

MARCELO FERNANDO SILVEIRA REZENDE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROSSATÉLITES DE
DALBERGIA NIGRA (PAPILIONOIDEAE)**

BELO HORIZONTE

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marcelo Fernando Silveira Rezende

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROSSATÉLITES DE
DALBERGIA NIGRA (PAPILIONOIDEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Bernadete Lovato

Co-Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

**Depto. de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte
Julho de 2007**

043

R467i

Rezende, Marcelo Fernando Silveira
Isolamento e caracterização de microssatélites de *Dalbergia nigra* (Papilionoideae) – [manuscrito] / Marcelo Fernando Silveira Rezende. – 2007.

66 f. : il.

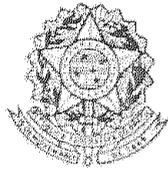
Orientador: Maria Bernadete Lovato

Co-orientador: Evanguedes Kalapothakis

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

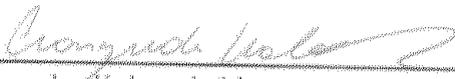
1. *Dalbergia* – Teses. 2. Biotecnologia – Teses. 3. Marcadores moleculares. 4. Microssatélites (Genética) – Teses. 5. Genética de Populações – Teses. I. Lovato, Maria Bernadete. II. Kalapothakis, Evanguedes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

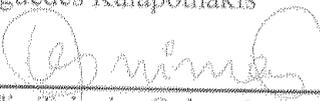
CDU:575



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Tese defendida e aprovada, em 31 de Julho de 2007, pela Banca Examinadora constituída pelos Professores:


Evanguedes Kalapothakis


Cláudia Teixeira Guimarães


Andréa Maria Amaral Nascimento

ESTRELADA

ÉS MENINA DO ASTRO SOL
ÉS RAINHA DO MUNDO MAR
TEU LUZEIRO ME FAZ CANTAR
TERRA, TERRA ÉS TÃO ESTRELADA

O TEU MANTO AZUL COMANDA
RESPIRAR TODA CRIAÇÃO
E DEPOIS QUE A CHUVA MOLHA
ARCO-ÍRIS VEM COROAR.

A FLORESTA É TEU VESTIDO
E AS NUVENS, O TEU COLAR
ÉS TÃO LINDA, Ó MINHA TERRA
CONSAGRADA EM TEU GIRAR.

NAVEGANTE DAS SOLIDÕES
NO ESPAÇO A NOS LEVAR
NAVE MÃE E O NOSSO LAR
TERRA, TERRA ÉS TÃO DELICADA.

OS TEUS HOMENS NÃO TÊM JUÍZO
ESQUECERAM TÃO GRANDE AMOR
OFERECES OS TEUS TESOUROS
MAS NINGUÉM DÁ O TEU VALOR.

TERRA, TERRA EU SOU TEU FILHO
COMO AS PLANTAS E OS ANIMAIS
SÓ AO TEU CHÃO EU ME ENTREGO
COM AMOR, FIRMO TUA PAZ.

(Milton Nascimento e Márcio Borges)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à UFMG como um todo, às pessoas que nela frequentam e que formam um espaço rico e prazeroso de se conviver. Já sinto saudades dos momentos vividos...

À professora e orientadora Bernadete, pela confiança depositada em mim, muitas vezes à distância. Agradeço especialmente pela compreensão nos momentos difíceis.

Às pessoas do laboratório de Genética de populações, a Carol, Helena, Reinaldo, Juliano, Júnia, Daniele, Maíra, boa parte das vezes distantes mas sempre prestativos e colegas. Especial à Renata pelo constante apoio e paciência. A Bia e Luciana, pela ajuda fundamental durante a realização dos trabalhos. Ao Renan, pela excelente prosa! A todos, pela amizade!

Ao Rennan, do laboratório do Geraldinho, pelas várias informações e experiências trocadas.

Ao professor Evanguedes, agradeço à excelente orientação, liberdade e confiança depositada em mim no espaço de seu laboratório. Também agradeço à paciência e solicitude constantes, principalmente nos trabalhos de bancada.

Aos vários amigos que fiz no laboratório de Marcadores Moleculares, em especial à Ana Luiza, Arthur, Carol, Gabriel, Higgor, Juliana, Thaís, Maria. Todos vocês, muito obrigado pela paciência em compartilhar a experiência que possuem. Aprendi muito nesse espaço de trabalho!

A todos os professores do programa de Mestrado em Genética, em especial à professora Adlane, pela compreensão e atenção carinhosa ao me ajudar na escrita do Abstract.

Aos colegas do Laboratório de Evolução e Diversidade Molecular, ao professor Fabrício, pelo apoio técnico em vários momentos.

A todos os professores, funcionários, alunos e colegas do Colégio Santo Antônio, que me apoiaram e me ensinaram muito nos últimos anos. À Fátima, pelo suporte dado a mim durante o tempo da graduação. Ao Kafunga, pela confiança, exemplo de vida e ensinamentos. Ao professor Nilo, pela amizade e fundamental apoio em minha formação profissional. Ao Jorge e Tuca, colegas essenciais. A Carol, pelo carinho!

Aos meus grandes amigos Filipe, Luis, Nessim e Rodrigo, que estiveram comigo nestes últimos anos, compartilhando dos vários momentos de alegria e tristeza.

A todos da minha grande família, querida, amada.

A minha mãe, a quem devo tudo, principalmente amor, educação e dedicação. Minha irmã Juliana e a Evana, que me agüentam todos os dias, pelo carinho e amor constantes!

A minha companheira e amada Hortência, foco dos meus futuros estudos!!!

Com muito amor e saudade, a meu pai.

Sumário

Lista de Figuras	III
Lista de Tabelas	V
Lista de Abreviaturas	VI
Resumo	1
Abstract	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 A Genética na Conservação da Biodiversidade	3
1.2 A Mata Atlântica	5
1.3 A espécie <i>Dalbergia nigra</i>	5
1.4 Marcadores Moleculares	7
1.5 Microssatélites	10
1.5.1 Conceito e Evolução	10
1.5.2 Vantagens e desvantagens do uso de microssatélites em plantas	13
1.5.3 Técnicas de isolamento de microssatélites	14
2. OBJETIVO	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Extração de DNA genômico	19
3.2 Clivagem com enzima de corte freqüente e seleção de fragmentos	20
3.3 Ligação dos fragmentos de DNA genômico ao vetor de clonagem	21
3.4 Transformação bacteriana e seleção de transformantes com inserto	22
3.5 Amostragem dos clones	23
3.6 Hibridização da biblioteca genômica com sonda radioativa complementar.....	25
3.7 Isolamento e identificação do clone positivo presente em culturas com mais de um clone	27
3.8 Seqüenciamento dos clones positivos e construção de consensos.....	31
3.9 Desenho dos iniciadores para os loci microssatélites identificados	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Extração de DNA genômico e seleção de fragmentos com tamanhos de interesse (500 – 1200 pb)	32
4.2 Ligação e confirmação da transformação pelo sistema IPTG/X-gal	35
4.3 Hibridização com sonda radioativa	36
4.4 Isolamento do clone positivo presente em tubos com mais de um clone	39
4.5 Seqüenciamento dos clones com sinal positivo	45
4.6 Desenho dos iniciadores	50
5. DISCUSSÃO	55

6. CONCLUSÃO	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Lista de Figuras

Fig. 1 – A espécie <i>Dalbergia nigra</i> , encontrada no campus UFMG	7
Fig. 2 – Representação esquemática de método 'tradicional' para o isolamento de microssatélites. Modificado de Zane <i>et al.</i> 2002	15
Fig. 3 – Vetor de clonagem pUC 18, com representação das seqüências presentes no sítio múltiplo de clonagem	21
Fig. 4 – Eletroforese em gel de agarose 1% contendo: a) Na canaleta 1, DNA genômico de <i>D. nigra</i> , extraído a partir de sementes germinadas. Na canaleta 2, mesmo DNA genômico digerido com enzima <i>Sau3AI</i> . b) canaleta 3, fragmentos produzidos por digestão, comparados com peso molecular lambda <i>HindIII</i>	32
Fig. 5 - Eletroforese em gel de agarose 1% contendo: a) Marcador molecular lambda <i>HindIII/EcoRI</i> . Coluna 1 - Controle, com DNA genômico total digerido. 2 – solução de digestão passada uma vez em resina <i>Sephacryl-1000</i> . 3 – Solução passada pela segunda vez em resina. b) Amostra passada na resina até três vezes	33
Fig. 6 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídio. a) Com fragmentos extraídos de gel <i>Low melting</i> 0,8% com o kit <i>Wizard® SV Gel</i> (Promega corp.), indicado pelas setas. b) Material não purificado em coluna de <i>Sephacryl-1000</i>	34
Fig. 7 - Eletroforese em gel de agarose 1% com indicativo da digestão do vetor de clonagem pUC18 por enzima de restrição <i>Bam HI</i> . Na canaleta 1, vetor pUC18 não digerido. Canaleta 2, pUC18 digerido com <i>BamHI</i> e posteriormente desfosforilado com a enzima <i>CIAP</i>	34
Fig. 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% com PCR da primeira amostragem de colônias brancas coletadas aleatoriamente a partir da seleção IPTG/X-gal. Canaleta 1 – Marcador de peso molecular lambda/ <i>HindIII</i> ; 2 – Controle Negativo; 3 – Controle Positivo; 4 a 20 – Clones	35
Fig. 9 - Eletroforese em gel de agarose com PCR da segunda amostragem de colônias brancas coletadas aleatoriamente a partir da seleção IPTG/X-gal. Canaleta 1 – Marcador de peso molecular lambda/ <i>HindIII</i> ; 2 – Controle Negativo; 3 – Controle Positivo; 4 a 20 – Clones	35
Fig. 10 - a) Autoradiografia da membrana 2 lavada com SSC 6X a 37°C e exposta ao filme durante 14 horas. b) Autoradiografia da mesma membrana 2, agora lavada em SSC 5X a 48°C e exposta ao filme durante 48 horas. O clone positivo 2V34 está circulado em vermelho. No canto inferior esquerdo, controle positivo aplicado à membrana	37
Fig. 11 - a) Autoradiografia da membrana 4 lavada com SSC 6X a 37°C e exposta ao filme durante 14 horas. b) Autoradiografia da mesma membrana 4, agora lavada em SSC 5X a 48°C e exposta ao filme durante 48 horas. Os clones positivos 4F27 e 4K13 estão circutados em vermelho. Em destaque, no canto inferior esquerdo, controles positivos aplicados à membrana ...	38
Fig. 12 - Autoradiografia da membrana de confirmação de clones positivos lavada com SSC 5X a 50°C, exposta ao filme por 24hrs. Circutados em amarelo, dois exemplos de clones confirmados, 4K13 e 1Q24, aplicados em duplicata de cima para baixo	39
Fig. 13 - Auto-radiografia da membrana de confirmação de clones positivos, lavada com SSC 5X	

a 40°C, exposta ao filme por 72hrs. Os clones confirmados nesta membrana foram obtidos a partir da segunda biblioteca construída. Clones de A1 até H6 da primeira membrana apresentam resultado duvidoso, provavelmente devido a erro durante aplicação dos clones na membrana	39
Fig. 14 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídio, apresentando os produtos da amplificação de 4 clones isolados da retransformação realizada do tubo 4K13	40
Fig. 15 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídio, apresentando os produtos da amplificação de 4 clones isolados dos tubos 4U7, 4C29, 4C35, 4K19, 4V19, 4D12, 4D6, 4E6 e 4O18. Observe que a estratégia não conseguiu separar os 2 clones do tubo em todos os casos	41
Fig. 16 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídio, apresentando a separação em eletroforese dos plasmídeos isolados das 4 colônias amostradas durante separação dos clones do tubo 4K13	42
Fig. 17 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídio, apresentando a separação em eletroforese dos plasmídeos isolados das 4 colônias amostradas durante separação dos clones de vários outros tubos com clones positivos. Todos os casos da figura continham 2 clones por tubo	43
Fig. 18 - Auto-radiografia da membrana de confirmação de clones separados na placa 3, lavada com SSC 6X a 40°C, exposta ao filme por 72hrs. Circulados, de cima para baixo, os clones com sinal forte 3C20, 1U26 e 3I35	44
Fig. 19 - Exemplo de seqüenciamento que identificou o microssatélite, mas que se encontra muito próximo do vetor. Em amarelo, o microssatélite. Em vermelho, a seqüência do vetor identificado	48
Fig. 20 - Seqüenciamento do clone 1Q24, que mostra a queda abrupta na qualidade do seqüenciamento após a região de repetição. Em amarelo, a região de repetição. Seta indica queda na qualidade da seqüência obtida	49

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Temas de oligos para microssatélites	26
Tabela 2 - Resultado da triagem com sondas radioativas na primeira biblioteca de <i>D. nigra</i>	36
Tabela 3 - Distribuição das amostragens de clones na placa 3, para separação dos clones presentes em mais de 2 em um único tubo	44
Tabela 4 - Lista dos clones e respectivos temas SSR da primeira biblioteca genômica	46
Tabela 5 - Lista dos clones e respectivos temas SSR da segunda biblioteca genômica	47
Tabela 6 - Lista dos clones utilizados e seus respectivos iniciadores propostos	51

Lista de abreviaturas

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ATP - Adenosina trifosfato

°C - Graus Celsius

CIAP - *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*

CTAB - *Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*

dNTP - Desoxi (nucleotídeo) 5.-trifosfato

DNA - Ácido desoxirribonucléico

g - grama

ISSR - *Inter-Simple Short Repeat*

LB - Luria Bertani meio para cultura de bactérias

M - Molar

mM - milimolar

mA - mili Ampere

min - minuto

ml - mililitro

mCi_r - millicurie

ng - nanograma

µg - micrograma

µl - microlitro

pb - pares de base

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

pH - Potencial hidrogeniônico

Pmol - Picomol

PTC - *Programmable Thermal Controller*

q.s.p. - quantidade suficiente para

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

rpm. - Rotações por minuto

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*

SNP- *Single Nucleotide Polimorphism*

SSC - *Salt Sodium Citrate solution*

SSR - *Sequence Simple Repeats*

STMS - *Sequence Tagged Microsatellite Site*

TAE - Tris, Ácido acético, EDTA

Taq DNA polimerase - DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*

TE - Tris, EDTA

U - Unidade de enzima

UV - Ultra Violeta

V - volts

Resumo

Nas últimas décadas a genética de populações acessa a distribuição genética das espécies, no tempo e no espaço, por meio de diferentes marcadores moleculares. O conhecimento da distribuição genética histórica e atual pode contribuir para eficientes programas de conservação. Em plantas, os primeiros marcadores utilizados foram as isoenzimas, que são ainda bastante empregadas. Atualmente expande-se o uso de microssatélites e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), além de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) em alguns casos. Os microssatélites são marcadores codominantes e o alto polimorfismo acessado por PCR é sua principal vantagem. A grande desvantagem consiste na construção de iniciadores espécie-específicos. Este trabalho teve como objetivo principal isolar marcadores microssatélites para a espécie *Dalbergia nigra*, o jacarandá-da-Bahia, encontrada na Mata Atlântica e ameaçada pela grande exploração de sua valiosa madeira. Foram construídas duas bibliotecas genômicas primárias da espécie, uma com 13.337 clones amostrados e outra com 1.920 clones individualizados em placas de 96 poços. A triagem por microssatélites foi feita com sondas marcadas radioativamente. Um total de 159 clones positivos foram identificados e seqüenciados e 62 microssatélites foram encontrados. Desses, foram selecionados 15 microssatélites para a construção de iniciadores. Espera-se encontrar polimorfismo em, no mínimo, metade deles. No futuro, esses iniciadores serão utilizados em diferentes estudos populacionais de *D. nigra* com propósitos de conservação da espécie.

Abstract

In the last decades, population genetics has made use of different molecular markers to assess genetic distribution of species in time and space. The knowledge of current and historical genetic distribution of threatened species can contribute to introduce efficient conservation programs. In plants isozymes were the first markers to be utilized and they are still used in some studies. Lately, the use of microsatellites and AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) have been increasing. SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) are also used in some instances. Microsatellites are codominant markers, and its major advantage is the high polymorphism assessed through PCR. The major disadvantage is the need for construction of species-specific primers. *Dalbergia nigra*, the rosewood tree, is found in the Atlantic Rainforest, and has been threatened due to the exploitation of its high valued wood. The objective of this study was the isolation of microsatellite markers for this species in order to use in population genetics studies. Two primary genomic libraries were constructed: one yielded 13,337 clones and the second one yielded 1,920 clones. The screening for microsatellites was made with radioactive-labeled probes. A total of 159 positive clones were identified and sequenced and 62 microsatellites were found. From these clones, 15 microsatellites were selected in order to construct species-specific primers. It is expected that half of the primers will be able to detect polymorphisms in *D. nigra*. In the future, these primers will be used in population genetics studies in an attempt to better implement conservation programs for this species.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Genética na Conservação da Biodiversidade

Atualmente, percebe-se uma preocupação cada vez maior em relação à forte interferência humana sobre o meio ambiente e seus recursos naturais. Amplamente divulgados pela mídia, os efeitos da intensa ação humana têm levado a comunidade científica de todo o mundo a se mobilizar em torno das conseqüências dos impactos produzidos e a proposição de alternativas que possam mudar o quadro catastrófico apresentado. A rápida industrialização de países do terceiro mundo no pós-guerra, países estes que abrangem boa parte da biodiversidade, somada à grande interferência já causada pelos países do primeiro mundo, proporcionou um grau de degradação ambiental nunca antes visto. A tendência é piorar. No Brasil, a exploração de recursos naturais faz parte de sua história desde o descobrimento, sendo que a maior parcela de degradação ocorreu nos últimos cinquenta anos, reduzindo drasticamente importantes ecossistemas brasileiros, como a Mata Atlântica e o Cerrado. Hoje, com uma economia baseada principalmente na exportação de soja, carne bovina, minério e, mais recente ainda, biocombustíveis, as expectativas quanto à preservação da biodiversidade brasileira são ainda mais preocupantes.

Globalmente, cresce a preocupação em relação à rápida redução dos ecossistemas e às grandes taxas de extinções, resultando em maior destaque para os estudos relativos à Conservação nas Ciências Biológicas. Preocupações com a conservação da biodiversidade estimulam ainda mais o refinamento de técnicas de medição e observação da natureza, mesclando, muitas vezes, técnicas moleculares com modelos ecológicos que descrevem processos e padrões naturais. Na genética de populações existe o objetivo claro de compreender a distribuição espacial e temporal da diversidade genética nas populações dos seres vivos e determinar qual é a influência dos mecanismos evolutivos nas distribuições genéticas constatadas. O conhecimento desenvolvido dessa forma pela genética de populações, na maioria das vezes auxiliado pelo refinamento de técnicas moleculares, é de suma importância para o delineamento de estratégias de conservação e manejo de populações naturais, visando à manutenção da diversidade genética das espécies (Avice *et al.* 1995). A Genética da Conservação, desenvolvida a partir das

preocupações com relação à conservação sob o ponto de vista da genética de populações, tem como objetivos detectar os fatores genéticos que afetam a extinção de populações e espécies, desenvolver o manejo genético de pequenas populações para minimizar os riscos de extinção, resolução de incertezas taxonômicas e de unidades de manejo e a compreensão da biologia de espécies (Frankham *et al.* 2002, 2005).

