

AMPLIFICAÇÃO HETÉROLOGA DE MARCADORES MICROSSATÉLISTES EM POPULAÇÕES DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO *Orthophytum disjunctum* (Bromeliaceae)

Júlio César da Silva¹; Rafael Batista Louzada²

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas, Licenciatura - CCB – UFPE; E-mail: julio_biolic@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Botânica – CCB – UFPE. E-mail: rb.louzada@gmail.com

Sumário: Bromeliaceae é uma família quase exclusivamente neotropical com cerca de 4000 espécies aceitas em 57 gêneros (Butcher & Gouda, 2014). São reconhecidos dois centros de diversidade para a família, um no escudo das Guianas e o outro no leste do Brasil (Smith & Downs, 1974; Givnish et al. 2011). No Brasil estão registradas 1309 espécies aceitas em 44 gêneros (Forzza et al., 2014). *Orthophytum* é um gênero endêmico do Brasil com cerca de 50 espécies (Louzada, 2012). A amplificação heteróloga de regiões de microssatélites (SSR) consiste na utilização de iniciadores (SSR) não próprios da espécie. O objetivo deste trabalho é testar a amplificação de iniciadores (SSR) previamente publicados para *O. ophiuroides* em *O. disjunctum*. Foram coletados 60 indivíduos de populações de Bezerros e Camocim de São Felix - Pernambuco, dos quais um foi utilizado para amplificação, junto com 8 iniciadores (SSR). A extração do DNA foi realizada pelo protocolo CTAB descrito por Weising et al., com pequenas modificações. As amplificações foram feitas usando o termociclador Veriti (Applied Biosystems), contendo um volume final de 10 µL, usando procedimento de marcação indireta por fluorescência de acordo com Schuelke. Esse trabalho permite obter respostas em relação à transferência de material genético entre espécies da família Bromeliaceae

Palavras-chave: Bromeliaceae, *Orthophytum*, Pernambuco, SSR.

INTRODUÇÃO

Bromeliaceae é uma família quase exclusivamente neotropical com cerca de 4.000 espécies aceitas em 57 gêneros (Butcher & Gouda, 2014). São reconhecidos dois centros de diversidade para a família, um no escudo das Guianas e o outro no leste do Brasil (Smith & Downs, 1974; Givnish et al. 2011). No Brasil estão registradas 1309 espécies aceitas em 44 gêneros (Forzza et al., 2014). *Orthophytum* é um gênero endêmico do Brasil com cerca de 50 espécies (Louzada, 2012). Ocorre na porção leste do Brasil desde os estados do Rio Grande do Norte e Ceará ao norte e Minas Gerais e Espírito Santo ao sul. A maioria das espécies são distintas e facilmente reconhecidas, entretanto, complexos morfológicos de espécies são encontrados no gênero como, por exemplo, o complexo de espécies *Orthophytum disjunctum* composto por três espécies (*O. disjunctum*, *O. jabrense* e *O. triunfense*). Para o estudo de delimitação dessas espécies se faz necessário o uso de ferramentas adicionais como análises multivariadas da morfologia, reprodutivas e moleculares, por exemplo, o uso de marcadores microssatélites (Goetze et al., 2013; Aoki-Gonçalves, 2014). Além do estudo sistemático, esse complexo de espécies também se apresenta como um interessante modelo para estudos filogeográficos onde o objetivo é reconstruir a distribuição geográfica das linhagens genealógicas das espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras foliares de 30 indivíduos foram coletadas em Bezerros, e mais 30 no município Camocim de São Felix. O DNA extraído seguiu o protocolo CTAB descrito por Weising et al. (2005), com pequenas modificações. A purificação do DNA extraído incluiu tratamento por RNase (10 µg/mL) durante duas horas a 37 °C. Para a quantificação do DNA extraído, foi mensurado sua absorbância (260 e 280 nm) através de Biophotometro Eppendorff. Oito iniciadores (SSR) desenvolvidos previamente para *Orthopytum ophiuroides* foram testados: OP18, OP38, OP17, OP34, OP08, OP13, OP30 e OP01 (Aoki-Gonçalves et al, 2014). O indivíduo utilizado para o teste foi JC27 coletado no município de Camocim de São Felix. As amplificações foram feitas usando o termociclador Veriti (Applied Biosystems), contendo um volume final de 10 µL, usando procedimento de marcação indireta por fluorescência de acordo com Schuelke (2000). Cada reação será realizada a partir de 1 ng de DNA genômico, 1x tampão Taq de reação (Fermentas), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,16 mM de primer reverse específico, 0,16 mM de primer forward marcado com fluorescência (6-FAM, VIC, NED ou PET) 0,05 mg/ml de BSA e 0,05 U de TaqDNA polimerase (Bioline, Taunton). Todos os loci foram amplificados usando um programa de PCR padrão com desnaturação inicial a 94 °C por 1 min, seguida por 35 ciclos de amplificação (94 °C por 1 min, 1 min sob a temperatura específica de anelamento de cada par de iniciador (SSR) 1 min a 72 °C) e uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min.

