

## Padronização de marcadores microssatélites para avaliação da diversidade genética de *Coleocephalocereus purpureus*, espécie de cacto ameaçado de extinção

Anderson Figueiredo de Carvalho<sup>1</sup>; Gustavo Augusto Lacorte<sup>2</sup>;

1 Anderson Figueiredo de Carvalho, Bolsista PIBIC-IFMG, Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMG Campus Bambuí, Bambuí - MG; anderson\_fbi45@outlook.com

2 Orientador: Gustavo Augusto Lacorte, Campus Bambuí; gustavo.lacorte@ifmg.edu.br

### RESUMO

Devido a percepção da ameaça de extinção da espécie de *Coleocephalocereus purpureus* e a busca de um entendimento melhor da genética da sua população a parceria da Instituição Federal de Minas Gerais – Campus Bambuí e da Empresa Nativa Serviços Ambientais Ltda, que querem ter formas alternativas de conservar tal espécie de Cactaceae colunar que sofre com as alterações antrópicas que ocorreram no meio no qual a espécie vive, ameaçando assim de forma grave a sua existência. Através das mudanças e descobertas de tecnologia desenvolvida na área de genética de populações é possível hoje identificar e caracterizar por meio de uma análise do material genético (DNA) das plantas, permitindo assim a previsão de aspectos que a mesma irá apresentar futuramente, viabilizando assim esse estudo pela melhoria em seu tempo de duração e nas possíveis alterações na genética da sua população para modificar a taxa de sobrevivência e aumentar a incidência da espécie de maneira positiva ao ambiente que a mesma se encontra e também a conservar os espécimes nativos, aumentando o banco de dados de DNA's existentes. As regiões escolhidas para o delineamento do estudo ocorreram por meio de 5 critérios que nortearam o desenho dos 44 primers testados no estudo, estes só puderam ser feitos por causa do sequenciamento genômico da espécie; a padronização da reação se deu de maneira gradativa por teste de diferentes mix's de substâncias essenciais e programas de PCR específicos para a melhor amplificação do DNA dos cactos. A visualização se deu por géis de poliacrilamida na coloração de nitrato de prata, isso para que fosse melhor exibido os resultados de leitura da amplificação, de modo a facilitar o descarte de amplificações inespecíficas. Obteve-se de resultados preliminares 10 primers para caracterizar o nível de variabilidade genética da população de *C. purpureus*, então será por meio desses que se tentará conservar a sua população.

### INTRODUÇÃO:

*Coleocephalocereus purpureus* (Buining & Brederoo) F. Ritter, é uma espécie de Cactaceae colunar, com cerca de 60 cm de altura; espinhos aciculares purpúreos; cefálio em um dos lados, com um denso feltro branco no ápice, estendendo até quase a metade da coluna e flores cor rosa que nascem no cefálio, parcialmente ocultas (Taylor & Zappi 2004). No Workshop de Revisão da Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção, realizado em 2005 pela Fundação Biodiversitas, 76 espécies de Cactaceae foram consideradas ameaçadas de extinção, incluindo *C. purpureus*. Já na Revisão da Lista das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção do Estado de Minas Gerais, das 504 espécies da flora citadas, 54 são da família Cactaceae (10,7%). *Coleocephalocereus purpureus* também está presente nessa lista vermelha. Dado o alto grau de endemismo das populações dessa espécie e o fato de ser naturalmente rara, com sua área de ocupação limitada a menos de 10km<sup>2</sup> e restrita à região de Itinga, Minas Gerais, *C. purpureus* foi classificado, em ambas as listas citadas, como uma espécie que possui um risco extremamente alto de extinção (CR – Criticamente em Perigo) (Biodiversitas 2007).

A caracterização da estrutura genética das populações naturais, sobretudo das populações ameaçadas, é de suma importância para o seu manejo com fins conservacionistas, uma vez que de posse da informação de quais fatores envolvidos na estruturação estão atuando, é possível planejar o manejo das populações de modo a reter o máximo da diversidade genética da população à longo prazo (Frankham, 2002).