O papel dos fatores genéticos na extinção de populações selvagens continua controverso, mas agora evidências cada vez mais fortes mostram que eles são importantes para o risco de extinção. Os fatores genéticos afetam o risco de extinção porque espécies ameaçadas têm populações pequenas e/ou em declínio (IUCN, 2004) e, em tais populações, a endogamia e a perda de diversidade genética são inevitáveis. A endogamia tem conseqüências deletérias em todos os aspectos da reprodução e sobrevivência, incluindo produção de esperma, habilidade de cruzamento, fecundidade da fêmea, sobrevivência juvenil, habilidade maternal, idade para a maturidade sexual e sobrevivência do adulto em animais e plantas. Esses efeitos são denominados depressão endogâmica. Além de afetar o valor adaptativo em curto prazo, a perda de diversidade genética afeta a habilidade das populações de evoluírem para responder às mudanças ambientais (perda de potencial evolutivo) (Frankham *et al.* 2002; Frankham, 2005).

Segundo Frankham (2005), se os fatores genéticos forem ignorados em planos de recuperação de taxa ameaçados e investigações de risco de extinção, os seguintes efeitos adversos podem ocorrer:

- As estimativas do risco de extinção podem ser substancialmente subestimadas em vários taxa;
- Estratégias inapropriadas de recuperação serão adotadas;
- Populações inapropriadas podem ser usadas para a reintrodução, uma vez que elas podem estar adaptadas a um ambiente diferente;
- Populações fragmentadas podem não ser corretamente diagnosticadas e o fluxo gênico entre elas será erroneamente manejado;
- Problemas associados com a perda de alelos de auto-incompatibilidade em pequenas populações de plantas não serão considerados;
- Diferentes unidades evolutivamente significativas ou taxa podem ser misturados, o que pode resultar em valor adaptativo reduzido (depressão exogâmica).

1.2 A Mata Atlântica

A Mata Atlântica é uma das principais florestas tropicais do mundo e originalmente cobria quase toda a costa brasileira, em um total de 1,2 milhões de Km² de floresta nativa. Após cinco séculos de ocupação humana e exploração econômica, houve uma redução da floresta para 7,5% da área original. Essa redução iniciou-se com o processo de colonização européia no Brasil, iniciada na costa Atlântica e, conseqüentemente, abarca as maiores e principais cidades brasileiras. Quinhentos anos de história baseada na exploração dos recursos naturais oferecidos pela floresta, como madeira e animais, além da abertura de pastagens e áreas para plantio de cana-de-açúcar e café, podem ser considerados como principais fatores da redução drástica desse importante ecossistema. Hoje, boa parte do pouco que restou de Floresta Atlântica está concentrada em regiões de relevo acidentado, como a Serra do Mar, onde a colonização e a agricultura eram dificultadas. Em Minas Gerais, além de pequenos fragmentos esparsos, o principal remanescente de Mata Atlântica limita-se ao Parque Estadual do Rio Doce, situado na porção sudeste do Estado, com uma área de 36.970 hectares (IEF 2007).

A redução severa descrita e o grande número de espécies endêmicas presentes na Mata Atlântica levaram à inclusão desse bioma na lista dos 25 *hotspots* mundiais para a conservação pela *Conservation International* (Myers et al., 2000).

1.3 A espécie *Dalbergia nigra*

O gênero *Dalbergia* (Papilionoideae) compreende cerca de 100 espécies distribuídas pantropicalmente (Polhill, 1981), sendo identificadas 41 espécies no Brasil, algumas com grande potencial econômico e com ocorrência no Cerrado e na Mata Atlântica (Carvalho, 1997), biomas altamente ameaçados por atividades humanas. *Dalbergia nigra*, o jacarandá-da-Bahia, é uma espécie característica e exclusiva da Mata Atlântica, de ocorrência desde o sul da Bahia até o litoral norte de São Paulo. O jacarandá-da-Bahia (*D. nigra*) é considerado uma das mais valiosas espécies madeireiras que ocorrem no Brasil (Carvalho, 1994), tendo sido fortemente explorado como uma fonte de madeira para a manufatura de móveis finos e instrumentos musicais. O intenso extrativismo da *D. nigra* associado à alta fragmentação da Mata Atlântica e à ausência de plantios de reposição resultaram na

inclusão desta espécie na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, categoria vulnerável, o que significa que essa espécie apresenta alto risco de extinção na natureza em médio prazo (IBAMA, 1992, IUCN, 1994). A espécie é também listada no Apêndice I da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e da Fauna em Perigo de Extinção (CITES 1992), o que proíbe a sua comercialização (Ribeiro *et al.*, 2005).

As árvores adultas de *D. nigra* (Figura 1) podem atingir mais de 35 m de comprimento e 155 cm de diâmetro na altura do peito (*dbh* – *diameter at breast height*). As folhas são compostas, alternas, paripenadas, com 10 a 20 folíolos, com 0,7 cm a 2,5 cm de comprimento por 0,4 cm a 1,0 cm de largura. As flores são branco-amareladas, perfumadas, com 0,5 cm a 1,0 cm de comprimento, reunidas em cachos axilares de até 6 cm de comprimento, dando origem a panículas de até 20 cm. As sementes são castanhas, lisas, achatadas e pequenas e são inseridas em frutos pequenos e achatados de cor castanha, contendo até duas sementes centrais (Carvalho, 1994). Não há na literatura dados sobre o seu sistema de cruzamentos, mas estudo de uma espécie congênica do Brasil (*D. miscolobium*) mostrou alogamia (predominantemente fecundação cruzada) com um aparente sistema de auto-incompatibilidade (Gibbs e Sasaki, 1998). O Pólen é provavelmente dispersado por abelhas (Ribeiro *et al.*, 2005) e as sementes, pelo vento (Carvalho 1994). Considerando o fato que *D. nigra* está ameaçada de extinção e, portanto, suas populações são em sua maioria pequenas, se ela apresentar também auto-incompatibilidade, como *D. miscolobium*, ela pode estar sofrendo redução do seu valor adaptativo (*fitness*), devido à redução no número de alelos de auto-incompatibilidade, o que leva à diminuição de cruzamentos compatíveis (Frankham *et al.*, 2002). A análise do sistema de cruzamentos em *D. nigra* pode ser realizada com a utilização de marcadores microsatélites e é um dos objetivos futuros de trabalho do laboratório de Genética de Populações e Conservação da Universidade Federal de Minas Gerais.



Fig. 1 – A espécie *Dalbergia nigra*, encontrada no campus UFMG.

1.4 Marcadores Moleculares

No final da década de 80 e início dos anos 90 surgiu uma grande diversidade de técnicas moleculares, em decorrência do desenvolvimento da PCR, reação em cadeia da polimerase. Atualmente, a disponibilidade de vários marcadores moleculares para estudos genéticos leva à discussão sobre quais são os melhores e em que condições o marcador se apresenta como a melhor opção.

Diversas técnicas moleculares têm sido empregadas no estudo de genética de populações, tendo fortes implicações na biologia da conservação. Inicialmente, a técnica mais difundida nos estudos genéticos baseados em marcadores era a da

eletroforese de isoenzimas. Posteriormente, outras técnicas baseadas em amplificação aleatória do DNA, como o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), RFLPS (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) e ISSR (*Inter-Simple Short Repeat*) foram empregadas nos estudos genéticos, inclusive de populações. O seqüenciamento de DNA, as análises de SNPs e os microssatélites são técnicas mais recentes e mais amplamente utilizadas.

As isoenzimas são marcadores bioquímicos, pois consistem na revelação da presença da enzima por meio da reação com substratos específicos. Pequenas alterações na composição da cadeia de aminoácidos entre enzimas com a mesma função em diferentes indivíduos (isoenzimas) produzem o polimorfismo utilizado nos estudos genéticos. Entretanto, mutações silenciosas, que determinam polimorfismo de seqüência de DNA, não podem ser distinguidas através da técnica de isoenzimas. Outro marcante problema da técnica é a dificuldade em encontrar alto polimorfismo entre os locos de isoenzimas. A técnica também envolve a utilização de excesso de substâncias tóxicas, além de ser bastante laboriosa.

Na genética de populações, parâmetros determinados pela análise de isoenzimas, como variação genética intra e interpopulacionais, fluxo gênico e heterozigozidade observada e esperada, são possíveis de comparação entre diferentes estudos e estão proximamente associados às várias características da história de vida das espécies. Conseqüentemente, as isoenzimas têm o potencial de produzir informações com importantes implicações em biologia evolutiva e ecologia, assim como em biologia da conservação (Hamrick e Godt, 1989). No entanto, limitantes práticos (e.g. quantidade insuficiente de tecidos vegetais facilmente acessíveis), assim como o baixo nível de polimorfismo levou a um aumento de interesse em marcadores baseados em DNA pela genética de populações (Nybom 2004).

Em um trabalho recente (Ribeiro *et al.*, 2005) foram analisadas a variação e a estrutura genética em plantas jovens e adultas de três populações de *Dalbergia nigra*, uma localizada em grande remanescente de Mata Atlântica (Parque Estadual do Rio Doce-MG) e outras duas localizadas em pequenos fragmentos com diferentes graus de distúrbios antrópicos. O estudo foi realizado utilizando-se isoenzimas como marcador molecular para determinação da estrutura genética. Foi observado que as plantas do fragmento com maior grau de distúrbio antrópico exibiram uma reduzida

variação genética e uma elevada divergência genética em relação às outras duas populações. Algumas questões referentes aos efeitos da fragmentação, entretanto, não foram respondidas completamente, devido ao pequeno número de áreas amostradas e pelo reduzido número de marcadores isoenzimáticos obtidos, conseqüência das dificuldades de revelar isoenzimas nessa espécie. Esse fato evidencia a importância de desenvolver marcadores genéticos polimórficos que permitam a análise dos efeitos da fragmentação em populações dessa espécie e em outros estudos genéticos necessários para a sua adequada conservação.

As técnicas de RAPD, AFLP e ISSR são baseadas na amplificação de regiões do DNA por PCR utilizando iniciadores aleatórios e inespecíficos. A técnica de RAPD foi a primeira a surgir dentro desse princípio e, conseqüentemente, a mais utilizada em estudos genéticos, principalmente em estudos de genética populacional de plantas. Na técnica de RAPD, após a amplificação com iniciadores de seqüências aleatórias, os produtos da amplificação são separados pelo tamanho sob eletroforese em gel de agarose, e os alelos são determinados pela presença ou ausência de banda no determinado loco. A grande polêmica em torno da técnica, e que tem diminuído significativamente seu uso em estudos genéticos, é a baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos, principalmente em decorrência da não especificidade dos iniciadores.

Na tentativa de minimizar os problemas decorrentes da baixa reprodutibilidade dos resultados de RAPD, foi desenvolvida a técnica de ISSR, que amplifica aleatoriamente regiões de microssatélites utilizando iniciadores construídos a partir de seqüências repetidas em *tandem*, com núcleos de repetição diversos. Dessa forma, aumenta-se a especificidade de anelamento, aumentando, conseqüentemente, a reprodutibilidade dos resultados de amplificação.

A técnica de AFLP compreende a combinação da RADP com outra técnica mais antiga, a RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Na AFLP, ocorre a amplificação por PCR dos fragmentos produzidos após digestão enzimática realizada com duas enzimas de restrição diferentes, utilizando-se iniciadores que se anelam no sítio de digestão das enzimas. Assim, são produzidos fragmentos de DNA que são separados por tamanho pela eletroforese em gel de poliacrilamida.

Nas três técnicas descritas brevemente, os alelos são determinados pela presença ou ausência da banda no gel. Dessa forma, esses marcadores são definidos como marcadores dominantes, pois dificilmente consegue-se distinguir os

homozigotos dominantes (presença de mais de um fragmento no mesmo loco em condição diplóide ou superior) daqueles que são heterozigotos (ausência de amplificação do alelo, em pelo menos um conjunto cromossômico, ao mesmo tempo em que há amplificação do alelo em outro conjunto cromossômico do indivíduo diplóide ou superior). A principal desvantagem em estudos de população de todos os métodos que utilizam iniciadores inespecíficos e produzem padrões de bandas multiloco é o fato de que os locos investigados são bialélicos (a banda está presente ou não) e não é possível a distinção de heterozigotos.

Vários outros marcadores moleculares foram desenvolvidos, com maior ou menor relevância. Dentre esses, destaca-se os SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*), sendo considerado muito promissor. Entretanto, sua utilização é ainda bastante restrita no estudo de genética de populações de plantas devido a custos de aparelhos de leitura dos alelos e desenvolvimento dos locos para estudo.

1.5 Microssatélites

1.5.1 Conceito e evolução

Microssatélites são repetições simples contíguas (por exemplo, $TA_{(n)}$) de quase qualquer seqüência, podendo ter de um a seis pares de bases como tema ou núcleo de repetição, e distribuídos por quase todo o genoma de eucariotos e, freqüentemente, de procariotos. As repetições são muitas vezes perfeitas, mas podem ser encontrados temas com algumas substituições ou inserções de base no meio da repetição, ou seja, imperfeitos, ou com mais de um conjunto de repetição lado a lado, considerado assim como um microssatélite composto (Ellegren, 2004). Os microssatélites estão entre as seqüências mais variáveis do genoma e os alelos de um determinado loco são produtos das diferenças em comprimento, devido aos diferentes números de repetições possíveis de existir entre os alelos. Por outro lado, as seqüências presentes nos flancos do microssatélites são conservadas (Schlötterer, 2000).

Não existe consenso sobre quantas unidades de repetição são necessárias para se definir a seqüência como sendo um microssatélite ou qual é a variação aceitável no tema de repetição que o define como imperfeito (Ellegren, 2004). Entretanto, é importante destacar, e é considerável no processo de isolamento de

microsatélites em uma determinada espécie, que existe uma grande variação nos tamanhos dos microsatélites entre diferentes taxa estudados. Por exemplo, a mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, é considerada uma espécie que apresenta microsatélites pequenos em relação a outras espécies que também têm todo o genoma seqüenciado, como os seres humanos (Schlötterer, 2000, 2007). Outra variação interessante a ser destacada é a diferença entre os tipos de motivos encontrados entre as espécies. Por exemplo, mamíferos apresentam muito mais temas com repetições AC/TG do que as outras possibilidades (AG/TC, AT/TA e CG/GC). Segundo Gupta *et al* (1996), em plantas, existe maior abundância de microsatélites (TA)_n do que as outras possibilidades. Os genomas das espécies vegetais apresentam maior abundância de repetições (GA)_n do que repetições (CA)_n. Com relação a temas trinucleotídeos, existe maior frequência de (AAT)_n e (AAG)_n em vegetais (Gupta *et al.*, 1996; Tóth *et al.*, 2000). As várias diferenças de distribuição dos microsatélites mencionadas aqui e outras também existentes dificultam a proposição de um modelo universal que explique o processo de geração de microsatélites no genoma das espécies.

Em muitos estudos de genética de populações, é necessário levar em conta os aspectos evolutivos que envolvem o marcador molecular usado, para a determinação das relações entre as distribuições alélicas dos locos entre as populações (estrutura genética) com a escala de tempo e a história evolutiva da espécie. Para o caso dos microsatélites, ocorrem adaptações da proposição de Kimura (1973), que define a mutação da seqüência por etapas (SMM – *stepwise mutation model*). Assim, o microsatélite ganha ou perde aleatoriamente uma unidade de repetição a uma taxa constante, alterando o comprimento de um arranjo de microsatélite, independente do tamanho inicial. Tem-se, nesse caso, uma simplificação do modelo, que não leva em conta observações relativas ao limite de tamanho existente em um microsatélite e variações de distribuição de tamanho de alelos e motivos no genoma de diferentes espécies.

O processo de formação de diferentes tamanhos de alelos em um loco microsatélite pode ser descrito como um mecanismo de deslizamento replicativo – durante a replicação e síntese de DNA, a fita nascente está dissociada da fita molde e, quando se reanela fora da matriz, forma um grampo ou alças da fita da DNA. Quando a síntese de DNA continua a partir desse ponto, o número de repetições do microsatélite é alterado na fita nascente. Se o grampo se forma na fita nascente, há

um aumento no número de repetições. Se o grampo se forma na fila molde, há uma redução no número de repetições. Variações de tamanho em um determinado alelo estão condicionadas também ao sistema de reparo de pareamento, um sistema enzimático nuclear que corrige erros de pareamento produzidos durante a replicação do DNA ou recombinação. Tal sistema de reparo diminui consideravelmente a taxa de mutação dos microssatélites em uma geração para outra e o processo de variação está condicionado à eficiência do reparo (Schlötterer, 2000; Li *et al.*, 2002; Zane *et al.*, 2002; Ellegren, 2004). Mesmo assim, a taxa de mutação em regiões de microssatélites, comparadas com outras regiões do genoma, é muito maior, variando de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por loco por geração (Oliveira *et al.*, 2006).

É importante destacar que, *in vitro*, é possível reproduzir o mecanismo de aumento ou diminuição de um microssatélite por meio do deslizamento replicativo. Apenas utilizando a DNA polimerase em reações de PCR, pode-se observar a formação de bandamento em escada ('*stutter bands*') em géis de poliacrilamida utilizados na separação dos produtos de amplificação. Bandas de menor intensidade presentes na periferia da banda principal, mais intensa, são resultados da produção de repetições adicionais do microssatélite em algumas cópias do material amplificado, variando o tamanho do alelo original da amostra. Essa situação é especial e considerável em amplificações por PCR realizada em microssatélites com mono e dinucleotídeos (Ellegren, 2004).

Diferentes fatores podem influenciar a taxa de mutação de um microssatélite, tendo em vista o mecanismo de deslizamento replicativo proposto, somada a condição de eficiência do sistema de reparo de pareamento. O primeiro e mais amplamente comentado refere-se ao número de repetições presentes em um dado microssatélite. Quanto mais repetições presentes em um loco, maior a probabilidade de se formar alças durante a replicação do DNA e, conseqüentemente, maior será a chance de se variar o número de repetições de tal microssatélite. Assim, quanto maior o tamanho do loco microssatélite, espera-se encontrar um maior número de alelos em uma dada população (Schlötterer, 2000; Li *et al.*, 2002).

Os microssatélites não se encontram distribuídos homogeneamente ao longo do genoma das espécies, e a distribuição encontrada reflete influências evolutivas nas regiões de repetição. O volume de repetições simples assumidas como de evolução neutra estão distribuídas em regiões de DNA não codificante, tanto em seqüências intergênicas como em íntrons. Nessas regiões predominam repetições

de mono, di e tetranucleotídeos. Tais temas não são encontrados em regiões de DNA codificador devido a alta taxa de mutação e, conseqüentemente, mudanças na matriz de leitura, o que é selecionado negativamente. Uma fração de microssatélites pode ser encontrada em região codificadora, principalmente repetições de trinucleotídeos e hexanucleotídeos e, muitas vezes, estão associados a várias doenças humanas (Ellegren 2004).

1.5.2 Vantagens e desvantagens do uso de microssatélites em plantas

Desde seu descobrimento no início dos anos 80, a ubíqua ocorrência de microssatélites, somado ao advento da PCR, possibilitou a análise do polimorfismo de microssatélites e, rapidamente, esse marcador molecular tornou-se o marcador de escolha no mapeamento genômico e subseqüentemente também em estudos de genética de populações e áreas relacionadas. Atualmente, os marcadores microssatélites são comumente empregados na análise da estrutura genética de populações vegetais de espécies silvestres e cultivadas. Os microssatélites apresentam alto polimorfismo e a facilidade na identificação de indivíduos define sua maior vantagem para estudos populacionais. Também se destaca a alta reprodutibilidade, por basear-se em amplificação por PCR utilizando iniciadores espécie-específicos.

Um grande problema no uso de microssatélites em estudos populacionais está relacionado com a falta de clareza sobre os processos de evolução dessas regiões genômicas somado com as altas taxas de mutação observadas. Assim, fica difícil fazer relações entre a estrutura genética apresentada pelo marcador e a história evolutiva da espécie no tempo (Nybom 2004).