RESULTADOS

A amplificação heteróloga foi realizada com sucesso em *O. disjunctum*. Quatro dos oitos iniciadores (SSR) mostraram positividade na amplificação.

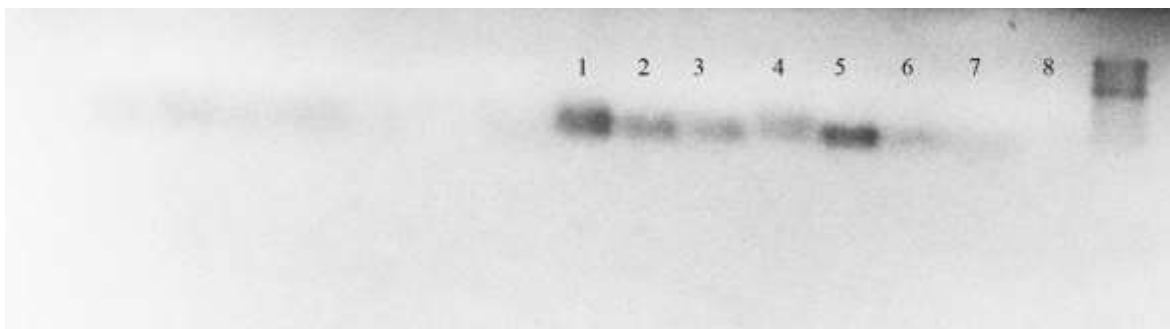


Figura 2. Padrões moleculares obtidos na amplificação de iniciadores (SSR) no indivíduo JC27. 1 = OP38; 2 = OP17; 3 = OP01; 4 = OP01; 4 = OP08; 5 = OP30; 6 = OP34; 7 = OP13 e 8 = OP18.

DISCUSSÃO

Assim como esse presente estudo, diversos trabalhos recentes têm sido realizados com a família Bromeliaceae no âmbito molecular, como em Krapp et al. 2013 e Lavor et al. 2013 e a partir desses estudos, podemos esclarecer hipóteses acerca do polimorfismo entre espécies, variações genéticas e desenvolver métodos de conservação eficazes para a família.

CONCLUSÕES

O presente estudo nos permitiu comprovar que é possível, a transferência de iniciadores (SSR) entre espécies da família Bromeliaceae.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CNPq, pela oportunidade de realizar o projeto no PIBIC, meu orientador pela sua orientação durante o projeto e pôr fim ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal e ao Laboratório de Morfo-Taxonomia Vegetal, por me proporcionarem toda a estrutura para realizar o projeto.

REFERÊNCIAS

- Aoki-Goncalves, F., Louzada, R.B., Souza, L. M., Palma-Silva, C. Microsatellite Loci for *Orthophytum ophiuroides* (Bromelioideae, Bromeliaceae) Species Adapted to Neotropical Rock Outcrops. *Applications in Plant Sciences*, v. 2, p. 1300073, 2014.
- Butcher., D. & Gouda., E. (cont. upd.) The new Bromeliad Taxonlist. Available from: <http://http://botu07.bio.uu.nl/bcg/taxonList.php?#H> (accessed: 07 Julho 2015).
- Forzza., R.C., Costa, A., Siqueira Filho, J.A., Martinelli, G., Monteiro, R.F., Santos-Silva, F., Saraiva, D. P., Paixão-Souza, B., Louzada, R.B., Versieux, L. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>>. Access on: 07 Sep. 2015.
- Givnish., T.J., Barfuss, M.H., Van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P., Jabaily, R., Crayn, D., Smith, J., Winter, K., Brown, G., Evans, T., Holst, B., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P., Sytsma, K., 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from a neight-locus plastid phylogeny. *Amer. J. Bot.* 98, 872–895.
- Goetze., M. ; LOUZADA., R. B. ; Wanderley., M.G.L. ; Souza., L. M. ; Bered., F. ; Palma-Silva., C. . Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 48, p. 194-198, 2013.
- Louzada, R.B., Wanderley, M.G.L. 2010. Revision of *Orthophytum* (Bromeliaceae): species with sessile inflorescences. *Phytotaxa* 13, 1–26.
- Louzada, R.B. 2012. Revisão taxonômica e filogenia de *Orthophytum Beer* (Bromeliaceae, Bromelioideae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

- Smith., L.B., Downs., R.J., 1974. Flora Neotropica Monograph No. 14, Part 1:
Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica. Organization for Flora Neotropica,
Hafner, New York, pp. 1–658.
- Schuelke, M. 2000. Aneconomic method for the fluorescent labeling of PCR fragments.
Nature Biotechnology, 18, 233–234.
- Weising., K.; Nybom., H.; Wolff., K. & Kahl, G. 2005. DNA Fingerprinting in Plants,
Principles, Methods, and Applications. Second Edition. CRC Press, Taylor & Francis
Group, Boca Raton, FA.