

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANNE BERNARDES

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS GENÔMICAS ENRIQUECIDAS COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES PARA *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (LOURO
PARDO)

CURITIBA

2015

MARIANNE BERNARDES

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS GENÔMICAS ENRIQUECIDAS COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES PARA *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (LOURO
PARDO)

Monografia apresentada à disciplina de Estágio
Supervisionado em Biologia como requisito parcial à
conclusão do Curso de Ciências Biológicas .
Bacharelado, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Kava-Cordeiro

Coorientadora: Dra. Valderês Sousa

CURITIBA

2015

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIANNE BERNARDES

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS GENÔMICAS ENRIQUECIDAS COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES PARA *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (LOURO
PARDO)

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas no curso de graduação em Ciências Biológicas, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a Dra. Vanessa Kava-Cordeiro
Orientadora
Departamento de Genética UFPR

Prof.^a Dra. Lygia Galli-Terasawa
Departamento de Genética UFPR

Me. Marcio Gonçalves da Rosa
Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC

Curitiba, 01 de julho de 2015.

A minha mãe Luci Terezinha Cosmala por ter me apoiado e me dado força em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Vanessa Kava-Cordeiro pelo acompanhamento, ajuda e orientação.

A minha coorientadora Dra. Valderês Sousa pela oportunidade, confiança, auxílio e colaborações.

A Embrapa Florestas pelo espaço para desenvolvimento do trabalho.

A Marcio Gonçalves da Rosa pela ajuda e amizade durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais Luci Terezinha Cosmala e Humberto Bernardes Jr. pelo carinho, amor e apoio.

A Rafael Landerdahl pelo amor, carinho, doces palavras, força, paciência, incentivo, apoio e compreensão.

A todos os amigos que contribuíram para a realização deste trabalho.

*Você tem que ser teu próprio
pronto socorro! Você tem que
saber que não é invulnerável, que
irão te fazer a corte e os cortes,
mas nunca as suturas+*

(Felipe Leprevost)

RESUMO

Microsatélites são marcadores moleculares que representam uma poderosa ferramenta usada em estudos de variabilidade genética. Por serem altamente polimórficos é possível extrair um grande número de informações que permite conhecer a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações naturais, importante para adotar estratégias eficazes para a conservação. Louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steud) é uma planta nativa do Brasil que pertence ao gênero *Cordia* e possui várias características que a torna uma espécie atraente para diversos estudos. Assim como outras espécies existentes na Mata Atlântica, o louro-pardo encontra-se vulnerável à perda da variabilidade genética. Sendo assim, o estudo genético desta espécie possibilitará o seu manejo visando sua conservação. O objetivo deste trabalho foi construir uma biblioteca genômica enriquecida com marcadores microsatélites para a espécie florestal louro-pardo. O desenvolvimento da biblioteca propiciará futuramente o desenvolvimento de *primers* espécie específicos, o que subsidiará estudos de genética de populações, conservação e manejo dessa espécie. A construção da biblioteca envolveu diversas etapas laboratoriais, começando pelo protocolo de extração de DNA de louro-pardo. Na sequência por meio de uma eletroforese foi avaliada a qualidade do DNA obtido que apresentou integridade e condições de ser digerido. Após a amostra produzir um perfil de clivagem apropriado, foi feita a ligação com adaptadores para que cada fragmento tivesse uma terminação comum e conhecida. Os fragmentos foram amplificados para posteriormente serem ligados a um vetor de clonagem utilizado para transformar uma cepa comercial de *Escherichia coli* (Top 10). A confirmação da transformação com o vetor e inserto ocorreu pela presença de colônias brancas no meio de cultura, já que foi utilizado um plasmídeo onde o inserto interrompeu o gene Lac-Z, responsável por produzir a enzima β galactosidase, que em presença dos compostos IPTG e X-GAL, faz com que a coloração das colônias seja azul. Em seguida, realizou-se a manutenção dos clones (biblioteca) com a finalidade de manter as colônias em meio adequado para análises futuras. O protocolo utilizado para a construção da biblioteca genômica enriquecida com marcadores microsatélites foi aprimorado com sucesso neste trabalho e servirá de modelo para a construção de outras bibliotecas genômicas de espécies florestais de importância socioeconômica.

Palavras-Chave: biologia molecular, marcadores moleculares, variabilidade genética.

ABSTRACT

Microsatellites are molecular markers that represent a powerful tool used in studies of genetic variability. Since they are polymorphic and allow to get a lot of information allowing to infer of the amount of genetic variability between and within natural populations. These information are very important to establish efficient conservation strategies for *louro-pardo* (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steud). This is a plant native to Brazil belonging to the *Cordia* genera with many characteristics that make it very interesting to many studies areas (for example this wood with high quality). As many others species from Brazilian rain forest, *louro-pardo* is vulnerable to loss of its genetic variability. Therefore studies about it of population genetic are very important in order to conserve its natural remnants. The main objective of this work was to build a genomic enriched library, with microsatellites markers. This library will enable the development of specific *primers* for genetic population studies, conservation and handling this species. Many steps were followed to library construction, starting with the extracting the *louro-pardo* DNA's. The extracted DNA showed a good quality to be digested. After the sample has able to produce a proper cleavage profile, a connection was established with adapters, so each fragment showed an usual and well know termination. Subsequently the amplified fragments were ligated to a cloning vector used to transform a commercial strain of *Escherichia coli* (top 10). The successful transformation with the vector and insert was showed through the presence of white colonies in the culture, was used as a plasmid where the stopped insert Lac-Z gene, responsible for producing the enzyme β -galactosidase, which compound in the presence of IPTG and X-Gal makes blue the color of the colonies. After that, the clone maintenance was conducted (library) as an effort to conserve the colonies in a proper environment for future analyses. The protocol used for the construction of genomic library enriched with microsatellite markers was enhanced with success in this work and serve as a model for building other genomic libraries of forest species of socio-economic importance.

Keywords: molecular biology, molecular markers, genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 . Área de distribuição natural do louro-pardo no Brasil.....	15
FIGURA 2 . Árvore de louro-pardo.....	16
FIGURA 3 . Principais etapas envolvidas na construção da biblioteca enriquecida envolvendo marcadores microssatélitesõ	23
FIGURA 4 . Diagrama esquemático das etapas realizadas para a construção da biblioteca genômica enriquecida com marcadores microssatélites para louro-pardo.....	26
FIGURA 5 . (a) Gel da extração de DNA de louro-pardo (b) Gel da extração de louro-pardo com DNA diluído 15 vezes.....	31
FIGURA 6 . Eletroforese em gel de agarose mostrando o arraste gerado após o DNA de louro-pardo passar pelo processo da digestão com a enzima <i>Afa</i> I.....	32
FIGURA 7 . Pré Amplificação via PCR mostrando os fragmentos de DNA de louro-pardo gerados após a ligação dos adaptadores.....	32
FIGURA 8 . Amplificação via PCR dos fragmentos selecionados enriquecidos de DNA de louro-pardo.....	33
FIGURA 9 . Esquema do vetor de clonagem pGEM . T Easy que possui múltiplos sítios de clonagem. Amp ^r : gene de resistência à ampicilina; ori: origem de replicação; lacZ: operon lac	34
FIGURA 10 . (a) Colônias azuis e brancas resultado da transformação por eletroporação (b) Colônias em maior aumento.....	35
FIGURA 11 . Manutenção dos clones de <i>E. coli</i> em microplaca com vetor pGEM com o inserto de DNA de louro-pardo enriquecido com regiões de microssatélites.....	35
FIGURA 12 . Biblioteca genômica enriquecida com marcadores microssatélites de louro-pardo pronta.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

CNPF - Centro Nacional de Pesquisa de Florestas

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

HCl . Ácido clorídrico

ISSR - Inter Simple Sequence Repeats

IPTG - I -D-1-thiogalactopiranosideo

PCR - Polymerase Chain Reaction

pb . Pares de bases

PVP . Polivinilpirrolidona

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

RNAse . Enzima que degrada RNA

SNP - Single Nucleotide Polymorphism

SSC - Cloreto de sódio e citrato trisódico di-hidratado

SSR - Simple sequence repeats

STMS - Sequence tagget microsatellite site

TBE . Tris borato EDTA

VNTR . Variable Number of Tandem Repeats

UFPR . Universidade Federal do Paraná

X . GAL - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- -d-galactopiranosideo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Louro-pardo.....	15
2.2 Marcadores moleculares.....	17
2.3 Marcadores microssatélites.....	19
2.4 Construção de bibliotecas genômicas enriquecidas com marcadores microssatélites.....	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Extração de DNA.....	27
4.2 Integridade do DNA.....	27
4.3 Digestão.....	28
4.4 Ligação de adaptadores.....	28
4.5 Pré-amplificação via PCR.....	28
4.6 Purificação.....	29
4.7 Seleção de fragmentos contendo microssatélites.....	29
4.8 Amplificação dos fragmentos selecionados.....	29
4.9 Clonagem em um vetor pGEM-T.....	30
4.10 Eletroporação em XL1-Blue.....	30
4.11 Seleção dos transformantes com o DNA de interesse.....	30
4.12 Manutenção dos clones.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES	40
7 REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cordia* engloba cerca de 250 espécies de ampla ocorrência no Brasil, dentre as espécies desse gênero, destaca-se louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steud) que possui uma série de características interessantes como: rápido crescimento, capacidade de regenerar-se, madeira de alta qualidade, facilidade de produção de mudas. Além disso, pode ser usado em reflorestamentos heterogêneos destinados a recomposição de áreas degradadas e de preservação permanente.

