

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *PHRAGMIPEDIUM SARGENTIANUM* ROLFE (ORCHIDACEAE)

Daniel Nascimento de Oliveira¹ & Cássio van den Berg²

1. Bolsista PROBIC, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: danielnascimento303@gmail.com

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

PALAVRAS-CHAVE: microssatélites, DNA, *Phragmipedium sargentianum*

INTRODUÇÃO

Orchidaceae apresenta cerca de 25 mil espécies com ocorrência em todo planeta exceto nos pólos, sua maior diversidade se encontra nas regiões neotropicais (Dressler, 1993). No Brasil, ocorrem 2419 espécies em 235 gêneros (Barros *et al.*, 2010). Destas, 67 foram classificadas recentemente como ameaçadas de extinção pela legislação federal, incluindo *Phragmipedium sargentianum* Rolfe. *Phragmipedium* pertence a subfamília Cyprripedioideae, e ocorre exclusivamente na América Tropical, contendo 25 espécies (sete no Brasil). Todas as espécies de Cyprripedioideae são fortemente procuradas por coletores de plantas nativas para o comércio ilegal de plantas, e por isso todas as espécies desta subfamília estão no Apêndice I da CITES (Convention for the International Trade of Endangered Species). Isso, aliado à forte pressão de perda de habitats florestais onde estas espécies ocorrem, resulta em que muitas espécies de *Phragmipedium* são hoje fortemente ameaçadas e têm populações reduzidas. *P. sargentianum* foi originalmente descrito de Pernambuco, e a maior parte da literatura registra esta espécie como restrita àquele Estado. Entretanto, em viagens de campo pela Bahia, foi encontrada a espécie em diversos locais, como, por exemplo, a Serra da Jibóia (Santa Terezinha-BA), e serras no sul da Bahia (Buerarema-BA, Arataca-BA) e na reserva da Michelin (Ituberá-BA). Por ser uma espécie de orquídeas da lista Brasileira de Flora ameaçada de extinção e estar no apêndice I do CITES, esta espécie foi incluída no projeto Núcleo de Excelência em Sistemática e Variabilidade Molecular de Plantas e Fungos como prioritária para o desenvolvimento de microssatélites.

Os microssatélites são marcadores alélicos de DNA muito úteis para avaliar a variabilidade genética de populações em geral e para delimitação de espécies proximamente relacionadas e de status duvidoso (Frankham *et al.*, 2003). Com o desenvolvimento das técnicas de manipulação do DNA, os microssatélites passaram a ser a ferramenta preferida a partir do final dos anos 80. Entretanto, para utilizar microssatélites, é necessário um processo de desenvolvimento de *primers* (iniciadores) para individualizar os locos para genotipagem. Como os locos estão presentes em regiões bastante variáveis do genoma, os microssatélites desenvolvidos só podem ser utilizados na espécie em questão ou espécies proximamente relacionadas. Existem poucos trabalhos desenvolvendo microssatélites em orquídeas (Cortés-Palomec *et al.*, 2008, Lombardo *et al.*, 2008, Pinheiro *et al.*, 2008), sobretudo considerando o tamanho da família.

No presente projeto, foi selecionada uma das espécies mais ameaçadas do Brasil, que tem ocorrência principal na Bahia, sobre a qual não existe qualquer estudo de genética populacional ou da conservação. O desenvolvimento de locos de microssatélites para *Phragmipedium sargentianum* gerará ferramentas moleculares que permitirão que posteriormente sejam feitos estudos de diversidade populacional, esclarecimento da delimitação taxonômica e estudos de genética da conservação com vistas ao manejo das populações ameaçadas desta espécie.

Esta pesquisa teve como objetivo desenvolver marcadores microssatélites polimórficos para a espécie *Phragmipedium sargentianum*, assim como coletar e extrair DNAs de uma população piloto de *P. sargentianum* para servir como piloto para o desenvolvimento de microssatélites nucleares e fazer uma biblioteca enriquecida em microssatélites utilizando métodos de digestão de DNA, enriquecimento de clonagem em *Escherichia coli*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Além dos diversos aparelhos eletrônicos pode-se contar com reagentes e produtos químicos usados em diversos procedimentos:

Na extração (protocolo Doyle & Doyle, 1987), usou-se CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), STE (Sódio-Tris-EDTA), o Clorofórmio/ Álcool Isoamílico 24:1, o Isopropanol e Álcool Etílico 70% e TE (Tris-EDTA). Na quantificação foi usada Agarose, Tampão SB20X 5%, Brometo de Etídio, corante Loading Buffer e marcador Ladder (100pb). Na obtenção de fragmentos (método ISSR) consumiu-se: tampão para microssatélites (5mM Tris-HCL (pH 9.1), 1,6 mM (NH₄)₂SO₄, 15µg/µL), Taq DNA polimerase, dNTPs (Desoxirribonucleotídeo Trifosfato), MgCl₂, *primers* (1,2,3,4,5,6) e H₂O (q.s.q).

