

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**CLARIANE DA SILVA**

**VALIDAÇÃO *in silico* DE MARCADORES SSR DE *Eugenia uniflora* E  
TRANSFERIBILIDADE PARA SETE ESPÉCIES DE *Eucalyptus***

**São Gabriel  
2016**

**CLARIANE DA SILVA**

**VALIDAÇÃO *in silico* DE MARCADORES SSR DE *Eugenia uniflora* E  
TRANSFERIBILIDADE PARA SETE ESPÉCIES DE *Eucalyptus***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação do Curso de Biotecnologia, na Universidade Federal do Pampa — Unipampa, Campus São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon

Coorientadora: Deise Schroder Sarzi

**São Gabriel  
2016**

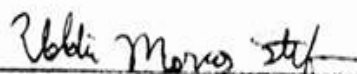
**CLARIANE DA SILVA**

**VALIDAÇÃO *in silico* DE MARCADORES SSR DE *Eugenia uniflora* E  
TRANSFERIBILIDADE PARA SETE ESPÉCIES DE *Eucalyptus***

Trabalho de Conclusão de Curso de  
Graduação do Curso de Biotecnologia, na  
Universidade Federal do Pampa —  
Unipampa, Campus São Gabriel, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 18 de novembro  
de 2016.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon  
Orientador  
(UNIPAMPA)



Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto  
(UNIPAMPA)



Prof. Msc. Tális de Oliveira Silva  
(UNIPAMPA)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus que me deu o dom da vida e a possibilidade de hoje estar aqui, em pé, sem almejar.

Aos meus pais Loecy e Aires, meus amores, os quais jamais negaram um minuto do seu tempo para me escutar seja só para saber como foi o meu dia na faculdade, sendo ele bom ou ruim, embora para qualquer um dos dois o tempo seja meio raro por tantas tarefas. A palavra de carinho, consolo e paciência estava sempre com vocês e foi nisso que sempre acreditei, por isso hoje estou aqui. É em vocês que me baseio para seguir em frente e digo para quem quiser ouvir o quanto tenho o prazer e orgulho de tê-los como pais, pois são meus exemplos de vida e superação, meus espelhos. A prova de que tudo se consegue quando se tem fé e paciência. Obrigado por todo esse amparo e amor sem fim, dedico a vocês esta conquista.

À minha querida e amada irmã Luane que mesmo estando longe, correndo atrás dos seus sonhos se tornou presente nos meus, tendo sempre um tempinho para me escutar e me mandar uma palavra de apoio nos momentos os quais eu achei que não iria conseguir.

Ao meu noivo, namorado, amigo e fiel companheiro Matheus, que me aguenta nesses dias complicados e turbulentos, com sua imensa paciência para me escutar e me dar conselhos. Estando fielmente ao meu lado, dando força e dizendo palavras confortantes para nunca desistir, nunca desanimar e levantar a cabeça que tudo vai dar certo. Tu és a minha motivação para jamais desistir de um sonho. Obrigado meu amor, não tenho palavras para dizer o quanto tu és importante para mim. TE AMO!

Ao meu orientador Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon, por ter me acolhido de braços abertos no seu grupo de pesquisa e dedicado seu tempo me orientando. Obrigada pela atenção e ensino que proporcionou a mim nesse período de graduação.

À minha coorientadora Deise Sarzi, que neste curto período de tempo foi mais que uma coorientadora e sim uma amiga, me ajudando nos momentos de aflição, até mesmo nas férias. Obrigada por todo teu ensinamento e pela dedicação do teu tempo, embora muitas vezes tendo outros trabalhos para resolver.

Aos meus sogros Danton e Luciara, que são meus segundos pais. Obrigada por todo carinho, apoio, ajudas e conselhos.

À minha colega, amiga/irmã de fé/camarada, Bruna Borges que está me acompanhando nessa jornada desde 2012 quando ingressamos na faculdade, embora já tenha se formado e esteja no mestrado jamais negou ajuda, sendo meu anjo da guarda, com seu imenso conhecimento sobre tudo, sempre esteve ao meu lado, me ajudando e me apoiando nos meus momentos de aflição. Obrigada por todo apoio, por todas palavras amigas e de confiança. Serei eternamente grata!

As minhas colegas e amigas guerreiras, Ananda Azambuja e Giane Borges, muito obrigada pela amizade de vocês e por estarem ao meu lado aguentando meus nervosismos e loucuras frequentes. Obrigada por todas palavras amigas, risadas, festas, caronas, viagens, enfim obrigada por tudo. Vocês são porretas!

A todos vocês meu muito obrigado. Amo vocês.

“É justamente a possibilidade de realizar um sonho que torna a vida interessante.”

**Paulo Coelho**

## RESUMO

Com o avanço das técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS), tem-se possibilitado o sequenciamento do genoma de espécies de interesse econômico, com custos relativamente baixos, desenvolvendo *primers* capazes de amplificar regiões ricas em microssatélites. A validação dos marcadores é de extrema importância, pois, é através dela que se obterá resultados confiáveis e adequados. Em relação aos testes de transferibilidade *in silico*, os quais requerem um banco de dados que possua informações de sequências gênicas da espécie em estudo, sendo ele o banco de dados de Sequências Expressas (EST). ESTs são marcadores de interesse pois controlam características fenotípicas importantes economicamente e permitem avaliar a distribuição de marcadores moleculares microssatélites em regiões transcrita e não transcrita. Espécies economicamente importantes da família Myrtaceae foram escolhidas para o estudo, sendo elas *Eugenia uniflora* e *Eucalyptus spp.* O presente estudo teve como objetivo validar *primers* de *E. uniflora* e testar sua transferibilidade para sete espécies de *Eucalyptus*. Para tal, foram utilizados dados obtidos no sequenciamento, montagem do rascunho do genoma de *E. uniflora*, prospecção de microssatélites e desenho de *primers*. A validação dos *primers* foi realizada através de uma simulação de eletroforese em gel. Após, obteve-se os bancos de dados de ESTs do *Taxonomy browser*, no site do NCBI, para sete espécies de *Eucalyptus*, sendo necessária a retirada de redundância, pois o banco de dados não possui curadoria e isso implica na possibilidade de muitas de suas sequências serem repetidas. As sequências repetidas foram excluídas e, por fim, realizou-se a simulação da PCR *in silico*. Da validação dos *primers* através dos géis, de um total de 111 *primers* testados, 80 *primers* amplificaram apenas um *locus* na região avaliada, demonstrando ser viáveis para a amplificação em laboratório. Dezoito *primers* apresentaram amplificação de dois *loci* na região avaliada e necessitam ser analisados em laboratório para ajustes na concentração de reagentes e temperaturas de anelamento. Contudo, 13 *primers* apresentaram amplificação de *loci* sobrepostos ou acima de três *loci* na região avaliada, tornando assim sua avaliação inviável. Para a transferibilidade através da comparação dos *primers* SSR de *Eugenia uniflora* (111) com os bancos de dados de EST de *Eucalyptus* por PCR virtual, obtivemos o número de *primers* transferíveis para cada espécie. O maior número de *primers* transferíveis foi para *E. gunni* (95), seguido de

*E. camaldulensis* (94), *E. globulus* (89), *E. pellita* (86) *E. grandis* (84), *E. urophylla* (76) e *E. tereticornis* (35). A transferibilidade de *primers* foi relativamente alta quando comparada com dados presentes na literatura, obtendo sucesso. Porém, o fato de algumas espécies terem uma transferibilidade baixa, pode se dar também pelo baixo número de sequências disponíveis no banco de dados. Esses marcadores apresentam um alto custo para seu desenvolvimento e, por isso, uma alternativa de barateamento é de extremo interesse. Conclui-se que através da validação dos *primers* houve redução nos custos laboratoriais, e havendo possibilidade de transferibilidade dos *primers* SSR de *Eugenia uniflora* para as sete espécies de *Eucalyptus*.