A maior dificuldade em sua utilização consiste na alta especificidade do marcador, necessitando a construção de iniciadores espécie-específicos para a PCR dos locos de microssatélites. A construção de iniciadores específicos era, até pouco tempo, de alto custo e extremamente laboriosa. Atualmente, muitos laboratórios já possuem melhores equipamentos e material disponíveis, o que tem diminuído consideravelmente os custos. Adicionalmente, diferentes estratégias de isolamento dos microssatélites têm surgido nos últimos anos, diminuindo o trabalho e o tempo gastos.

Se a maior desvantagem dos microssatélites encontra-se na dificuldade e alto custo em se isolar os iniciadores de amplificação por PCR, muitos estudos têm mostrado que pares de iniciadores desenhados para uma espécie podem ser usados para outras espécies correlacionadas, algo muitas vezes difícil de ser conseguido. A transferibilidade, como é chamada, é possível devido à natureza homóloga das seqüências de DNA das regiões flangeadoras dos microssatélites entre espécies próximas (Oliveira *et al.* 2006).

Nybom (2004) comparou diferentes marcadores moleculares baseados em DNA utilizados em estudos com plantas e demonstrou maior nível de polimorfismo nos marcadores microssatélites em relação aos outros marcadores de DNA considerados dominantes (RAPD, AFLP, ISSR). A grande vantagem dos microssatélites encontra-se nas estimativas de variação intrapopulacional, que se apresentam mais altas do que as estimativas baseadas em marcadores dominantes. Em contraste, estimativas de variação interpopulacional são quase que idênticas entre todos os marcadores baseados em DNA.

1.5.3 Técnicas de isolamento de microssatélites

Antes que um microssatélite possa ser amplificado por PCR, é necessária a identificação e o seqüenciamento da região flangeadora, para a construção de iniciadores específicos. O isolamento de locos microssatélite e de suas regiões flangeadoras é o primeiro passo para a sua utilização em análises. Diversas técnicas foram desenvolvidas nos últimos vinte anos para a identificação e o desenvolvimento dos iniciadores de marcadores microssatélites (Ferreira & Grattapaglia 1996, Salles *et al.* 2003).

Na técnica mais clássica, são necessários o estabelecimento de uma biblioteca primária de DNA genômico da espécie e a procura por regiões com repetição em *tandem* por meio de hibridização dos clones produzidos com sondas radioativas ou fluorescentes de oligonucleotídeos com seqüências repetitivas. Clones positivos originados da sondagem são seqüenciados e analisados quanto à existência de um bom marcador microssatélite. O processo está esquematizado de maneira resumida na figura 2 (Zane *et al.* 2002, Salles *et al.* 2003).

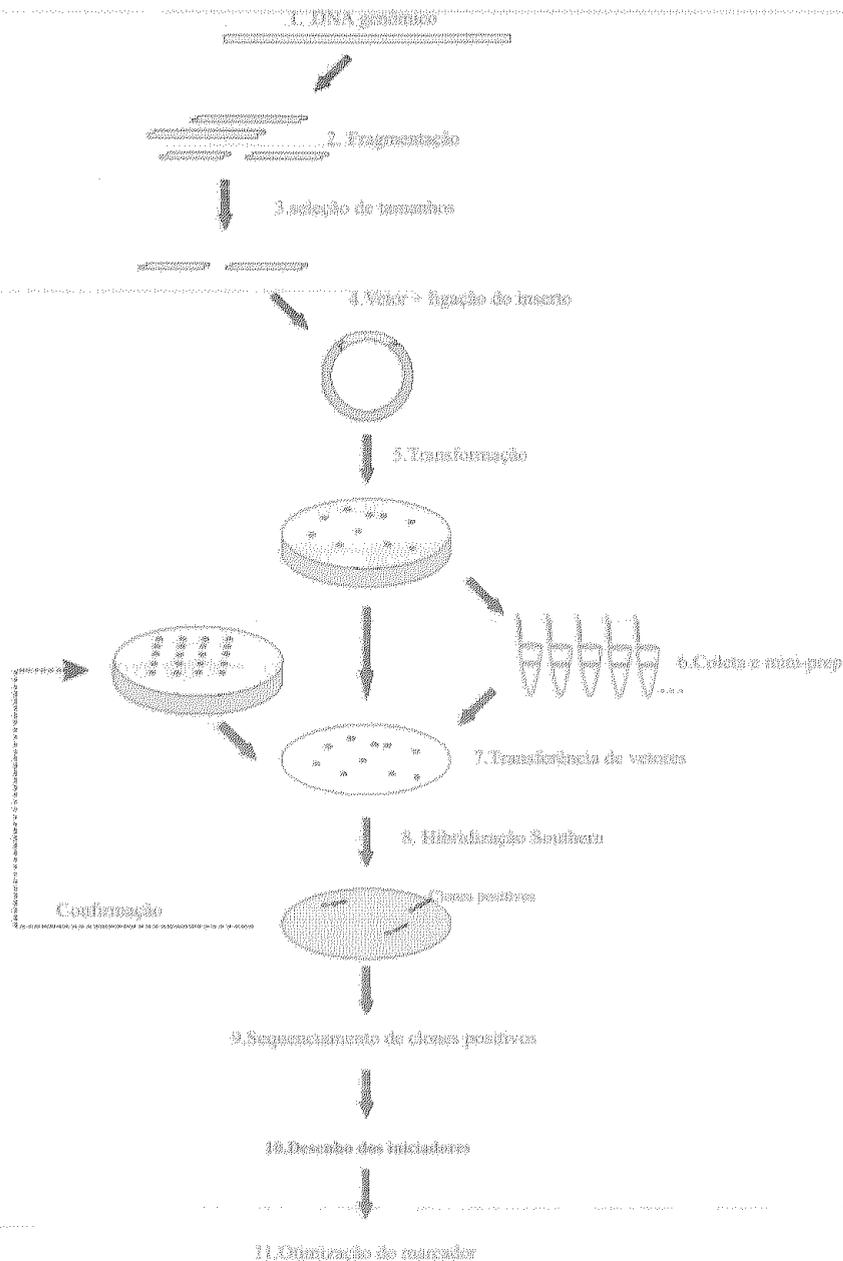


Fig.2 - Representação esquemática de método 'tradicional' para o isolamento de microssatélites. Modificado de Zane *et al.* 2002.

A segunda técnica mais amplamente utilizada, principalmente nos últimos anos, consiste na produção de uma biblioteca enriquecida para repetições microssatélites, por meio de seleção dos insertos antes da clonagem. Um exemplo comum de seleção de fragmentos pode ser feito através da produção de um ligante com tema repetitivo e biotina ligada na extremidade. Os oligonucleotídeos com biotina se ligam entre fragmentos de DNA genômico com repetições microssatélites e estreptavidina envolvida com grânulos magnéticos. Após a ligação, são lavados

em coluna magnética, onde ficam presos os fragmentos com as repetições microssatélites para serem clonados em vetor específico e transformação em bactéria. Os clones assim obtidos podem ser diretamente seqüenciados, sem a necessidade de maior seleção por hibridização com oligonucleotídeos marcados radioativamente. Essa técnica é mais utilizada na caracterização de microssatélites em espécies pouco estudadas geneticamente, de distribuição natural. Também, a técnica por enriquecimento é recomendada para espécies de *taxa* reconhecidos por terem baixa freqüência de microssatélites em seu genoma, como aves e plantas (Zane *et al.* 2002).

Atualmente, espécies de grande importância econômica e que possuem projetos genomas concluídos ou em andamento podem ter seus locos microssatélites identificados apenas por meio de identificação de seqüências repetitivas em banco de dados que possuem depósitos de seqüências da espécie, como é o caso dos humanos, mosca-da-fruta, *Arabidopsis thaliana* e arroz (Dieringer e Schöterer, 2007).

Um complicador recorrente na utilização de microssatélites em estudos populacionais é o grande número de amplificações necessárias para a identificação dos alelos de vários locos em um número grande de indivíduos. Para reduzir esse problema é proposta a construção de conjuntos de análise com mais de um loco, chamados multiplex. Em um multiplex, mais de um loco pode ser amplificado e seus alelos identificados em uma única reação de PCR. Duas formas comuns são possíveis – na primeira, o multiplex é composto por locos de tamanhos diferentes e temperatura de anelamento de seus iniciadores iguais, sem ocorrência de sobreposição de alelos de diferentes locos. Na segunda, os iniciadores de diferentes locos, que apresentam um mesmo tamanho de produtos de amplificação, são marcados com diferentes fluorescências. O produto da amplificação e os alelos produzidos podem ser identificados com seqüenciadores automatizados de DNA.

Esta dissertação faz parte de um programa do laboratório de Genética de Populações e Conservação e seus resultados complementarão outros trabalhos com a espécie *D. nigra* que estão sendo desenvolvidos. Um desses trabalhos se refere ao estudo filogeográfico de *Dalbergia nigra* com vistas a entender o efeito dos eventos climáticos que ocorreram no Pleistoceno na estrutura genética e na diversidade das populações, analisadas com seqüências de DNA de cloroplasto (cpDNA). A comparação entre os estudos realizados com marcadores que

apresentam baixa taxa de evolução (como o cpDNA) com os marcadores de microssatélites, que apresentam elevada taxa de evolução, poderá distinguir os fatores responsáveis pela estrutura genética atual das populações, como atividades antrópicas recentes, como fragmentação de áreas e desmatamento, dos eventos climáticos ocorridos no Pleistoceno (Ribeiro *et al.* 2007). Estudos de estrutura genética em nível local, bem como de fluxo genético por pólen e por sementes constituem projetos a serem implementados com os microssatélites isolados no presente estudo.

2. OBJETIVO

O presente trabalho de dissertação tem como objetivo geral identificar marcadores microssatélites de *Dalbergia nigra* com alto grau de polimorfismo para realização de estudos futuros de genética de populações, objetivando o manejo e conservação desta espécie arbórea ameaçada. Para tanto, as seguintes etapas foram propostas:

- Construção de biblioteca genômica primária de jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra*);
- Hibridização com sondas que apresentam regiões de repetição;
- Seqüenciamento e caracterização dos microssatélites;
- Construção dos iniciadores para os diferentes locos microssatélites identificados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração de DNA genômico

Folhas jovens e sementes de *D. nigra* foram coletadas de um indivíduo da espécie existente próximo à reitoria da UFMG, no campus Pampulha. O material foi levado diretamente para o laboratório, sem necessidade de estocagem, para a extração imediata do DNA genômico.

A extração foi realizada por meio de um protocolo que utiliza o detergente catiônico CTAB (Doyle & Doyle, 1987; Cheung *et al.*, 1993; Wang *et al.* 1993; Stewart & Via, 1993 e Lodhi *et al.* 1993; *apud* Ferreira & Grattapaglia, 1995), com algumas modificações. Em um cadinho, 3g de folha fresca foram trituradas com ajuda de nitrogênio líquido e o pó produzido foi transferido para um tubo de 50 ml. Neste tubo, foi adicionado 15 ml de tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4M, EDTA 20mM, Tris-HCl 100mM pH8,0) já pré-aquecido em banho-maria a 65°C. Com o objetivo de minimizar os efeitos marcantes causados pela grande quantidade de compostos secundários presentes na espécie, que dificultam a obtenção de DNA genômico puro de qualidade, aumentou-se a concentração de beta-mercaptoetanol a 5% e adicionou-se albumina bovina 2% (BSA) no tampão de extração.

Após encubar em banho-maria a 65°C durante 40 minutos com homogeneização suave a cada 10 minutos e resfriamento da mistura, foi adicionado 15 ml de solução de clorofórmio – álcool isoamílico na proporção de 24:1, seguida de nova homogeneização suave por 15 minutos.

A mistura foi centrifugada durante 15 minutos a 3.000 rpm e a fase aquosa transferida para outro tubo de 50 ml. Neste novo tubo com a fase aquosa foi realizada uma precipitação, com a adição de 1/10 do volume final de acetato de sódio 3M e duas vezes o volume de álcool 100% gelado. A mistura foi encubada a -20°C até o dia seguinte, quando foi centrifugada a 3.000 rpm durante 15 minutos. O precipitado obtido foi lavado três vezes em álcool 70% e depois seco em estufa a 37°C durante duas horas. Após seco, o DNA foi ressuscitado em 400 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA) e armazenado a -20°C.

O DNA extraído foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1%.

Sementes recém-germinadas sem a casca também foram usadas para a obtenção de um extrato de DNA menos oxidado, com menor quantidade de impurezas do que o obtido a partir de folhas através do mesmo procedimento de extração.

3.2 Clivagem com enzima de corte freqüente e seleção de fragmentos

A digestão do DNA genômico total foi realizada com a enzima de restrição *Sau3AI*, que reconhece o sítio GATC, de acordo com manual do fabricante (Promega Corp.). Inicialmente, a digestão foi testada com uma pequena quantidade da amostra de DNA genômico da espécie. Tendo a confirmação da eficiência de corte da enzima, por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, a reação foi realizada com quantidade maior, cerca de 5 ng de DNA, suficiente para produzir fragmentos em quantidade para ligação em vetor de clonagem.

Dois processos foram utilizados para a separação dos fragmentos de interesse, com tamanhos entre 500 – 1200pb. É importante ressaltar que a seleção de fragmentos com tamanho maior aumentam as chances de encontrar microssatélites, aumentando a área genômica avaliada, e facilitam a construção de iniciadores para os microssatélites a partir da região flanqueadora.

A reação de digestão foi transferida para uma coluna/filtro preenchida por resina *Sephacryl S-1000* (Amersham Pharmacia). A coluna e a resina foram lavadas com tampão de ligação da enzima T4 DNA ligase (66 mM Tris-HCl, 6,6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 150 mM NaCl) para se obter um melhor rendimento na etapa de ligação ao vetor de clonagem. A resina retém fragmentos e impurezas de baixo peso molecular em seus poros, incluindo fragmentos de DNA de tamanho inferiores a 500 pb. Os tamanhos dos fragmentos foram confirmados através de eletroforese em gel de agarose 1%, comparados com marcador de peso molecular λ /*HindIII* (Promega corp.).

A segunda estratégia desenvolvida consistiu na purificação dos fragmentos com os tamanhos desejados presentes em gel de agarose. Os fragmentos presentes na reação de digestão do DNA genômico total foram separados por eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (Promega corp.) 0,8% e os tamanhos desejados extraídos da agarose utilizando kit de extração *Wizard® SV Gel* segundo manual do fabricante.

3.3 Ligação dos fragmentos de DNA genômico ao vetor de clonagem

A amplificação plasmidial foi realizada com inserção do vetor a ser utilizado em bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes de linhagem TOPO10, posteriormente crescidas por incubação em agitador a 37°C por 18 horas, em meio LB com ampicilina. O procedimento de extração plasmidial por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) foi realizado com a cultura de crescimento bacteriano de 18 horas de incubação.

O vetor utilizado para clonagem dos fragmentos foi o pUC18 com sítio múltiplo de clonagem na região intragênica da beta-galactosidase (Figura 3). O vetor foi linearizado através de digestão enzimática com *Bam*H-I, reconhecidora de sítio G↓GATCC e desfosforilado com a enzima CIAP (*Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal*) de acordo com manual do fabricante (Promega Corp.) A desfosforilação previne futuro reanelamento das extremidades do plasmídeo durante reação de ligação. Indicativo da ocorrência da linearização do vetor por digestão enzimática foi obtido pela eletroforese em gel de agarose 1%.

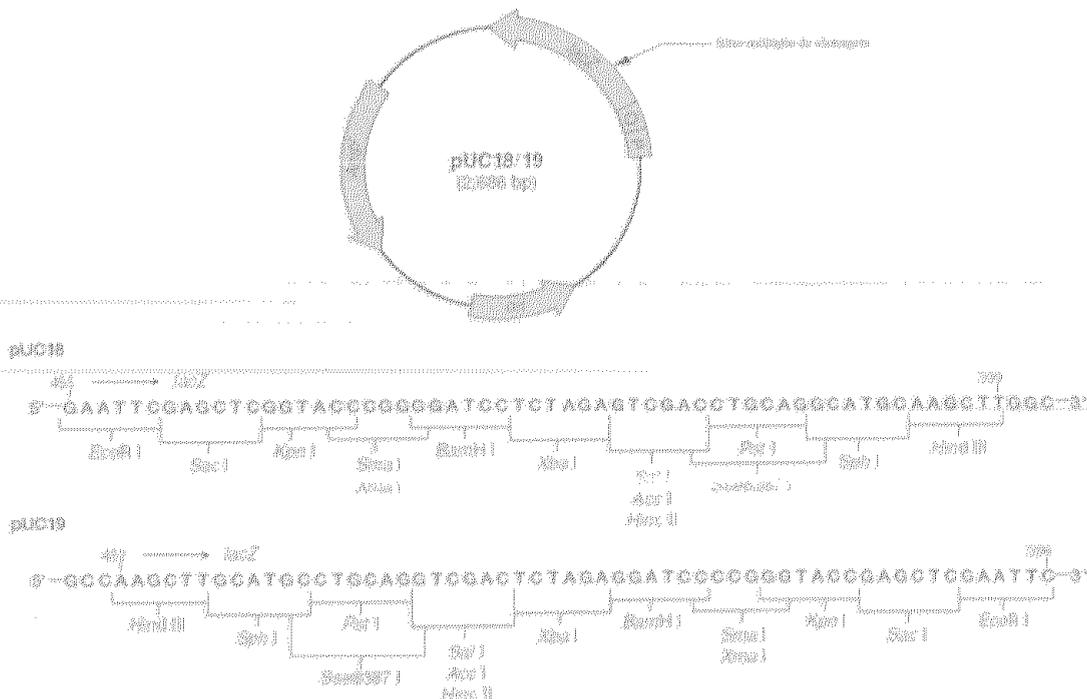


Figura 3: Vetor de clonagem pUC18, com representação das sequências presentes no sítio múltiplo de clonagem.

A ligação dos fragmentos selecionados do DNA genômico de *D. nigra* nos vetores digeridos e desfosforilados foi realizada pela reação com T4 DNA ligase, de acordo com manual do fabricante (Promega Corp.). A reação foi incubada em geladeira a 4°C por 24 horas. Após incubação, o produto foi precipitado, lavado em etanol 70% e ressuscitado em água, para posterior eletroporação em *E. coli*. O sucesso da ligação foi confirmado após transformação, extração do DNA plasmidial e amplificação através de reação de PCR. O sucesso foi definido através da proporção de clones que apresentavam insertos maiores que 500 pb.

3.4 Transformação bacteriana e seleção de transformantes com inserto

A transformação foi realizada em células bacterianas *E. coli*, linhagem TOPO10, preparadas para eletrocompetência. A preparação para eletrocompetência era conduzida por lavagem das células em glicerol 10% três vezes e ressuscitadas no próprio glicerol a um volume final de 50µl. O armazenamento era feito a -80°C (Sambrook *et al.*1989). A eletroporação foi feita em cubeta com 2µl do produto da ligação em 50µl de células eletrocompetentes, submetida a um pulso elétrico de 2 kVa no eletroporador *Micropulser* (BioRad). Adicionou-se imediatamente na cubeta 1 ml de meio 2XYT (5 g NaCl, 16 g bactotripton, 10 g de extrato de levedura, H₂O q.s.p. 1L, pH 7,5) e transferiu-se o conteúdo para tubo de 1,5 ml. Após incubação por 1 hora a 37°C, foi feita distribuição de 100 µl da cultura de crescimento em placas de petri com meio LB Agar (5 g de NaCl; 10 g de pepton; 5 g de extrato de levedura, 20 g de ágar; H₂O q.s.p. 1L; pH 7,5) com ampicilina (100 µg/ml). Em cada placa com meio LB Agar também foi adicionado 30µl de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galactopiranosídeo). As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas.

