

Cristina Corrêa Todeschini<sup>1</sup>, Fernanda Bered<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Genética e Conservação de Plantas, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
cristinatodeschini@hotmail.com

## Introdução

A proteção da vida não é apenas uma premissa ética, mas uma necessidade econômica. A família Bromeliaceae compreende aproximadamente 3.350 espécies distribuídas em 58 gêneros. No Brasil, podemos encontrar cerca de 50% das espécies conhecidas, sendo um importante centro de diversidade da família. As bromélias sofrem uma crescente demanda do mercado de plantas ornamentais, no entanto este mercado não é suprido por produtores nacionais, mas sim por forte ação do extrativismo. Esse grupo também sofre grande fragmentação de hábitat decorrente do desmatamento da Mata Atlântica.

*Vriesea carinata* (Wawra) (Figura 1), pertencente à subfamília Tillandsioideae, é nativa e endêmica do Brasil, ocorrendo na Mata Atlântica, na Floresta Ombrófila Mista e Densa, Floresta Estacional Semidecidual e Restingas (Figura 2).

A análise do DNA possibilita examinar as variações entre indivíduos, apontando suas diferenças dentro e entre populações e as variações nas frequências alélicas entre elas. Uma forma de estudar as populações dessa espécie é utilizando marcadores de microssatélites (constituídos de DNA repetitivo), os quais são regiões instáveis do genoma, que estão sob alterações mutacionais, com taxas muito mais elevadas do que as observadas em sequências de DNA não repetitivo.

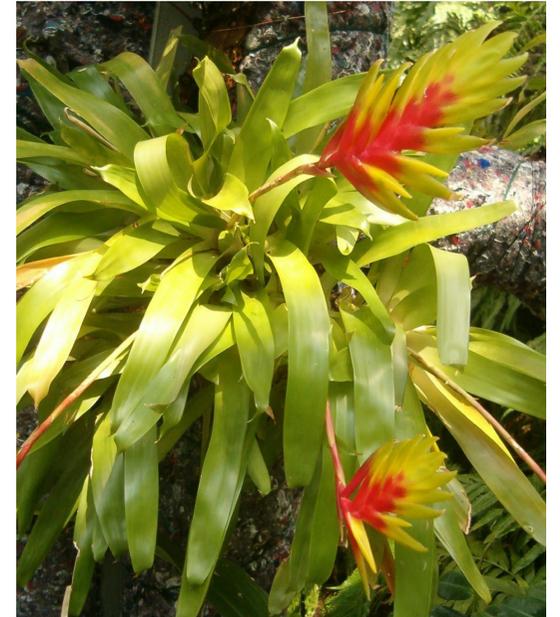


Figura 1: Ilustração de *V. carinata*. Fonte: Botanical Gardens Berlin-Dahlem

## Objetivo

O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites para a espécie *Vriesea carinata* utilizando uma biblioteca de RNA gerada por sequenciamento e nova geração (NGS).

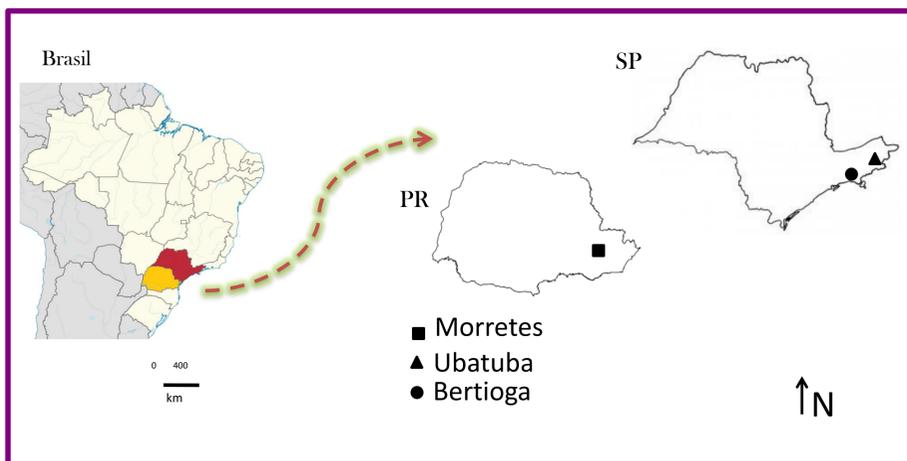


Figura 2: Populações amostradas ao longo da distribuição geográfica de *V. carinata*