Assim como outras espécies da Mata Atlântica, *Cordia trichotoma* se encontra vulnerável à perda da variabilidade genética, devido à exploração e constante degradação deste bioma. Deste modo, a análise da variabilidade genética existente nas populações dessas espécies torna-se importante para manejo e conservação (CARVALHO, 2002).

As informações sobre a diversidade e estrutura genética das populações de louro-pardo ainda são escassas e/ou inexistentes, fazendo-se necessário a compreensão dos mecanismos que regulam as populações desta espécie como forma de orientar estratégias para conservação da biodiversidade.

A evolução das metodologias utilizadas em biologia molecular tem trazido diversos avanços no campo da genética. Neste sentido algumas ferramentas dessa ciência, como marcadores moleculares, têm sido empregadas para realização de diversos estudos de genética de populações, evolução, mapeamento genético entre outros. Os marcadores microssatélites são amplamente utilizados como instrumentos moleculares em estudos de variabilidade genética tanto entre quanto dentro de populações. O elevado polimorfismo desses marcadores pode ser usado para o estudo de populações naturais de plantas, sendo de grande importância para subsidiar a adoção de estratégias eficientes para conservação. Além disso, Varshney, Graner e Sorrells (2005) acrescentam que os microssatélites também são eficientes na análise de paternidade em mapeamentos genéticos e físicos.

Para os estudos que usam os marcadores microssatélites é necessária a disponibilidade de *primers* espécie específicos para as regiões microssatélites a serem amplificadas via reação em cadeia da polimerase (PCR) de uma determinada espécie (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Para louro-pardo ainda não existem *primers* específicos e a transferibilidade não é perfeita, por isso a razão desse trabalho.

Com o intuito de contribuir futuramente para a preservação da diversidade genética de louro-pardo e promover o uso posterior dos conhecimentos gerados, através de estudos de manejo populacional, ecologia e conservação esse trabalho pretende construir

uma biblioteca genômica de marcadores microssatélites para louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steud).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Louro-pardo

Boraginaceae é uma família de plantas de regiões tropicais, subtropicais e temperadas composta por plantas arbóreas, arbustivas e herbáceas. Esta família é constituída por aproximadamente 100 gêneros, sendo *Cordia* um dos mais importantes com cerca de 250 espécies (CARVALHO, 1988).

De acordo com Carvalho (2006) *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel, conhecida popularmente por louro-pardo, ocorre principalmente no Brasil, Argentina e Paraguai.

No Brasil essa espécie apresenta uma ampla ocorrência que vai desde o Ceará (Serra do Araripe . 7 °S) até o Rio Grande do Sul (30 ° 32 S) (Figura 1), sendo que, por sua natureza caducifólia, cresce melhor nas áreas sem geadas rigorosas (CARVALHO, 2006).

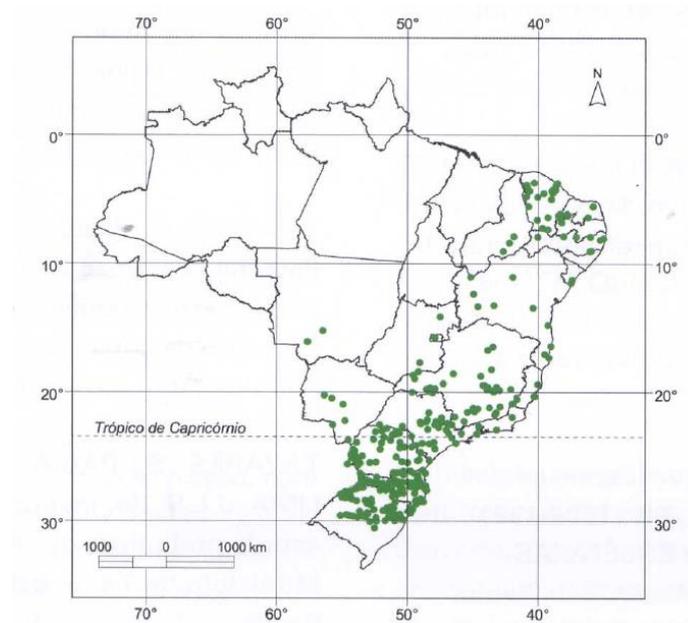


Figura 1 . Área de distribuição natural do louro-pardo no Brasil

Fonte:Carvalho (2002).

Na descrição morfológica Reitz, Klein e Reis (1983) caracterizam o louro-pardo como árvore decidual de 25 até 35 metros de altura e de até 100 cm de diâmetro na altura do peito. O tronco geralmente é bastante reto e cilíndrico; fuste comprido de dez a vinte metros, casca cinza claro com sulcos longitudinais, lembrando os do cedro, porém mais delicados e mais numerosos. A Figura 2 mostra uma árvore de louro-pardo.



Figura 2 . Árvore de louro-pardo.

Fonte: sites.unicentro.br.

Carvalho (2002) destaca que o louro-pardo é uma das espécies nativas mais promissoras para plantio nas regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Segundo o autor, essa espécie tem sido plantada experimentalmente em vários locais no sul do Brasil, pelo Centro Nacional de Pesquisa de Florestas (CNPQ) e tem apresentado boa forma e crescimento rápido.

Reitz, Klein e Reis (1983) ponderaram que as características silviculturais mais importantes da espécie são o rápido crescimento inicial da planta, a faculdade de regenerar-se com facilidade, especialmente em lugares de terreno desflorestado ou degradado pela agricultura, e pela forma, que tem o fuste, sem a tendência de ramificar-se em sentido lateral. Carvalho (2006) aponta que, além das características citadas, o louro-pardo também possui madeira de qualidade e facilidade de produção de mudas, a dispersão das sementes é anemocórica.

Segundo Lorenzi (1998) e Rizzini (1978) sua madeira é muito utilizada na confecção de mobiliário para revestimento decorativo e na fabricação de portas e janelas, também em interiores e estruturas de embarcação sobre a linha de flutuação, confecção de pequenas embarcações, tonéis e caixilhos. Sua utilização em tornearia permite obter valiosas peças, como também em esculturas. Lorenzi (1998), Mendonça, Ramos e Paula (2001) destacam ainda o seu uso em reflorestamentos heterogêneos destinados a recomposição de áreas degradadas e de preservação permanente.

Pelos aspectos ecológicos de grupo sucessional estudados por Carvalho (2006) o louro-pardo é considerada uma espécie secundária inicial, com tendência pioneira. No

estágio sucessional é comum na vegetação secundária no estágio de capoeira e capoeirões.

Para Reitz, Klein e Reis (1983), o louro-pardo é uma das espécies florestais que se prestam biológica, social e economicamente para combinar sua plantação com a agricultura durante a primeira fase do crescimento e logo com pastoreio controlado, pois a árvore não exerce competição sobre os campos naturais nem sobre as áreas cultivadas.

Além da utilização dessa espécie para produção de madeira e recuperação de áreas degradadas, Menezes *et al.* (2001) relata que várias propriedades medicinais têm sido atribuídas às espécies do gênero *Cordia*, dentre elas: cicatrizante, adstringente, anti-inflamatória, anti-helmíntico, anti-malária, diurético, contra infecções urinárias, doenças pulmonares e hanseníase.

Carvalho (2002) afirma que nos plantios, observa-se variação acentuada entre plantas de louro-pardo, mas, o melhoramento genético pode elevar, em muito, seu desempenho silvicultural em crescimento e forma. Entre as origens testadas pela Embrapa Florestas, destacam-se pela superioridade de crescimento, Londrina . PR e Itararé . SP e, pela tolerância ao frio, Colombo . Pr. No tocante à conservação genética, *Cordia trichotoma* está na lista das espécies que correm perigo de extinção no estado de São Paulo, sendo conservada *ex situ* pela Embrapa Florestas.

Apesar da sua importância e potencial para uso futuro, estudos sobre o conhecimento de sistema reprodutivo da planta, distribuição da variação genética dentro e entre indivíduos, fluxo gênico entre e dentro de populações e outros parâmetros para a caracterização genética dessa espécie ainda são escassos na literatura.

2.2 Marcadores moleculares

O emprego de marcadores moleculares para o estudo de genética de populações tem sido importante especialmente para espécies nativas. Nos últimos anos, com os avanços na área da genética e da biologia molecular, principalmente com o advento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA, foram desenvolvidas poderosas técnicas para o desenvolvimento de diferentes tipos de marcadores genéticos moleculares (BORÉM e CAIXETA, 2009). Marcadores moleculares podem ser definidos como marcadores genéticos baseados na detecção de isoenzimas ou sequências de DNA (FALEIRO, ANDRADE e REIS, 2011).

A seguir, estão apresentados os marcadores moleculares mais utilizados.