As colônias bacterianas obtidas que tinham os plasmídeos com fragmento de DNA inserido no sítio múltiplo de clonagem foram identificadas como colônias de cor branca, quando inoculadas em meio contendo X-gal. As colônias azuis apresentam capacidade de degradar X-gal e, portanto, não apresentam inserto em seus vetores, pois o sítio múltiplo de clonagem está exatamente dentro do gene da beta-galactosidase, que quebra X-gal.

Foram produzidas várias placas de cultura de colônias transformadas, para realização de uma grande amostragem de clones.

Colônias brancas foram coletadas aleatoriamente para confirmação da existência e dos tamanhos dos insertos nos vetores de clonagem. Para tal, após coleta individualizada de cada colônia em tubos com 1 ml de meio LB e incubados por 12 horas a 37°C, foi realizada a extração plasmidial por lise alcalina com detergente SDS 1% em cada tubo de cultura (Sambrook *et al.* 1989). Os clones obtidos foram testados quanto à presença de insertos pela amplificação por PCR, utilizando-se iniciadores universais M13 direto e reverso (F: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' e R: 5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'). O volume final da reação foi de 25 µl, com as seguintes quantidades de reagentes por reação: 25 a 50 ng de DNA molde, tampão de PCR IB (*Phoentria*) 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂), 100 µM de dNTPs, 5 pMoles de cada *primer*, 1U de Taq polimerase (*Phoentria*). As reações foram realizadas no termociclador PTC 100 (*MJResearch*) com os seguintes passos: 94°C (3 min), 94°C (30s), 58°C (30s), 72°C (30s), seguido por 25 ciclos de 94°C (30s), 54°C (30s), 72°C (30s) e finalmente 72°C (5 min). Os produtos da reação foram avaliados em gel de agarose 1%, comparados com marcador de peso molecular lambda *HindIII/EcoRI*.

3.5 Amostragem dos clones

Após confirmação positiva dos insertos com tamanhos superiores a 500pb, foram traçadas estratégias de amostragem dos clones em culturas, que perfizessem uma varredura genômica capaz de obter número significativo de clones com microssatélites (superior a 30).

Foram desenvolvidas duas estratégias para a construção de um conjunto de amostras dos clones. As colônias brancas foram coletadas e distribuídas em tubos individualizados de 1,5 ml, com 1 ml de meio de cultura LB (5 g de NaCl; 10 g de peptona; 5 g de extrato de levedura, 20 g de ágar, H₂O q.s.p. 1L; pH 7,5) com ampicilina (100 µg/ml), para realização de extração plasmidial por lise alcalina em pequeno volume, isolamento de vetores com diferentes insertos, em uma amostragem capaz de representar bem o genoma da espécie – uma biblioteca genômica primária tradicional. Com o propósito de aumentar a varredura genômica em uma quantidade menor de extrações plasmidiais realizadas, foram adicionadas mais de uma colônia branca por tubo de cultura em muitas coletas. Assim, as culturas com mais de uma colônia que apresentassem sinal positivo na hibridização

teriam que ser novamente transformadas e seus clones individualizados antes do seqüenciamento.

A extração dos plasmídios em número grande de amostras foi realizada por lise alcalina adaptada de Sambrook *et al.* (1989) para um volume menor de reagentes. Os tubos de 1,5 ml com meio de cultura, após coleta das colônias, foram incubados por 18 horas a 37°C, para crescimento bacteriano, e submetidos a centrifugação à 8000 rpm por cinco minutos, para precipitação das células e descarte do meio de cultura. Aos tubos foram adicionados 10 µl de solução I (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0) e o precipitado ressuspendido em agitador. Em seguida foi adicionado 10 µl de solução II (NaOH 0,2N, SDS 1%), considerada como solução de lise, e deixado em descanso por 10 minutos a 4°C. Após descanso foram acrescentados 10 µl de solução III (acetato de potássio 3M, 11,5% ácido acético glacial), que estava a -20°C. Os tubos foram mantidos em descanso a 4°C por 5 minutos e posteriormente centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada tubo produzido por centrifugação foi transferido para novos tubos e nestes tubos foram adicionados cerca de 60 µl de etanol 100% (duas vezes o volume transferido). Novamente deixados em descanso por cerca de 10 minutos, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Os tubos foram lavados uma vez com 100 µl de etanol 70%, centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos e secos a temperatura ambiente de um dia para o outro, antes de serem tampados e guardados em caixas a temperatura ambiente.

Uma segunda amostragem desenvolvida aumentou a varredura do genoma da espécie, com clones individualizados em placas de 96 espaços, perfazendo um total de 1.920 clones, em 20 placas. A cada poço de uma microplaca de 96 foi acrescentado meio 2XYT contendo ampicilina (100 µl/mL) e uma colônia branca coletada. As placas foram mantidas em agitador a 150 rpm na temperatura de 37°C por 18 horas. Posteriormente, cada placa foi submetida à extração plasmidial das células bacterianas crescidas em meio de cultura. Cada microplaca foi centrifugada por 9 minutos a 4000 rpm, para sedimentar as células e descartar o meio de cultura, adicionado a cada poço 80 µl de GET (20% de glicose filtrada, 0,5M EDTA pH 8,0 autoclavado, 1M Tris-HCl pH 7,4 autoclavado e H₂O q.s.p. 500ml) e a placa agitada para ressusensão das células. Todo o produto ressuspendido foi transferido para

uma nova placa de fundo redondo, contendo 2,5 µl de RNase (10 mg/ml) em cada poço da microplaca. Na nova placa foi adicionado 80 µl de NaOH 0,2N/ SDS 1% em cada poço. A placa foi selada, misturada por inversão trinta vezes e deixada em descanso por 10 minutos, sendo adicionado 80 µl de acetato de potássio 3M, a 4°C. Novamente, as placas foram misturadas por inversão trinta vezes. As placas foram incubadas em estufa a 90°C por 30 minutos e posteriormente resfriadas em gelo, para serem submetidas a centrifugação por 9 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços com filtro da *Milipore* e centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm, para que todo o volume atravessasse o filtro e caísse em outra microplaca de 96 poços de fundo em "V". Em cada poço da nova placa com o filtrado foi adicionado 100 µl de Isopropanol 100% gelado. As placas foram misturadas trinta vezes por inversão e centrifugadas por 45 minutos a 4000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados duas vezes com etanol 70% gelado e deixadas para secar a temperatura ambiente, de um dia para o outro, antes de serem seladas e guardadas em caixas, a temperatura ambiente.

3.6 Hibridização da biblioteca genômica com sonda radioativa complementar

As amostras em tubos foram ressuspendidas com 20 µl de solução tampão, composta por TE e 0,06% de Azul de Bromofenol, sendo todas as amostras da primeira biblioteca genômica primária, em tubos de 1,5 ml, aplicadas em membranas de *nylon*, em uma organização pré-determinada, para futura identificação dos clones positivos. A organização consistia em pontos de aplicação orientados por molde de PVC, em linha vertical de A até Z e 35 colunas de aplicação. O clone, então, era identificado posteriormente pela posição na membrana, consistindo primeiro pelo número da membrana em que se encontrava, letra correspondente à linha e número seguinte correspondente à coluna de aplicação. Por exemplo, o clone 4K13 se encontrava na membrana de hibridização 4, na linha K de cima para baixo, e na coluna 13 da linha K. O clone poderia ser melhor identificado através de sobreposição da membrana ao molde de aplicação. No canto inferior esquerdo das membranas eram aplicados controles positivos, que consistiam em produtos de amplificação de clones que sabidamente continham regiões de repetição.

A segunda biblioteca genômica, com clones em placas de 96 poços, tiveram suas amostras ressuspendidas com 60 µl de água MilliQ autoclavada, na expectativa deste material já se encontrar pronto para seqüenciamento. Os clones foram aplicados também em membranas de *nylon* e tendo um molde em PVC como guia. O molde era construído de acordo com a posição na placa, ou seja, linhas de A a H e colunas de 1 a 12. O clone era posteriormente identificado pela posição na placa. Por exemplo, BN4C9 representa o clone da biblioteca nova (BN) que se encontra na membrana de aplicação 4, na linha C e na coluna 9.

Após aplicação nas membranas de *nylon*, estas eram submetidas à radiação ultravioleta de alta intensidade para a fixação dos clones na membrana, antes da hibridização.

A identificação dos clones positivos para temas microssatélites, a partir da biblioteca genômica de *D. nigra*, foi realizada por hibridização com oligos de seqüências específicas com repetições de 2-4 nucleotídeos marcados radiativamente. A tabela 1 apresenta a lista de temas de oligonucleotídeos construídos para marcação radioativa para a hibridização, todos com 8 repetições em *tandem*. Estes oligonucleotídeos foram marcados em sua extremidade 5' com gama-32P|ATP deoxicidina (10 mCi/mL - *GE Healthcare*), por meio de reação realizada com a enzima quinase polinucleotídeo T4, de acordo com protocolo da enzima (*Promega Corp.*)

Tabela 1: Temas de oligos para microssatélites

Tetra	Tri	Di
GATA	ATG	CA
TATC	AAC	CT
GACA	GAA	TA
GGAT	AAT	
TATT	TAG	
TACT	CAC	
GCTA	CAT	
GTCA		
CGGA		
CCGT		
GAGG		
GATT		
CATG		
CCAG		
CGTA		
CTTG		
CAGC		
TATG		
TAGT		
AAGT		

Primeiro passo antes da hibridização com os oligos marcados radiativamente, as membranas foram pré-hibridizadas, por lavagem com solução BLOTO (leite em pó desnatado 5%) e SSC 6X (NaCl 0,9 M, Citrato de Sódio 0,09 M) durante 18 horas a 50°C, para o bloqueio das mesmas. Após a pré-hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes em SSC 6X e SDS 0,1%. A hibridização foi realizada com os oligonucleotídeos marcados radiativamente em solução SSC 6X e SDS 1%, as membranas mergulhadas e viradas com frequência de três vezes durante 14 horas. Após hibridização, foram realizadas lavagens da membrana de controle de estringência, utilizando-se concentrações cada vez mais fracas de sal (SSC 5x, 3x, 2x) e aumentando-se a temperatura (50°C, 55°C e 60°C) (Sambrook *et al.* 1989).

As membranas, após hibridização, foram expostas em tempos variados a filmes radiográficos de 35 x 43 cm (Kodak T-Mat G/RA) dentro de cassetes apropriados em sala escura que, ao serem reveladas, mostraram a localização exata dos clones positivos (aqueles com presença de microssatélites) na membrana. Diferentes tempos de exposição ao filme radiográfico e variações no grau de estringência possibilitam definir com maior confiança o sinal como sendo positivo. Estes clones foram identificados por sobreposição com o molde de aplicação e resgatados da biblioteca genômica. Ainda para a confirmação dos sinais positivos, os clones identificados na primeira análise foram aplicados e nova membrana e submetidos a nova hibridização, com os mesmos oligonucleotídeos marcados radiativamente. Do resultado de confirmação, foram definidos os clones positivos a serem seqüenciados, por ordem de força do sinal.

3.7 Isolamento e identificação do clone positivo presente em culturas com mais de um clone

Clones positivos confirmados e classificados com sinal forte na autoradiografia e que estavam contidos em tubos com mais de um clone tinham que ser separados e identificados antes do seqüenciamento. Os tubos foram amostrados com mais de um clone por tubo na tentativa de aumentar a amostragem do genoma da espécie, com a realização de menos extração plasmidial, considerando que os vegetais apresentam menos microssatélites do que outros taxos (Zane *et al.* 2002).

Para tal, foi necessária uma nova transformação do material do tubo em *E. coli* TOP 10 eletrocompetente. A partir da placa de cultivo das colônias derivadas da nova transformação em meio seletivo, foram coletadas colônias brancas aleatoriamente, na proporção 2:1 em relação ao número de clones presentes no tubo. Assim, para tubos que continham dois clones, eram coletadas 4 colônias para extração plasmidial, para tubos que continham 3 clones, eram coletadas 6 colônias para extração plasmidial, e assim sucessivamente. Estas proporções tinham o objetivo de aumentar a chance de coletar colônias que continham os clones diferentes presentes no tubo inicial.

Três procedimentos foram adotados para a identificação dos diferentes clones presentes em um mesmo tubo:

1. Identificação por comparação dos tamanhos dos *amplicons*, produzidos por PCR dos clones;
2. Identificação pelos diferentes bandeamentos dos plasmídios produzidos por eletroforese em gel de agarose;
3. Identificação dos clones positivos por uma nova hibridização com sonda radioativa após separação por *mini-prep* em placas de 96 poços.

No primeiro procedimento, os clones foram amplificados por PCR em reações contendo 25 a 50 ng de DNA molde, tampão de PCR IB (*Phoentria*) 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂), 100 µM de dNTPs, 5 pMoles de *primer* M13 direto e reverso, 1U de Taq polimerase (*Phoentria*). Os *amplicons* gerados eram separados em gel de agarose por eletroforese e comparados quanto ao tamanho em relação ao marcador molecular λ Hind III/EcoRI (*Promega*). *Amplicons* com mesmo tamanho eram considerados como oriundos do mesmo clone coletado na primeira biblioteca. Por exemplo, um tubo que apresentava inicialmente dois clones era amostrado em 4 clones indistintos após nova transformação. Desta nova amostragem, espera-se encontrar dois *amplicons* de tamanhos diferentes através da PCR dos quatro clones isolados da nova transformação.

A segunda estratégia consistia em comparar os diferentes padrões de bandeamento produzidos pelos plasmídios quando separados por eletroforese em gel de agarose 1%. Sabe-se que os plasmídios, pela constituição circular da

molécula de DNA, podem formar diferentes estados topológicos, o que resulta em mais de uma banda no gel. Insetos de tamanho diferentes podem, então, produzir diferentes padrões de bandeamento quando inseridos no mesmo vetor de clonagem. Esta regularidade foi observada durante as primeiras identificações de clones indistintos realizadas no primeiro procedimento, comparado com o padrão de separação por eletroforese produzidos pelos plasmídios em gel de agarose 1%. Este procedimento tinha como objetivo identificar o maior número possível de diferentes clones eliminando a necessidade de PCR de todos os vetores. Mais rápido e menos oneroso.

A terceira estratégia foi traçada para a identificação de clones positivos em tubos que continham mais de dois clones. Para tubos com 3 e 4 clones, a realização de extração plasmidial em tubos individuais para cada amostragem de nova transformação era extremamente laboriosa. Para tal, foram realizadas extração plasmidial em placas de 96 poços das colônias coletadas, com a adição de seis colônias da mesma transformação nas mesmas linhas da placa.

A extração plasmidial foi desenvolvida como descrita na construção da segunda biblioteca genômica da espécie, em placas de 96 poços.

Os clones extraídos foram aplicados em membrana de *nylon* com molde análogo à distribuição em uma placa de 96 poços e submetidos à hibridização com sonda radiativa, como já descrito. Aqueles que apresentavam sinal positivo na membrana eram submetidos a seqüenciamento para identificação do microssatélite. Quando havia mais de um sinal positivo para o mesmo clone, era seqüenciado apenas um clone isolado na placa.

3.8 Seqüenciamento dos clones positivos e construção de consensos

Após a identificação e isolamento dos clones positivos presentes em tubos com mais de um clone, estes foram submetidos a seqüenciamento utilizando-se *ET Kits* (*DYEnamic ET Terminator Dye - GE Healthcare*). Cerca de 150 ng de DNA plasmidial e 5 pmoles de iniciadores M13 (-20) direto foram utilizados na reação de amplificação por PCR com 4 µl de *ET Kit* e volume final de 10 µl, completado com água deionizada estéril. As reações foram feitas em placas de 96 poços. A reação de seqüenciamento foi realizada com um programa de 30 ciclos de 95°C (20s), 55°C (15s), 60°C (80s). Após a reação de PCR, o DNA amplificado foi precipitado

adicionando-se 1 μ l de acetato de amônio e 30 μ l de etanol absoluto a cada um dos poços. As placas de seqüenciamento foram agitadas e incubadas por 20 min a temperatura ambiente e protegidas da luminosidade com papel laminado. Após a incubação, as placas foram centrifugadas por 45 min a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado. A cada um dos poços foram adicionados 150 μ l de etanol 70%, sendo o sobrenadante descartado após a centrifugação da placa por 10 min a 4000 rpm. Após 20 min de repouso para total evaporação do álcool o precipitado obtido foi ressuspenso em 10 μ l de *loading buffer* (GE Healthcare) e levados ao seqüenciador automático de 96 capilares *MegaBace* (GE Healthcare).

Todas as outras seqüências de clones positivos, inclusive as que não tiveram microssatélites identificados, tiveram suas seqüências comparadas com outras conhecidas e depositadas em banco de dados *on-line*, através do programa BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul *et al.*, 1990), mais especificamente, pelo BLASTn (comparação nucleotideo-nucleotideo) no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Quando o seqüenciamento do clone identificava o microssatélite e produzia seqüência com tamanho suficiente para a determinação das regiões flanqueadoras apenas utilizando o iniciador M13 direto, mais duas seqüências com o mesmo iniciador M13 direto eram produzidas, para a construção de consenso.

Quando o microssatélite não era identificado em um clone positivo no seqüenciamento com iniciador M13 direto e quando julgado necessário, era realizado o seqüenciamento do clone da mesma forma descrita, variando no caso o iniciador reverso M13 (-20), para atingir toda a região do inserto. As seqüências produzidas com iniciadores M13 direto e reverso eram comparadas com o tamanho do inserto do clone, determinado por PCR, para averiguar se abrangia toda a região existente.

Seqüências consenso foram produzidas para clones que tinham microssatélites e regiões flanqueadores com tamanho suficiente para a construção de iniciadores específicos. Cada iniciador possui em torno de 20 pares de bases. Foi utilizado os programas Phred v. 0.20425 (Ewing e Green 1998, Ewing *et al.* 1998), Phrap v. 0.990319 (<http://www.phrap.org/>) e Consed 12.0 (Gordon *et al.* 1998) para a determinação da qualidade das seqüências produzidas e construção dos consensos através de alinhamento das várias seqüências do mesmo clone. Foi tomado o cuidado de conferir a retirada das seqüências pertencentes ao vetor de clonagem.

3.9 Desenho dos iniciadores para os loci microssatélites identificados

Para o desenho de iniciadores complementares a cada região flanqueadora das seqüências dos microssatélites foi utilizado o programa disponível gratuitamente na internet (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), chamado Primer 3 (Whitehead Institute of Biomedical Research). No desenho dos iniciadores, alguns critérios rigorosos foram definidos, para tentar evitar a amplificação de produtos inespecíficos, entre eles: temperatura média de anelamento de 52 a 68°C, diferença máxima de 3°C na temperatura de anelamento entre cada iniciador do par; conteúdo de GC entre 40 e 60%, ausência de complementaridade entre os pares de iniciadores. Outro dado interessante a ser destacado é o tamanho esperado do produto da PCR pela utilização dos iniciadores construídos. Os locos que apresentaram tamanhos semelhantes de produto de amplificação, com temperaturas próximas de anelamento podem ser utilizados na proposição de multiplex, por meio da ligação dos iniciadores construídos a diferentes marcadores fluorescentes para cada loco. A leitura dos alelos em mais de um loco seria feito em seqüenciador automático de 96 capilares *MegaBace* (GE Healthcare), possibilitando a análise de vários locos em vários indivíduos em uma única placa de 96 poços.

Outra possibilidade é conjugar locos com tamanhos de produto de amplificação distintos que apresentam mesma temperatura de anelamento para a construção de multiplex. Assim, pode-se realizar uma única reação de amplificação para mais de um loco e análise do polimorfismo em um mesmo gel de poliacrilamida. Entretanto, neste caso, é necessário analisar primeiro se há sobreposição de alelos de diferentes loci para a viabilização do multiplex.