Os estudos de variabilidade e estruturação genética em populações de plantas são prioritários pelas informações sobre a capacidade de sobrevivência da espécie e de suas populações, diante das constantes alterações ambientais (Prathepha & Baimai, 1999). Portanto, a manutenção à longo prazo de uma população passa pela manutenção e ampliação de sua diversidade genética de modo a maximizar a resiliência da população frente às mudanças ambientais e demais fatores estocásticos. Assim os planos de

monitoramento de populações naturais devem incorporar também o monitoramento da diversidade genética bem como realizar estimativas de como esta diversidade está estruturada.

Após o surgimento das técnicas de biologia molecular, foram desenvolvidos dezenas de marcadores genéticos moleculares que são baseados no polimorfismo genético que pode ser acessado diretamente no DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Alfenas, 2006; Faleiro, 2007). A criação dos marcadores de DNA possibilitou um grande impulso para a determinação da variabilidade genética entre e dentro de espécies. Esses marcadores são vantajosos em relação aos marcadores morfológicos e os bioquímicos, por possibilitarem detecção de polimorfismo de um maior número de regiões do genoma, além de permitir maior precisão e obtenção de respostas mais rápidas. Essa rapidez é excelente principalmente quando se trata de espécies de ciclo longo, pois elimina a necessidade de espera da expressão tardia de determinadas características (Pigato & Lopes, 2001a; Brondani et al., 2003; Xavier et al., 2005). A partir da análise de dados obtidos com o uso dos marcadores moleculares podem-se estimar vários parâmetros genéticos que podem ser aplicados para diversos fins. Para espécies em que o interesse é conservá-la, essas informações podem ser aplicadas na detecção de populações que apresentam diferenças de variabilidade genética, exigindo diferentes estratégias para conservação *in situ*, *ex situ* ou *on farm* (Pigato & Lopes, 2001b; Telles et al., 2003).

A área de distribuição da espécie tem sofrido ameaças antrópicas, sobretudo com a implantação de atividade mineradora. Durante a fase de legalização da atividade minerária na região, a empresa Nativa Serviços Ambientais Ltda foi contratada pela empresa mineradora que visava o uso da área, para propor um plano de ocupação da área e de manejo da população local de *C. purpureus* bem como dos recursos ambientais associados à sua sobrevivência a longo prazo. Neste plano, foi contemplada a criação de uma Unidade de Conservação visando a preservação da espécie *C. purpureus*, a RPPN *Coleocephalocereus purpureus*. E ainda, dentro do plano de manejo da RPPN foi prevista que a viabilidade genética a longo prazo da população de *C. purpureus* fosse monitorada por meio de avaliação da diversidade e estrutura genética desta população. Entretanto, nenhum marcador molecular estava disponível para a espécie *C. purpureus*, sendo o seu desenvolvimento uma etapa prévia para a realização de estudos de avaliação da diversidade e estrutura genética da população de *C. purpureus* na RPPN *Coleocephalocereus purpureus*. Neste contexto, em 2016 foi aprovado um projeto de pesquisa aplicada do IFMG, em parceria com a empresa Nativa Serviços Ambientais Ltda para o desenvolvimento dos marcadores moleculares do tipo microssatélites para acessar a diversidade genética de *C. purpureus* na população protegida dentro da RPPN. Este projeto tem o objetivo de padronizar as condições de amplificação para uso dos marcadores moleculares desenvolvidos para acessar a diversidade genética de *C. purpureus* para avaliar a diversidade genética remanescente nas populações.

## METODOLOGIA:

A partir de um banco de dados gerados por sequenciamento genômico aleatório de um espécime de *C. purpureus* contendo mais de 15 milhões de regiões contendo sequências repetitivas curtas, foram pré-selecionados 150 regiões de marcadores microssatélites confeccionados para os testes de padronização seguindo o seguinte critério: (1) apresentar pelo menos 5 unidades do motivo repetitivo; (2) apresentar um tamanho de pelo menos 350 bases; (3) apresentar regiões flanqueadoras não repetitivas; e (4) serem regiões de microssatélites perfeitas. A verificação das regiões para a pré-seleção foi realizada através do programa MEGA6 (Tamura et al., 2013).