- Isoenzimas: grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas. As diferentes isoenzimas são resultantes de variações alélicas dos genes codificadores;
- RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*): polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição. São fragmentos de DNA obtidos com o uso de enzimas de restrição, separados por eletroforese e visualizados por meio de hibridizações com sondas de sequências homólogas marcadas com radioatividade ou fluorescência;
- Minissatélites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*): são sequências de DNA de 10 a 100pb repetidas em tandem (lado a lado). O número de repetições de tais sequências em cada região hipervariável pode chegar a 50. As regiões hipervariáveis estão distribuídas por todo o genoma, constituindo vários locos nos diferentes cromossomos;
- Microssatélites/SSR - (*Simple Sequence Repeat*): são sequências de DNA muito curtas repetidas em tandem, cuja detecção é feita por PCR utilizando *primers* específicos;
- AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*): são polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados. São fragmentos de DNA (80 a 150pb) obtidos com a digestão do DNA com enzimas de restrição, seguida da ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos via PCR;
- ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*): são fragmentos de DNA de 100 a 3000pb amplificados via PCR usando um único *primer* (16-20pb) construído a partir de sequências de microssatélites;
- SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*): é utilizado para identificar mutações e polimorfismos baseados na posição de um único nucleotídeo, necessitando de informações de sequenciamento do DNA para o desenho de *primers* e sondas específicas.

O uso de marcadores moleculares tem sido amplamente empregado no processo de caracterização genética devido a várias características desejáveis, como por exemplo: detecção de taxa de polimorfismo, herdabilidade, ausência de influência ambiental, baixo custo por dado gerado, distribuição em todo o genoma e o processo de análise pode ser automatizado em alguns casos (FERREIRA, MORETZSOHN, BUSO, 2007; BORÉM e CAIXETA, 2009).

Para Faleiro, Andrade e Reis (2011) os marcadores moleculares permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre identidade genética, diversidade, frequência gênica, relacionamentos filogenéticos, mapeamento genético, seleção

assistida, entre outras. Essas informações são extremamente úteis em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético.

Bajay (2014) afirma que o estudo da variabilidade genética possibilita acessar informações a respeito da diversidade genética em ambientes com históricos de formação distintos como fragmentos reflorestados e fragmentos de remanescentes naturais. Para o autor, esta variabilidade é uma condição necessária, tanto para a ocorrência de mudanças evolutivas nos organismos, como para a manutenção das populações nos ambientes em constantes modificações. A estimativa de fluxo gênico entre populações é importante para a compreensão dos padrões de diversidade e estrutura genética de uma espécie.

A escolha do tipo de marcador a ser empregado na análise depende de uma série de fatores que estão relacionados com o objetivo da pesquisa, infraestrutura disponível e recursos financeiros para o investimento; da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (CIAMPI, VINSON e GAIOTTO 2007, FALEIRO, ANDRADE e REIS, 2011).

Bajay (2014) aponta que, dentre os vários tipos de marcadores moleculares disponíveis, os marcadores microssatélites são destaque, pois através deles é possível determinar polimorfismo e padrões de variabilidade genética nas espécies.

2.3 Marcadores microssatélites

Microssatélites ou STMS (~~sequence tagged microsatellite site~~) ou sequências simples repetidas (SSRs) é um tipo de marcador molecular encontrado no genoma de animais e plantas. Esses marcadores são compostos por sequências de poucos pares de bases de DNA (2-6 pb) com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem, abundantes e dispersos por todo o genoma dos organismos eucarióticos (AGARWAL, SHRIVASTAVA e PADH, 2008). Estão presentes tanto em regiões codificantes como não codificantes e geralmente são caracterizados por um elevado grau de polimorfismo (FALEIRO, ANDRADE e REIS, 2011; BORÉM e NETO, 2013).

Kashyap *et al.* (2006) observou que os microssatélites são encontrados preferencialmente em regiões não codificadoras e devido a isso podem ser considerados marcadores seletivamente neutros, o que é muito importante para estudos em genética de populações naturais. O alto polimorfismo desses marcadores é uma vantagem em estudos de fluxo gênico, padrões de diferenciação e níveis de endogamia entre populações. Ainda está em discussão a origem desse polimorfismo, mas uma das possibilidades seja devido a deslizamentos (*slippage*) na replicação do DNA, recombinação

desigual ou alinhamento incorreto das fitas de DNA. Durante a replicação de uma região repetitiva, as fitas de DNA separam-se e associam-se novamente de forma incorreta, gerando cópias de trechos de DNA (alelos) com diferentes tamanhos ou números de repetições de um determinado motivo no próximo ciclo de replicação, por meio da inserção ou deleção de uma unidade de repetição (BORÉM e CAIXETA, 2009; BORÉM e NETO, 2013).

De acordo com Bajay (2014) para se amplificar uma região contendo SSRs, são utilizadas as sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites para a construção de *primers* (iniciadores), que serão usados na amplificação dos locos, usando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR). Deste modo, é possível obter uma amplificação específica da região que contém a sequência SSR. O polimorfismo entre as bandas é decorrente dos números diferentes de elementos simples repetidos, que são representados por diferentes tamanhos de fragmentos amplificados. Os produtos da amplificação por PCR podem ser separados em gel de poliacrilamida, ou gel de agarose ou por sequenciador automático. Cada tamanho de fragmento diferente de DNA representa um alelo daquele loco específico.

Os microssatélites são classificados conforme a composição das sequências repetidas: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção, por exemplo: GTGTGTGT; (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao motivo, por exemplo: GTGTGTAGTGTGT; (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas adjacentes, por exemplo: GTGTGTCACACA (OLIVEIRA *et al.*, 2006; NASS, 2007; BORÉM e CAIXETA, 2009).

Devido ao alto grau de polimorfismo encontrado em seus locos, os microssatélites são considerados marcadores poderosos, o que faz com que possam ser usados em diversos estudos populacionais permitindo detectar variabilidade genética desde indivíduos até espécies próximas (BORÉM e CAIXETA, 2009). Para Oliveira *et al.* (2006) esses marcadores podem fornecer informações importantes para identificação de unidades de conservação e dos processos genéticos que ocorrem nas populações como padrões de fluxo gênico, cruzamento entre parentes e incidência de deriva genética. Por sua natureza codominante eles podem ser usados tanto para populações selvagens como para as cultivadas. Eles também têm sido usados como ferramenta para o mapeamento de genoma de diversos organismos e isto é possível devido ao fato que as regiões flanqueadoras complementares aos *primers* são frequentemente conservadas dentro da mesma espécie ou em gêneros correlatos, ainda que essas regiões estejam sujeitas a

altas taxas de mutação. A informação fornecida por esses marcadores pode ser aplicada nas mais diferentes áreas, que variam desde estudos arqueológicos a pesquisa forense, também são amplamente usados em genética de populações e para conservação dos recursos biológicos (BORÉM e NETO, 2013).

Os microssatélites estão substituindo rapidamente outros marcadores, pois apresentam inúmeras vantagens quando comparados a eles (RFLP, RAPD, AFLP, principalmente). Além de serem altamente polimórficos e informativos, sua herança é codominante, o que permite a discriminação entre homozigotos e heterozigotos, são multialélicos, ocorrem abundantemente em genomas de eucariotos, são baseados em PCR e, portanto, necessitam de pequena quantidade de DNA, são altamente reproduzíveis, não requerem radioatividade, estão bem dispersos no genoma em regiões codificadoras e não codificadoras e por fim os locos são frequentemente conservados entre espécies relacionadas (SALLES *et al.*, 2003; BORÉM e CAIXETA, 2009; FALEIRO, ANDRADE e REIS, 2011).

Oliveira *et al.* (2006) afirmam que, em geral, os marcadores moleculares tradicionais tem, um baixo poder estatístico e de precisão para estimar diferenças genéticas, mas a descoberta de locos altamente variáveis, como os presentes nos microssatélites, possibilitam rodar análises estatísticas capazes de determinar diferenças entre grupos de espécies em risco de extinção.

O elevado custo e mão de obra para obtenção de *primers* informativos e específicos para cada espécie são algumas das limitações envolvendo os marcadores microssatélites. O grande inconveniente desses marcadores é que, quando se está estudando a espécie pela primeira vez, eles precisam ser isolados da maioria das espécies. Isso ocorre porque os SSRs normalmente são encontrados em regiões não codificantes em que a taxa de substituição de nucleotídeos é maior do que nas regiões de codificação. Deste modo, a estratégia de usar *primers* universais que foi muito eficaz para DNA mitocondrial (KOCHER, THOMAS e MEYER, 1989) é problemática para microssatélites. No entanto, em alguns casos pode ocorrer a conservação de sítios microssatélites entre espécies relacionadas, possibilitando aproveitar *primers* desenvolvidos para uma determinada espécie e empregá-los em outras espécies que sejam filogeneticamente próximas (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998). A presença de regiões flanqueadoras altamente conservadas em alguns loci de microssatélites tem sido descritas em alguns animais como tartarugas, cetáceos e peixes (ZANE *et al.*, 2002).

Segundo Borém e Caixeta (2009) o isolamento de regiões microssatélites do genoma e o desenvolvimento dos respectivos *primers* amplificadores pode ser feito por

métodos tradicionais de construção de bibliotecas ou por técnicas de enriquecimento. Os métodos tradicionais consistem da digestão do DNA, clonagem e sequenciamento. Já a construção de bibliotecas via protocolos de enriquecimento visa aumentar a eficiência em isolamento as regiões microssatélites para posterior sequenciamento. De acordo com Ciampi, Vinson e Gaiotto (2007) e Nass (2007), os principais protocolos de enriquecimento são:

- a) Enriquecimento da colônia ou hibridação de placa por meio de sondas marcadas e complementares às sequências repetitivas;
- b) Enriquecimento por extensão do iniciador via iniciadores complementares ou degenerados;
- c) Enriquecimento por meio de sondas complementares à região microssatélite ligadas à biotina, para posterior separação magnética;
- d) Enriquecimento por hibridação com membrana de náilon;
- e) Enriquecimento via RAPD.

