



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76

Redeclamação pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



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

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

TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *CATTLEYA LUETZELBURGII*

Maryelle Vanilla de Abreu Cerqueira¹; Cassio van den Berg²; André Pinto Lima³

1. Bolsista FAPESB, Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

maryellevanilla@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: vcassio@gmail.com

3. Usuário do Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: andre8fs@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Chapada Diamantina; Marcadores Microsatélites; Diversidade genética

INTRODUÇÃO

Cattleya Lindl. é um gênero Neotropical com aproximadamente 114 espécies (Van den Berg, 2014), sendo um dos mais importantes da família *Orchidaceae* devido ao elevado valor ornamental. Entre suas divisões, *Cattleya* series *Parviflorae* (Lindley) Van den Berg apresenta-se como a maior série contida no gênero, possuindo 47 espécies (Van den Berg, 2014), em maioria rupícolas e semelhantes entre si. Destas, *C. luetzelburgii* Van den Berg. é a única espécie do gênero com flores de tonalidade amarela encontrada na Chapada Diamantina, local que tem sido considerado um grande centro de diversidade e endemismo de orquídeas (Silva, 2008).

Pouco se conhece sobre a diversidade genética das populações de *C. luetzelburgii*, fato que pode ser verificado no herbário e em campo. Pesquisas moleculares podem gerar informações valiosas quanto a taxonomia, ecologia e evolução da espécie de interesse. Entre os estudos de genética populacional, os marcadores microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), são ferramentas muito utilizadas para conhecimento da variabilidade genética das espécies por conter elevada taxa mutacional e polimorfismo alélico, que pode ser detectado através de diferenças no número de repetições (Santana, 2014).

Segundo Santana (2014), os microsatélites também são potencialmente transferíveis para espécies filogeneticamente próximas, assim apresentando-se como uma alternativa econômica e rápida. Em estudos realizados por Almeida *et al.* (2013), utilizando microsatélites para *Cattleya labiata* Lindl. e *C. warneri* T. Moore, foram caracterizados 21 marcadores. Os autores sugerem que estes são potencialmente úteis para estudos de diversidade genética para outras espécies do mesmo gênero. Além disso, Novello *et al.* (2013), desenvolveram nove pares de *primers* para caracterização de populações naturais de *Cattleya coccinea* Lindl., sendo parte destes utilizados por Leles (2013), que obteve ampla transferibilidade para *C. liliputana* (Pabst) Van den Berg, espécie também contida na série *Parviflorae*.

Diante do potencial informativo e econômico, a transferabilidade de marcadores microssatélites apresenta-se como um método viável e eficaz para o estudo de genética de populações. Desta forma, este trabalho possui como objetivo transferir locos de microssatélites de outras espécies de *Cattleya* para *Cattleya luetzelburgii*, assim contribuindo com as pesquisas da flora da Chapada Diamantina, já em desenvolvimento na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram realizadas no Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas (LAMOL), pertencente à Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Foram utilizadas amostras de duas populações de *C. luetzelburgii* disponíveis no banco de DNA do LAMOL.

Para as análises moleculares, foram testados 32 locos de SSR através de Reações em cadeia da polimerase (PCRs), com volume final de 10 µL por reação, contendo 1 µL de DNA, 5 Ml da enzima Taq Polimerase, 2 µL de aditivo TBT, 0,13 µL de *primer forward*, 0,13 µL de calda M13, 0,26 µL de *primer reverso* e completando-se o valor com água ultra purificada.

Foram realizadas otimizações nos protocolos de PCR existentes, já testados por outros usuários do LAMOL, para detectar a temperatura ideal (Ta) de amplificação, realizando-se testes para cada um dos locos utilizados, que foram os mesmos empregados por Novello *et al.* (2013), Leal *et al.* (2013) e Almeida *et al.* (2013). O sucesso das amplificações foi visualizado em gel de agarose a 1,2%.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Foi realizado um total de 110 PCRs para otimizações de protocolos existentes, havendo variações nas temperaturas de anelamento, que foram de 51 a 55 °C. A extensão dos locos amplificados foi de 110 a 300 pares de base (pb), com diferentes arranjos de nucleotídeos nos motivos de repetição.