Palavras-chave: Pitangueira. EST-SSR. Bioinformática.



## ABSTRACT

The progress of next generation sequencing techniques (NGS) has enabled the genome sequencing of economically important species not only with relatively low costs but also developing primers with efficiency in amplifying microsatellite rich regions. The validation of markers is of major importance since it allow us to obtain reliable and suitable results. Transferability assays *in silico* requires a database containing the gene sequences of the species under study that may be found through the Expressed Sequence Tag (EST) database. ESTs are markers of interest as they control phenotypic traits with economic importance and to assess the distribution of microsatellite molecular markers in transcribed and non-transcribed sites. In this regard, economically important species from the Myrtaceae family were chosen for the present study: *Eugenia uniflora* and *Eucalyptus* spp. This study aimed to validate *E. uniflora* primers and test its transferability to seven species of *Eucalyptus*. For this purpose, data from the sequencing, draft genome assembly of the *E. uniflora*, prospection of microsatellites and primer design were used. The validation of the primers was held through a gel electrophoresis simulation. After that, data from ESTs were obtained from the Taxonomy browser on the NCBI website for seven *Eucalyptus* species, requiring the removal of redundancy since this database has no curation which implies the possibility of many repeated sequences. These repeated sequences were excluded and, lastly, the PCR simulation was fulfilled. For the *primers* validation through virtual gels, from an amount of 111 *primers* tested, 80 *primers* amplified only one *locus* in the evaluated area, proving to be viable for amplification in laboratory. Besides, eighteen *primers* showed amplification of two *loci* in the assessed region and because of that, they need to be evaluated in laboratory for adjustments in reagent concentrations and annealing temperatures. Moreover, thirteen primers showed amplification of overlapped *loci* or above three *loci* in the assessed region, thus making their evaluation unfeasible. For transferability by comparing the SSR *Eugenia uniflora primers* (111) with the *Eucalyptus* EST database by virtual PCR, it was possible to obtain the number of transferable *primers* for each species. The largest number of transferable *primers* was *E. gunni* (95), followed by *E. camaldulensis* (94), *E. globulus* (89), *E. pellita* (86) *E. grandis* (84), *E. urophylla* (76) and *E. tereticornis* (35). The transferability of *primers* was relatively high in comparison to the data presented in literature meaning, therefore, success. Yet, the

fact that some species show a low level of transferability may also occur for the low number of sequences available in the database. These markers have a high development cost and, for this reason, a cheaper alternative is of the utmost interest. As a conclusion, it was possible to evidence a reduction in laboratory costs through the validation of the *primers* in addition to reveal the possibility of transferability *Eugenia uniflora* SSR *primers* for the seven species of *Eucalyptus*.

Key words: Surinam cherry. EST-SSR. Bioinformatics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Amplificação através do gel de eletroforese <i>in silico</i> .....	24
<b>FIGURA 2:</b> Comparação entre marcadores de <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Eucalyptus</i> ssp.....	25
<b>FIGURA 3:</b> Amplicons de <i>Eugenia uniflora</i> para cada espécie de <i>Eucalyptus</i> .....	26

## LISTA DE SIGLAS

cDNA- DNA complementar

DNA- Ácido desoxirribonucleico

EST- *Expressed Sequence Tag*

pb- Pares de base

PCR- Reação em cadeia da polimerase

NGS- Sequenciamento de nova geração

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

SSR- Sequências Simples Repetidas

spp- espécies

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
1.1	Família Myrtaceae:	14
1.2	Marcadores moleculares:	15
1.2.1	Marcadores microssatélites:	15
1.3	Bioinformática:	17
1.4	Validação e transferibilidade de <i>primers</i> :	17
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	19
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	20
3.1	Geral:	20
3.2	Específicos:	20
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	21
4.1	Obtenção das sequências analisadas	21
4.1.1	Sequenciamento do Genoma	21
4.1.2	Montagem do Genoma	21
4.1.3	Desenvolvimento e desenho dos <i>primers</i> SSR	22
4.2	Validação dos <i>primers</i> SSR de <i>Eugenia uniflora</i>	22
4.3	Processo para simulação da PCR <i>in silico</i>	23
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	24
5.1	Validação dos <i>primers</i> SSR de <i>Eugenia uniflora</i>	24
5.2	Transferibilidade de marcadores SSR	25
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	27
	REFERÊNCIAS	28
	ANEXOS	34

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae é uma família de plantas dicotiledôneas da qual tem-se o conhecimento de 5600 espécies, sendo estas distribuídas em 132 gêneros (GOVAERTS et al., 2012). Assim, foram escolhidas para o estudo duas que possuem um grau economicamente elevado sendo elas *Eugenia uniflora* e *Eucalyptus spp.*

Nativa do Brasil, a *Eugenia uniflora* L. conhecida popularmente como pitangueira, é uma planta frutífera que apresenta quatro diferentes centros de diversidade: Nordeste-Caatinga, Sul-Sudeste, Brasil Central-Cerrado e Mata Atlântica (DONADIO et al., 2002). Adaptada a regiões de clima tropical, a espécie é importante na recuperação de áreas degradadas de sistemas agroflorestais e reflorestamentos, sendo também utilizada para paisagismo e cultivares, tendo sua madeira para fins de produção de instrumentos agrícolas (LORENZI, 1998).

Devido a ação dos seus compostos fenólicos, a *E. uniflora* possui aplicação na medicina popular através da utilização de suas folhas em chás, agindo principalmente como hipotensor, antigota, estomáquico e hipoglicemiante (ALMEIDA et al., 1995; AURICCHIO e BACCHI, 2003), além de seus frutos serem fontes de alimento à fauna silvestre, gerando assim uma grande importância ecológica. Ainda em relação a este fato, muitos animais favorecem a sobrevivência e permanência da espécie ao dispersar suas sementes após o consumo (PIZZO, 2003; GRESSLER, 2006).

O gênero *Eucalyptus* é nativo da Austrália, possuindo cerca de 600 espécies, além de possuir uma grande variação entre estas, tendo diversas procedências. Essa variabilidade é utilizada na produção de matéria-prima, o qual através do melhoramento genético confere e agrega qualidade aos diversificados produtos e a economia (OLIVEIRA, 1997). Do ponto de vista econômico, os reflexos do melhoramento genético são evidentes e alcançam importância significativa dentro dos vários seguimentos industriais que utilizam a madeira como insumo energético ou na indústria de celulose (PONCE, 1995).

Os microssatélites foram utilizados em *Eucalyptus*, com objetivos do tipo: teste de paternidade e seleção de indivíduos de *Eucalyptus grandis* (KIRST et al.,

2005); teste de paternidade e sistema reprodutivo em *E. grandis* e *E. urophylla* (GRATTAPAGLIA et al., 2004); mapa de ligação em *E. grandis* e *E. urophylla* (BRONDANI et al., 2002) entre outros. Na medicina destaca-se a utilização do *Eucalyptus globulus* L., no tratamento de gripes, congestão nasal e sinusite, segundo informações etnofarmacológicas (LORENZI & MATOS, 2002).

De acordo com Viana et al. (2003), o uso de marcadores moleculares na avaliação da variabilidade genética permite caracterizar indivíduos de qualquer espécie de maneira precoce e em menor espaço de tempo, sendo portanto viável. Porém, poucos registros são encontrados na literatura em relação ao uso de marcadores moleculares em espécies nativas do Sul do Brasil.

## **1.2 Marcadores moleculares**

Os marcadores moleculares representam características de DNA que são responsáveis por diferenciar dois ou mais organismos, sendo estas herdadas geneticamente (MILACH, 1998). Atualmente, existem diversos tipos de marcadores moleculares baseados em DNA e estes se diferenciam pela tecnologia empregada para detectar variabilidade e diferenças entre organismos, assim como pelos custos, facilidades de utilização, consistência e repetibilidade (MILACH, 1998; WEISING et al., 2005). Levando em consideração as últimas décadas, uma grande variedade de marcadores moleculares baseados em DNA tem sido desenvolvida (PHILLIPS e VASIL, 2001; WEISING et al., 2005).

