



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76  
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

## XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2020

### TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATELITES PARA *Cattleya pfisteri* (Orchidaceae)

**André Pinto Lima<sup>1</sup>; Cassio van den Berg**<sup>2</sup>; **Maryelle Vanilla de Abreu Cerqueira**<sup>3</sup>

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: andre8fs@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: vcassio@uefs.br
3. Bolsista Fapesb, Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: maryellevanilla@gmail.com

**PALAVRAS-CHAVE:** SSR, Diversidade Genética, *Primers*.

### INTRODUÇÃO

No Brasil existem em torno de 2500 espécies de Orchidaceae (Pabst & Dungs 1975, 1977), sendo que no estado da Bahia são citadas 533 espécies (Flora do Brasil, 2020). Dentre estas espécies o gênero *Cattleya* contém espécies encontradas majoritariamente no Brasil. *Cattleya pfisteri* (Pabst & Senghas) Van den Berg está incluída na série *Parviflorae*, tendo sido descrita pela primeira vez por Pabst em 1975, sendo endêmica da Chapada Diamantina – BA, Brasil.

As ferramentas moleculares como os marcadores de microssatélites são bastante utilizadas para conhecer a variabilidade genética existente nas espécies ou nas populações dentro das espécies, pois estas ferramentas são aptas para diferir e caracterizar geneticamente os indivíduos, e bastante úteis sem estudos de genética de populações. (Ribeiro *et al.*, 2013; Collevatti *et al.*, 2013; Telles *et al.*, 2013). Marcadores *SSR* - *Simple Sequence Repeat* (Litt & Luty, 1989) são construídos com o uso de *primers* que flanqueiam regiões contendo os microssatélites.

Os marcadores de microssatélites que foram criados para uma determinada espécie podem ser transferidos para espécies próximas filogeneticamente. Espécies mais próximas possuem uma melhor taxa de transferibilidade (Varshnery *et al.*, 2005; Barbará *et al.*, 2007). A transferibilidade pode ser testada em testes de amplificação de DNA via a reação em cadeia de polimerase (PCR), onde se otimizam diferentes temperaturas de anelamento dos *primers* e concentrações dos reagentes usados na amplificação, até a obtenção de ampliações de bom nível. Os *primers* com resultados positivos para amplificação precisam então ser avaliados para polimorfismo.

Até o presente momento ainda não estão disponíveis marcadores microssatélites para *Cattleya pfisteri*. Leles (2013), obtiveram a transferencia de sete marcadores microssatélites transferidos de *C. coccinea* Lindl. para *Cattleya liliputana* (Pabst) Van den Berg, que pertence à mesma série de *C. pfisteri*.

Com base nisso, no presente estudo foi testado o potencial de transferibilidade de marcadores microssatélites de outras espécies de *Cattleya* para *Cattleya pfisteri*, com o

intuito de permitir o seu uso para futuros estudos genéticos-populacionais com esta espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas quatro populações de *Cattleya pfisteri*, que já se encontravam extraídas e armazenadas a -80°C no banco de DNA do laboratório de sistemática molecular vegetal (LAMOL) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

Para a obtenção dos dados moleculares foram utilizados DNA de quatro indivíduos (uma amostra de cada população) para testar os *primers* existentes no LAMOL. anteriormente desenvolvidos para *Cattleya labiata* Lindl. e *C. Warneri* T.Moore (Almeida *et al.*, 2013), e outros da literatura para *C. coccinea* (Novello *et al.*, 2013) totalizando 32 *primers* testados.

A amplificação dos fragmentos de DNA foi feita utilizando termociclador *Swift MaxPro Thermal Cycler*®, fazendo diferentes testes de temperaturas de anelamento dos *primers*. O ajuste da temperatura de anelamento dos locos foi realizado com o aumento ou diminuição da temperatura, até que as visualizações das bandas no gel apresentassem a melhor resolução possível. A receita das reações totalizando 10 µL foi a seguinte: 5 µL de Top Taq Master Mix (*Qiagen Inc., Hilden, Germany*), 2,35 µL de água ultra pura, 2 µL TBT (trealose, albumina de soro bovino), 0,13 µL de de *primer* forward, 0,26 µL de *primer* reverse e 0,26 µL de M13. O sucesso das amplificações foi avaliado em eletroforese em gel de agarose a 1,0%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para as otimizações dos testes de transferabilidade foram realizadas no total de 110 reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Os locos de microssatélites amplificados tiveram uma variação de temperatura de anelamento entre 51°C a 58°C, com uma variação em tamanho de pares de bases (pb) dos produtos amplificados desde 110pb até 293 pb.