Dos 32 pares de *primers* de *Cattleya* avaliados quanto ao potencial de amplificação, 22 apresentaram um bom padrão de bandas e dez não amplificaram ou foram inespecíficos em gel de agarose 1,2%. Desta forma, houve aproximadamente 69% de transferabilidade entre os locos testados.

Entre os 22 locos que apresentaram amplificação satisfatória, 16 foram os mesmos utilizados por Almeida *et al.* (2013) e seis por Novello *et al.* (2013). Os primers desenvolvidos por Leal *et al.* (2013) não amplificaram para *C. luetzelburgii*.

Tabela 1. Características dos marcadores microssatélites com potencial de transferência para *Cattleya luetzelburgii*, contendo tamanho (pb), sequência, repetição e Ta (temperatura de anelamento).

Marcador	Tamanho	Repetição	Ta (°C)
Cac02*	173	(AG)18	54
Cac08*	186	(CA)10	54
Cac09*	179	(AG)8	54
Cac10*	184	(TG)9	54
Cac11*	167	(AG)8	53
Cac18*	224	(GA)11N (AG)26	TD
Cl_31_1**	249	(GA)7(AG)3	54
Cl_49_19**	188	(CT)15(TCC)4	53
Cl_47_38**	180	(GA)4GT(GA4)	53
Cl_47_19**	150	(CT)9CGCA(CT)3	54
Cl_p_15_36**	300	(CTTTTT)2 (AGG)2(GA)4	55
Cl_p_15_28**	261	TA)4(CT)23 (TC)4(TG)4	52
Cl_31_7**	179	(TC)3T(TC)4	54
Cl_47_4**	233	(AT)5g(AT)3	52
^a Cw_35_28**	233	(AAAAAT)4(AAAAG)4(GA)4	51
Cl_49_27**	254	(TA)8(TC)20	54
Cl_46_3**	265	(TTTTA)4(GT)4	54
Cl_p_15_45**	141	(AG)8	52
Cl_31_2**	166	(AG)5	53
Cw_35_24**	182	(AATT)4(AT)4	52
Cw_35_29**	293	(TTTA)5	54
Cl_26_12**	110	(TC)3(AC)8	52

* Novello *et al.* (2013) ** Almeida *et al.* (2013) TD= Programa Touchdown

Entre os 22 pares de *primers* transferidos, cinco destacaram-se como mais promissores, com bandas uniformes e intensas: Cl_p_15_36, Cw_35_28, Cl_31_2, Cw_35_29 e Cl_26_12. Estes locos foram utilizados por Almeida *et al.* (2013), desenvolvidos para *C. labiata* e *C. warneri*. Dos 21 *primers* de Almeida testados em *C. luetzelburgii*, 16 foram amplificados, representando uma transferabilidade de 76%, mostrando-se muito promissores. Almeida *et al.* (2013), afirmam que os marcadores SSRs para *Cattleya* representam uma ferramenta eficaz para estudos futuros em diversidade genética, estrutura populacional e identificação de híbridos. Além disso, há um grande potencial de amplificação e polimorfismo nos *primers* testados.

Os pares Cac08, Cac09, Cac11, Cac18, Cl_31_1, Cl_49_19, Cl_47_38, Cl_p_15_28, Cl_31_7, Cl_49_27e Cl_46_3 também apresentaram boa amplificação, com bandas uniformes e de intensidade razoável. Já os locos Cac02, Cac10, Cl_47_19, Cl_47_4, Cl_p_15_45 e Cw_35_24 amplificaram com bandas menos intensas.