Existem diversas vantagens no uso de marcadores moleculares mas para que estas sejam compreendidas deve-se primeiro entender que estes marcadores genéticos são parte do cromossomo, tendo localizações específicas, o que pode ser utilizado, inclusive, como ponto de referência para análises de genomas (KUMAR, 1999).

### **1.2.1 Marcadores microssatélites**

Os marcadores microssatélites também conhecidos como marcadores SSR (Sequências Simples Repetidas), são unidades curtas de 2 a 5 pb repetidas em tandem (FALEIRO, 2007).

Estes marcadores são encontrados em grandes quantidades e uniformemente distribuídos pelo genoma das plantas, além de serem codominantes, multialélicos e com alta heterozigosidade (ZUCCHI, 2003), sendo usados para avaliar e monitorar similaridade, variabilidade e relação genética entre genótipos, construir mapas genéticos e encontrar marcadores para características de interesse (MEHLENBACHER, 1995; PIGATO & LOPES, 2001; SALLA et al., 2002; UPADHYAY et al., 2004).

Existem diversas vias para desenvolver marcadores microssatélites que serão posteriormente utilizados em estudos genéticos e programas de melhoramento de espécies florestais. Exemplos destas vias são: bibliotecas genômicas, bibliotecas de cDNA e sequenciamento, sendo a eficiência destas inquestionável. Porém o custo de desenvolvimento destas vias é muito alto, embora o sequenciamento já possua um custo mais reduzido (KANTETY et al., 2002).

As vantagens dos marcadores SSR vão desde sua codominância, o alto nível de polimorfismo que pode ser detectado até sua alta reprodutibilidade. Mas como dito anteriormente, existe um alto custo requerido no desenvolvimento de *primers* específicos, o que gera desvantagens (FALEIRO, 2007). Como um método para minimizar os custos de geração de dados, tem-se o desenvolvimento baseado em sequências EST, as quais apresentam vantagens sobre os métodos tradicionalmente propostos, pois implica na utilização de sequências EST depositadas em bancos de dados. O banco de dados de sequências expressas (EST) são marcadores de interesse pois controlam características fenotípicas importantes economicamente e permitem avaliar a distribuição de microssatélite em regiões transcrita e não transcrita. (KANTETY et al., 2002).

Para testes em laboratório é necessário amplificar microssatélites via PCR utilizando *primers* específicos para flanquear o DNA de interesse (FALEIRO, 2007). Esta metodologia gera muitos custos e a partir disto é importante realizar a validação dos *primers* antes da transferibilidade para outras espécies. De acordo com a literatura, obteve-se sucesso ao realizar a transferibilidade de *primers* entre algumas espécies da mesma família (SCHIAVON et al., 2009; LEITE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

### 1.3 Bioinformática



O termo bioinformática surgiu no final da década de 80, criado por Hwa Lim, porém só foi popularizado a partir da década de 90 devido ao projeto genoma humano (GOODMAN, 2002). A bioinformática pode ser definida como uma área da ciência que engloba aspectos da informática desde processamento, armazenamento, análise até a interpretação de dados oriundos de uma informação biológica (VASCONCELOS, 2003). Sendo tida como uma ferramenta de grande importância para estudos e análises, a bioinformática combina diferentes técnicas da matemática, computação e biologia com o objetivo de agilizar e facilitar a compreensão de dados biológicos experimentais (SOUSA, 2001).

Segundo Luscombe et al. (2001), a bioinformática tem os seguintes objetivos: organizar dados permitindo o pesquisador acessar e/ou submeter as informações existentes ou produzidas; auxiliar as análises e interpretações de dados a partir do desenvolvimento de ferramentas e recursos para tal e, por último, utilizar estas ferramentas de maneira biologicamente significativa.

#### **1.4 Validação e transferibilidade de *primers***

Com o avanço das técnicas de sequenciamento de nova geração “Next Generation Sequencing” (NGS), tem-se possibilitado o sequenciamento do genoma de espécies de interesse econômico, com custos relativamente baixos, desenvolvendo *primers* capazes de amplificar regiões ricas em microssatélites. (MACHADO & SILVA 2013). A validação dos marcadores é de extrema importância pois, é através dela que se obterá resultados confiáveis e adequados para dar continuidade com experimentos em laboratório, evitando gastos desnecessários.

Características importantes a se considerar durante a validação de microssatélites de indivíduos heterozigotos, é que estes apresentam duas bandas de gel, enquanto que indivíduos homozigotos apresentam apenas uma banda (WEISING et al., 2005). Assim, isto pode se tornar uma influência durante a interpretação de dados da validação, podendo gerar falsos resultados (KIJAS et al., 1997; DEWOODY et al., 2004). Entretanto, a ocorrência desses alelos não amplificados são menos frequentes em marcadores SSR se for comparado aos microssatélites genômicos (LEIGH et al., 2006; LIEWLAKSANEEYANAWIN et al.,

2004; RUNGIS et al., 2004). *In silico* temos que ter apenas uma banda devido à montagem, que não é feita em 2 cromossomos, mas em apenas 1 deles.

Em relação a transferibilidade de marcadores pode se definir como a propriedade de determinados pares de *primers*, conseguirem flanquear regiões microssatélites de duas espécies filogeneticamente relacionadas, porém não idênticas (KULEUNG et al., 2004). A informação genética desses marcadores pode ser realizada através da conservação da ordem e conteúdo gênico que existem entre estas espécies (MUDGE et al., 2005), sendo isto possível devido ao fato de os genomas vegetais possuírem esta característica de conservação (KUMAR, 1999), porém deve-se levar em consideração a distância filogenética entre as espécies sob análise (KUMAR, 1999; KALÓ et al., 2004). De acordo com alguns autores, espécies diferentes conservam determinadas ordens de genes por estes serem vantajosos as plantas e devido a este fato, não devem sofrer modificações (KUMAR, 1999; ZHU et al., 2008).

Segundo Varshney et al., (2005), os marcadores SSR tem como principal característica o seu potencial de transferibilidade. Estes marcadores exibem maior mobilidade interespecífica do que os marcadores genômicos pelo fato deles serem derivados de regiões transcritas (SCOTT et al., 2000).

## 2 JUSTIFICATIVA

A validação dos marcadores é de extrema importância pois, é através dela que se obterá resultados confiáveis para só assim, a transferibilidade ser possível. A transferibilidade de marcadores microssatélites entre espécies ocorre naturalmente, apesar de haver diminuição desta característica com o aumento da distância genética. Pesquisas com espécies afins demonstram a possibilidade de utilização de *primers* microssatélites para amplificação em diferentes espécies e gêneros. O método convencional para descoberta de microssatélites é caro e laborioso, por isso tem sido substituído por análises *in silico* nos bancos de dados genômicos, diminuindo assim tempo e gastos desnecessários. A utilização de espécies próximas evolutivamente e com um número elevado de sequências expressas no banco de dados ajuda na descoberta de transferência de microssatélites.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como principal objetivo validar *primers* de *Eugenia uniflora* e testar sua transferibilidade para sete espécies de *Eucalyptus*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Revelar através de tecnologias disponíveis as regiões variáveis entre as espécies de *Eucalyptus spp* e *Eugenia uniflora*;
- Possibilitar detecção de diferenças entre indivíduos;
- Validar os microssatélites para *Eugenia uniflora* através de gel virtual.
- Reduzir gastos laboratoriais.

## 4 METODOLOGIA

O sequenciamento e montagem do genoma, assim como o desenvolvimento de marcadores microssatélites e desenhos dos *primers* SSR foram realizados e cedidos pela mestrandia do PPGCB Deise Schroder Sarzi.

