

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES DE SSR PARA *PHRAGMIPEDIUM SARGENTIANUM* (ORCHIDACEAE)

Monick Lima Carvalho 1; Cassio Van Den Berg 2.

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: monicklimacarvalho@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas (DCBIO), Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: vcassio@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Orchidaceae, Sapatinho-de-vênus, Microssatélites.

INTRODUÇÃO:

Phragmipedium sargentianum ocorre em Pernambuco e na Bahia (Barros et al., 2010)^[1] e é uma espécie de orquídeas da lista Brasileira de Flora ameaçada de extinção, além de estar no apêndice I do CITES. Por isso foi considerada prioritária para o desenvolvimento de microssatélites, com potencial para estudos futuros de genética da conservação. 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)^[2]. Existem poucos trabalhos desenvolvendo microssatélites em orquídeas (Cortés-Palomec et al., 2008^[3], Lombardo et al., 2008^[4], Pinheiro et al. 2008^[5]), sobretudo considerando o tamanho da família.

METODOLOGIA:

Materiais foliares de 24 indivíduos foram extraídos, coletados no Morro da Pioneira, Santa Terezinha-BA. Foi feita a extração de DNA genômico total (protocolo CTAB 2X de Doyle & Doyle, 1987), e em seguida a quantificação de DNA utilizando géis de Agarose. Uma biblioteca foi confeccionada realizando PCRs de ISSRs não ancorados que então foram ligados a adaptadores utilizando a T4 DNA ligase (Provan & Wilson, 2007)^[7]. Em seguida o DNA foi purificado com o Kit GFX banda-gel (GE Healthcare). Na fase de clonagem inicialmente foi feita uma reação de ligação para unir os produtos de PCR e ISSR com o plasmídeo pGEM-T ou pGEM-T easy. Em seguida, os plasmídeos foram usados para transformação com células competentes de *E. coli* (TOP10), e as células crescidas em meio SOC e meio LB (Luria-Bertani) com ampicilina, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) e IPTG (isopropil-1-tio- β -D-galactosídeo). Após a transformação é necessária a manutenção dos clones para garantir que cada construção (vetor + fragmento) seja mantida em condições apropriadas para análise posterior, com armazenagem em placas ELISA com fundo U esterilizados, meio 2YT-HMFM (pode-se usar meio LB). O próximo passo foi a amplificação dos insertos clonados, em uma nova reação de PCR com os primers T7 e SP6, e adição de betaína. Após a amplificação dos insertos deve ocorrer uma limpeza do produto PCR para sequenciamento com PEG 20% (20% Polietilenoglicol 8000/ NaCl 2,5 M) e etanol 80%, e então a biblioteca foi sequenciada com ambos os primers utilizados na PCR (T7 e SP6). As seqüências obtidas foram editadas e então foram selecionadas as que continham microssatélites potenciais usando o programa BIOEDIT (Hall 1999)^[8]. Os locos foram detectados utilizando o software MSATCOMMANDER.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Primeiro o DNA das amostras coletadas foi extraído utilizando o protocolo CTAB (Doyle & Doyle)^[6]. Logo em seguidas as amostras foram limpas com álcool etílico 70%, descartando a