## Metodologia

- ❖ O DNA foi extraído das folhas de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1990) com modificações.
- ❖ Foram isoladas sequências de microssatélites *in silico* a partir dos dados gerados por NGS (Guzman *et al.*, 2013) e desenhados os *primers* para a amplificação dessas regiões.
- ❖ Testou-se e validou-se os *primers* desenvolvidos em diferentes plantas de *Vriesea carinata*, através de reações de polimerase em cadeia (PCR) segundo Palma-Silva *et al.* (2007) e os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e corado com GelRed e comparados com marcador de peso molecular de 100pb (LGC Biotecnologia).
- ❖ Os locos com amplificação satisfatória no gel de agarose tiveram seus PCRs repetidos, adicionando-se um terceiro *primer* a reação (M13) marcado com diferentes fluorescências.
- ❖ Os produtos das amplificações foram genotipados em sequenciador automático em comparação com marcador de tamanho molecular GS500 LIZ e a identificação dos alelos foi realizada no programa GENEMARKER.
- ❖ Os locos com perfeita amplificação e polimorfismo foram selecionados e estão sendo analisados quanto à diversidade genética das populações coletadas de *V. carinata*.

## Resultados Preliminares

- ❖ Um total de 632 *contigs* foram selecionados previamente por apresentarem motivos de microssatélites, destes, 222 sequências preliminares foram analisadas e 98 pares de *primers* que delimitam as ilhas de microssatélites foram desenhados utilizando o programa Primer3.
- ❖ Destes 98 *loci* foram selecionados os 30 mais promissores e então realizada a síntese dos *primers* e realizados os testes em laboratório.

- ❖ Foram realizados PCRs com os 30 locos sintetizados em seis indivíduos de *V. carinata*, dos quais 17 apresentaram padrão de amplificação satisfatório em gel de agarose.
- ❖ Posteriormente, realizou-se o segundo teste, no qual foram repetidos os PCRs dos *loci* previamente selecionados, os quais foram genotipados em sequenciador automático para verificação de polimorfismo.
- ❖ Dos 17 *loci* enviados para a empresa prestadora desse serviço, 13 amplificaram satisfatoriamente e 11 foram polimórficos (Tabela 1).
- ❖ No momento, duas populações estão sendo testadas quanto ao seu polimorfismo a fim de estimar a diversidade genética nessas populações naturais de *Vriesea carinata*.

**Tabela 1.** Descrição e caracterização dos 11 *primers* polimórficos que delimitam regiões de microssatélites em *Vriesea carinata*, incluindo nome do locus, sequência do primer, motivo, número de alelos (A), tamanho do alelo.

NOME	PRIMERS	Motivo	A	Tamanho
Vcar_10	F: AACTTGTCTATGTCTAAAGGAATGG R: ACTCTGCGGCTGTTCTTCTC	(TTG)5N(GTT)9N(TAT)7	4	236
Vcar_11	F: ACTCTGCGGCTGTTCTTCTC R: AACTTGTCTATGTCTAAAGGAATGG	(ATA)7N(AAC)9N(CAA)5	5	236
Vcar_31	F: CCGTAGGCGACGATAGAGAG R: GTGGGGGAGGAGAGAGAAAG	(AG)15	3	203
Vcar_72	F: TTCTCAATCTTCACCGACGA R: GCGAGGAGGACGATGACTC	(CGC)7N(GTCCTC)3N(TCC)6	5	217
Vcar_95.1	F: CATTGGTGTGTTGGGTTCA R: GAGATGGCTGAGGAAGATGC	(TGCCAC)4N(CTT)6	3	185
Vcar_115	F: CGCCATTATCAACGATCACA R: GGCGCTTATTTATGCTCTGC	(GA)8N(AG)7	6	187
Vcar_139	F: CCCCAGAAATTGATCGAAAC R: GGTGAGTGAGATTGGGTGGT	(AGG)6N(TGG)9N(GA)8	4	239
Vcar_143	F: CCCTCCCGATCGAATTTAT R: AGGAGCTCCGATCCATAACC	(CTC)9N(TAGGGT)2	2	235
Vcar_153	F: TGGATGTGAAGGAGCAGAAA R: ATGCAACAATCATGCAGTGG	(GCTGAA)2N(GCT)8N(CCTGCT)2	3	209
Vcar_258	F: TTCTTCGAGAGCTTCGATCC R: GAGTCAATGCGGAGAAGCAT	(CCT)9	6	213
Vcar_280	F: CACAAAGCCACTCACAAAACC R: ACTGCCAATCCGGTATGAAG	(CT)8N(TC)7	2	202

## Perspectivas

- ❖ Os loci com perfeita amplificação e polimorfismo serão selecionados para teste em outras espécies de bromélias, com o objetivo de verificar seu potencial para amplificação heteróloga.