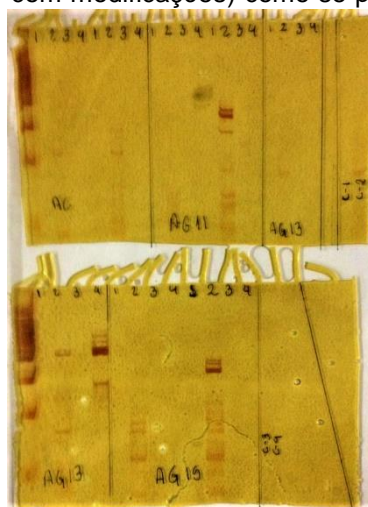
Desta pré-seleção, foram escolhidas 44 regiões que permitiram a construção de oligonucleotídeos baseados no comportamento previsto de amplificação dos oligoiniciadores, os quais deveriam possuir as seguintes características: tamanho entre 18 e 22 nucleotídeos, conteúdo GC entre 40 e 60%, temperatura de anelamento similares. A construção dos oligonucleotídeos foi realizada utilizando o software Primer3 Plus (Untergasser et al., 2012).

Os 44 marcadores selecionados foram submetidos a testes de padronização de condições de amplificação, no qual foi considerado como marcador com amplificação padronizada aquele marcador que apresentasse resultados positivos de amplificação para pelo menos 90% das 10 amostras de DNA de *C. purpureus* definidas para teste, sem amplificação de regiões inespecíficas que comprometessem a análise da região alvo. Foram selecionados parâmetros de teste: temperatura de anelamento, número de ciclos de amplificação, concentração de DNA por reação, concentração de DNA polimerase, concentração de primers, concentração de  $MgCl_2$  e tipo de tampão de amplificação.

Os resultados da amplificação foram checados através de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante seguida de coloração com nitrato de prata. Foram utilizados marcadores de tamanho de fragmento de 50 pares de bases em cada gel para verificação do tamanho dos fragmentos gerados.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES:

O começo da padronização se deu na busca da condição ideal para o funcionamento dos primers com isso se testou os tampões I0, I10, I110 e IVB; em alguns tampões se utilizou a presença ou não de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), por fim outra variação importante a se colocar foi a utilização de dois DNA's distintos, os que vieram com o kit de primers e os que foram extraídos pelo bolsista através do protocolo de extração de tecido vegetal (Doyle & Doyle, 1987 com modificações) como se pode observar na figura 01 a condição 02 foi a que melhor deu resultado usada para todos os 44 primers cumprindo os critérios relação a variação do DNA o quando usado o DNA do Kit de



para os primers, portanto a mesma foi desenvolvida, logicamente estabelecidas anteriormente e em resultado se apresentou melhor primers.

Fig. 01 – Resultado das condições testadas para o estabelecimento da padrão.

A partir disso obteve-se um resultado positivo para 10 primers, o que serão utilizados para a caracterizar a variabilidade genética da população. Isso reafirma o citado na literatura em que se utiliza no mínimo 8 primers para realizar tal caracterização, consequentemente valida as possíveis afirmações da variabilidade genética da população de *C. purpureus* e traz à tona possíveis trabalhos para a melhoria e conservação de tal espécie.