### 4.1 Obtenção dos marcadores analisados

As sequências dos marcadores de *Eugenia uniflora* estão disponíveis no GenBank (sob os números KT873889 até KT873945). A obtenção dos marcadores é descrita a seguir:

-Coleta e extração de DNA:

Amostras foliares de um indivíduo de *Eugenia uniflora* foram coletadas em uma população natural localizada na Universidade Federal do Pampa, município de São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil e depositado sob indicação HBEI1150, no Herbário Bruno Edgar Irgang.

#### 4.1.1 Sequenciamento do Genoma

Foi necessário fazer sequenciamento do genoma de *Eugenia uniflora*, sendo este o primeiro passo para se obter uma descrição completa da informação genética de cada organismo, pois todos os dados necessários para construção estão presentes no DNA genômico. Para isto utilizamos a plataforma NGS IonTorrent PGM®.

#### 4.1.2 Montagem do Genoma

Após isso foi necessária a montagem do genoma, sendo este o processo de reconstrução da sequência de DNA original de um organismo a partir dos “reads” com o programa Velvet (versão 1.2.10) (ZERBINO, D. E BIRNEY, E., 2008).

### 4.1.3 Desenvolvimento e desenho dos *primers* SSR

O desenvolvimento de marcadores microssatélites foi realizado através do software SSR locator (MAIA et al., 2008) para encontrar SSR-di, tri e tetra, com no mínimo de 6 repetições. O desenho dos *primers* foi realizado através do software Primer3.

### 4.2 Validação dos *primers* SSR de *Eugenia uniflora*

A partir dos dados gerados, são necessárias análises de validação para comprovar a eficácia dos marcadores, e de transferibilidade, visando a redução de custo. Para validar os marcadores foi realizada a simulação de eletroforese em gel com ajuda do software SIMGEL, incluído no pacote SPCR (CAO et al., 2005). A validação seguiu os seguintes critérios de avaliação:

- Não apresentar *loci* sobrepostos;
- Os alelos devem estar entre 90 e 280 pb;
- Quando dois *loci* estiverem no tamanho desejado e não sobrepostos, eles devem ser testados em laboratório;
- *Primers* ótimos devem ter apenas um *loco* na região desejada;
- Mais que dois *loci* na região avaliada, será desconsiderado para análises em laboratório.

Um alelo/*loco* é considerado ótimo, pois a montagem do genoma através do sequenciamento é feita em apenas um cromossomo, não sendo possíveis heterozigotos e, conseqüentemente, não tendo possíveis dois alelos.

### 4.3 Processo para simulação da PCR *in silico*

Para tal foi necessário acessar o bancos de dados de ESTs do *Taxonomy browser* no site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foram obtidos dados de sequências ESTs para sete espécies de *Eucalyptus*, sendo elas *Eucalyptus gunnii*, *Eucalyptus pellita*, *Eucalyptus tereticornis*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*.

É necessária a retirada de redundância do banco de dados, pois este não possui curadoria. Para isso, em um computador utilizando o sistema LINUX, o qual é uma versão gratuita e de código aberto do UNIX, os programas GC ContentCalculator e CAP3 (HUANG e MADAN, 1999) foram instalados para que as sequências fossem contadas e montadas.

Para cada espécie individual, as sequências foram contadas pelo programa GC ContentCalculator, e posteriormente as sequências mascaradas foram montadas pelo programa CAP3 gerando agrupamentos baseados na similaridade das sequências, obtendo como resultado arquivos com sequências consenso *contigs* e sequências únicas *singles* em formato *.fasta*, sendo assim removidas as sequências repetidas.

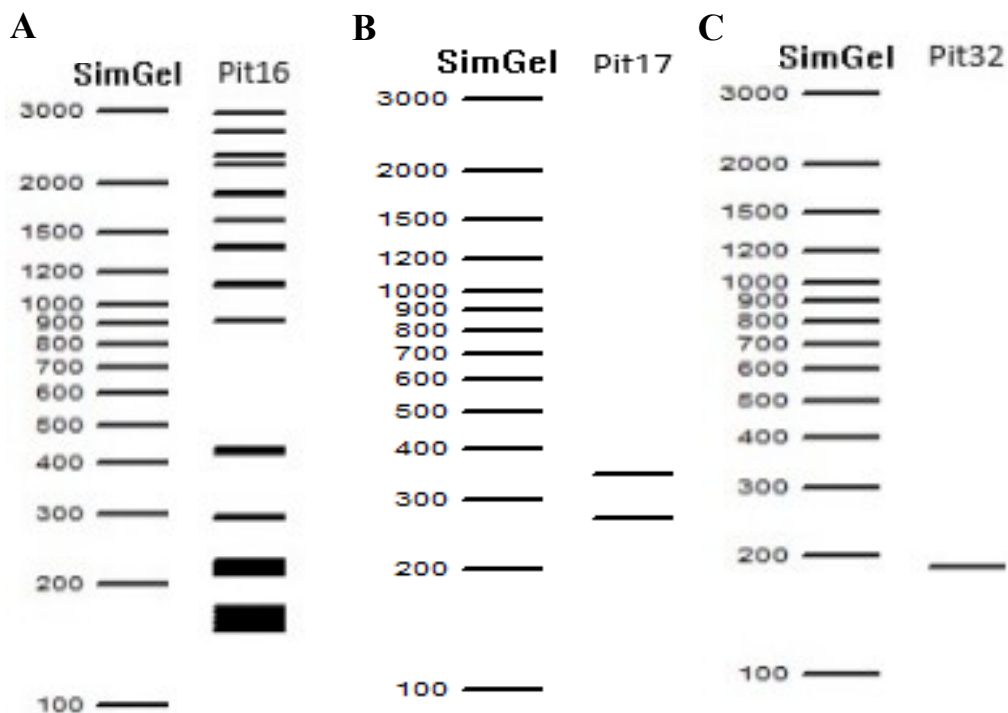
Por fim, foi utilizado o programa SSR locator, o qual fez a simulação da PCR *in silico*, necessitando de especificações exatas de temperatura de anelamento (45°C) e porcentagem de Guanina/Citosina (30%), para a primeira PCR *in silico* de *Eugenia uniflora*, seguida de cada uma das sete espécies de *Eucalyptus*, procurando assim a transferibilidade entre tais espécies.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Validação dos *primers* SSR de *Eugenia uniflora*

Os *primers* de *Eugenia uniflora* passaram por um processo de validação antes de serem submetidos a testes de transferibilidade. Durante a validação alguns *primers* não passaram pelos critérios impostos sendo assim descartados. Da validação dos *primers* através dos géis (Anexo 1), de um total de 111 pares de *primers* testados, 80 pares de *primers* amplificaram apenas um *loco* na região avaliada, demonstrando ser viáveis para a amplificação em laboratório (Anexo 2). Dezoito pares de *primers* apresentaram amplificação de dois *loci* na região avaliada e necessitam ser avaliados em laboratório para ajustes na concentração de reagentes e temperaturas de anelamento. Contudo, 13 pares de *primers* apresentaram amplificação de *loci* sobrepostos ou acima de três *loci* na região avaliada e foram considerados inviáveis para testes em laboratório.