Uma vez obtidas as sequências contendo microssatélites por qualquer método escolhido, são sintetizados pares de *primers* para genotipagem e caracterização genética das populações ou acessos.

De acordo com Frankhan (2010) é fundamental conhecer os padrões de distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações naturais para adotar estratégias de conservação efetivas. Para Ferreira e Grattapaglia (1998) a variabilidade genética pode ser detectada nas populações por meio de parâmetros que estimam a diversidade genética.

Collevatti e colaboradores (2010) afirmam que marcadores microssatélites são muito empregados em estudos genéticos como ferramentas moleculares para estimar a diversidade genética das populações como medida de variabilidade genética. O autor explica que a análise da diversidade genética empregando SSRs é utilizada estimando os parâmetros a seguir: (*A*) número de alelos por loco, (*F*) porcentagem de locos polimórficos, (*H_o*) heterozigosidade observada, (*H_e*) heterozigosidade esperada segundo o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, (*i*) índice de fixação, e o (*PIC*) conteúdo de informação polimórfica.

Estudos em bancos de dados mostram que a frequência de distribuição de microssatélites difere em plantas e animais. O genoma de plantas contém em média, dez vezes menos microssatélites que o genoma humano (RAFALSKI *et al.*, 1996). As repetições mais comuns em plantas são (AT)*n*, (GA)*n*, (AC)*n*, (AAT)*n* e (AAC)*n* (WANG *et al.*, 1994; GUPTA e VARSHNEY, 2000; NASS, 2007).

Visando contribuir para a conservação genética, diversos estudos utilizando a técnica de microssatélites têm sido realizados para espécies florestais nativas e exóticas, como por exemplo, os trabalhos de Oliveira *et al.*, (2012); Moraes *et al.*, (2013); Santos (2012), assim como com plantas de importância ecológica, - (SIGRIST, 2009; RAMOS, 2014), deste modo, a construção da biblioteca com marcadores microssatélites para louro-pardo apresenta grande potencial de uso.

2.4 Construção de bibliotecas genômicas enriquecidas com marcadores microssatélites

A estratégia de desenvolvimento de marcadores microssatélites tem início com a construção de uma biblioteca genômica, isolando os locos de interesse na espécie alvo (BORÉM e CAIXETA, 2009). A construção da biblioteca genômica conta com uma série de etapas que se encontram resumidas a seguir e aparecem ilustradas na Figura 3.

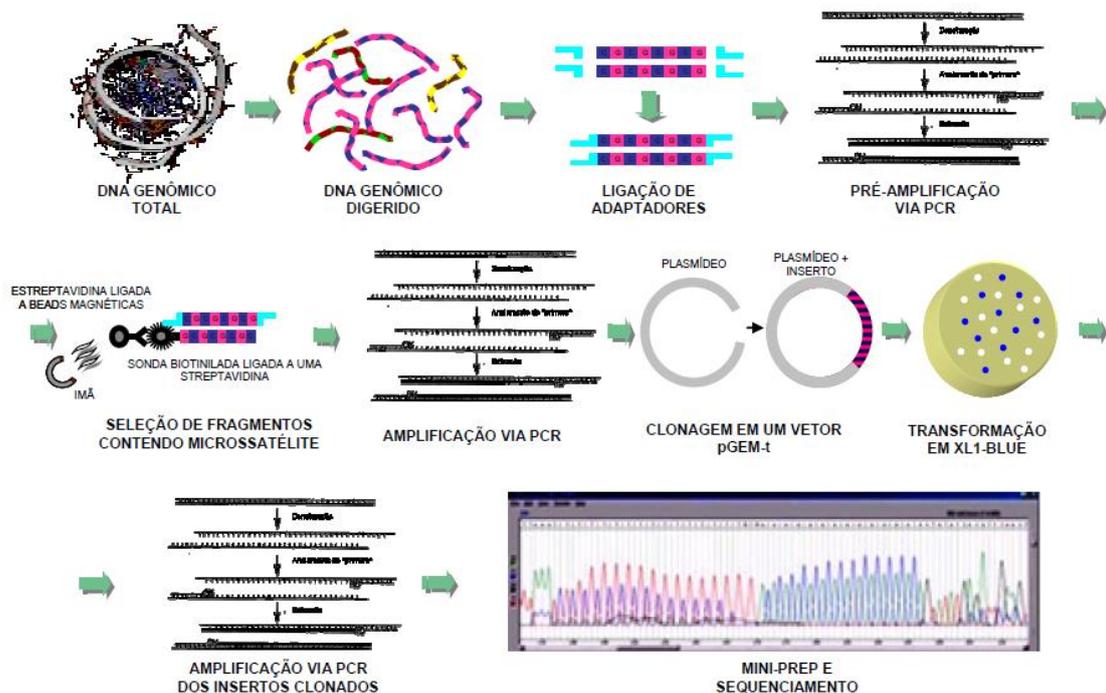


Figura 3 . Principais etapas envolvidas na construção da biblioteca enriquecida envolvendo marcadores microssatélites.

Fonte: Nucci (2007).

Inicialmente é necessário extrair DNA de qualidade, em seguida realizado o processo de fragmentação do DNA, através de uma digestão, empregando enzimas de restrição. Essa etapa tem por objetivo gerar fragmentos adequados para que

adaptadores, que tem uma terminação comum e conhecida, possam ser ligados. Uma pré-amplificação, via PCR, é realizada com o objetivo de amplificar a quantidade de fragmentos e garantir que a ligação tenha ocorrido. Após essa etapa o DNA é purificado e então uma seleção dos fragmentos que contêm os microssatélites é conduzida. Uma nova PCR é realizada a fim de gerar fragmentos de fita dupla em maior quantidade para então ser feita a clonagem, onde esses fragmentos serão ligados a um vetor de clonagem. As células de *E. coli* são transformadas com eletroporação para proporcionar a amplificação do inserto (fragmento de DNA inserido em um vetor) e por fim faz-se a manutenção dos clones que visa garantir que cada construção (vetor + fragmento) seja mantida em condições apropriadas para análises posteriores.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O trabalho teve como objetivo principal construir uma biblioteca genômica enriquecida com marcadores microssatélites para a espécie florestal louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel).

3.2 Objetivos específicos

1. Testar o protocolo de extração de DNA (CTAB 2%) estabelecido na Embrapa Florestas para a espécie em estudo e ajustá-lo, se necessário;
2. Construir uma biblioteca genômica para louro-pardo utilizando a metodologia de microssatélites;
3. Subsidiar estudos de análise genética de populações naturais remanescentes e implantadas para estudos futuros envolvendo o louro-pardo;
4. Implementar metodologias de construção de biblioteca de microssatélites para aplicação em estudos futuros com outras espécies vegetais de interesse.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de louro-pardo foram obtidas a partir plantas da área experimental da Embrapa Florestas . CNPF, localizada no município de Colombo, Paraná.

Uma planta foi selecionada aleatoriamente, da qual folhas mais jovens, tenras e verdes foram coletadas ao acaso e armazenadas em freezer . 80 °C. Toda a parte prática foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Florestas.

A Figura 4 mostra um diagrama esquemático das análises realizadas neste trabalho para a construção da biblioteca enriquecida em microssatélites para louro-pardo.

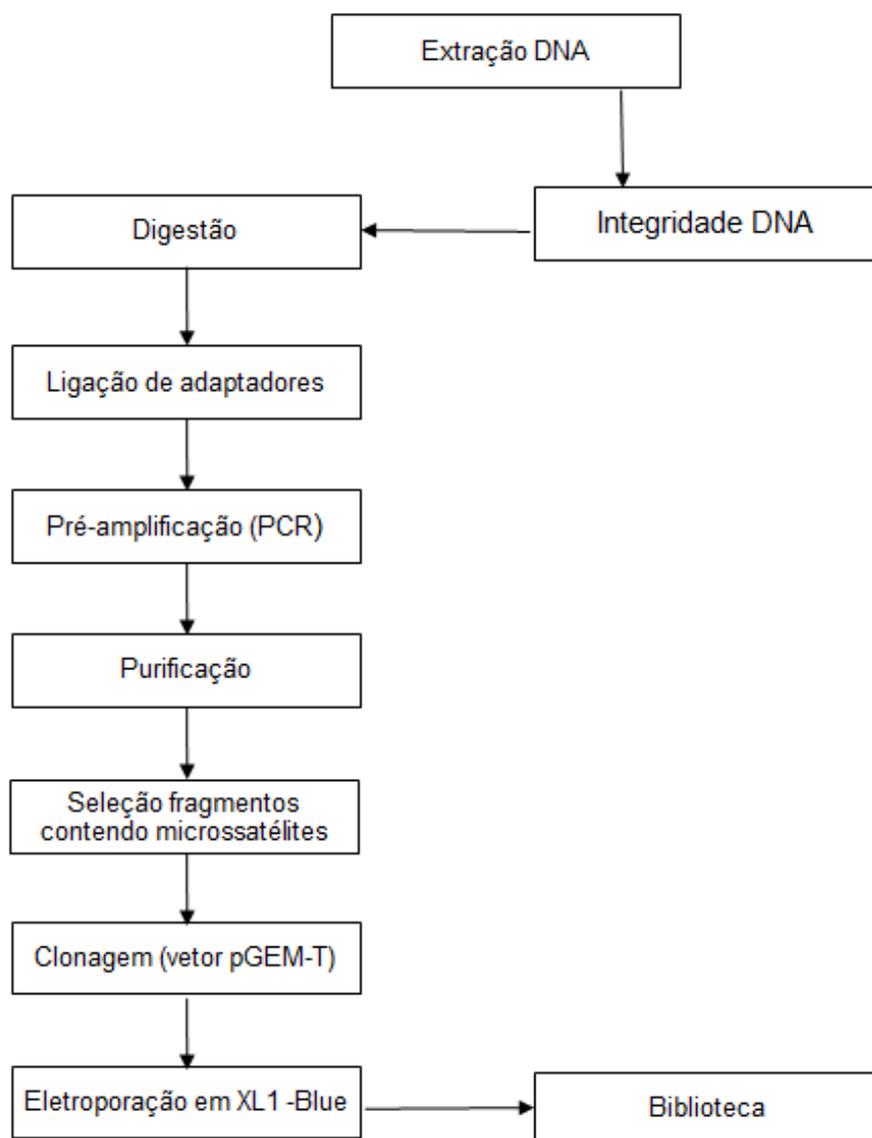


Figura 4 . Diagrama esquemático das etapas realizadas para a construção da biblioteca genômica enriquecida com marcadores microssatélites para louro-pardo.