Na purificação, utilizou-se Kit “Qiaquick PCR Purification Kit” da Qiagen que contém Tampão PB (Capture Buff Type 3), Tampão PE(Wash Buffer Type 1), Tampão EB (Elution Buffer Type 4) e Sódio 3M, pH 5. Na fase de clonagem foi utilizado: água MilliQ, Tampão 2x Rapid Ligation Buffer, MgCl₂, PEG 6000 (Polietilenoglicol), T4 DNA ligase e o plasmídeo pGEM-T ou pGEM-T easy. Na transformação usou-se células competentes de *Escherichia coli* como JM109, TOP10 e X-Blue, meio SOC, meio LB (Luria-Bertani), ampicilina, X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactopyranoside) e IPTG (isopropil-1-tio-β-D-galactosídeo). A manutenção dos clones que visa garantir que cada construção (vetor+fragmento) seja mantida em condições apropriadas para análise posterior, usou-se placas ELISA com fundo U esterilizados, meio 2YT-HMFM (pode-se usar meio LB) e palitos estéreis.

O próximo passo foi a amplificação dos incertos clonados, utilizando-se tampão 10X, MgCl₂, DNTPs, os *primers* T7 e SP6, betaína, BSA (Albumina de Sérica Bovina), Taq e H₂O (q.s.q). Após a amplificação dos incertos foi necessária uma limpeza do produto PCR para o posterior sequenciamento com PEG 20% (20% Polietilenoglicol 8000 / NaCl 2,5 M) e etanol 80%.

Em virtude da complexidade do estudo, este foi dividido em três fases: fase pré-laboratorial, campo e laboratorial. Na primeira fase houve uma apropriação do conhecimento relacionado ao trabalho através da compreensão de biologia molecular básica, estudos dos marcadores microssatélites, levantamento bibliográfico e por fim identificação e compreensão dos métodos e protocolos utilizados no laboratório o que subsidiou o treinamento realizado para ingressar na fase de laboratório. A terceira fase foi realizada no laboratório contando apenas com as amostras retiradas em campo, materiais de laboratório e os protocolos, sendo alguns deles adaptados para melhores resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Primeiro o DNA das amostras coletadas foi extraído utilizando o protocolo CTAB (Doyle & Doyle, 1987), em seguida foi realizada uma quantificação das amostras por eletroforese em gel de agarose, a análise garantiu a viabilidade das 24 amostras obtidas e então passou-se para a fase posterior. Foi efetuada uma PCR do DNA extraído para obtenção de fragmentos com o método ISSR onde as 24 amostras foram misturadas aos reagente da PCR e passaram pelo termociclador, os 24 produtos da PCR foram quantificados para

compreender qual *primer* (dentre os 6) obteve melhor resultado. Após perceber a homogeneidade das amostras e sua viabilidade confirmada elas foram misturadas num tubo e levadas para a fase de purificação por coluna onde o DNA se ligou a ela pela adição de tampões PB, PE e EB e levado ao freezer.

Na fase seguinte utilizou-se o protocolo da Promega adaptado, os fragmentos obtidos via PCR e limpos em coluna foram ligados ao vetor de clonagem para a fase de transformação, onde as células competentes de *Escherichia coli* (X-Blue, seguida de TOP10 e por último JM109 duas vezes) foram transformadas com o produto da clonagem para obter a amplificação do inserto, sendo que obteve resultado satisfatório apenas o último procedimento com JM109. Foi feita uma manutenção dos clones, onde 96 amostras foram guardadas para biblioteca em ultrafreezer garantindo que estas amostras estejam em condições apropriadas para análise posterior. Após garantir o armazenamento seguro destas colônias, passou-se para a amplificação dos insertos clonados, utilizando uma reação de PCR com os *primers* T7 e SP6. Foram realizadas 4 PCRs obtendo ao final 195 amostras que foram quantificadas e levadas para a fase de limpeza do produto da PCR (com PEG 20%), que é o último procedimento, e necessário para o posterior seqüenciamento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Objetivo geral ainda se encontra em andamento, necessita de maior tempo de pesquisa, porém alguns objetivos específicos foram alcançados tais como: coletar e extrair DNAs de uma população piloto de *P. sargentianum* para servir como piloto para o desenvolvimento de microssatélites nucleares; fazer uma biblioteca enriquecida em microssatélites utilizando métodos de digestão de DNA, enriquecimento de clonagem em *Escherichia coli*.

Os procedimentos realizados em laboratório foram satisfatórios, pois foram obtidas amostras suficientes para a posterior conclusão do trabalho, os protocolos utilizados para execução das atividades configuram-se como de alta complexidade e aceitabilidade da veracidade dos resultados.

REFERÊNCIAS

- BARROS, F. DE, VINHOS, F., RODRIGUES, V.T., BARBERENA, F.F.V.A., FRAGA, C.N. 2010. *Orchidaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000179>).
- CORTÉS-PALOMECA, A.; MCCAULEY, R.A.; OYAMA, K. 2008. Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Mol. Ecol. Res.* 8: 135-138.
- DOYLE, J. J., & DOYLE, J. L. . 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- DRESSLER RL. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Portland, OR: Dioscorides Press.
- FRANKHAM, R., BALLOU, D. J. & BRISCOE, D. A. 2003. Introduction to conservation genetics. 3^o ed. Cambridge University Press, UK
- LOMBARDO V. T., HOPKINS, S. E., SELOSSE, M. A., COZZOLINO, S., TAYLOR, D. L. 2008. Isolation and characterization of new polymorphic microsatellite loci in the mixotrophic orchid *Limodorum abortivum* L. Swartz (Orchidaceae). *Mol. Ecol. Res.* 8: 1117-1120
- PINHEIRO, F., SANTOS, M. O., BARROS, F. MEYER, D., SALATINO, A., SOUZA, A. P., COZZOLINO, S. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci in the

Brazilian orchid *Epidendrum fulgens*. Conservation Genetics. v. 9, n. 6, p. 1661-1663, DEC 2008.