A figura abaixo demonstra três géis avaliados durante o processo de validação (Pit16, Pit17 e Pit32), sendo que os mesmos exemplificam os critérios avaliados durante a mesma:



**FIGURA 1:** Amplificação através do gel de eletroforese *in silico*. O SimGel corresponde ao marcador ou ladder em pares de bases, sendo a região avaliada entre 90 e 280 pb. Letra A (Pit16) e letra B



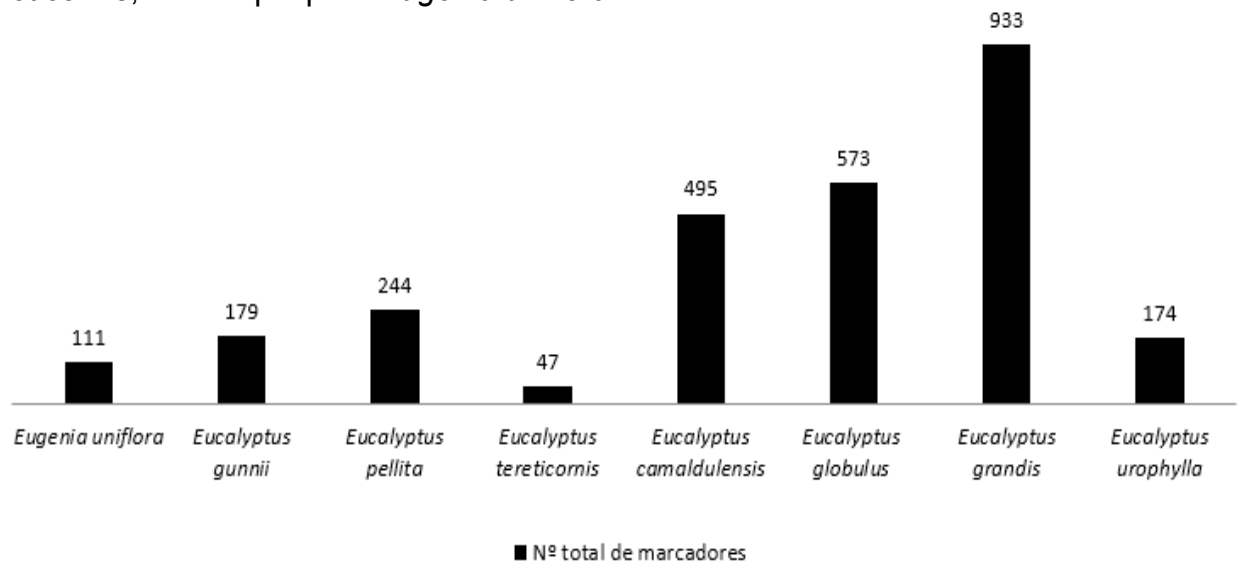
(Pit17) são *primers* que não demonstraram estar de acordo com os critérios propostos durante a validação, sendo que ao contrário da letra C (Pit32) que demonstrou ser um ótimo *primer*. (Fonte: Autor, 2016)

Como demonstra a figura 1, os géis A e B (Pit16 e Pit17, respectivamente), não estão de acordo com os critérios para *primers* ótimos. O gel A apresentou *loci* sobrepostos, tornando assim a avaliação desses *loci* inviáveis, enquanto que o gel B apresentou *loci* de tamanhos desejados porém, ainda necessitam ser analisados em laboratório.

O gel C (Pit32) apresentou apenas um *loco* na região avaliada indicando que o mesmo possui uma amplificação correta tornando-o viável para utilização laboratorial.

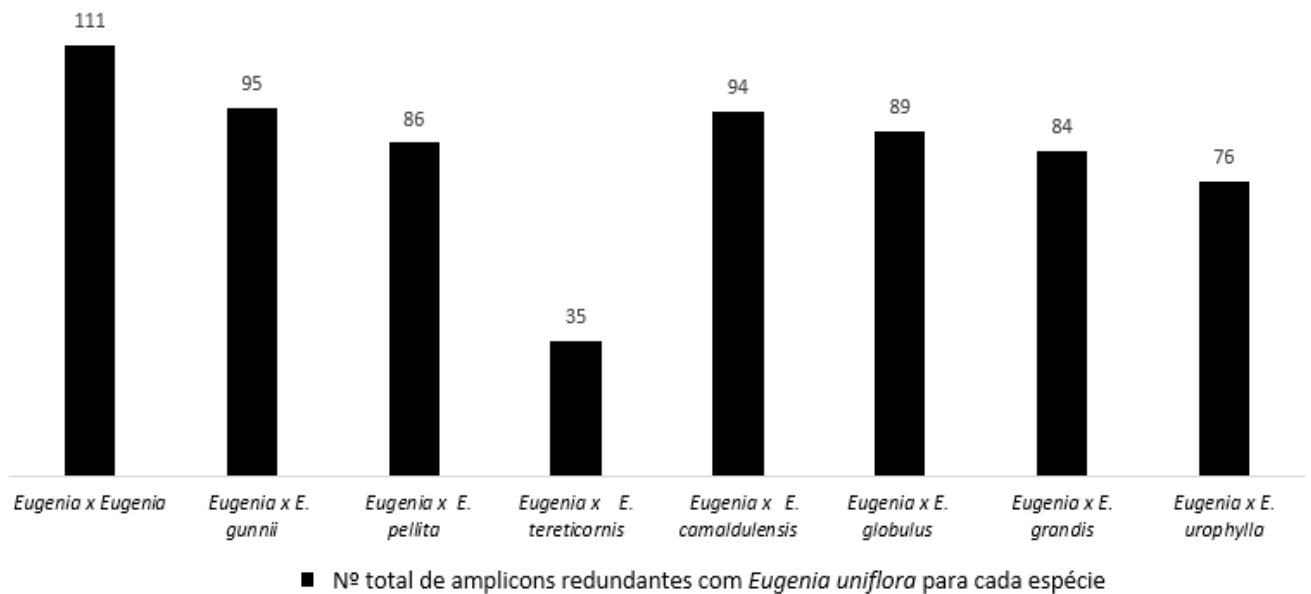
## 5.2 Transferibilidade de marcadores SSR de *Eugenia uniflora*

Através do primeiro PCR *in silico* pôde-se obter um grande número de marcadores SSR para cada espécie, seguindo especificações de temperatura de anelamento e porcentagem de Guanina e Citosina. Como demonstra a figura 2, foram obtidos 933 marcadores para *E. grandis*, 573 para *E. globulus*, 495 para *E. camaldulensis*, 244 para *E. pellita*, 179 para *E. gunnii*, 174 para *E. urophylla* e 47 para *E. tereticornis*, sendo que para *Eugenia uniflora* foram encontrados 111 marcadores.



**FIGURA 2:** Número total de marcadores obtido para cada espécie, utilizando as especificações de temperatura de anelamento e porcentagem de Guanina/Citosina empregados para *E. uniflora*. A figura demonstra um maior número de marcadores para *Eucalyptus grandis* em um total de 933 SSR para a espécie. (Fonte: Autor, 2016)

Após o número total de marcadores ser definido foi realizada uma segunda PCR *in silico* mostrando o número de amplicons redundantes, dos *primers* obtidos dos bancos de dados, quando comparados com os *primers* de *Eugenia uniflora*, obtivemos o número de *primers* transferíveis para cada espécie. A quantidade destes *primers* é demonstrado na figura 3, onde observa-se um maior número de *primers* transferíveis para *E. gunnii* (95), seguido de *E. camaldulensis* (94), *E. globulus* (89), *E. pellita* (86) *E. grandis* (84), *E. urophylla* (76) e *E. tereticornis* (35). A transferibilidade de *primers* foi relativamente alta quando comparada com dados presentes na literatura, obtendo sucesso. De acordo com Brondani et al., (1998) isto ocorre pelo fato dos níveis de conservação das sequências entre as espécies testadas serem altas e terem similaridade com as sequências disponíveis no banco de dados.



**FIGURA 3:** Número total de amplicons redundantes com *Eugenia uniflora* para cada espécie de *Eucalyptus*. (Fonte: Autor, 2016)

Através disso, pode-se dizer que os resultados observados sejam devido ao fato de algumas espécies terem uma transferibilidade baixa, ou também pelo baixo número de sequências disponíveis no banco de dados, contrário ao ocorrido nos dados anteriormente demonstrados.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente trabalho foi possível observar que a bioinformática com a melhoria dos programas facilitou a realização de tarefas laboriosas e exaustivas, economizando reagentes, comparando sequências de DNA e gerando resultados potencialmente significativos. Através dos resultados obtidos pode-se concluir que há possibilidade de transferibilidade dos *primers* SSR de *Eugenia uniflora* para as sete espécies de *Eucalyptus*, tendo a validação *in silico* de *primers* SSR como uma alternativa de barateamento de extremo interesse, pois permite excluir previamente marcadores que não seriam ideais.