Fonte: A autora (2015).

4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA de louro-pardo seguiu a metodologia CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) 2 % conforme proposto por Ferreira e Grattapaglia (1995).

Essa metodologia de extração se baseia principalmente na dissolução das membranas celulares através do uso do detergente CTAB. Primeiramente as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido até atingir o ponto de um pó fino e homogêneo para romper a parede celular e conseguinte extravasamento do conteúdo celular. Transferiu-se o macerado de louro pardo para um tubo tipo *appendorf* de 2,0 mL e foi adicionado 700 µL de solução CTAB com 1,4 µL de 2-mercaptoetanol nessa amostra macerada. Esses componentes servem para dissolver as membranas celulares e evitar o efeito oxidativo dos polifenóis. A amostra foi levada ao banho-maria a 65 °C por uma hora, em seguida, uma extração com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi realizada a fim de se desnaturar as proteínas. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo tipo *appendorf* e nele, com o intuito de precipitar os ácidos nucleicos, foi adicionado 500 µL de isopropanol gelado. A amostra foi levada ao freezer por duas horas, em seguida, duas lavagens com 500 µL de etanol 70 % e uma com etanol absoluto foi realizada. O DNA foi seco em temperatura ambiente *overnight* para então ser ressuscitado em tampão TE com RNase e incubado em estufa a 37 °C por uma hora. Após esse período o DNA foi guardado em freezer com temperatura de -20 °C.

4.2 INTEGRIDADE DO DNA

A integridade do DNA extraído foi avaliada através de uma eletroforese utilizando-se agarose, tampão TBE (tris, ácido bórico, EDTA), brometo de etídio, padrões de DNA extraídos de bactéria, glicerol e azul de bromofenol.

A eletroforese foi realizada utilizando como matriz um gel de agarose 1 %. A agarose foi solubilizada no tampão TBE 1X e levada ao micro-ondas até a dissolução da agarose, em seguida foi adicionado o corante brometo de etídio (intercalante) com o objetivo de demonstrar a presença de material genômico. A sua função intercalante permite que, quando exposto a luz UV revele as possíveis bandas existentes. O gel foi colocado em um suporte até sua solidificação. O DNA foi misturado a uma solução denominada tampão de corrida, composta por glicerol (à fim de conferir peso ao DNA) e azul de bromofenol (corante), para visualizar a corrida. O gel de 10 cm foi colocado na cuba de eletroforese e a corrida eletroforética teve início com as condições de: 80 V por

aproximadamente 1 h 30 min. Ao final, o gel foi colocado em um transiluminador e exposto a luz UV para revelação. A foto ficou documentada no computador acoplado ao equipamento.

Todas as etapas subsequentes obedeceram a metodologia proposta por Souza, Zucchi e Vincentz, 2014.

4.3 DIGESTÃO

Para realizar a digestão das amostras utilizou-se os seguintes reagentes: tampão 1X, espermidina (40 mM) enzima *Afa I* (10 u/ μ L) e DNA em uma concentração máxima de 250 ng/ μ L.

A reação foi realizada em tubos tipo *appendorf* de 0,6 mL e incubada em estufa a 37 °C por 3 horas. Todos os reagentes foram misturados, porém, para um melhor resultado, colocou-se metade do volume da enzima, incubou-se por 1 h e em seguida acrescentou-se a outra metade que permaneceu em incubação por mais 2 h.

A amplificação foi identificada pela presença de bandas através de uma eletroforese em gel de agarose, onde pipetou-se 10 μ L da digestão em poços no gel conforme sugerido por Ferreira e Grattapaglia, 1995.

4.4 LIGAÇÃO DE ADAPTADORES

A ligação dos adaptadores foi realizada em um termociclador Veriti 96 *Well Thermal Cycler* por 2 horas a 20 °C e os seguintes reagentes foram utilizados: água ultrapura, tampão 5X, enzima T4 DNA ligase (1 u/ μ L), DNA digerido, primers RSA21 (5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3') e RSA25 (5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCAC A 3') ambos na concentração de 10 μ M.

4.5 PRÉ-AMPLIFICAÇÃO VIA PCR

A etapa de pré-amplificação via PCR foi conduzida em um termociclador Veriti 96 *Well Thermal Cycler* utilizando-se as soluções: tampão 10X, MgCl₂ (25 mM), dNTP (2,5 mM), enzima RSA21 (10 μ M) e Taq polimerase. No termociclador os seguintes ciclos foram utilizados: 95 °C 4 min, seguido de 20 ciclos (94 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min) e 72 °C por 8 min. A amplificação foi checada através da eletroforese em gel de agarose onde foram aplicados 10 μ L da reação de amplificação (FERREIRA e GRATTAPAGLIA,

1995).

4.6 PURIFICAÇÃO

Para a purificação do DNA o kit Quiaquick PCR purification kit+ (QIAGEN) foi usado. Nessa etapa foram empregados os seguintes reagentes e materiais: tampão PB, tubo coletor, coluna de purificação, tampão PE e água ultrapura. A purificação do DNA seguiu a metodologia estabelecida pelo fabricante.

4.7 SELEÇÃO DE FRAGMENTOS CONTENDO MICROSSATÉLITES

O processo de enriquecimento foi realizado através da hibridização de oligonucleotídeos conjugados a biotina. As sondas utilizadas foram (Biotina - IIII(CT)8 e Biotina . IIIII(GT)8), complementares a sequências repetitivas GA e CA, respectivamente.

Inicialmente foi feito um preparo das microesferas magnéticas (*beads*) (agitação e magnetização) utilizando o reagente SSC 0,5X. No preparo do DNA purificado utilizou-se água ultrapura e o DNA foi incubado em banho-maria a 95 °C por 15 minutos para a desnaturação da dupla fita do DNA. Após, sondas biotiniladas (50 µM) foram adicionadas juntamente com o reagente SSC 20X e os tubos foram agitados lentamente por 20 minutos. As microesferas magnéticas foram misturadas no tubo contendo DNA e incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. O DNA foi ressuspensionado em SSC 0,1X, essa etapa de lavagem foi repetida por 3 vezes e ao final o DNA foi ressuspensionado em água ultrapura.

4.8 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS SELECIONADOS

Após a seleção dos fragmentos enriquecidos, estes foram submetidos a PCR utilizando como primer o adaptador RSA21. A amplificação foi realizada utilizando: água ultrapura, tampão 10X, MgCl₂ (25 mM), dNTP (2,5 mM), enzima RSA21 (10 µM) e Taq polimerase. A reação foi conduzida em termociclador nas seguintes condições (ciclos): 95 °C 1 min, seguido de 25 ciclos (94 °C 40 s, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min) e 72 °C por 5 min. Em seguida foi realizada a eletroforese em gel de agarose onde foram aplicados 10 µL da reação de amplificação nas mesmas condições de eletroforese apresentadas no item 4.2 (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

4.9 CLONAGEM NO VETOR pGEM-T

Os fragmentos amplificados via PCR foram ligados a um vetor de clonagem (pGEM-T . *Easy vector* - PROMEGA) por meio de reação composta por: tampão 2X, plasmídeo pGEM-T, produto de amplificação e enzima ligase. Essa reação foi incubada por 12 horas em termociclador a 4 °C.

4.10 ELETROPORAÇÃO EM XL1-BLUE

Células de *E. coli* foram transformadas com o produto de clonagem em um eletroporador da marca *Eppendorf* (1 pulso de 2500 Volts), para isso utilizou-se: células eletrocompetentes, produto de clonagem, placas com meio LB + ampicilina, IPTG, X-GAL, fluxo laminar.

4.11 SELEÇÃO DOS TRANSFORMANTES COM O DNA DE INTERESSE

Após as células sofrerem a transformação em um eletroporador da marca *Eppendorf* as mesmas foram incubadas em tubos tipo Falcon por 1 hora a 37 °C para então serem plaqueadas em meio de cultura LB contendo ampicilina. Foram feitas 3 placas e com concentração de 50 µL, 100 µL e 150 µL, em cada uma delas foi adicionado IPTG e X-GAL, as placas foram incubadas a 37 °C e após colocadas em geladeira por 1 hora para que as colônias ficasse azuis.