Dentre os 32 locos de microssatélites testados, 19 *primers* (59,37%) produziram um bom padrão de bandas, seis (18,75%) não amplificaram e sete (21,87%) apresentaram um padrão inespecíficos das bandas (Figura 1).

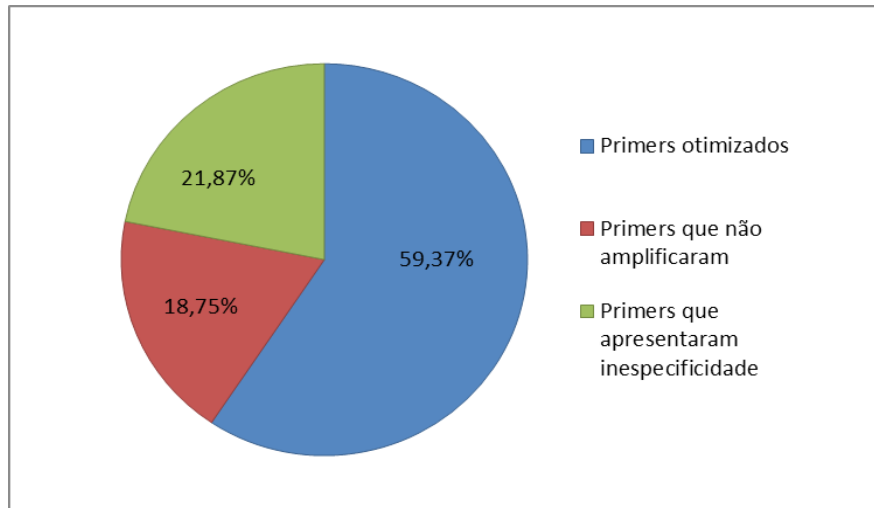


Figura 1. Porcentagem de locos de microssatélites com bom padrão de amplificação, locos que apresenta inespecificidade de amplificação e não amplificados para *Cattleya pfisteri* avaliados em gel de agarose a 1,2%.

Já quando se analisaram os *primers* amplificados por outros autores observamos uma porcentagem de 77,77%, sete *primers* de nove desenvolvidos por Novello *et al.* 2013 e 61,90%, 13 de 21 *primers* desenvolvidos por Almeida *et al.* (2013). Os *primers* desenvolvidos por Leal *et al.* (2013), a partir da biblioteca enriquecida de *C. coccinea* não apresentaram amplificação para *C. pfisteri*.

Do total de 19 *primers* transferidos, quatro se mostraram mais promissores e se distinguiram dos demais apresentando maior uniformidade e qualidade das bandas. O loco Cac16 (Novello *et al.* 2013), e os locos Cl\_26\_12, Cl\_31\_2 e Cw\_35\_29 (Almeida *et al.*, 2013) foram os que apresentaram as melhores uniformidades.

O potencial de transferabilidade dos marcadores é maior quando há um grau de parentesco genético entre as espécies analisadas. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a taxa de transferabilidade entre as espécies de *Cattleya* testadas foi de quase 60%, o que pode ser considerado um valor elevado, porém esperado por se tratarem de espécies filogeneticamente próximas. Segundo Barbará *et al.* (2007), as taxas de transferabilidade entre as monocotiledôneas é cerca de 40%, indicando que no presente trabalho a taxa de sucesso foi bem superior. Segundo Kalia *et al.*, (2011), quanto mais próximas filogeneticamente são as espécies existe uma maior chance de transferabilidade, pela existência de regiões do genoma onde podem estar conservados os *primers* flanqueadores dos SSR. Barbará *et al.*(2007), em seu trabalho de revisão de literatura sobre marcadores de microssatélites também ressaltou que quanto maior o parentesco entre as espécies maiores são as chances de haver transferabilidade e conservação de sequências dos *primers*.

No trabalho de Almeida *et al.* (2013), com espécies *Cattleya labiata* e *C. warneri* T. Moore ele concluiu que estes marcadores tem um grande potencial para estudos de diversidade genética para espécies deste gênero No presente trabalho, existe um grande potencial de transferabilidade destes locos já que obtivemos amplificação satisfatória para um grande número de locos, mesmo que 50% deles apenas venha a apresentar

polimorfismo, ainda teria grande valor para estudos de genética de populações para esta espécie estudada.