Como perspectivas, após os *primers* validados *in silico*, estes deverão ser testados em laboratório e poderão ser utilizados para estudos de genética de populações, evolução e melhoramento genético.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E.C.; KARNIKOWSKI, M.G.O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. **Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine.** Rev. Saúde Pública, v.29, p. 428-433, 1995.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. **Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas.** Rev. Inst. Adolfo Lutz, v.62, n.1, p.55-61, 2003.
- BRONDANI, R.P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. **Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* e *E.urophylla*.** Theoretical and Applied Genetics, v.97, p.816-827, 1998.
- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. **Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers.** Molecular Genetic Genomics, v.267, p.338-347, 2002.
- CAO, Y.; WANG, L.; XU, K.; KOU, C.; ZHANG, Y.; WEI, G.; HE, J.; WANG, Y.; ZHAO, L. **Information theory-based algorithm for in silico prediction of PCR products with whole genomic sequences as templates.** BMC Bioinformatics, v.6, n.190, 2005.
- DEWOODY, J.; NASON, J.D.; SMITH, M. **Inferring demographic processes from the genetic structure of a metapopulation of *Boltonia decurrens* (Asteraceae).** Conserv Genet, v.5, p.603–617, 2004.
- DONADIO, L.C.; MÔRO, F.V.; SERVIDONE, A.A. **Frutas Brasileiras.** Jaboticabal: Novos Talentos, p.288, 2002.
- FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.102, 2007.
- GIBAS, C.; JAMBECK, P. **Desenvolvendo Bioinformática: ferramentas de software para aplicações em Biologia.** Editora Campus. Rio de Janeiro. RJ, p.440, 2001.

GOODMAN, N. **Biological data becomes computer literature: new advances in bioinformatics.** Current Opinion in Biotechnology, v.13, p.68-71, 2002.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.HOLST, B. K.; LANDRUM, L. L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L. H.; WILSON, P; G.; LUCAS, E. **World Check-List of Myrtaceae**, 2012. Facilitado pelo Royal Botanic Gardens, Kew. Publicado na internet; <http://apps.kew.org/wcsp/>. Acessado em 29/09/2016. 09:22.

GRATTAPAGLIA, D.; RIBEIRO, V.J.; REZENDE, G.D.S.P. **Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for *Eucalyptus*.** Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v.109, p.192-199, 2004.

GRESSLER, E. **Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil.** Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v.29, n.4, p.509-530, 2006.

HUANG, X.; MADAN, A. **CAP3: A DNA Sequence Assembly Program.** Genome Research, v.9, p.868-877, 1999.

KALÓ, P.; SERES, A.; TAYLOR, S.A.; JAKAB, J.; KEVEI, Z.; KERESZT, A.; ENDRE, G.; ELLIS, T.H.N.; KISS, G.B. **Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*.** Molecular Genetics and Genomics, v.272, p.235-246, 2004.

KANTETY, R.V., M.L. ROTA, D.E. MATHEWS, AND M.E. SORRELLS. **Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat.** Plant. Mol. Biol. Rep. v. 48, p.501-510, 2002.

KIJAS, J. M. H.; THOMAS, M. R.; FOWLER, J. C. S.; ROOSE, M. L. **Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*.** Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 94, p. 701-706, 1997.

KIRST, M.; CORDEIRO, C.M.; REZENDE, G.D.S.P.; GRATTAPAGLIA, D. **Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations.** Journal of Heredity. v.2, n.96, p.161-166, 2005.

KULEUNG, C.; BAENZIGER, P.S.; DWEIKAT, I. **Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale.**Theoretical and Applied Genetics, v.108, p.1147-1150, 2004.

KUMAR, L.S. **DNA markers in plant improvement: An overview**. Biotechnology Advances, v.17, p.143-182, 1999.

LEIGH, T. W.; PETERS, C.; AND SHELTON, J. **The consumer quest for authenticity: The multiplicity of meanings within the MG subculture of consumption**. Academy of Marketing Science. Journal v.34, n.4, p.481-493, 2006.

LEITE, T. L.; MARCO, A. F.; TARCHETTI, B. D.; FERREIRA, M. A. J. F.; AMARAL, Z. P. S.; BUSO, G. S. C. **Análise de transferibilidade de primers microssatélites de *Cucumis melo* para *Curcubita moschata* e *Luffa cylindrica***. Brasília, 2007.

LIEWLAKSANEEYANAWIN, C.; RITLAND, C.E, EL-KASSABY, Y.A and RITLAND. **Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs**. Theor Appl Genet v.109, p.361-369, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, Editora Plantarum. p.352, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Nova Odessa/ Editora Plantarum, 2002.

LUSCOMBE, N.M. ; GREENBAUM, D.; GERSTEIN, M. **What is bioinformatics? An introduction and overview**. For IMIA 2001 Yearbook. New Haven, USA, 2001.

MACHADO, E.L., SILVA, S.A. **Design And validation of SSR Microsatellite primers for castor bean**. Pesq. Agropec. Bras. v.48, p.1457–1463, 2013.

MAIA, L.C.; PALMIERI, D.A.; DE SOUZA, V.Q.; KOPP, M.M.; DE CARVALHO, F.I.; COSTA DE OLIVEIRA, A. **SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation**. International Journal of Plant Genomics, v. 2008, n. 41 p. 26-96, 2008.

MEHLENBACHER, S.A. **Classical and molecular approaches to breeding fruit and nut crops for disease resistance**. Hortscience, Alexandria, v.30, n.3,p.466-477, 1995.

MILACH, S.C.K. **Marcadores de DNA**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v.5, p.14-17, 1998.

MUDGE, M., VOUTAZ, J., SCHROER, C. & LUM, M. **Reflection Transformation Imaging and Virtual Representations of Coins from the Hospice of the Grand St. Bernard.** In The 6th International Symposium on Virtual Reality, Archaeology and Cultural Heritage (VAST2005). Eurographics Association, p. 29–39, 2005.

OLIVEIRA, J. T. O. **Caracterização da madeira de eucalipto para a construção civil.** Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

OLIVEIRA, M. S. P.; SANTOS, J. B.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, D.F. **Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites.** Ciência & Agrotecnologia, Lavras, v. 34, n. 5, 1253-1260. 2010.

PHILLIPS, R.L. e VASIL, I.K. **DNA-based markers in plants.** 2nd edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.529, 2001.

PIGATO, S.M.P.C.; LOPES, C.R. **Avaliação da variabilidade genética em quatro gerações de *Eucalyptus urophylla* S.T.** Blake por meio de marcador molecular RAPD. Scientia Forestalis, Piracicaba, n.60, p.119-133, 2001.

PIZZO, M. A. **Padrão de deposição de sementes e sobrevivência de sementes e plântulas de duas espécies de Myrtaceae na Mata Atlântica.** Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 26, n.3, p.371-377, 2003.

PONCE, F. A. U. **Marketing Interno: um estudo de caso no setor de franquizado do ramo de perfumaria e cosméticos nas cidades de São Paulo e Osasco.** Tese (Doutorado em Administração) – Departamento de Administração da Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da Universidade de São Paulo, 1995.

RUNGIS, D., BERUBE, Y., ZHANG, J., RALPH, S., RITLAND, C.E., ELLIS, B.E., DOUGLAS, C., BOHLMANN, J. & RITLAND, K. **Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp) from expressed sequence tags.** Theor. Appl. Genet., v.109,p.1283–1294, 2004.

SALLA, M.F.S.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. **Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.).** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.24, n.1, p.15-22, 2002.

SCHIAVON, A. L.; SANTOS, M. A.; SOUZA, R. C.; HUNGRIA, M. **Transferibilidade de marcadores microssatélites de soja para feijão comum (*Phaseolus vulgaris*)** In: IV Jornada acadêmica da Embrapa soja, Londrina, n. 312, p. 180-185, 2009.