4.12 MANUTENÇÃO DOS CLONES

A biblioteca foi concretizada através da manutenção dos clones que visava garantir que cada construção (vetor + fragmento) fosse mantida em condições apropriadas para análise posterior. Essa etapa foi realizada em fluxo laminar, utilizando-se microplaca com fundo U contendo meio 2YT-HMFM + ampicilina (100 µg/mL). As colônias brancas (obtidas na etapa anterior) foram repicadas com a ajuda de palitos estéreis e mantidas em *shaker* a 37 °C por 20 h, em seguida foram acondicionadas em freezer . 20 °C por 20 min e após em freezer . 80 °C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo utilizado para extração de DNA foi eficiente e portanto não sofreu alterações. Para verificar a qualidade, quantidade e integridade do DNA utilizou-se um gel de agarose. Neste foram colocados padrões de DNA de concentração conhecida (20, 50, 100 e 200 ng/ μ L) à fim de se comparar ao DNA extraído. A Figura 5 (a) mostra o resultado da extração de DNA, onde foi possível observar a integridade e boa qualidade do DNA obtido, porém o mesmo estava muito concentrado, bem acima do padrão de 200 ng/ μ L. Devido a isso e também ao fato de que o DNA a ser usado para os microssatélites deve apresentar uma concentração de no máximo 250 ng/ μ L, o DNA de louro-pardo foi diluído 15 vezes e repetiu-se o gel (Figura 5 b). Através do segundo gel foi possível constatar a boa qualidade do DNA obtido (integridade), passível de amplificação. Verificou-se ainda que o DNA encontrava-se em faixa de concentração de 100 a 200 ng/ μ L, deste modo, o DNA de louro pardo apresentou concentração adequada para ser usado nas demais etapas da construção da biblioteca.

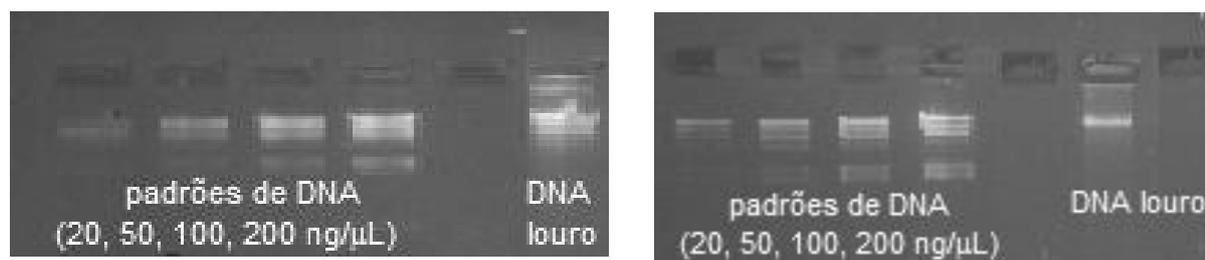


Figura 5 - (a) Gel da extração de DNA de louro-pardo. (b) Gel da extração de louro-pardo com DNA diluído 15 vezes.

Fonte: A autora (2015).

A digestão do DNA genômico com a enzima *Afa* I não gerou nenhum tamanho preferencial de fragmento, produzindo um perfil de clivagem adequado para a construção da biblioteca genômica. Através do gel (Figura 6) foi possível observar que a digestão ocorreu com sucesso, pois foi possível visualizar um *smear* (arraste) uniforme. Conforme esperado, pode-se verificar que para o louro-pardo a enzima *Afa* I demonstrou efetividade na clivagem, nesse sentido estudos de Bajay (2014) também obtiveram sucesso na utilização da enzima de restrição *Afa* I na clivagem dos fragmentos.



Figura 6 . Eletroforese em gel de agarose mostrando o arraste gerado após o DNA de louro-pardo passar pelo processo da digestão com a enzima *Afa I* .

Fonte: A autora (2015).

Após a clivagem do material genômico os adaptadores com terminação comum e conhecida (RSA21 e RSA25) foram ligados, utilizando a enzima T4 DNA ligase, ao DNA. Os reagentes, água, tampão, adaptadores, T4 ligase e DNA digerido, foram incubados por duas horas em um termociclador a 20 °C. A ligação dos adaptadores foi confirmada pela etapa de pré-amplificação, resultando em uma maior quantidade de DNA para a seleção. A pré-amplificação foi realizada através da técnica de PCR e a visualização desta reação foi efetuada em gel de agarose (Figura 7). Através da Figura 7 constatou-se o sucesso tanto da ligação do DNA aos adaptadores quanto da pré-amplificação, pois um *smear* é visualizado no gel. A avaliação dos fragmentos, para assegurar se os mesmos estão dentro do tamanho esperado, foi feita com o auxílio de um marcador 1 kb que foi colocado ao lado da amostra e assim, foi possível comparar o arraste obtido da amostra com o tamanho dos pares de base. De acordo com Souza, Zucchi e Vincentz (2014), nessa etapa, deve-se observar um arraste de 1200 a 300 pares de bases e no presente trabalho verificou-se que a amostra encontra-se na faixa de 1636 - 506 pares de base, estando, portanto apta a seguir as demais etapas da construção da biblioteca.

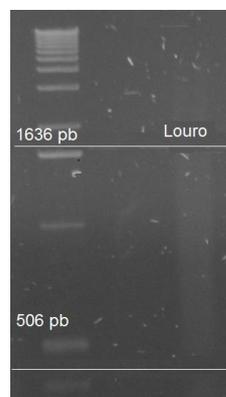


Figura 7 - Pré Amplificação via PCR mostrando os fragmentos de DNA de louro-pardo gerados após a ligação dos adaptadores.

Fonte: A autora (2015).

A continuidade na construção da biblioteca se deu por uma purificação dos fragmentos visando preparar o DNA para a etapa de seleção de fragmentos de interesse e em seguida foi realizada a seleção de fragmentos que continham microssatélites.

Com os fragmentos selecionados procedeu-se uma pré-amplificação com o intuito de amplificar os fragmentos digeridos (que estavam previamente ligados a adaptadores) para gerar fragmentos de fita dupla em maior quantidade. O resultado foi lido através de um gel de agarose (Figura 8). De acordo com a Figura 8 constata-se que os fragmentos foram amplificados com sucesso, pois a amostra comportou-se como o esperado. Através do gel da Figura 8 foi possível visualizar um arraste entre 200 e 1200pb e verificou-se também que não houve a formação de bandas preferenciais.

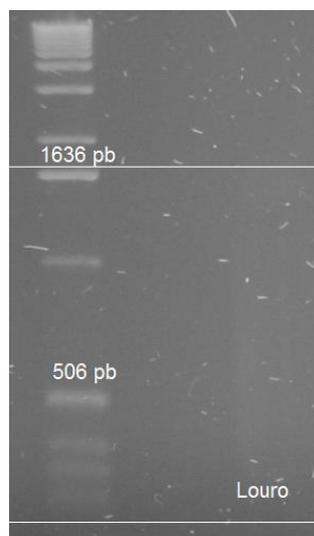


Figura 8 - Amplificação via PCR dos fragmentos selecionados enriquecidos de DNA de louro-pardo.

Fonte: A autora (2015).

Após ser realizada a transformação e as células serem incubadas, a confirmação da inserção dos fragmentos de DNA genômico de *Cordia trichotoma* no interior das bactérias foi feita por duas etapas distintas: a primeira baseada na presença do gene de resistência a ampicilina do plasmídeo pGEM-T, introduzido através da transformação. A ampicilina é um fator restritivo ao crescimento das bactérias que não contém o gene de resistência à mesma. Normalmente as bactérias não são resistentes ao antibiótico, ou seja, não crescem. Essa resistência é dada pelo plasmídeo introduzido através da transformação.

A segunda etapa, baseou-se na seleção pela coloração branco/azul (IPTG/X-GAL) das colônias de bactérias, somente bactérias com o vetor e sem o inserto continham o gene Lac-Z íntegro e funcional. Este gene é muito utilizado como gene repórter que produz uma enzima chamada β -galactosidase. A presença desta enzima faz com que a colônia da bactéria, portadora do plasmídeo contendo este gene, seja azul quando

colocada na presença dos compostos químicos isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indoil-b-D-galactosídeo (X-GAL). O IPTG induz a produção da enzima β -galactosidase que degrada o substrato X-GAL formando um produto colorido, de cor azul (LODISH, BERK e ZIPURSKI, 2000).

Foi possível verificar a transformação nos sítios de restrição, uma vez que os sítios de restrição das enzimas utilizadas para cortar esse tipo de plasmídeo se localizam exatamente na região onde encontra-se o gene que codifica a enzima β -galactosidase (Figura 9). Quando um fragmento exógeno de DNA é adicionado dentro deste plasmídeo, introduzindo-o nessa região, o gene que produz a enzima β -galactosidase é inutilizado. Sendo assim, as colônias de bactérias que possuíam o plasmídeo com este gene intacto em seu interior produziram colônias azuis, enquanto que as colônias de bactérias que possuíam o plasmídeo com o inserto, ou seja, o gene Lac-Z interrompido é incapaz de produzir a β -galactosidase, produziram colônias brancas (LODISH, BERK e ZIPURSKY, 2000).