4. RESULTADOS

4.1 Extração de DNA genômico e seleção de fragmentos com tamanhos de interesse (500 – 1200 pb)

A extração de DNA genômico de a partir de sementes germinadas de *D. nigra* resultou em uma amostra íntegra, ao ser observado em gel de agarose 1%. Entretanto, o material da extração de folhas apresentou-se visualmente escuro, provavelmente resultante de oxidação devido a compostos secundários ou excesso de pigmentos restantes da extração. A extração realizada a partir de sementes germinadas não apresentou aspecto escuro e o DNA estava íntegro ao ser analisado em gel de agarose 1%. Ambas as amostras foram testadas quanto à digestão com enzima de restrição *Sau3AI* e foram eficientemente digeridas. A Figura 4 mostra a digestão do DNA das sementes germinadas confirmada em gel de agarose 1%.

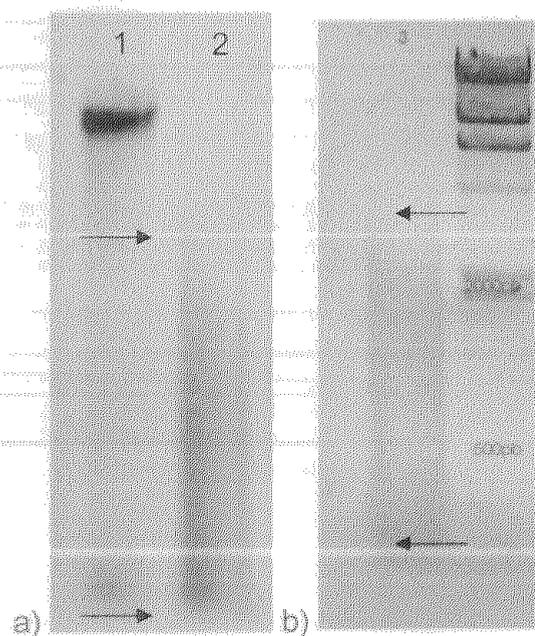


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1% contendo: a) Na canaleta 1, DNA genômico de *D. nigra*, extraído a partir de sementes germinadas. Na canaleta 2, mesmo DNA genômico digerido com enzima *Sau3AI*. b) canaleta 3, fragmentos produzidos por digestão, comparados com peso molecular lambda *HindIII*. Setas indicam região dos fragmentos produzidos.

Para a seleção de fragmentos de interesse, a estratégia baseada em limpeza do produto da digestão em coluna de *Sephacryl-1000* não foi satisfatória. A amostra foi aplicada até três vezes na coluna com a resina e durante o processo apresentou

grande perda de material e pequena quantidade de fragmentos de interesse, permanecendo fragmentos de baixo peso molecular (Figura 5).

O processo de seleção de fragmentos a partir de corte do trecho com o tamanho de interesse diretamente do gel de agarose *low melting* 0,8% e posterior extração com Kit *Wizard® SV Gel* (PROMEGA corp.) apresentou os fragmentos com tamanho de interesse (Figura 6). Esta amostra selecionada com o kit foi utilizada na ligação com o vetor e construção da biblioteca genômica primária.

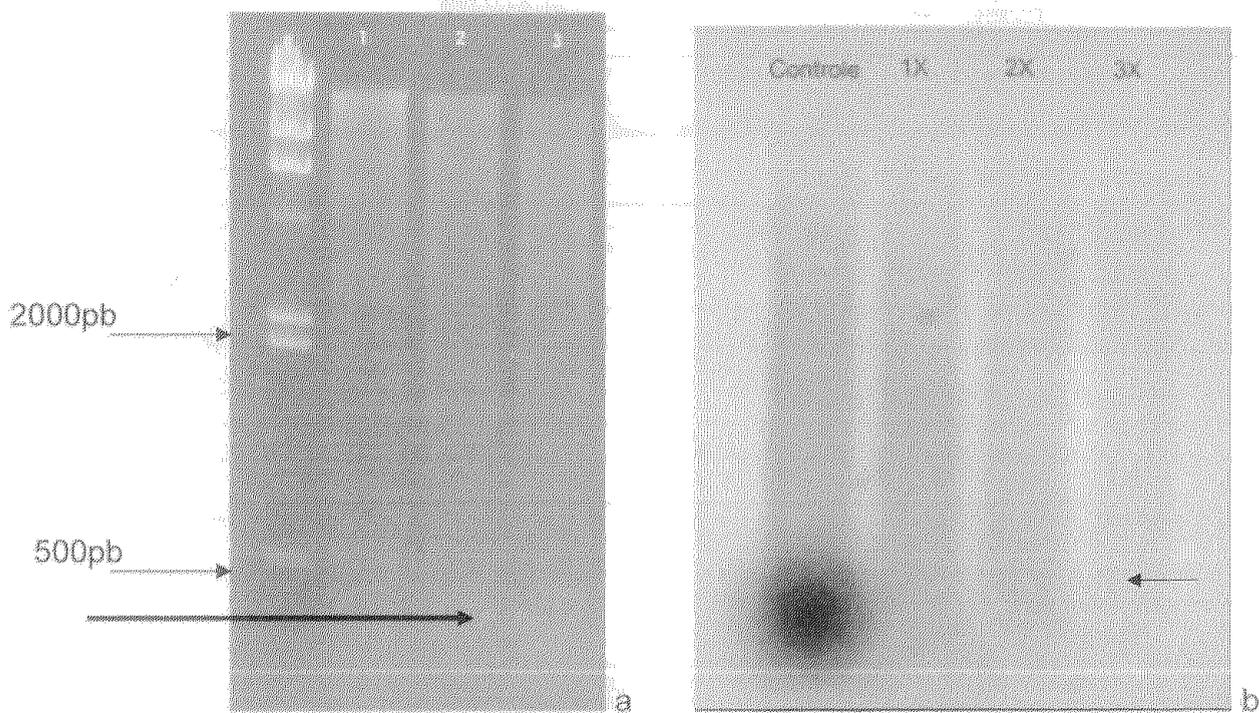


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1% contendo: a) Marcador molecular λ *HindIII/EcoRI*. Coluna 1 - Controle, com DNA genômico total digerido. 2 - solução de digestão passada uma vez em resina *Sephacryl-1000*. 3 - Solução passada pela segunda vez em resina. Seta maior indica excesso de fragmentos inferiores a 500pb. b) Amostra passada na resina até três vezes. Notar a considerável perda de material. Não há indicação do peso molecular. Entretanto, em até 3X na coluna ainda pode-se notar fragmentos pequenos, indicados na seta, que provavelmente são inferiores a 500pb.

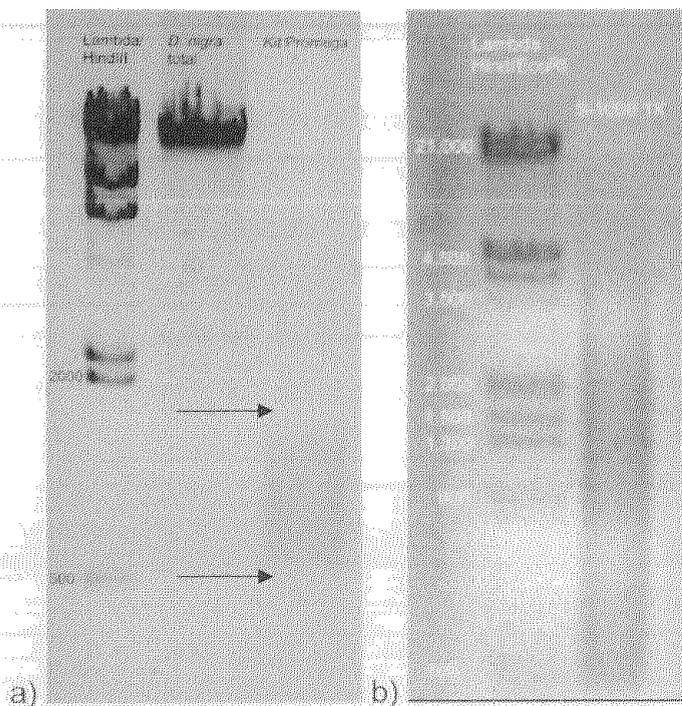


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídio. a) Com fragmentos extraídos de gel *Low-melting* 0,8% com o kit *Wizard® SV Gel* (Promega corp.), indicado pelas setas. b) Material não purificado em coluna de *Sephacryl-1000*.

O vetor de clonagem foi digerido com a enzima *Bam*HI e posteriormente desfosforilado, o que aumenta a eficiência de ligação. A Figura 7 apresenta o gel de agarose 1%, com a indicação de ocorrência de digestão do vetor, na canaleta 2.

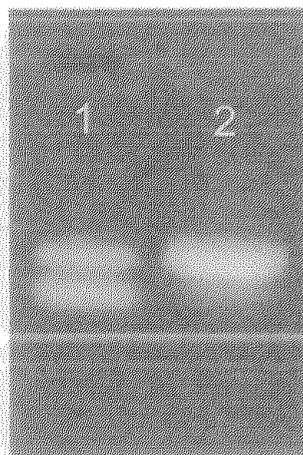


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% com indicativo da digestão do vetor de clonagem pUC18 por enzima de restrição *Bam*HI. Na canaleta 1, vetor pUC18 não digerido. Canaleta 2, pUC18 digerido com *Bam*HI e desfosforilado.

4.2 Ligação e confirmação da transformação pelo sistema IPTG/X-gal

Após a transformação de células eletrocompetentes com a reação de ligação dos fragmentos com vetor de clonagem previamente preparado, amostras aleatórias de colônias brancas foram confirmadas quanto à presença e tamanho dos insertos. Em duas amostragens, perfazendo um total de 34 colônias brancas amplificadas, foram obtidos 21 insertos com tamanhos aproximados ou superiores a 500pb, o que corresponde a 62% da amostra (Figuras 8 e 9).

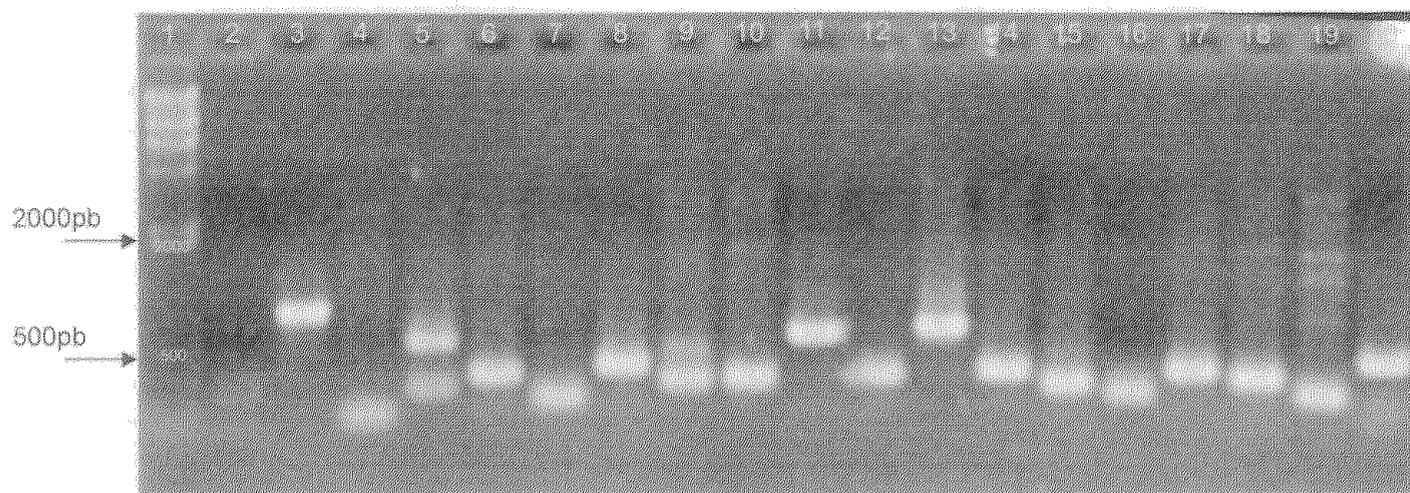


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% com PCR da primeira amostragem de colônias brancas coletadas aleatoriamente a partir da seleção IPTG/X-gal. Canaleta 1 – Marcador de peso molecular λ HindIII; 2 – Controle Negativo; 3 – Controle Positivo; 4 a 20 – Clones.

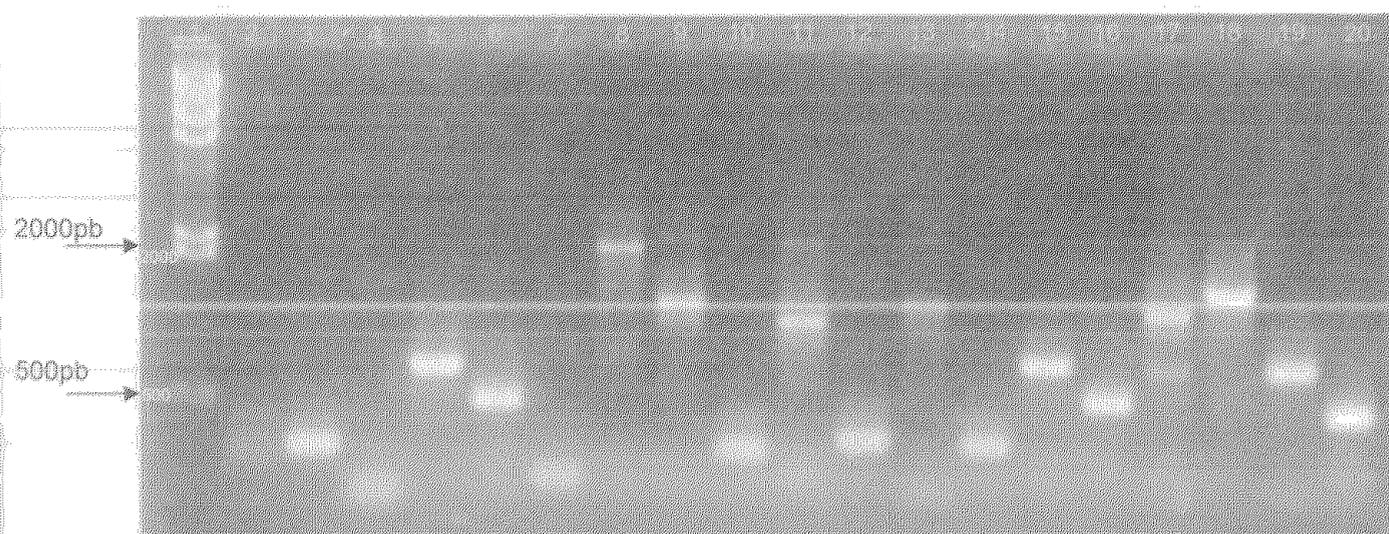


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose com PCR da segunda amostragem de colônias brancas coletadas aleatoriamente a partir da seleção IPTG/X-gal. Canaleta 1 – Marcador de peso molecular λ HindIII; 2 – Controle Negativo; 3 – Controle Positivo; 4 a 20 – Clones.

4.3 Hibridização com sonda radioativa

As Figuras 10 e 11 apresentam as auto-radiografias das membranas de hibridização lavadas em diferentes graus de exstringência e expostas em diferentes tempos, para melhor visualização e confirmação dos clones positivos. Alguns exemplos de clones positivos trabalhados posteriormente estão circulados. As figuras 12 e 13 representam as auto-radiografias produzidas com a confirmação do sinal positivo dos clones selecionados a partir da primeira análise da primeira hibridização. Nessas, podemos selecionar os clones positivos mais confiáveis para o sequenciamento.

Durante a construção da primeira biblioteca genômica, mais de uma colônia foi coletada por tubo, na tentativa de aumentar a amostragem de clones da espécie. Assim, a porcentagem de clones positivos pode estar subestimada, pela possibilidade de haver mais de um clone positivo em um tubo. Entretanto, mesmo considerando esta situação, foi obtida uma baixa porcentagem de clones positivos, perfazendo um total de 1,5% de toda a biblioteca (Tabela 2). Apenas 260 clones estavam individualizados nos tubos e, nesta baixa amostragem, foi obtido um valor próximo de clones positivos (1,54%) em relação ao total.

Na segunda biblioteca genômica, construída em placas de 96 canaletas, com clones individualizados, foram isolados 1.920 clones. Desta biblioteca foram identificados 64 clones considerados como positivos fortes e 65 clones positivos com sinal médio. Assim, obteve-se cerca de 6,72% de clones positivos a partir dessas membranas. É importante destacar que o valor obtido foi superestimado, com o propósito de abranger ao máximo os clones analisados, na expectativa de aumentar o número de temas SSR identificados a partir do sequenciamento.

Tabela 2 - Resultado da triagem com sondas radioativas na primeira biblioteca de *D. nigra*.

	1 clone/tubo	2 clones/tubo	3 clones/tubo	4 clones/tubo	Total
Spots na membrana	260	1365	2985	348	4958
Total de clones	260	2730	8955	1392	13337
Clones positivos	4	51	121	14	190
% de clones positivos	1,54	1,86	1,35	1,01	1,5

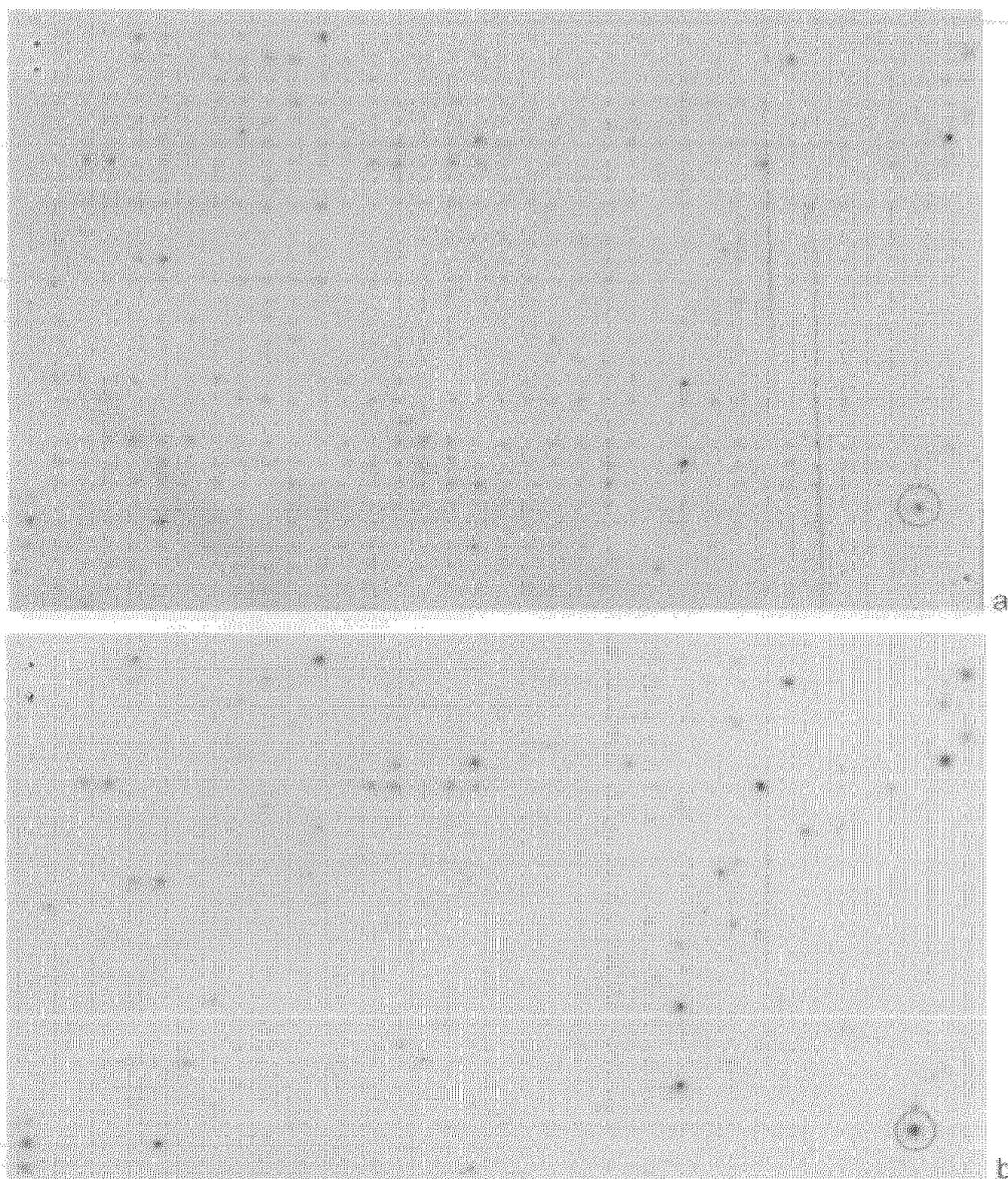


Fig. 10 – a) Autoradiografia da membrana 2 lavada com SSC 6X a 37°C e exposta ao filme durante 14 horas. b) Autoradiografia da mesma membrana 2, agora lavada em SSC 5X a 48°C e exposta ao filme durante 48 horas. O clone positivo 2V34 está circulado em vermelho. No canto inferior esquerdo, controle positivo aplicado à membrana.