Condições de anelamento que funcionaram:

| Código do marcador | Sequência do primer direto | Sequência do primer reverso | Tamanho do amplicon |
|--------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------|
| CGCCG_5            | CGAACAGCAGATCATCGACT       | ACCTGGGCGAACTGACGAT         | 256                 |
| ATGT_8             | AACAGCAACTGCAACAATCG       | CCCTTGTTCTTCTGTAAACCC       | 240                 |
| AG_13              | GCACCACCAAATCCTTCCAT       | TTCGTTCTAGTTCGCCACAG        | 214                 |
| AG_11              | AAAGGAGATGTGCACTCACG       | ATTAGCCGTACCGTCAGAGT        | 161                 |
| AG_15              | AACAGCCTAAAGAAGCCCAG       | ATTCTTGTCGCCTATGGTGC        | 162                 |
| GAT_11             | GTAACGGTTGGGAATGGGAA       | AAGTCCTCCCTCAGTTCCAA        | 233                 |
| GA_102             | CAAACACAGCAACAGCACAA       | TTTGGACACTGTTGGACTCG        | 245                 |

|        |                       |                      |     |
|--------|-----------------------|----------------------|-----|
| TC_17  | CCCTTGAACCAACCTGTGTT  | GGGTTCAGGTCTTTGGACAT | 238 |
| TTA_10 | GTGATGACCTCGTCTTTCTGA | TGGGTATTAAGGCTCACGA  | 216 |
| ATGA_7 | GTGCTGATGAGTGTTTGTACA | AATGAATGCACCGACCTCAC | 249 |

## CONCLUSÕES:

Após a pré-seleção de 150 regiões contendo repetições, selecionamos 44 regiões adequadas para análise de marcadores microssatélites. Após todo o processo de padronização foi possível estabelecer condições de uso para 10 marcadores que serão utilizados para acessar a diversidade genética de *C. purpureus* no programa de monitoramento genético da espécie visando a sua conservação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa. Ed. UFV. 2ª Edição. 627p. 2006.

BIODIVERSITAS. 2007. **Revisão das Listas Vermelhas da Flora e da Fauna Ameaçadas de Extinção de Minas Gerais**. Disponível em: <[http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/RelatorioListasmg\\_Vol2.pdf](http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/RelatorioListasmg_Vol2.pdf)>.

Acessado em: 02/07/2019

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-molecular aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. EMBRAPA – CENARGEN, Brasília, DF. 1998.

FRANKHAM, Richard; BRISCOE, David A.; BALLOU, Jonathan D. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge University Press, 2002.

PIGATO, Silvan Maria Paes Cangiani; LOPES, Catalina Romero. Avaliação da variabilidade genética em quatro gerações de *Eucalyptus urophylla* ST Blake por meio do marcador molecular RAPD. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, p. 119-133, 2001.

PIGATO, Silvana Maria Paes Cangiani; LOPES, Catalina Romero. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* ST Blake. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, p. 135-148, 2001

PRATHEPHA, Preecha; BAIMAI, Visut. Genetic differentiation in Thai populations of the rare species *Afgekia sericea* Craib (Leguminosae) revealed by RAPDPCR assays. **Genetica**, v. 105, n. 2, p. 193-202, 1999.

TAYLOR, N. P. et al. Cactaceae. **Cactus and succulent plants—status survey and conservation action plan**. IUCN, SSC Cactus and Succulent Specialist Group, Gland, Cambridge, p. 17-20, 1997.

TAYLOR, Nigel P.; ZAPPI, Daniela C. Cactaceae of Jequitinhonha river valley (Minas Gerais). **Acta Botanica Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 63-69, 1991.

TAYLOR, Nigel P.; ZAPPI, Daniela C. **Cacti of eastern Brazil**. Royal Botanic Gardens, Kew, 2004.

TELLES, Mariana Pires de Campos et al. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesq Agropec Bras**, v. 36, n. 11, p. 1387-94, 2001.

TELLES, Mariana Pires de Campos et al. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC. ("cagaiteira"—Myrtaceae) in Central Brazil: Spatial analysis and implications for conservation and management. **Conservation Genetics**, v. 4, n. 6, p. 685-695, 2003.

XAVIER, Gustavo Ribeiro et al. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 4, p. 353-359, 2005.

TAMURA, K. et al. MEGA6: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0**. **Molecular Biology and Evolution**: 30 2725-2729, 2013.

UNTERGASSER, Andreas et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 15, p. e115-e115, 2012.