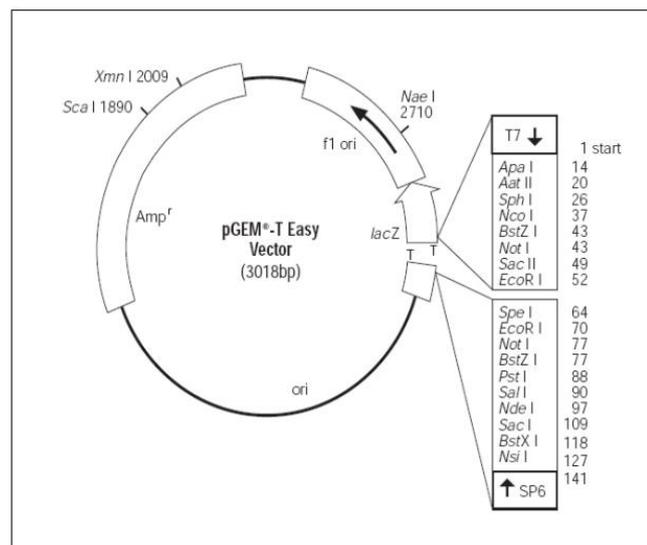


Figura 9. Esquema do vetor de clonagem pGEM . T Easy que possui múltiplos sítios de clonagem.

Amp^r: gene de resistência à ampicilina; ori: origem de replicação; lacZ: operon lac.

Fonte: PROMEGA.

A confirmação da transformação pode ser vista na Figura 10, mostrando o resultado da placa que foi incubada com 100 μ L de bactérias transformadas. Através dessa placa é possível visualizar que a transformação obteve sucesso, pois houve o crescimento de colônias brancas (transformadas com o vetor e com o inserto) e azuis (transformadas com o vetor sem o inserto).

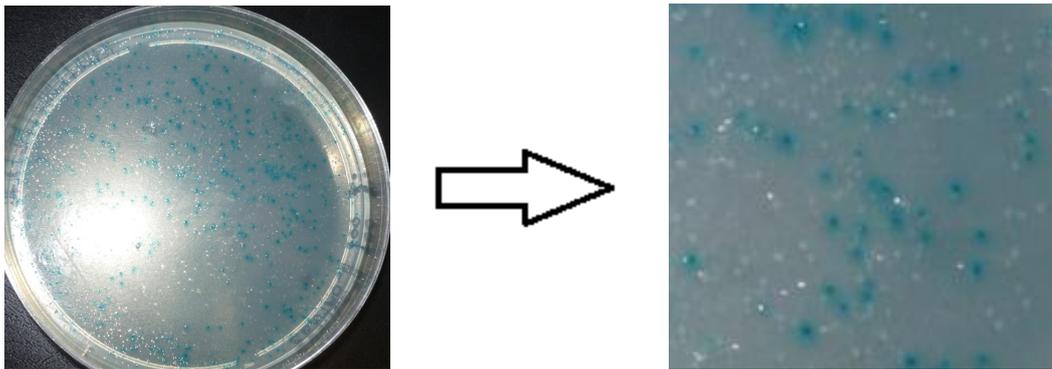


Figura 10 . (a) Colônias azuis e brancas resultado da transformação por eletroporação. As colônias que tiveram o gene da β -galactosidade interrompido apresentaram coloração branca (com o inserto) e as colônias que tiveram o gene intacto apresentaram coloração azul.

Fonte: A autora (2015).

(b) ampliação de uma parte da placa mostrando melhor as colônias formadas.

Diversas colônias brancas e azuis cresceram pela placa, a seleção dos transformantes foi realizada pela capacidade de crescer em presença do antibiótico ampicilina e através da coloração branca de algumas colônias transformantes indicativa da presença do inserto dentro da região codificadora da enzima β -galactosidase. Na etapa seguinte foi realizada a manutenção dos clones (colônias brancas) (Figura 11) visando garantir que cada construção (vetor + fragmento) fosse mantida em condições apropriadas para análises posteriores (sequenciamento).

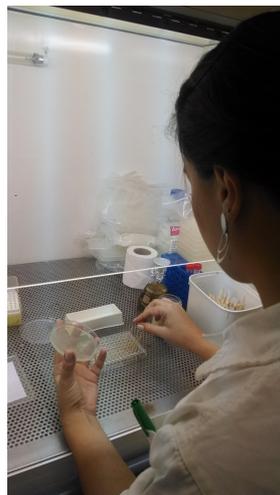


Figura 11 . Manutenção dos clones de *E. coli* em microplaca com vetor pGEM com o inserto de DNA de louro-pardo enriquecido com regiões de microssatélites.

Fonte: A autora (2015).

A manutenção dos clones é a biblioteca propriamente dita, as colônias brancas foram replicadas para uma microplaca com fundo U de 96 poços contendo meio de

cultura e incubadas em *shaker* a 50 RPM e a 37 °C para crescerem. A placa continha 94 colônias brancas, dispostas em 12 colunas (numeradas de 01 a 12) por 8 fileiras (classificadas de A a H). Os últimos poços H11 e H12 contiveram uma colônia azul e um palito sem colônia. Esses serviram como controle da placa e foram discriminados em uma etiqueta.

Após verificar o crescimento das colônias a placa (Figura 12) foi transferida para freezer . 20 °C e após alguns minutos armazenadas no para freezer - 80 °C.



Figura 12 . Biblioteca genômica enriquecida com marcadores microssatélites de louro-pardo pronta.

Fonte: A autora (2015).

Bajay (2014) empregou metodologia similar à deste trabalho para construção de biblioteca de microssatélites da espécie *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr (Pau-jacaré). A partir da biblioteca genômica construída, o autor obteve sequências de boa qualidade a partir de 84 colônias, sendo que em 37 delas não foram encontrados microssatélites, ele identificou, portanto 54 microssatélites. Ainda, a partir da biblioteca genômica gerada, Bajay (2014) sintetizou 28 pares de primers que utilizou para analisar quatro populações de *P. gonoacantha*, ao final, o autor pode constatar pelas análises realizadas um polimorfismo moderado nas populações estudadas. Deste modo, o autor aponta para a necessidade de conservação dos remanescentes florestais para preservar a diversidade genética e também a necessidade de um enriquecimento genético nas áreas em processo de restauração para aumentar as probabilidades de sobrevivência a longo prazo dessas populações. Assim como no trabalho de Bajay (2014), trabalhos futuros com o louro-pardo utilizarão a biblioteca para construção de primers espécie-específicos para verificar o polimorfismo e estudar como está a diversidade genética de populações remanescentes desta espécie.

Ramos (2014) também aplicou metodologia semelhante para construção de biblioteca genômica utilizando marcadores microssatélites, ele estudou uma espécie de palmeira típica da Amazônia e o objetivo do seu trabalho foi manejo e conservação da

espécie. Esse autor não teve dificuldades na obtenção da biblioteca sendo que análises posteriores, como sequenciamento, foram realizadas com êxito.

Sigrist (2009) fez construção de bibliotecas enriquecidas em microssatélites para açafraão (*Curcuma longa* L.) a fim de analisar divergência genética. O objetivo de Sigrist (2009), assim como de Ramos (2014), também foi contribuir com conservação e uso dos recursos genéticos disponíveis para a espécie de estudo. Esse autor construiu sua biblioteca de microssatélites de maneira muito similar a desenvolvida nesse trabalho, contou-se que ele teve sucesso nessa construção assim como em análises de sequenciamento.

Moraes *et al.* (2013) construíram uma biblioteca genômica para marcadores microssatélites e utilizaram metodologia semelhante a este trabalho. Os autores estudaram *Manikara multifida* que, assim como louro-pardo, é uma árvore endêmica remanescente típica de regiões da mata Atlântica. Como não havia informação genética a respeito dessa árvore, desenvolveu-se a biblioteca visando fornecer recursos para estudos futuros visando a conservação dessa espécie. Moraes e colaboradores detectaram 67 regiões que continham microssatélites, um total de 14 pares de ~~primers~~ primers foram desenhados e testados e foram identificados oito locos polimórficos que indicaram um alto grau de polimorfismo. Segundo os autores, os microssatélites são uma ferramenta poderosa para estudos de paternidade e para análise de identidade. Eles concluem que os locos identificados tem grande potencial para serem usados em estudos genéticos que visem a conservação de *M. multifida*.

Oliveira e colaboradores (2012) estudaram *Plathymenia reticulata* Benth. uma espécie de árvore típica da mata Atlântica e Cerrado que compartilha algumas características com o louro-pardo: madeira de alta qualidade e grande potencial de regeneração, porém devido a extração irregular de sua madeira essa leguminosa está perdendo seu habitat e está vulnerável à extinção. Visando auxiliar nos modelos de gestão e conservação dessa espécie, bem como estudar a estrutura genética e o potencial evolutivo das populações remanescentes, foi desenvolvido uma biblioteca genômica com marcadores microssatélites para *P. reticulata*. Das 96 sequências que Oliveira e colaboradores (2012) obtiveram, 42 continham microssatélites e destas, 27 continham características adequadas para o desenho de primers. Amostras de espécies adultas de populações de duas unidades de conservação foram usadas e através delas foi possível caracterizar 11 marcadores microssatélites em *P. reticulata*. O estudo de Oliveira *et al.* (2012) descreveu os primeiros marcadores microssatélites para espécies de *P. reticulata*. Os autores concluem que esses marcadores polimórficos podem ser usados

como ferramentas para responder questões ecológicas e evolutivas além de facilitar pesquisas e desenvolvimento de estratégias de conservação para espécies da mata Atlântica.