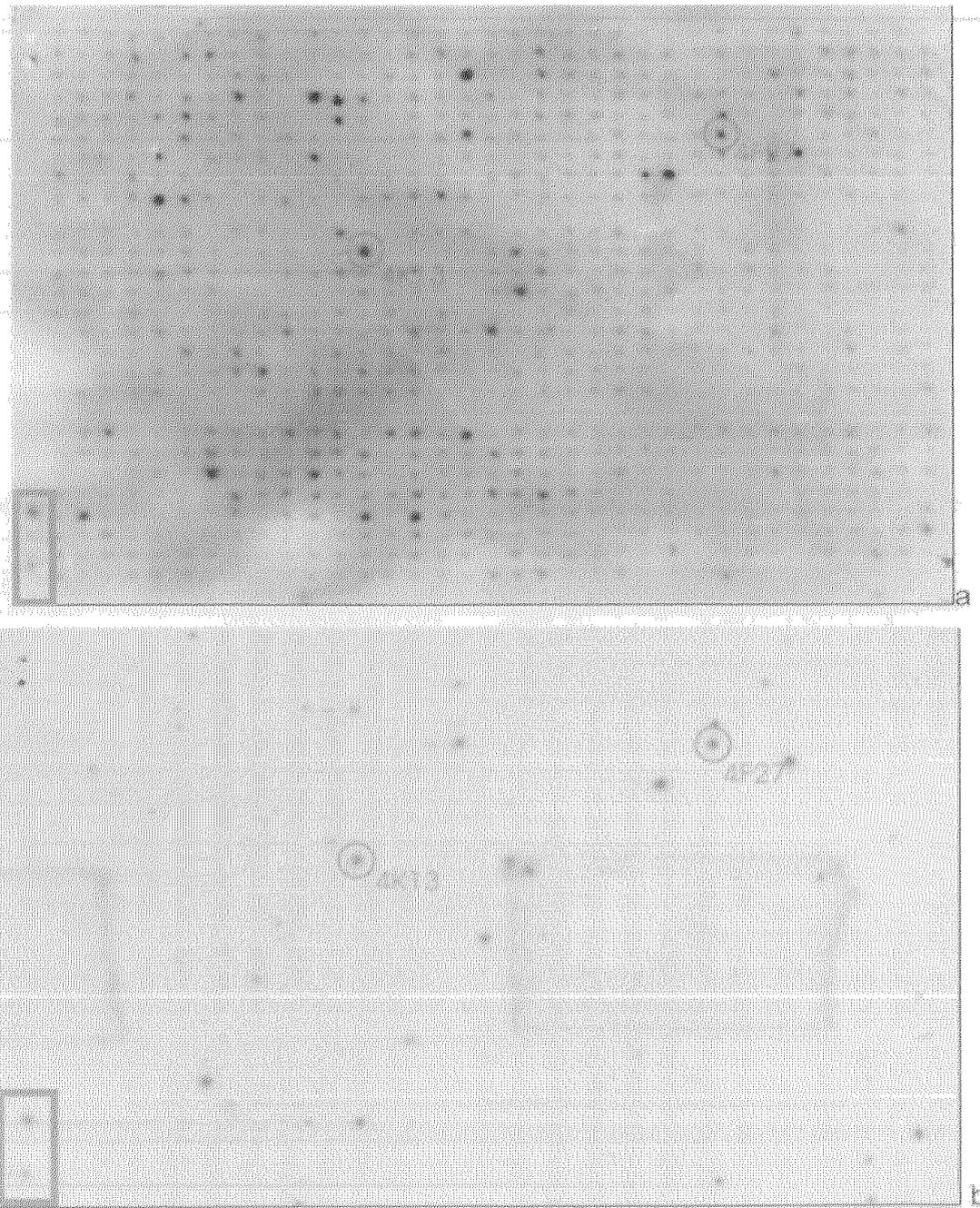


Fig. 11 – a) Autoradiografia da membrana 4 lavada com SSC 6X a 37°C e exposta ao filme durante 14 horas. b) Autoradiografia da mesma membrana 4, agora lavada em SSC 5X a 40°C e exposta ao filme durante 48 horas. Os clones positivos 4F27 e 4K13 estão circulado em vermelho. Em destaque, no canto inferior esquerdo, controles positivos aplicados à membrana.

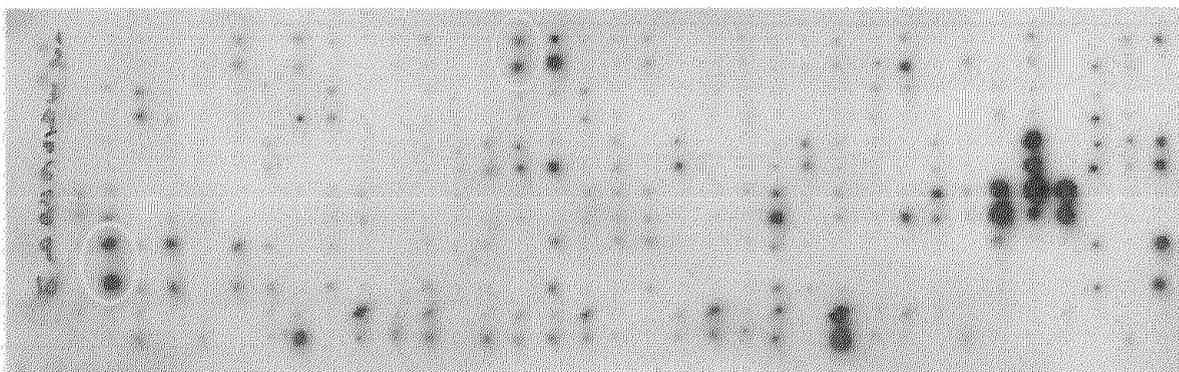


Figura 12: Autoradiografia da membrana de confirmação de clones positivos lavada com SSC 5X a 50°C, exposta ao filme por 24hrs. Circulados em amarelo, dois exemplos de clones confirmados, 4K13 e 1Q24, aplicados em duplicata de cima para baixo.

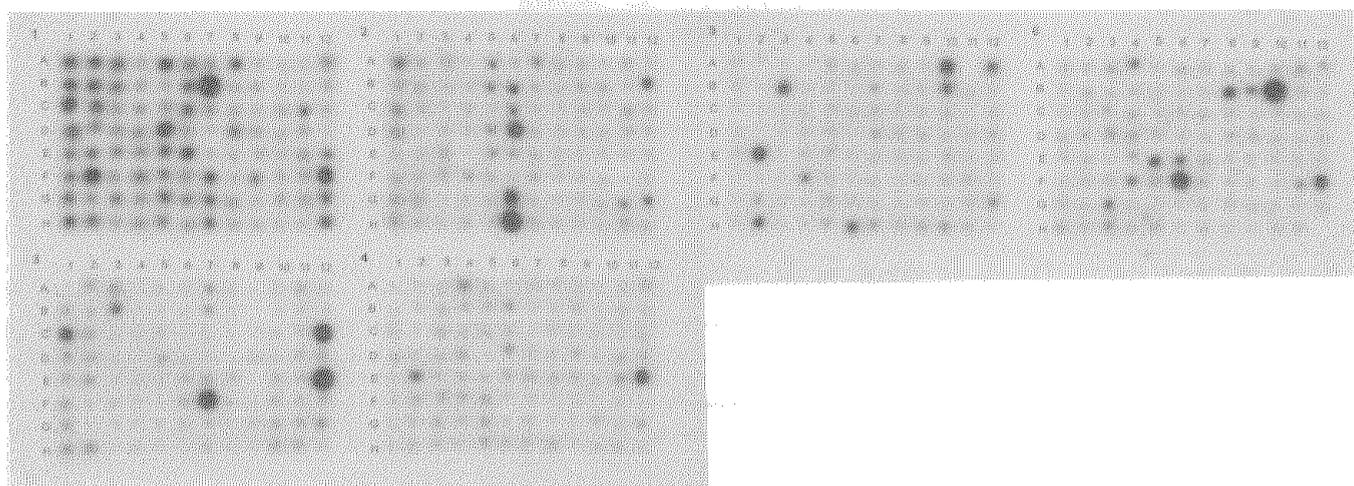


Figura 13: Auto-radiografia da membrana de confirmação de clones positivos, lavada com SSC 5X a 40°C, exposta ao filme por 72hrs. Os clones confirmados nesta membrana foram obtidos a partir da segunda biblioteca construída. Clones de A1 até H6 da primeira membrana apresentam resultado duvidoso, provavelmente devido a erro durante aplicação dos clones na membrana.

4.4 Isolamento do clone positivo presente em tubos com mais de um clone

Considerando o resultado da hibridização da primeira biblioteca, descrito na Tabela 2, podemos observar que o número de clones positivos obtidos a partir de tubos com clones individualizados, quatro ao todo, não atinge a quantidade de SSRs necessários para trabalhos com estes marcadores. Assim sendo, diferentes estratégias de isolamento do(s) clone(s) positivo(s) presente(s) em tubos com mais de um clone tiveram que ser desenvolvidas, para aumentar a amostragem de clones a serem seqüenciados.

A figura 14 apresenta o resultado da separação dos clones presentes no tubo 4K13, que continha dois clones. Depois de ter sido retransformado e cultivado em

meio seletivo, quatro colônias independentes foram isoladas para mini-prep. O DNA resultante foi submetido a PCR e os produtos obtidos foram separados em gel de agarose. A eletroforese resultante sugere que o primeiro e o último clones no gel são o mesmo e os dois presentes no meio correspondem ao outro clone do tubo 4K13, pela comparação dos tamanhos, como pode ser visto na figura 14. Ambos os clones apresentam um tamanho de inserto superior a 500pb. O primeiro e o segundo clones foram seqüenciados, para identificação do microssatélite.

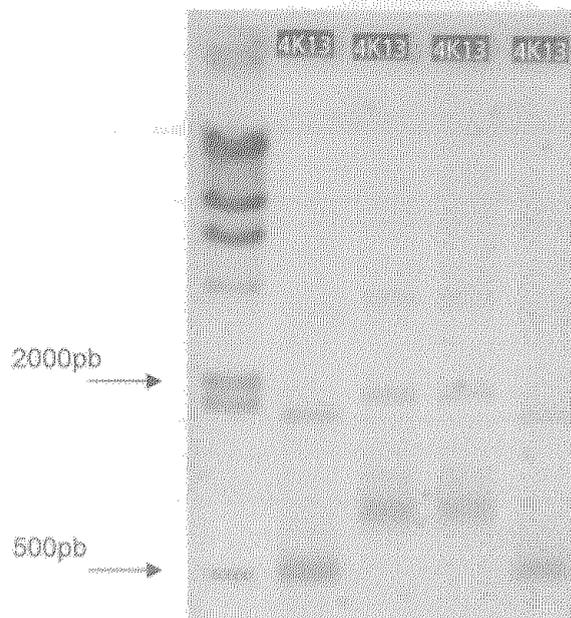


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídio, apresentando os produtos da amplificação de quatro clones isolados da retransformação realizada do tubo 4K13.

A figura 15 mostra os resultados da aplicação da mesma estratégia de separação dos clones presentes em outros tubos. Os tubos 4U7, 4C35, 4K19 e 4D12 puderam ter seus clones separados em dois clones distintos. Os outros clones apresentaram insertos com os mesmos tamanhos, o que impossibilita a distinção. Provavelmente são produtos do mesmo clone do tubo e a amostragem feita a partir da coleta de quatro colônias na placa não conseguiu abranger os dois clones presentes em um único tubo.

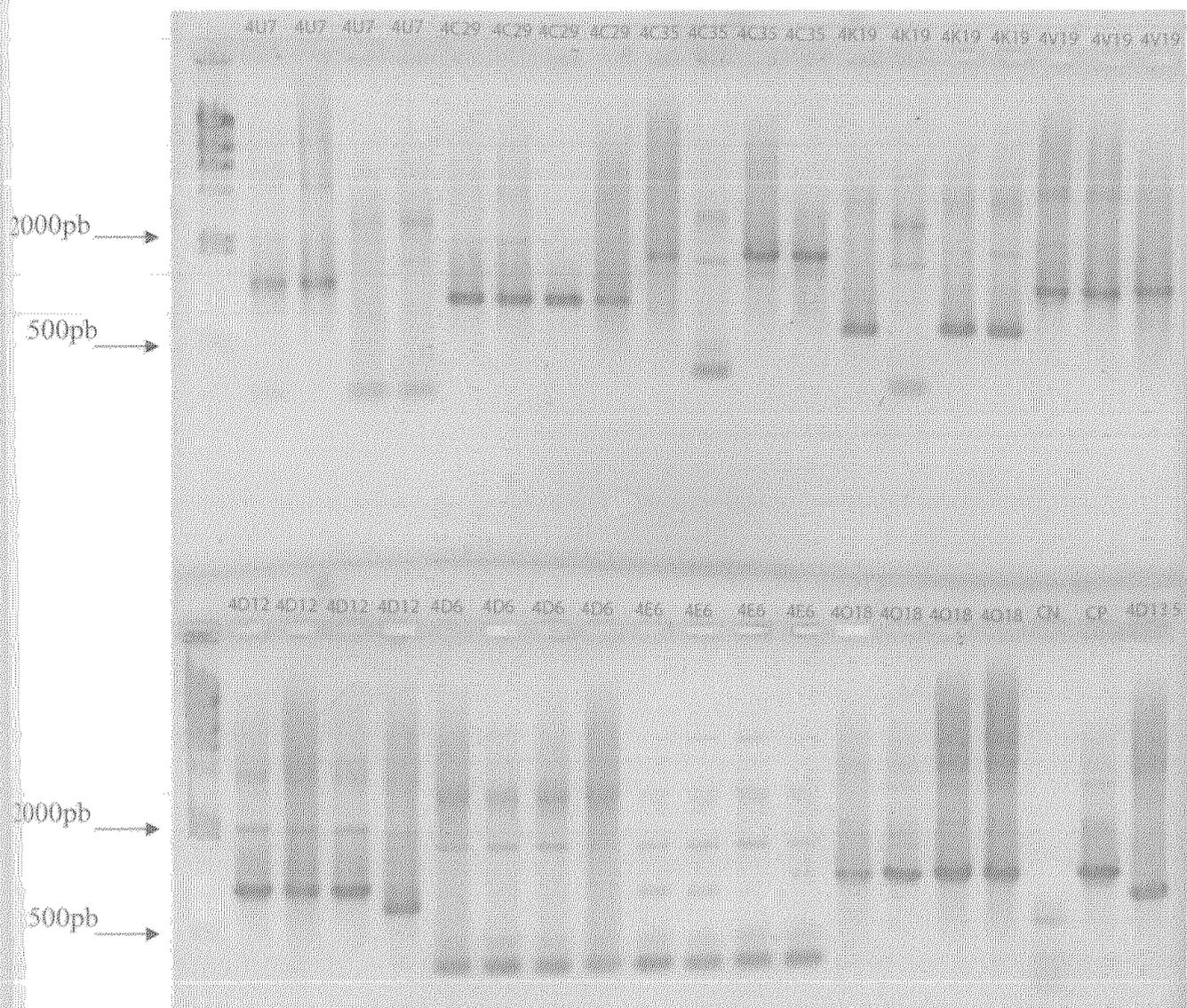


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídio, apresentando os produtos da amplificação de quatro clones isolados dos tubos 4U7, 4C29, 4C35, 4K19, 4V19, 4D12, 4D6, 4E6 e 4O18. Observe que a estratégia não conseguiu separar os dois clones do tubo em todos os casos.

A mesma estratégia ainda foi utilizada na separação de outros clones positivos de tubos que continham mais de um clone. Entretanto, a estratégia se mostrou extremamente laboriosa, com baixo rendimento para o grande número de tubos a serem analisados. A necessidade de analisar o maior número de clones possível em um período de tempo mais curto exigiu a simplificação do sistema.

Durante a quantificação dos clones em gel de agarose 1%, foi observado que os plasmídeos apresentavam padrões de bandeamento diferentes, quando apresentavam insertos de tamanho diferentes. Tal observação era feita com a comparação dos produtos de PCR e os vetores separados em gel de agarose. A

figura 16 apresenta a comparação feita entre os plasmídeos purificados de quatro colônias distintas da retransformação do tubo 4K13, separados em gel de agarose. Note a mesma diferenciação a partir da figura 14, que mostra os produtos de PCR dos insertos presentes nos mesmos vetores.

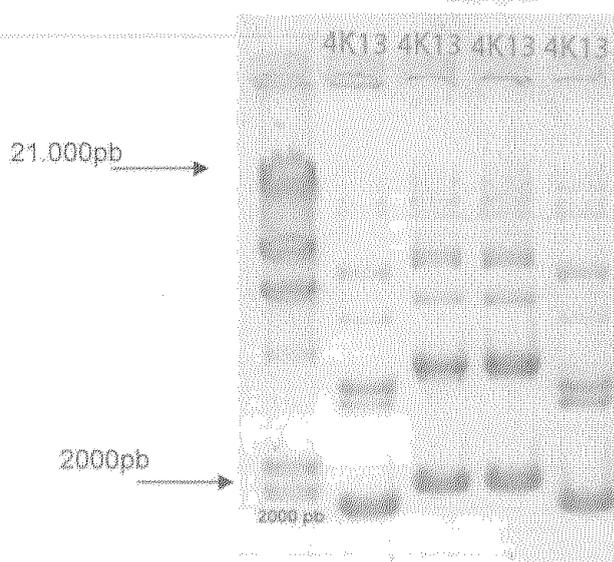


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídio apresentando a separação em eletroforese dos plasmídeos isolados das quatro colônias amostradas durante isolamento dos clones do tubo 4K13.

O mesmo procedimento de separação dos clones foi adotado em outros clones, tomando o cuidado em observar se a mesma situação se aplicava em casos já conhecidos de tamanho do inserto e distinção entre os clones do tubo, através de PCR. A figura 17 mostra a separação realizada em outros tubos com mais de um clone por tubo. Observe que nem todos os casos foram possíveis de distinguir mais de um clone por tubo, apresentando o mesmo padrão de bandejamento.