parte líquida e conservando o “pellet”, posteriormente a amostra foi colocada para secar overnight e ressuspensa com TE por 48h. Em seguida foi realizada uma quantificação das amostras por eletroforese em gel de agarose, a análise garantiu a viabilidade das 24 amostras obtidas, passou-se para a fase posterior, a PCR do DNA extraído para obtenção de fragmentos com o método ISSR (Provan & Wilson, 2007)^[7], onde as 24 amostras foram misturadas aos reagentes já citados e passaram pelo termociclador utilizando o seguinte programa: 94°C por 3 minutos, 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 35 ciclos, 72°C por 1 minuto e por fim 72°C por 5 minutos. 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 tampão PB e centrifugação por 1 minuto a 13000 rpm, a solução do tubo coletor foi descartada e posteriormente adicionado tampão PE centrifugando novamente nas mesmas condições e descartando o conteúdo do tubo coletor duas vezes após uma nova centrifugação, ao final o DNA foi eluído em tampão 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 a reação é misturada up-and-down e incubada durante 1h à temperatura ambiente, passando para a fase de transformação, onde as células competentes de *E. coli* foram transformadas com o produto da clonagem para obter a amplificação do inserto. 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, foi preparada mix de uma reação de PCR utilizando os primers T7 e SP6, em seguida sendo inserido em tubos de 0,5 mL o mix e as colônias repicadas com ponteiros estéreis e levados ao termociclador com o seguinte programa: 94°C por 5 minutos, 94°C por 15 segundos, 55°C por 35 segundos, 35 ciclos, 72°C por 90 segundos e por fim 72°C por 7 minutos, foram feitos 4 PCRs obtendo ao final 195 amostras que foram quantificadas e levadas para a fase de limpeza.

Da biblioteca construída, foram sequenciados com sucesso 78 clones. Após edição e comparação das sequências verificamos 52 *contigs* com sequências distintas. Entre estas, 13 sequências continham regiões repetitivas de microssatélites, e em alguns casos, mais de uma no mesmo clone. A maioria dos motivos encontrados foram dinucleotídeos (15 locos), mas também foi encontrado um trinucleotídeo e um tetranucleotídeo, em um total de 17 locos. Uma comparação da frequência de microssatélites encontrados na biblioteca de ISSR confeccionada neste trabalho indicou menor ocorrência ou menor agrupamento de microssatélites no genoma de *Phragmipedium sargentianum*, quando comparado a trabalhos utilizando a mesma técnica em outras espécies de orquídeas (*Masdevallia solomonii*, López-Roberts et al. 2011^[9] e *Cattleya labiata*, Almeida et al., 2013^[10]). Por outro lado, devido à ocorrência de vários microssatélites em algumas regiões bastante repetitivas, e um número satisfatório de locos deverá ser obtido sequenciando mais clones e/ou usando bibliotecas de ISSR em que as reações originais misturem mais de um primer.

CONCLUSÃO:

Apesar da metodologia ter se revelado mais difícil em *Phragmipedium sargentianum* do que em outras espécies de Orchidaceae para as quais foi aplicada, ainda assim será possível o desenho de locos microssatélites a partir de uma biblioteca de ISSRs para a espécie. Isso apenas requer a utilização de um maior número de colônias e mesclar primers com diferentes motivos na mesma reação.

REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA:

- ^[1]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>).
- ^[2]Frankham, R., Ballou, D. J. & Briscoe, D. A. 2003. **Introduction to conservation genetics**. 3° ed. Cambridge University Press, UK.
- ^[3]Cortés-Palomec, 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.
- ^[4]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
- ^[5]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*. **Cons.Genet. Res.** 9: 1661-1663.
- ^[6]Doyle, J. J., and J. L. Doyle 1987. A rapid isolation procedure For small quantities of fresh tissue. **Phytochem. Bull.** 19: 11-15.
- ^[7]Provan, J. & Wilson, P.J. 2007. Development of microsatellites for the peat moss *Sphagnum capilifolium* using ISSR cloning. **Mol. Ecol. Notes** 7:254-256.
- ^[8]Hall T. A. 1999. bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Ac. Symposium Series**, 41: 95–99.
- ^[9]López-Roberts, M. C., Almeida, P. R. M., Oliveira, E. J. F., van den Berg, C. 2012. Microsatellite development for the threatened orchid *Masdevallia solomonii* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.** 99: 66-68.
- ^[10]Almeida, P. R. M., López-Roberts, M. C., Vigna, B. B. Z., Souza, A. P., Góes-Neto, A., van den Berg, C. 2013. Microsatellite markers for the endangered orchids *Cattleya Labiate* Lindl. and *C. warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Cons. Genet. Res.** 5: 791-794.