Rymer *et al.* (2013) publicaram um trabalho recente com marcadores envolvendo uma espécie do mesmo gênero do louro-pardo: *Cordia alliodora* (louro-amarelo). Essa espécie está presente na África, Ásia e Oceania, porém está fortemente centrada na região neotropical com maior diversidade de espécies na América do Sul, assim como o louro-pardo, sua madeira é de grande qualidade e possui características em comum como facilidade de regeneração, crescimento vigoroso de mudas, tendência pioneira, entre outras. Os autores utilizaram os microssatélites como ferramenta para avaliar a biogeografia do louro-amarelo. Rymer *et al.* (2013) relataram, através das várias linhas de evidências biogeográficas, que as espécies pertencentes a América do Sul possuem a maior diversidade e variação na morfologia de corte. Os autores também discutem que estudos morfológicos e de filogenia molecular apontam que louro-amarelo e louro-pardo são espécies irmãs, além disso, detectaram uma grande variação genética nas espécies encontradas na América do Sul. Com base nos dados obtidos os autores a creditam que *C. alliodora* expandiu-se para a América Central a partir de uma origem sul-americana.

Um trabalho semelhante envolvendo a espécie *Cordia africana* Lam. utilizou marcadores microssatélites. Neste trabalho, Derero, Gailing e Finkeldey (2011) obtiveram resultados importantes na determinação da variação genética em populações dessa espécie típica da Etiópia. Assim como louro-pardo *Cordia africana* Lam. também apresenta rápido crescimento e madeira de alta qualidade, além de melhorar a fertilidade do solo e ser importante como árvore de sombra em sistemas agroflorestais. Um total de 22 populações de espécies foi avaliado e observou-se os níveis de variação genética dentro e entre as populações. O estudo concluiu que existe um fluxo de genes eficiente através do pólen e semente e é provável que esse seja o principal fator que contribui para a manutenção da diversidade genética das populações nas condições naturais e de devastação.

Figueira *et al.* (2010) realizaram um estudo envolvendo uma espécie do mesmo gênero *Cordia* conhecida popularmente como "erva-baleeira", esta espécie é conhecida na medicina popular por possuir propriedades farmacológicas. Os autores desenvolveram oito marcadores microssatélites que foram altamente polimórficos para avaliar a estrutura genética e diversidade de populações e coleções de germoplasma de *Cordia verbenacea*. Figueira *et al.* (2010) utilizaram a mesma metodologia usada nesse trabalho para obtenção da biblioteca genômica. Segundo os autores, os

pares de *primers* desenvolvidos através da biblioteca enriquecida em marcadores microssatélites foram muito úteis para avaliar o grau de diversidade genética e inferir processos evolutivos em populações naturais, e será utilizado para gerar informações para orientar programas de conservação e racional exploração de *C. verbenacea*.

6 CONCLUSÕES

A construção da biblioteca genômica de louro-pardo foi uma parte de um projeto desenvolvido e implantado pelo Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Florestas para estudos de diversidade biológica. Todas as etapas realizadas neste trabalho para obtenção da biblioteca enriquecida para locos microssatélites foram realizadas com êxito. As próximas etapas consistirão em amplificar os insertos clonados através de PCR, inocular e extrair o DNA plasmidial das colônias recombinantes para posterior sequenciamento dos clones obtidos a fim de se construir *primers* específicos para a espécie para que possam ser realizados estudos de genética de populações e estudos de conservação.

Esse estudo subsidiará a construção de outras bibliotecas genômicas de espécies florestais, pois se pretende implantar essa metodologia no laboratório de Biologia Molecular. Espera-se que em breve possam ser desenvolvidas outras bibliotecas de espécies florestais nativas e assim contribuir ainda mais com a preservação ambiental. Desta forma, além da construção da biblioteca genômica enriquecida com marcadores microssatélites de *Cordia trichotoma* (louro-pardo), o desenvolvimento deste projeto também refletiu no aprimoramento destas técnicas, formando recursos humanos altamente capacitados para o desenvolvimento de bibliotecas genômicas.

7 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, Heidelberg, n.27, p.617-631, 2008.
- BAJAY, M. M. Diversidade e Estrutura Genética de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. em áreas em processo de restauração florestal e remanescentes de Mata Atlântica. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2014.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. Marcadores moleculares. Viçosa: Editora UFV, 374 p., 2009.
- BORÉM, A.; NETO, R. F. Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas. Visconde do Rio Branco: Suprema, 336 p., 2013.
- CARVALHO, P. E. R. Louro-pardo. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, n. 17, p. 63-66, 1988.
- CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 2, 628 p., 2006.
- CARVALHO, P. E. R. Louro Pardo. *Circular Técnica*, 66. Embrapa Florestas, 2002.
- CIAMPI, A.Y.; VINSON, C.C.; GAIOTTO, F.A. Estimativa da diversidade genética em arbóreas nativas tropicais utilizando microssatélites. *Recursos Genéticos Vegetais*. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 421-440, 2007.
- COLLEVATTI, R. G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J. D. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. *Tree Genetics & Genomes*, v.6, p. 555-564, 2010.
- DERERO, A.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. Maintenance of genetic diversity in *Cordia africana* Lam., a declining forest tree species in Ethiopia. *Tree Genetics & Genomes* 7:1-9, 2011.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS, F. B. Biotecnologia estado da arte e aplicações na agropecuária. Embrapa Cerrados, 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa Cenargen, 1995.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p., 1998.

FERREIRA, M.E.; MORETZSOHN, M.C.; BUSO, G.S.C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (ed.). Recursos Genéticos Vegetais. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 377- 420, 2007.

FIGUEIRA, G. M.; RISTERUCCI, A. M.; ZUCCHI, M. I.; CAVALLARI, M. M.; NOYER, J. L. Development and characterisation of microsatellite markers for *Cordia verbenacea* (Boraginaceae), an important medicinal species from the Brazilian coast. Conservation genetics v.11:1127-1129, 2010.

Figura do esquema do vetor de clonagem pGEM . T Easy. Disponível em: <<http://www.promega.com>>. Acesso em: 14.05.15.

FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. Biological Conservation, v. 143, p. 1919-1927, 2010.

Foto árvore de louro-pardo. Disponível em:<<http://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/10568-2/>>. Acesso em: 06.03.15.

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, v.133, p.163-185, 2000.

KASHYAP, V. K., GUHA, S.; SITALAXIMI, T.; BINDU, G. H.; HASNAIN, S. E.; TRIVED, R. Genetic structure of indian populations based on fifteen autosomal microsatellite locos. BMC Genetics, Austin, v.49, p. 1-28, 2006.

KOCHER, T. D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the

National Academy of Sciences of the USA, v.86, 6196-6200, 1989.

LODISH, H.; BERK A.; ZIPURSKY, S.L. Molecular Cell Biology, 4th edn. New York: WH Freeman, 2000.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed. São Paulo: Editora Plantarum, 368p., 1998.

MENDONÇA, E. A. F.; RAMOS, N. P.; PAULA, R. C. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (louro. pardo) pelo teste de tetrazólio. Revista Brasileira de Sementes, v.23, n 2, p.64-71, 2001.

MENEZES, J. E.; LEMOS, R. L. G.; SILVEIRA, E.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L. Trichotomol, a new Cadinenediol from *Cordia thricotoma*. J. Braz. Chem. Soc. v. 12, n. 6, 787-790, 2001.

MORAES, R. C. S.; VIVAS, C. V.; OLIVEIRA, F. A.; MENEZES, I. P. P.; VAN DEN BERG, C.; Gaiotto, F. A.. Microsatellite markers for an endemic Atlantic forest tree, *Manilkara multifida* (Sapotaceae). AOB Plants, v. 5, 2013.

NASS, L. L. Recursos genéticos vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 858p., 2007.

NUCCI, S. M. Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de população de macaúba. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) . Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2007.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetic and Molecular Biology, v.29, n.2, 294-307, 2006.

OLIVEIRA, F.A.; TARAZI, R. MENEZES, I. P. P.; VAN DEN BERG, C.; TSAI, S. M.; GAIOTTO, F. A. Microsatellite markers for *Plathymenia reticulata* (Leguminosae). American Journal of Botany. v.99, 2012.

RAFALSKI, J.A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE C.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B., LAI, E. (eds.). Analysis of

- non-mamalian genomes . a practical guide. Academic Press, New York, pp 75 -134, 1996.
- RAMOS, S. L. F. Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de tucumã-do-Amazonas por meio de microssatélites visando o manejo e conservação da espécie. Tese, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, 2014.
- REITZ, R., KLEIN, R. M., REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 524p., 1983.
- RYMER, P. D.; DICK, C. W.; VENDRAMIN, G. G.; BUONAMICI, A.; BOSHIER, D. Recent phylogeographic structure in a widespread 'weedy' neotropical tree species, *Cordia alliodora* (Boraginaceae). *Journal of Biogeography*, 40, 693-706, 2013.
- RIZZINI, C. T. Árvores e madeiras úteis do Brasil. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 304 p., 1978.
- SALLES, G.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. Circular Técnica 20, Brasília, 2003.
- SANTOS, F. L.; Avaliação da Diversidade Genética em *Eucalyptus ssp.* por meio de marcadores moleculares e métodos quantitativos. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual de Santa Cruz . BA, 2012.
- SIGRIST, M. S. Divergência genética em *Curcuma longa* L. utilizando marcadores microssatélites e agromorfológicos. Dissertação de mestrado . Instituto Agronômico de Campinas, 2009.
- SOUZA, A. P.; ZUCCHI, M. I.; VINCENTZ, M. Microssatélites para Estudos Genéticos de Eucariotos. CBMEG/UNICAMP, Campinas, SP, 2014.
- VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, v. 23, 2005.
- WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G. & TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics.*, v.88, p. 1-6, 1994.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16, 2002.