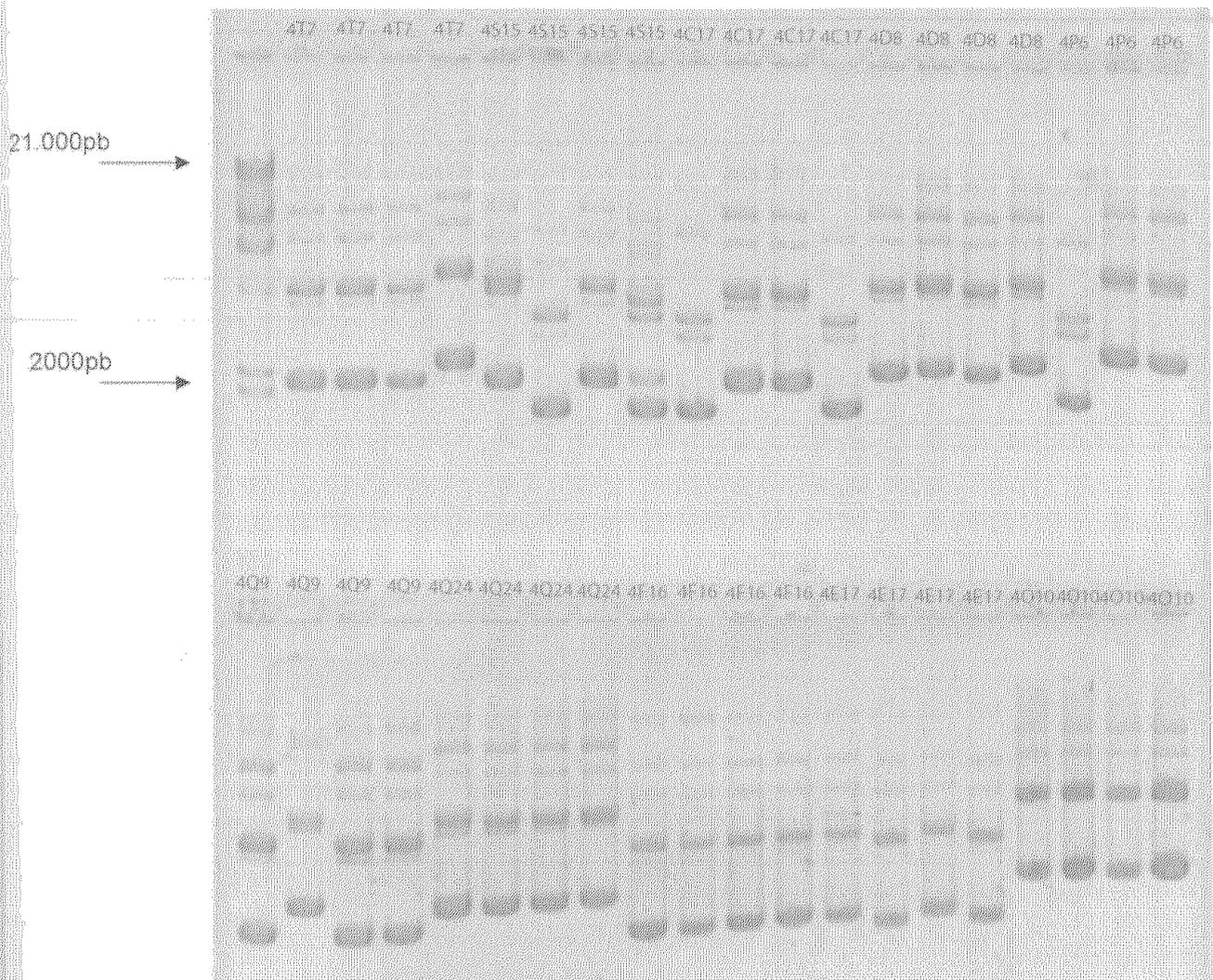


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídio, apresentando a separação dos plasmídeos isolados das quatro colônias amostradas durante isolamento dos clones das culturas mistas com clones positivos. Todos os casos da figura continham dois clones por tubo.

As estratégias acima se mostravam muito trabalhosas para a separação dos clones presentes em tubos com mais de dois clones. Para o isolamento dos clones em tais tubos, 3 ou 4 clones por tubo, era necessário uma amostragem muito grande para realmente separar os clones contidos, um volume muito grande de mini-preps em tubos e muitas reações de PCR. Assim, clones positivos que apresentavam mais de dois clones por tubo foram separados em placas de 96 canaletas, para posterior aplicação em membrana de *nylon* e nova hibridização com sondas radioativas. Clones com sinal positivo eram, então, seqüenciados.

Tabela 3 – Distribuição das amostragens de clones na placa 3, para separação dos clones presentes em mais de dois em um único tubo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3F22	3F22	3F22	3F22	3F22	3F22	3C20	3C20	3C20	3C20	3C20	3C20
B	1U26	1U26	1U26	1U26	1U26	1U26	3U22	3U22	3U22	3U22	3U22	3U22
C	3T33	3T33	3T33	3T33	3T33	3T33	3N10	3N10	3N10	3N10	3N10	3N10
D	3Q10	3Q10	3Q10	3Q10	3Q10	3Q10	3G22	3G22	3G22	3G22	3G22	3G22
E	3Z32	3Z32	3Z32	3Z32	3Z32	3Z32	3U31	3U31	3U31	3U31	3U31	3U31
F	3J4	3J4	3J4	3J4	3J4	3J4	3Z19	3Z19	3Z19	3Z19	3Z19	3Z19
G	3G31	3G31	3G31	3G31	3G31	3G31	3I35	3I35	3I35	3I35	3I35	3I35
H	3R22	3R22	3R22	3R22	3R22	3R22	3O21	3O21	3O21	3O21	3O21	3O21

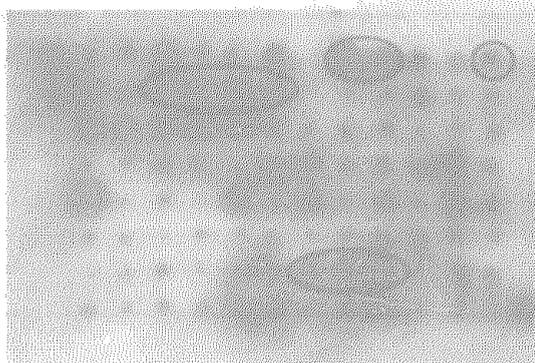


Figura 18: Auto-radiografia da membrana de confirmação de clones separados na placa 3, lavada com SSC 6X a 40°C, exposta ao filme por 72hrs. Circulados, de cima para baixo, os clones com sinal forte 3C20, 1U26 e 3I35.

A tabela 3 e a figura 18 apresentam mostram um exemplo do procedimento. Clones retransformados foram coletados na distribuição apresentada na tabela 3 e aplicados na mesma ordem em uma membrana de *nylon*. Foram considerados apenas os sinais fortes como clones positivos. O resultado da hibridização está presente na figura 18, com alguns exemplos de sinal forte que foram posteriormente seqüenciados. Estes exemplos de clones circulados, 3C20, 1U26 e 3I35, apresentavam microssatélites e seqüências boas para construção de contigs.

Considerando todos os processos de separação dos clones realizados, foi obtido um total de 63 clones para seqüenciamento e identificação de microssatélites. Ainda existem muitos clones com sinal positivo da primeira biblioteca que não foram separados para seqüenciamento e que deverão ser posteriormente seqüenciados.

4.5 Seqüenciamento dos clones com sinal positivo

A partir da primeira biblioteca genômica, foram seqüenciados 63 clones positivos, dentre aqueles que se apresentavam com sinal forte e médio na membrana, sendo que destes foram identificados 31 temas microssatélites (49,2% dos clones seqüenciados). A tabela 4 apresenta o clone e seu respectivo tema SSR identificado.

A partir da tabela 4, observa-se que 16 temas são classificados como possuidores de repetições perfeitas, 51,6% dos microssatélites identificados. Dez temas são classificados como de repetições imperfeitas e cinco temas como repetições compostas. Vinte e três clones (74,2%) apresentam repetições de dinucleotídeos e oito temas (25,8%) são de trinucleotídeos. Não foi identificado nenhum tema com repetição de tetranucleotídeo na primeira biblioteca. Com exceção do clone 1Q24, nenhum outro clone apresentou microssatélite com mais de vinte repetições do mesmo tema (Tabela 4).

Tabela 4 - Lista dos clones e respectivos temas SSR obtidos da primeira biblioteca genômica construída.

Clone	Tema SSR
1E28	(TCA) ₅
1O17	(AC) ₁₉
1Q24	(AG) ₄₉
1U26	(AAG) ₂ AGG(AAG) ₂ ...(AGG) ₂ AAG(AGG) ₃ ...(GGT) ₆
1U26	(AGA) ₆
2B35	(GT) ₉
2V34	(AT) ₁₀ (AG) ₁₉
3C20	(TG) ₉ TC(TA) ₈
3F22	(AC) ₇ (AT) ₅
3G22	(ATT) ₅ TGATATACATT(CA) ₆
3I35	(GGA) ₄ ...(TGA) ₃ (TGG) ₆ ...(ATG) ₄ CTGCTG
3T33	(TA) ₈
3U31	(TA) ₅ TGT(AG) ₆
4C29	(TG) ₈ C(TG) ₂
4D12	(GT) ₅ GA(GT) ₂
4E12	(AT) ₁₆
4E17	(TG) ₉
4F27	(AC) ₅ (TC) ₉ CA(CT) ₅
4K13	(GA) ₈ (GT) ₂ (GA) ₈ (GT) ₁₄
4L31	(AT) ₂ AGAT(AG) ₁₅
4O18	(CT) ₁₃
4O10	(TGT) ₆
4O10	(CT) ₁₁
4R35	(CA) ₁₁
4V8	(TA) ₈
5Q26	(TGC) ₃ TAC(TGC) ₂ ...(GCT) ₆
5Q30	(AT) ₈ (GT) ₁₂
6A14	(GA) ₁₄
6A15	(AG) ₅ AAA(GT) ₆ GA
6E12	(AG) ₁₂
6H14	(ACC) ₄

A partir da segunda biblioteca construída, foram seqüenciados 96 clones, entre aqueles que tinham sinal forte e médio na membrana de confirmação dos sinais. A partir dos seqüenciamentos, foram identificados 31 temas microssatélites, sendo 32,3% do total da amostra seqüenciada.

Dezenove clones possuem temas com dinucleotídeos, dez possuem trinucleotídeos, dois possuem tetranucleotídeos e um possui um tema hexanucleotídeo. É importante destacar que em duas ocasiões o clone apresentava ao mesmo tempo repetições de di e trinucleotídeos. Entre estes microssatélites da biblioteca nova, apenas três temas apresentavam mais de vinte repetições em *tandem*.

Tabela 5 - Lista dos clones e respectivos temas SSR obtidos da segunda biblioteca genômica construída.

Clone	Tema SSR
Placa2-H10	(CTT) ₄
Placa3-A8	(TAT) ₄
Placa4-A3	(AT) ₉
Placa4-C3	(AG) ₁₆ (CCA) ₄
Placa4-C9	(TTG) ₉
Placa4-C10	(CA) ₉ AC(ACA) ₄
Placa4-D10	(TG) ₉
Placa5-D4	(AT) ₂₂ (AC) ₆
Placa5-E6	(TA) ₂₉
Placa5-F9	(TGT) ₇
Placa5-F10	(AT) ₃₄
Placa5-F11	(TG) ₉
Placa7-C10	(ATCC) ₄
Placa7-E1	(TA) ₅ TGTATAT(TA) ₁₃
Placa7-G2	(GCT) ₅
Placa7-H6	(GTG) ₆
Placa 9-C12	(GT) ₆ (TG) ₅
Placa11-E8	(AG) ₅ C(AG) ₅
Placa12-A3	(AGAGAT) ₄
Placa 12-F10	(TTTC) ₅ (TC) ₃ TT(TC) ₇ (TA) ₁₁
Placa12-F12	(GTT) ₇ AAT(GTT) ₂
Placa 14-D8	(TA) ₁₀ (TC) ₅ TT(TC) ₄ (CT) ₃
Placa14-G5	(TC) ₁₂
Placa 15-F7	(TTG) ₉
Placa16-F11	(CA) ₇
Placa17-A2	(GT) ₉ (AT) ₄
Placa 19-A4	(CTT) ₉ (CT) ₁₃
Placa19-D9	(CT) ₆ TCAACG(TC) ₆

No total das bibliotecas, foram vasculhados 15.247 clones, tendo sido encontrado 62 microssatélites. Este resultado representa 0,41% de microssatélites entre todos os clones amostrados. A maioria dos microssatélites, 52 (83,9% do total de microssatélites), apresentou repetições de dinucleotídeos. Entre os dinucleotídeos presentes em repetições perfeitas, imperfeitas e compostas, foram encontrados 17 temas AT/TA, 20 temas CA/GT e 15 temas GA/CT.

Considerando que os tamanhos dos clones variavam entre 500 a 1200 pb, temos uma varredura do genoma da espécie que gira em torno de 13.000.000 pb ou 13 megabases, podendo variar até 5,3 mpb para mais ou para menos. Este valor pode ser visto como sendo de 0,477 microssatélites a cada 100 kpb de DNA da espécie analisada neste trabalho.

Outro aspecto a ser considerado é que ainda faltam muitos clones com sinal positivo a serem rastreados quanto à presença de microssatélites através de seqüenciamento e identificação dos temas presentes.

Entre as seqüências obtidas e que apresentavam microssatélites, nem todas apresentavam condições ideais para a construção de iniciadores a partir das regiões flangeadoras. Alguns microssatélites apresentavam seqüência próxima demais do sítio múltiplo de clonagem do vetor, impossibilitando a confecção do iniciador (Figura 19). Neste caso, já foi observada na literatura a confecção de iniciadores que invadem as repetições do microssatélite. Este procedimento tem sido evitado, a não ser que não seja encontrado um número satisfatório de microssatélites polimórficos.

>D06 well D06 GenepopMarcelo_12072006 Run01 Cimarron
3.12 Even Spacing 741

```

GGTCGABCTGCANGGCCGAGTGAANNMAMMATACTCCCTMAGACGCCCTC
CGGCGATGGAGATCCGCCGTCCTCCGTCGTGAAGAACCCCCGCCGCCGCTT
TCCGCATGGTCGCCAATCTCGCCCAACGCGCCGAAGCCGAAAAAAAACGC
AAGAACCTTCAGGTGCATTTTCATGTTATTGCTTAGTATAATATCTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTATTTCGTTATTTTTATATCAATTTTGGATCCCGGGT
ACCGAGCTCGAATTTCGTAATCATGTATAGCTGTTCCCTGTGTGAAATTG
TTATCCGCTCACAAATCCACACANCATACGAGCCGGAAGCATAAAATGTA
AAGCCCGGGTGCCTAATGAGTGAAGCTAACTCACATTAATTCGGTTGCG
TCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACTGTCTGTGCCAGCTGCATTAATG
AATCGCCCAACCGCGCGGGAGAGCCGTTTCCGTATTGGGGCTTTCCG
CTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCCCTCGGTCTTCCGCTGCGCGGAGCG
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAAAGCAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACC
GTAAAAGGCCGCGTGTGCTGGCTTTTCCATAGGCTCCGCCCCGTTGAGC
AGCATCACAAAATCGACGCTCAATCAGAGGTGGCGAAACCGGACAGGAC
CTATAAGATACCAGGCTTTCCCTGGAAAGCTCCTCGTGGCTTCTCTG
GTTCCGACCTGCGTTACGGAATACTGTCGGGCCCCCTTTTAACTCCGCTTTCC
GGGAAAACGGGTGGGAGCACTTTTTCATTAAGGTCACCGACTCCGAMMAM
GAAATTTCCCCAGGACCGGAGGAAAGGACCAGCACAGCCACAAAAGCCGG
GGGHHHGGTGGCACCAAACCCGCCCTTGGAGAKCACACAACAGGTTGGAG
CCCTTAAACACCGGAAAALACGACTTGAAGGCACAAACCCCGGAAAAC
ACAAATTTCCGCGGHHHMLAUCOCMGGGNGAAACGHHHAGCAACACGCCAG
CA

```

Figura 19: Exemplo de seqüenciamento que identificou o microssatélite, mas que se encontra muito próximo do vetor. Em amarelo, o microssatélite. Em vermelho, a seqüência do vetor identificado.

Outros clones não apresentavam seqüências com qualidade para a realização de consenso confiável. Estas seqüências podem ainda ser trabalhadas para a identificação das seqüências flangeadoras do microssatélite. Uma situação curiosa foi constante em boa parte dos seqüenciamentos – a qualidade do sinal durante o seqüenciamento caía consideravelmente após atingir a região de repetição. Em 77 seqüências com microssatélites, sendo que muitos destes são seqüenciamentos do mesmo clone, foi constatada uma queda na qualidade da leitura ou interrupção abrupta da leitura quando passada a região de repetição em 24 casos, o que

4.6 Desenho dos iniciadores

Um fator importante que teve que ser desconsiderado para a possibilidade de construção de multiplex com os iniciadores construídos é o tamanho do microssatélite, representado pelo número de repetições. Boa parte dos microssatélites encontrados podia ser considerada como pequenos (menos de 20 pares de bases de repetição) e abrangiam o mesmo tamanho. Assim, dos iniciadores construídos, 14 de 15 propostos tinham tamanho de produto de amplificação esperado entre 150 – 250 pb. Apenas um tinha mais de 300 pb (Clone 3I35 – Tabela 6). Apenas quatro microssatélites tinham mais de 20 repetições, o que seria ideal na expectativa futura de encontrar polimorfismo.

A tabela 6 apresenta os iniciadores propostos a partir de cada consenso e a temperatura de anelamento de cada iniciador. A temperatura de anelamento também é um aspecto importante na proposição de multiplex para estes loci. Para o mesmo conjunto de loci é necessário temperaturas de anelamento semelhantes.

Tabela 6 - Lista dos clones utilizados e seus respectivos iniciadores propostos

Locus/nº do clone	Tipo de repetição	Iniciadores	Tm	Tamanho do produto
1E28	(TCA) ₅	F: 5' CAAAAACCTGTTTGGCAAATTA 3' R: 5' TCTTGGGTTGTGGTGTGAA 3'	59.06	158pb
			59.98	
1U26	(AGA) ₆	F: 5' GAGGCGAAGGGAGAAAGAAT 3' R: 5' CCAACTTTTACAATCATTTCG 3'	59.79	227pb
			60.35	
2V34	(AT) ₁₀ (AG) ₁₅	F: 5' CTGAATTGCCGAGACGAAGT 3' R: 5' GCTTTACGCTATTTAGCCCTCA 3'	60.40	237pb
			59.91	
3C20	(TG) ₉ TC(TA) ₈	F: 5' TGGCATACTCGATAGGAGCA 3' R: 5' TGCAGGCATGCACATATAATC 3'	59.40	237pb
			59.56	
3G22	(ATT) ₅ TGATATACATT(CA) ₅	F: 5' TGCTGCAGTTTAGGGTAAAGG 3' R: 5' CCTCAGCAGCCAGTGGTTAG 3'	59.41	170pb
			60.98	
3I35	(GGA) ₄ -(TGA) ₃ (TGG) ₆ -(ATG) ₄	F: 5' GATGCAAAAGAAGATGGAGGA 3' R: 5' CGAACGCAACAAATTAAGTTCA 3'	59.26	343pb
			60.16	
3T33	(TA) ₈	F: 5' TTCCTTCATTCCACTCTATTTCAA R: 5' TCAATTCTAATATCTCAAAAATCAGTCA 3'	59.16	249pb
			57.64	
3U31	(TA) ₅ TGT(AG) ₉	F: 5' CAAGAGCTCGTCGAAATGTG 3' R: 5' AACTGCATGATTATATCGCTATTGA 3'	59.59	225pb
			59.14	
4F27	(AC) ₅ (TC) ₆ CA(CT) ₅	F: 5' ACAGTAACGCGGAGAAGGAA 3' R: 5' CTCCATAGGGCGATTGTCCAC 3'	59.88	206pb
			60.48	
4K13	(GA) ₈ (GT) ₂ (GA) ₂ (GT) ₁₄	F: 5' TTCTCTTGTTGAGGCTCGT 3' R: 5' CGGTCTCCTCTTGCTATCCA 3'	59.99	246pb
			60.35	
5Q26	(TGC) ₃ TAC(TGC) ₂ -(GCT) ₆	F: 5' TCCCTCATCTTCCTCCCTCT 3' R: 5' CCTCCTCCTAAGCCAGTTGA 3'	60.15	230pb
			59.42	
6A15	(AG) ₂ AAA(GT) ₆ GA	F: 5' CATCACTCCCCACAGTAGGC 3' R: 5' GTATCGATTCCCCGTCAGAA 3'	60.53	160pb
			59.89	
BN4C9	(TTG) ₉	F: 5' GTGCCTTCCCCTTGTTGTTA 3' R: 5' GGAAGAGACCGCAACAGTTC 3'	59.97	150pb
			59.85	
BN5D4	(AT) ₂₂ (AC) ₆	F: 5' GACCAAAGGCAACACTTACG 3' R: 5' CACCATATACACGCATAGCA 3'	58.28	213pb
			59.48	
BN7H6	(GTG) ₆	F: 5' CTTTTGAACTTGGCCACCAT 3' R: 5' CACATAGCTCGTGTCCGCACT 3'	59.97	188pb
			60.08	

Seguem abaixo as seqüências consenso obtidas dos clones, com microssatélites em destaque e que foram usados para a proposição de iniciadores para PCR. Sublinhado, os iniciadores obtidos a partir da análise no Primer3 (site).

