.Ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220p.

GOLDENBERG, R. & SHEPHERD, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation. *Plant Systematics and Evolution* 211: 13-

GOLDENBERG, R., 2004. O Gênero *Miconia* (Melastomataceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, vol. 18, n. 4, p. 927-947.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, v.39, p. 439-446, 1974.

HAMRICK, J. L., ANDSCHNABEL, A. (1985). Understanding the genetic structure of plant populations: some old problems and a new approach. In *Population genetics in forestry* (pp. 50-70). Springer Berlin Heidelberg.

HÖRANDL, E. & PAUN, O. 2007. Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials.

LE ROUX, JOHANNES J., ANIA M. WIECZOREK, AND JEAN-YVES MEYER. "Genetic diversity and structure of the invasive tree *Miconia calvenscens* in Pacific islands." *Diversity and Distributions* 14.6 (2008): 935-948.

LEWIN, B. *Genes IV*. Oxford: Oxford University Press, 1990.

LITT, M. & LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Annual Journal Human Genetics*, p. 397-401, 1989.

LORIEUX M; NDJIONDJOP MN; GHESQUIÈRE A. 2000. A first interspecific *Oryza sativa* and *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetical linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 593-601.

MAIA, Fabiano Rodrigo, et al. "Development and characterization of microsatellite markers for *Tibouchina hatschbachii* (Melastomataceae), an endemic and habitat-restricted shrub from Brazil." *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 38.3 (2016): 327.

MARUYAMA, PK., ALVES-SILVA, E. e MELO, C., 2007. Oferta qualitativa e quantitativa de frutos em espécies ornitocóricas fazer Gênero *Miconia* (Melastomataceae). *Revista Brasileira de Biociências*, vol. 5, no. 1, p. 672-674.

MEDEIROS, A. C.; LOOPE, L. L.; MCELVANEY, S. Status, ecology, and management of the invasive plant, *Miconia calvenscens* DC (Melastomataceae) in the Hawaiian Islands. *Bishop Museum Occasional Papers*, v. 48, p. 23-36, 1997.

MERCADANTE, Mauricio; disponível em <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Miconia+albicans>

METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.

MISTURA, Claudete Clarice, et al. "Transferibilidade de marcadores microssatélites de coco (*Cocos nucifera*) para butiá (*Butia odorata*)."
Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE) (2012).

MULLIS, K. B.; FALOONA, E.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via apolymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, v. 155, p. 335-350, 1987.

NERI, AV., CAMPOS, EP., DUARTE, TG., MEIRA NETO, JAA., FRANCISCO DA SILVA, A. e VALENTE, GE., 2005. Regeneração de Espécies Nativas lenhosas solucionar

plantio de *Eucalyptus* em área de cerrado na Floresta Nacional de Paraopeba, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, vol. 19, n. 2, p. 369-376.

OLIVEIRA, Marcia Cristina de Sena. et. al. Fundamentos práticos e protocolos de extração e amplificação. Embrapa Pecuária sudeste, 2007.

PEAKALL, R. & SMOUSE, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.

RATTER, JA., RIBEIRO, JF. e BRIDGEWATER, S., 1997. A vegetação do cerrado brasileiro e as ameaças à sua biodiversidade. *Annals of Botany*, vol. 80, p. 223-230.

REDDY, M. P.; SARLA, N. & SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, v. 128, p. 9-17, 2002.

RENNER, S.S. 1989. A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76:496-518.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S. J.; HIGUCHI, G. HORN, G. T.; MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491, 1988.

SANTIN, Angelo Miguel et al. Controle biológico da planta invasora *Miconia calvescens* por uma nova espécie de *Ditylenchus*. 2008.

SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em plantas arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamento ambientais. In Higa, A. R. Silva, L. (Ed.). *Pomares de sementes de espécies nativas*. Curitiba Fundacao de Pesquisas Florestais do Parana – FUPEF, 2006. p. 193-138.

SILVERTOWN, J. The evolutionary maintenance of sexual reproduction evidence from the ecological distribution of sexual reproduction in clonal plants. *International Journal of Plant Sciences*, Chicago, v. 169, n. 1, p. 158-166, 2008.

SOARES, T. N.; SANTANA, L. L.; OLIVEIRA, L. K.; TELLES, M. P. C.

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

WILLIAMS, J.G. K.; KUBLELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism's amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p.6531-6535, 1990.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, 1993.