Dos nove *primers* utilizados por Novello *et al.* (2013), em *C. coccinea*, seis foram amplificados para *C. luetzelburgii*, apresentando 66,6% de transferabilidade. Este valor foi um pouco acima dos resultados obtidos pelos autores, 59,25 %. Além disso, Novello *et al.*

(2013), também constataram que oito dos nove locos utilizados apresentaram amplificação cruzada positiva para a maior parte das plantas testadas.

Novello *et al.* (2013), não conseguiram amplificar o loco Cac09 em nenhum dos táxons adicionais testados, porém, nos testes realizados para o presente trabalho, houve transferibilidade para a espécie estudada. O loco apresentou bandas uniformes e de intensidade razoável.

C. coccinea pertence à série *Sophronitis* e está relacionada com *Parviflorae* (a qual inclui *C. luetzelburgii*), no subgênero *Cattleya* (Van de Berg, 2014), o que pode explicar o sucesso da transferibilidade neste trabalho. Segundo Barbará *et al.* (2007), quanto maior o grau de parentesco entre as espécies, maior será o percentual de marcadores transferidos, devido à homologia do genoma. Além disso, as monocotiledôneas – como as orquídeas – apresentam percentual de amplificação médio de 40%. O quantitativo de transferibilidade entre espécies de gêneros diferentes possui média igual ou inferior a 10% (Barbará *et al.*, 2007).

Os locos Cac02, Cac11 e Cac18 (desenvolvidos para *C. coccinea*), também apresentaram transferibilidade para *C. liliputiana* (Leles *et al.*, 2013), que está inclusa na série *Parviflorae* (Van de Berg, 2014).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de transferibilidade de marcadores microssatélites de outras espécies de *Cattleya* para *C. luetzelburgii* foram bastante promissores, apresentando bons percentuais de amplificação.

O presente estudo confirma a viabilidade do método, tendo em vista a economia de tempo e recursos financeiros e humanos para o desenvolvimento destes marcadores. Além disso, apresentou resultados que podem ser utilizados para o desenvolvimento de pesquisas referentes à flora neotropical do Nordeste brasileiro.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. R. M.; ROBERTS, M. C. L.; VIGNA, B. B. Z.; SOUZA, A. P.; NETO, A. T. G.; Van den Berg, C. (2013). Microsatellite markers for the endangered orchids *Cattleya labiata* Lindl. and *C. warneri* T. Moore (*Orchidaceae*). **Conservation Genet Resour.** 5:791–794.
- BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, GECELE, M.; BERED, F., FAY, M.F.; LEXER, C. (2007). Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v.16, n,18, p.3759-3767, 2007.
- LELES, B. P. (2013). **Estrutura genética, variabilidade morfológica e investimento reprodutivo de *Cattleya liliputiana* (*Orchidaceae: Laeliinae*), endêmica do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil.** 75 f. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.
- NOVELLO, M.; RODRIGUES, J. F.; PINHEIRO, F.; OLIVEIRA, G. C. X.; VEASEY, E. A.; KOEHLER, S. (2013). Simple-sequence repeat markers of *Cattleya coccinea* (*Orchidaceae*), an endangered species of the Brazilian Atlantic Forest. **Genetics and Molecular Research** 12 (3): 3274–3278.
- SANTANA, A. R. (2014). **Transferibilidade e desenvolvimento de sistema multiplex de genotipagem de marcadores microssatélites para *Pterodon emarginatus* Vogel**

(*Fabaceae*). 62 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia molecular). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

SILVA. J. R. S. (2008). **Variabilidade populacional de *Cattleya pfisteri* (pabst & senhas) Van den Berg (*Orchidaceae*)**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2008.

Van den Berg, C. (2014). Reaching a compromise between conflicting nuclear and plastid phylogenetic trees: a new classification for the genus *Cattleya* (*Epidendreae*; *Epidendroideae*; *Orchidaceae*). **Magnolia Press**. 186 (2): 75–86.