5. DISCUSSÃO

Para vegetais, segundo Zane *et. al* (2002), é aconselhável e a partir desse trabalho tornou-se uma tendência, a construção de uma biblioteca enriquecida para o isolamento de microssatélites. Esses autores constataram que as plantas correspondem ao grupo de seres vivos com o maior número de trabalhos baseados em biblioteca enriquecida publicados até março de 2001, na *Molecular Ecology Notes*. Entretanto, até então, trabalhos com bibliotecas genômicas primárias não enriquecidas correspondiam à grande maioria. A justificativa dos autores para a construção de bibliotecas enriquecidas baseia-se na baixa proporção de clones positivos obtidos através da triagem de uma biblioteca tradicional. Em plantas, há uma proporção de clones positivos em trabalhos com biblioteca tradicional que varia de 0,059 a 5,8%. Neste trabalho de dissertação foram encontradas proporções que variaram em torno de 1,5% para a primeira biblioteca construída e 6,72% para a segunda. Pela estratégia aplicada na construção da primeira biblioteca, temos o valor de 1,5% subestimado, podendo haver mais de um clone positivo em um mesmo tubo. O valor de 6,72% é altamente superestimado, como foi definido na descrição dos resultados, e teve como intuito não permitir a perda de nenhum microssatélite, principalmente com temas AT/TA, que porventura poderia ser descartado com um sinal despercebido na membrana, mesmo variando as estringências de análise. Provavelmente o valor real deve ser bem inferior ao determinado nessa segunda biblioteca e provavelmente encontra-se entre aqueles definidos no trabalho de Zane *et. al* (2002).

O conhecimento da baixa proporção de clones positivos para o *táxon* motivou a construção da primeira biblioteca genômica adicionando mais de um clone por tubo, na tentativa de aumentar ainda mais a amostragem do genoma da espécie e, conseqüentemente, obter o maior número possível de clones positivos. Somado à maior amostragem, o desenvolvimento de muitos oligonucleotídeos com diferentes temas (33 ao todo) criava a expectativa de obter microssatélites com temas mais diversos e em maior número, aumentando a proporção da triagem inicial. Essa seria uma importante vantagem em relação a uma biblioteca enriquecida que, muitas vezes, é limitada a poucos temas de repetição. Além disso, diminui a chance de obter microssatélites repetidos ao final do trabalho, como é mais comum em bibliotecas enriquecidas de plantas (Squirrell *et. al* 2003). O objetivo de obter um

grande número de clones positivos, mesmo que em proporção baixa, foi atingido, com 190 clones positivos apenas na primeira biblioteca. Mesmo assim, como consequência da imprevisibilidade da estratégia traçada durante a coleta das colônias brancas, a maioria dos clones positivos estava em tubos de culturas mistas, e a separação dos clones para identificação do positivo foi extremamente trabalhosa, existindo ainda algumas amostras que não foram separadas. Para tal, por disponibilidade de material e expectativa criada com os resultados da primeira triagem, foi decidida a construção de nova biblioteca genômica, dessa vez com clones individualizados em miniplacas de 96 poços, que disponibilizam clones diretamente para seqüenciamento após nova hibridização e confirmação do positivo, simplificando o processo.

Squirrell *et al.* (2003) indicam em seu trabalho as perdas médias observadas em cada etapa de isolamento de microssatélites. Considerando uma biblioteca genômica primária sem enriquecimento, há uma perda de até 48,7% na etapa de seqüenciamento dos clones, sem identificação do microssatélite em clones positivos triados. Nessa etapa de seqüenciamento foram perdidos 59,2% de clones, sem microssatélites em suas seqüências, considerando as duas bibliotecas juntas. Deve-se destacar que o valor de clones positivos triados na segunda biblioteca foi superestimado e já se esperava maior perda proporcional na etapa de seqüenciamento. Entretanto, existe a possibilidade de se diminuir essa proporção de perda, pois muitos clones ainda não foram seqüenciados em toda a extensão do inserto e existem ainda clones positivos a serem seqüenciados e isolados dos tubos da primeira biblioteca. Ainda no trabalho de Squirrell *et al.* (2003), pode-se considerar perdas referentes à análise das seqüências com microssatélites, como no caso de microssatélites com seqüências flanqueadoras muito curtas. Existe uma perda média de 46% das seqüências com microssatélites na etapa definida. Nesse trabalho de dissertação foram perdidos 7 microssatélites por se encontrarem muito próximos do sítio múltiplo de clonagem do vetor. Desses, três poderiam ser salvos com construção de iniciadores que sobreponham a região de repetição, mas o procedimento será evitado até que haja real necessidade por falta de locosi polimórficos entre os outros com maior flexibilidade de construção dos iniciadores. Boa parte da perda que ocorreu até então se deve à dificuldade em se seqüenciar toda a região do inserto, com destaque à perda na qualidade do seqüenciamento quando atinge a região de repetição. Assim, alguns clones com microssatélites não

tiveram todo o inserto seqüenciado, mas apresentam potencial para a construção de iniciadores. Isso tem sido feito com a definição exata do tamanho do inserto através de PCR e seqüenciamento utilizando iniciadores M13 direto e reverso para o vetor de clonagem.

Todas as outras seqüências de clones positivos, inclusive as que não tiveram microssatélites identificados, tiveram suas seqüências comparadas com outras conhecidas e depositadas em banco de dados *on-line*, através do programa BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul *et al.*, 1990), mais especificamente, pelo BLASTn (comparação nucleotídeo-nucleotídeo) no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Entre as seqüências que não tiveram microssatélites, foi identificada alta homologia de seqüência em 14 casos, 8,8% das seqüências trabalhadas. Nessas, todas tinham alta homologia com seqüências de outras plantas e, mais interessante, seis delas tinham homologia com plantas da mesma subfamília da *Dalbergia nigra*, a subfamília Papilionoideae da família Fabaceae, uma das três maiores famílias vegetais existentes. Todos esses resultados geram maior confiança em relação ao material trabalhado, menor preocupação em relação a possíveis contaminações. Também, três seqüências referiam-se a RNA ribossomal 18S de plantas da subfamília, duas eram homólogas a retrotransposons presentes em plantas e uma seqüência referia-se a um gene nuclear para uma proteína chaperone de atuação em cloroplasto. Todos esses resultados reforçam ainda mais a origem das seqüências.

Dentre os temas microssatélites encontrados neste trabalho, como era de se esperar, a maioria absoluta era de temas dinucleotídeos, amplamente definido na literatura (Gupta *et al.* 1996, Tóth *et al.* 2000, Elegren 2004). Entretanto, também é bastante comentada a prevalência de temas AT/TA nos genomas de plantas, seguida por uma grande abundância de GA/CT em relação a temas CA/GT, mais freqüentes em animais (Gupta *et al.* 1996, Tóth *et al.* 2000) e este trabalho não observou maior destaque de distribuição de nenhum tipo de tema. Foram encontrados 17 temas AT/TA, 20 temas CA/GT e 15 temas GA/CT, não tendo relação com o que é exposto em outros trabalhos com plantas. Talvez esse resultado obtido seja consequência da triagem com muitos tipos diferentes de oligonucleotídeos marcados e pouco refinamento durante lavagem das membranas de hibridização, com variações pouco sutis de estringência. Poucos tipos de

microssatélites com trinucleotídeos foram identificados, também sem destaque aparente para um tipo específico relatado na literatura.

Apenas um microssatélite encontrado continha mais de 20 repetições seqüenciais perfeitas, e boa parte dos outros podiam ser considerados pequenos, com menos de 12 pares de base. Existe forte consideração para o fato de que forças evolutivas podem limitar o tamanho dos microssatélites e que há consideráveis variações nos tamanhos dos microssatélites de diferentes espécies (Schlötterer 2000). Isso pode ocorrer devido a variações na eficiência do sistema de reparo entre os diferentes taxa. Outra possibilidade é a relação que se acredita existir entre as áreas de repetição no genoma e a organização cromossômica particular de cada espécie, e que grandes variações no número de repetições podem ser selecionadas negativamente (Li *et al.* 2002). Também, é considerável destacar que problemas durante o seqüenciamento, observado nos casos em que os temas de repetição eram muito extensos, podem ter diminuído consideravelmente a identificação de microssatélites de grande comprimento. O seqüenciamento era realizado a partir de reação padrão, e existe a possibilidade de ter sido fornecido baixa concentração de dideoxis fluorescentes para as diferentes bases presentes no *ET kit* e que se esgotavam quando atingiam a região de repetição do microssatélite, fazendo cair a qualidade de leitura.

O último estágio de obtenção de microssatélites apresenta perda média de 50% dos locos disponíveis para o desenho de iniciadores, como consequência de problemas como a não amplificação do microssatélite (0 – 40%), múltiplas bandas não interpretáveis (0 – 58%) e locos monomórficos (0 – 60%). (Squirrell *et al.* 2003). Este trabalho propôs o desenho de 15 iniciadores, ou seja, abrangendo 15 locos microssatélites para a espécie *D. nigra*. Considerando a perda média de 50% postulada por Squirrell *et al.* (2003) na etapa de análise dos iniciadores construídos, espera-se obter algo em torno de sete microssatélites polimórficos. O número de locos ainda pode aumentar, refinando a análise de muitos clones com problemas relatados e a soma de mais clones positivos a serem seqüenciados. Algo que muito preocupa é a postulação de alguns autores, que diz que quanto menor um microssatélite, menos alelos pode apresentar tal loco em uma população (Schlötterer 2000, Li *et al.* 2002, Ellegren 2004). Boa parte dos microssatélites encontrados e propostos para construção de iniciadores são pequenos, com poucas unidades de repetição. Mesmo assim, comparando com outros trabalhos em plantas, os

microssatélites apresentados aqui podem ser polimórficos com poucos alelos e passíveis de utilização em trabalhos. Merdinoglu et al. (2005) isolou uma grande quantidade de locos polimórficos para *Vitis vinifera* L., com biblioteca enriquecida para CT/AG e CA/TG, e muitos se apresentavam pequenos, mas polimórficos. Exemplo pode ser dado nos casos dos locos VVlv61, com tema (CT)₁₃, e 5 alelos e VVlv70, com tema (GA)₂₂, e 8 alelos identificados, semelhantes aos temas identificados neste trabalho de dissertação. Em um trabalho com uma espécie arbórea da Amazônia (*Manilkara huberi* – Sapotaceae) loci com repetições dinucleotídeos com variação de 11 a 23 repetições tiveram uma média de 6,43 alelos por loco. Dependendo do número de indivíduos analisados, o número de alelos nos locos construídos aqui para *D. nigra* pode ser alto o suficiente para trabalhos posteriores com a espécie em genética de populações.

Apesar do caminho tortuoso percorrido neste trabalho para a espécie *D. nigra*, a técnica empregada na identificação de microssatélites atingiu seu principal propósito - a construção de iniciadores de loci microssatélites com potencial de aplicação em estudos populacionais. Mesmo não sendo indicada a estratégia de triagem de biblioteca genômica primária tradicional para plantas, a experiência adquirida com manipulação e condições laboratoriais voltadas para o propósito pode minimizar as dificuldades apresentadas. Muitos laboratórios têm se voltado para a construção de microssatélites, atendendo não só as necessidades de pesquisa no meio em que se encontram, mas atendendo demandas de outros pesquisadores de áreas bem distintas, como é o caso da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Azevedo et al. 2005, Vinson et al. 2005) e outros fora do país. Boa parte desses laboratórios desenvolve seus trabalhos com bibliotecas enriquecidas e conseguem obter iniciadores em até um mês de trabalho, sendo o tempo de obtenção com menor volume de trabalho a principal vantagem destacada. Mesmo assim, para uma biblioteca genômica tradicional, a obtenção de microssatélites pode ser rápida e eficiente, se houver à disposição um laboratório bem equipado e material. Neste trabalho, após aquisição de experiência, a segunda biblioteca genômica construída tradicionalmente em placas de 96 poços, com um total de 1.920 clones, foi triada e seqüenciada em um mês e meio, obtendo somente nela 31 microssatélites em seus clones. Com maior amostragem em uma biblioteca tradicional é possível adquirir mais microssatélites no mesmo período de tempo.

Cabe julgar os prós e contras de cada estratégia, conjugados com o que está mais proximamente disponível a um pesquisador.

Perspectivas

Os iniciadores propostos já foram construídos e brevemente serão testados quanto à padronização da PCR, de acordo com quantidade utilizada do iniciador, temperaturas de anelamento e variações do ciclo de reação.

Amostras de DNA de indivíduos em diferentes populações da espécie *D. nigra*, distribuídos do sul da Bahia até São Paulo, já se encontram extraídas no laboratório. Após padronização, serão testadas a riqueza de alelos e heteroziguidade esperada e observada para cada locus polimórfico identificado.

Os loci polimórficos serão utilizados em estudos populacionais do Jacarandá-da-bahia. Esta dissertação faz parte de um projeto maior do Laboratório de Genética de Populações e Conservação do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, com intuito de compreender melhor os fatores evolutivos que moldaram a espécie em estudo e conseqüentemente propor medidas de conservação eficientes para essa importante espécie brasileira.

6. CONCLUSÃO

Tendo em consideração os resultados obtidos e a discussão apresentada, podemos concluir que a metodologia, mesmo considerada muitas vezes pela literatura como inadequada para plantas, foi eficaz no isolamento de diferentes tipos de microssatélites para a espécie *Dalbergia nigra*.

A estratégia de amostragem com mais de um clone por tubo realizada na primeira biblioteca genômica, apesar de ter obtido muitos microssatélites, não pode ser considerada eficiente para plantas, pois a porcentagem de clones positivos é baixa e o processo de isolamento dos clones é extremamente oneroso. A literatura também aponta a prevalência de temas AT entre dinucleotídeos de plantas, o que não foi constatada com a metodologia empregada.

Foi obtido número suficiente de microssatélites para serem testados e espera-se que se encontre polimorfismo em pelo menos metade deles.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKESSON, M., BENSCH, S., 2005. Ten years of AFLP ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology* 14(10): 2899-2914.
- AZEVEDO, V. C. R., VINSON, C. C., CIAMPI, A. Y., 2005. Twelve microsatellite loci in *Manilkara hunberi* (Ducke) Standl (Sapotaceae), an Amazonian timber species. *Molecular Ecology Notes* 5: 13 – 15.
- CARVALHO P. E. R., 1994. Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira. EMBRAPA-CNPQ/SPI, Brasília.
- CARVALHO, A. M., 1997. A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. *Brittonia*, 49: 87-109.
- CITES, 1992. CITES: Appendices I, II and III to the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Washington: U.S. Fish and Wildlife Service.
- DESALLE, R., AMATO, G., 2004. The expansion of conservation genetics. *Nature Genetics*, 5: 702-712.
- ELLEGREN, H., 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews*, 5: 435 - 444.
- FERRAZ-GRANDE F. G. A., TAKAKI M., 2001. Temperature dependent germination of *Dalbergia nigra* Allem (Leguminosae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44: 401-404.

- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D., 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN. pp. 220.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J. D., BRISCOE, D. A., 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press.
- FRANKHAM, R., 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126: 131-140.
- GIBBS, P., SASSAKI, R., 1998. Reproductive Biology of *Dalbergia miscolobium* Benth. (Leguminosae-Papilioideae) in SE Brazil: the effects of pistillate sorting on fruit-set. *Annals of Botany*, 81: 735-740.
- GUPTA, P. K., BALYAN, H. S., SHARMA P. C., RAMESH B., 1996. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science*, 70: 45 – 53.
- IBAMA, 1992. Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Secretaria de Meio Ambiente. Diário Oficial, 6 de abril de 1992, pp. 4302-4303.
- IUCN, 1994. Red List Categories, IUCN Species Survival Commission. Gland, Switzerland: IUCN
- LI, Y., KOROL, A. B., FAHIMA, T., BEILES, A., NEVO, E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453 – 2465.
- MERDINOGLU, D., BUTTERLIN, G., BEVILACQUA, L., CHIQUET, V. BLONDON, A. F. A., DECROOCCQ, S., 2005. Development and characterization of a large set

of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Molecular Breeding*, 15: 349 – 366.

NYBOM, H., 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13: 1143-1155.

OLIVEIRA, E. J., PÁDUA, J. G., ZUCCHI, M. I., VENCOVSKY, R., 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 2: 294-307.

RIBEIRO, R. A., RAMOS, A. C. S., LEMOS FILHO, J. P., LOVATO, M. B., 2005. Genetic variation in remnant populations of *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an endangered tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Annals of Botany*, 95: 1171-1177.

ROZEN, S., SKALETSKY, H., 1998. *PRIMER 3*. Whitehead Institute for Biomedical Research. http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_<http://www.cgi>.

SALLES, G., BUSO, C., CIAMPI A. Y., MORETZOHN M. C., AMARAL Z. P. S., 2003. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microsatélites. *Circular Técnica da Embrapa*, 20: 1-11.

SAMBROOK, J., FRITSH, E. F., MANIATIS, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, vol. 1, 2, 3. New York: Press Cold Spring Harbor.

SCHLÖTTERER, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365-371.

SCHLÖTTERER, C., 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5: 63-69.

- SCHLÖTTERER, C., Dieringer, D., 2007. Two distinct modes of microsatellite mutation processes: evidence from the complete genomic sequences of nine species. *Genome Research*, 13: 2242 – 2251.
- SQUIRRELL, J., HOLLINGSWORTH M., WOODHEAD M., RUSSEL, A., LOWE J., GIBBY, M., POWELL, W., 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology*, 12: 1339 – 1348.
- TÓTH, G., GÁSPÁRI, Z., JURKA, J., 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967 – 981.
- VINSON, C. C., AZEVEDO, V. C. R., SAMPAIO, I., CIAMPI, A. Y., 2005. Development of microsatellite markers for *Carapa guianensis* (Aublet), a tree species from the Amazon forest. *Molecular Ecology Notes*, 5: 33 – 34.
- ZANE, L., BARCELONI, L., PATARNELLO, T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)