Já no trabalho de Novello *et al.* (2013), os marcadores desenvolvidos para *C. coccinea* foram testados em outras espécies de orquídeas utilizando três espécies de *Cattleya* e *Gomesa longipes*, *Prosthechea vespa*, *Brasiliorchis gracilis* e *Epidendrum secundum*. Os autores obtiveram boas taxas de amplificação cruzada destas espécies de diferentes gêneros e até subtribos, resultando uma amplificação média de 59,25% dos *primers* utilizados. No nosso trabalho presente resultou em um valor superior de 77,77% de *primers* amplificados. O valor superior é esperado, já que foram utilizados *primers* previamente desenvolvidos para espécies do mesmo gênero.

Os resultados obtidos até o presente estágio do trabalho são bastante promissores, indicando a economia de tempo e recursos para o desenvolvimento de marcadores SSR específicos para a espécie-alvo. A avaliação completa da transferabilidade não foi feita conforme o plano original, uma vez que no período de abril a julho de 2020 não foi possível a execução de trabalho presencial no laboratório para avaliação do polimorfismo, e apenas análise dos dados levantados até março. Além disso, o equipamento necessário para genotipar às reações de PCR estava inoperante, e não houve possibilidade de conserto do mesmo por falta de recursos de contrapartida da UEFS nos projetos em que este trabalho se insere. Mesmo assim, se tomarmos uma taxa média de 50-60% dos locos com polimorfismo, deverá ser possível retirar um painel de 9-11 locos de microssatélites, a partir dos 19 que amplificam.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os locos Cac16, Cl\_26\_12, Cl\_31\_2 e Cw\_35\_29, apresentaram os melhores padrões de amplificação. Houve sucesso na amplificação de 19 marcadores microssatélites das espécies do gênero *Cattleya*, previamente desenhadas para *C. coccinea*, *C. labiata* Lindl. e *C. warneri* para *C. pfisteri*, assim indicando que as sequências flanqueadas de microssatélites estudadas são suficientemente conservadas entre as espécies para permitir amplificação.

Esses loci têm, portanto, um excelente potencial para serem utilizados em estudos genéticos de *Cattleya pfisteri* visando à conservação desta espécie e estudos voltados para genética de populações ou melhoramento genético. A análise de polimorfismo terá que ser realizada posteriormente para permitir o uso de parte desses 19 *primers* para construir um painel para genotipar a espécie para estudos de genética de populações e conservação.

E este trabalho mostra que a uma grande viabilidade na transferabilidade de *primers*, tendo em vista a otimização destes marcadores.

### **REFERÊNCIAS**

- ALMEIDA, P. R. M.; ROBERTS, M. C. L.; VIGINA, N. B. Z.; SOUZA, A. P.; NETO, A. G.; van den BERG, C. Microsatellite markers for the endangered orchids *Cattleya labiata* Lindl. and *C. warneri* T. Moore (Orchidaceae). Conservation Genet Resour, v. 5, n 3 p 791-794, 2013.
- BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M.; BERED, F.; FAY, M.F.; LEXER, C.; Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. Molecular Ecology, v.16, n,18, p.3759-3767, 2007.
- Cattleya* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11329>>. Acesso em: 26 Mar. 2019.
- COLLEVATTI, R. G.; TELES, M. P. C.; NABOUT, J. C.; CHAVES, L. J.; SOARES, T. N. Demographic history and the low genetic diversity in *Dipteryx alata* (Fabaceae) from Brazilian

Neotropical savanas. *Heredity*, v. 111, p. 97-105, 2013.

KALIA, R. J.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, v. 177, p. 309–334, 2011.

LELES, B. P. Estrutura genética, variabilidade morfológica e investimento reprodutivo de *Cattleya liliputiana* (*Orchidaceae: Laeliinae*), endêmica do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

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*, v. 44, p. 397-401, 1989.

PABST, G.F.J., DUNGS F. Brucke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim, Alemanha. *Orchidaceae Brasiliensis*, v.1 p 408, 1975.

PABST, G.F.J., DUNGS, F. Brucke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim, Alemanha. *Orchidaceae Brasiliensis*, V. 2, p. 418, 1977.

RIBEIRO, F. E.; BAUDOUIN, L.; LEBRUN, P.; CHAVES, L. J.; BRONDANI, C.; Costa, E. F. N.; Vencovsky, R. Genetic diversity in Brazilian tall coconut populations by microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 13, p 356-362, 2013.

TELLES, M. P. C.; LIMA, J. S.; RESENDE, L. V.; VIANELLO, R. P.; CHAVES, L. J.; SOARES, T. N.; COLLEVANTTI, R. G. Development and characterization of new microsatellites for *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). *Genetics and Molecular Research*, v. 12, p3124-3127, 2013.

VARSHNEY, R.; GRANER, K. A.; SORELLES, O M. E.; Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology*, v. 23, p. 48-55, 2005.