SCOTT, K. D.; EGGLE, P.; SEATON, G.; ROSSETO, M.; ABLETT, E. M.; LEE, L. S.; HENRY, R. J. **Analyses of SSRs derived from grape ESTs**. Theoretical and Applied Genetics, v.100, p.723-726, 2000.

SOUZA, M.V. **Gestão da Vida - Genoma e Pós Genoma**. Editora UnB. Brasília, DF. p.144, 2001.

UPADHYAY, A.; JAYADEV, K.; MANIMEKALAI, R.; PARTHASARATHY, V.A. **Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers**. Scientia Horticulturae, Amsterdam, v.99, n.3-4, p.353-362, 2004.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. **Genic microsatellites markers in plants: features and applications**. Trends in Biotechnology, v.23, n.1, 2005.

VASCONCELOS, S.S. **"Uma investigação: ESTs (Expressed Sequence Tags) podem ser usados no desenvolvimento de marcadores moleculares baseados em introns?"**, Tese (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia)- Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2003.

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M.; MALDONADO, J.F.M.; JÚNIOR, A.T.A. **Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.25, n.3, p.489-493, 2003.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K. e KAHL, G. **DNA fingerprinting in plants: Principles, Methods, and Applications**. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, p.444, 2005.

ZERBINO, D.R.; BIRNEY, E. **Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs**. Genome Res. v.5, n.18, p.821-829, 2008.

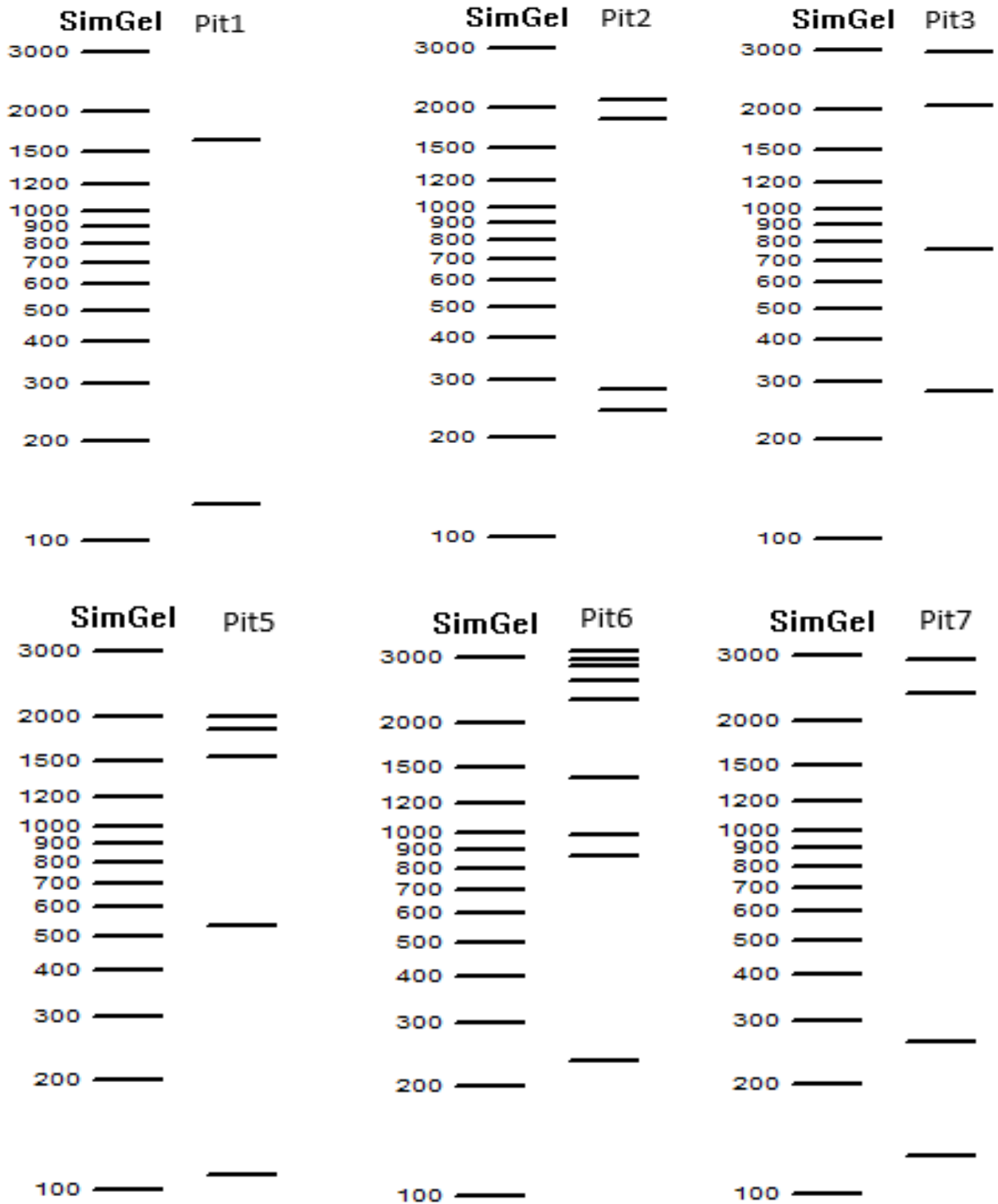
ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOSKY, R. **Genetic structures and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers**. Genetics and Molecular Biology, v. 26, p. 449-457, 2003.

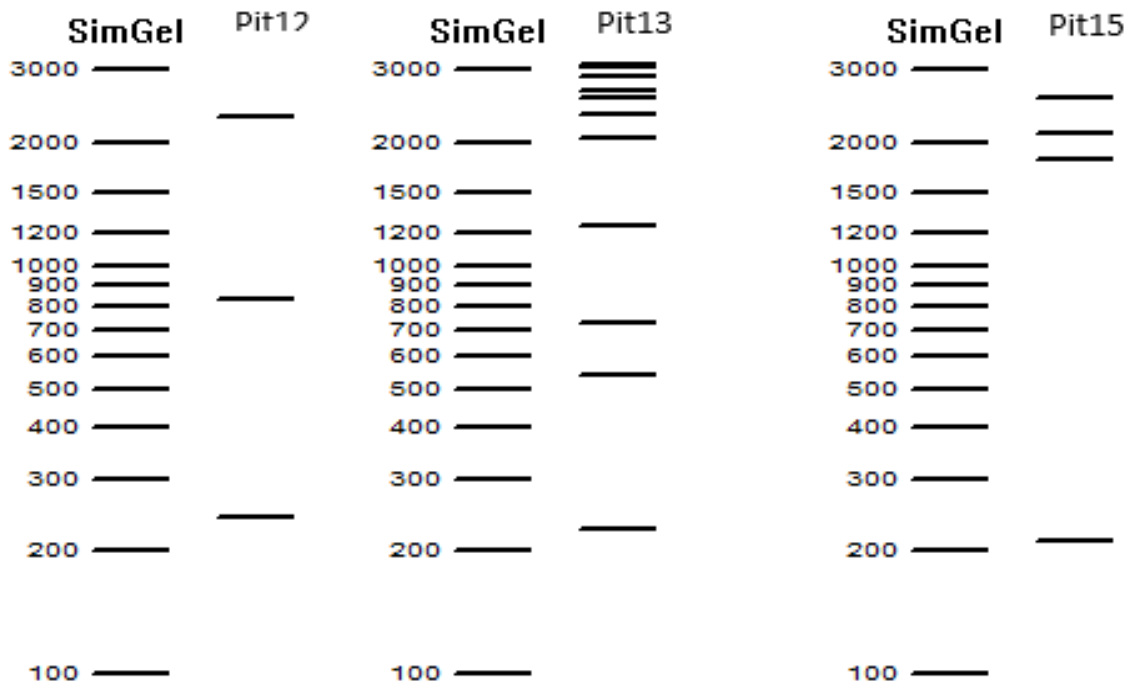
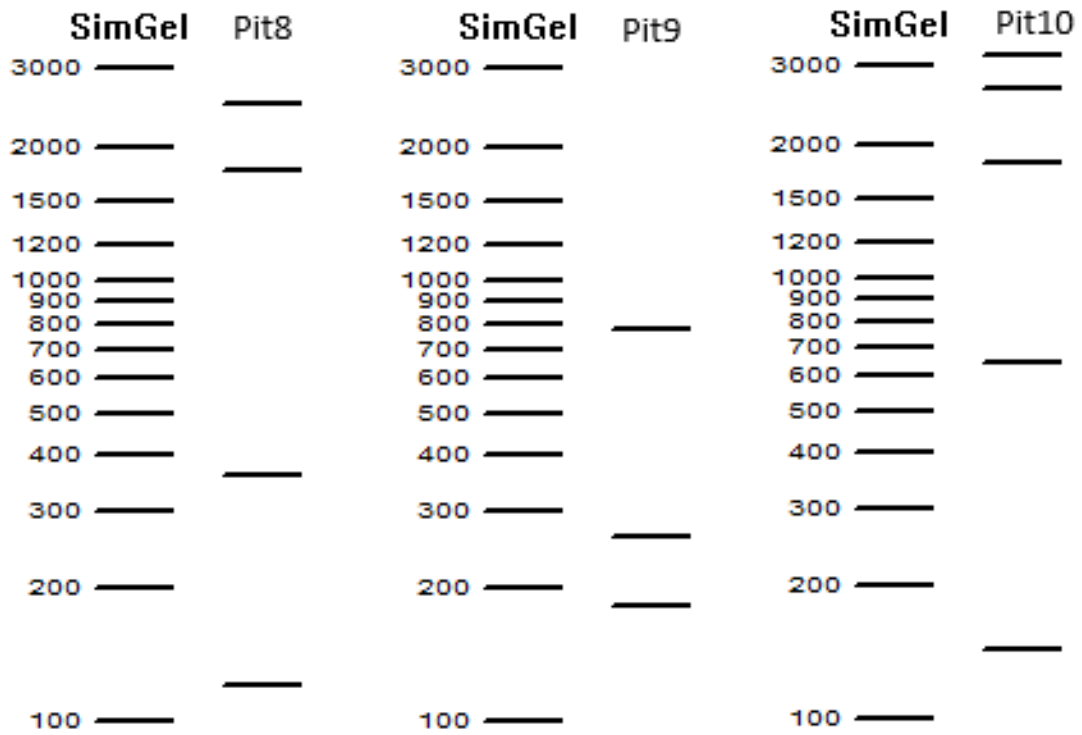


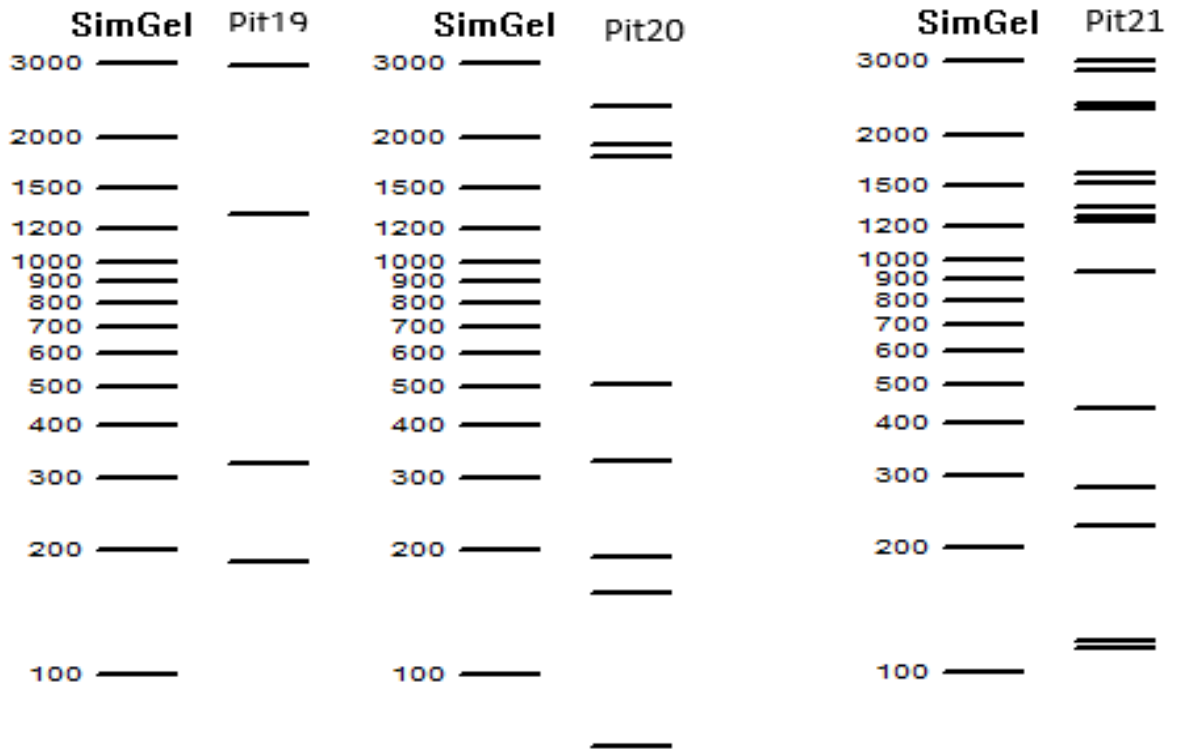
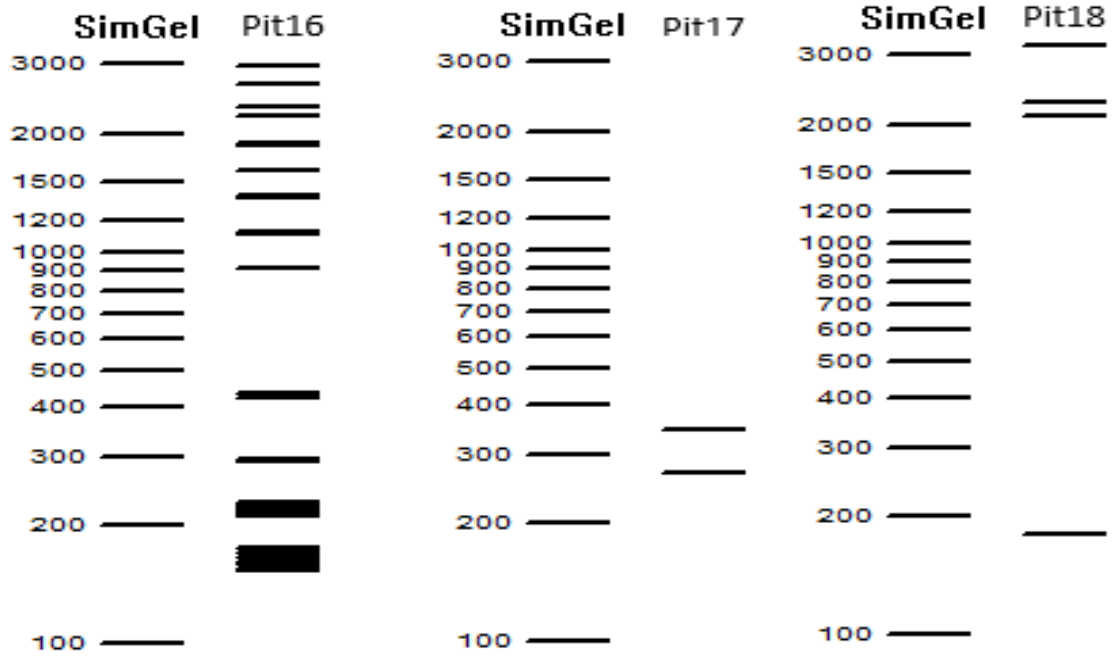
ZHU, C.; GORE, M.; BUCKLER, E.S. and YU, J. **Status and prospects of association mapping in plants.** Int J Plant Genomics, v.1, p.5-20, 2008.

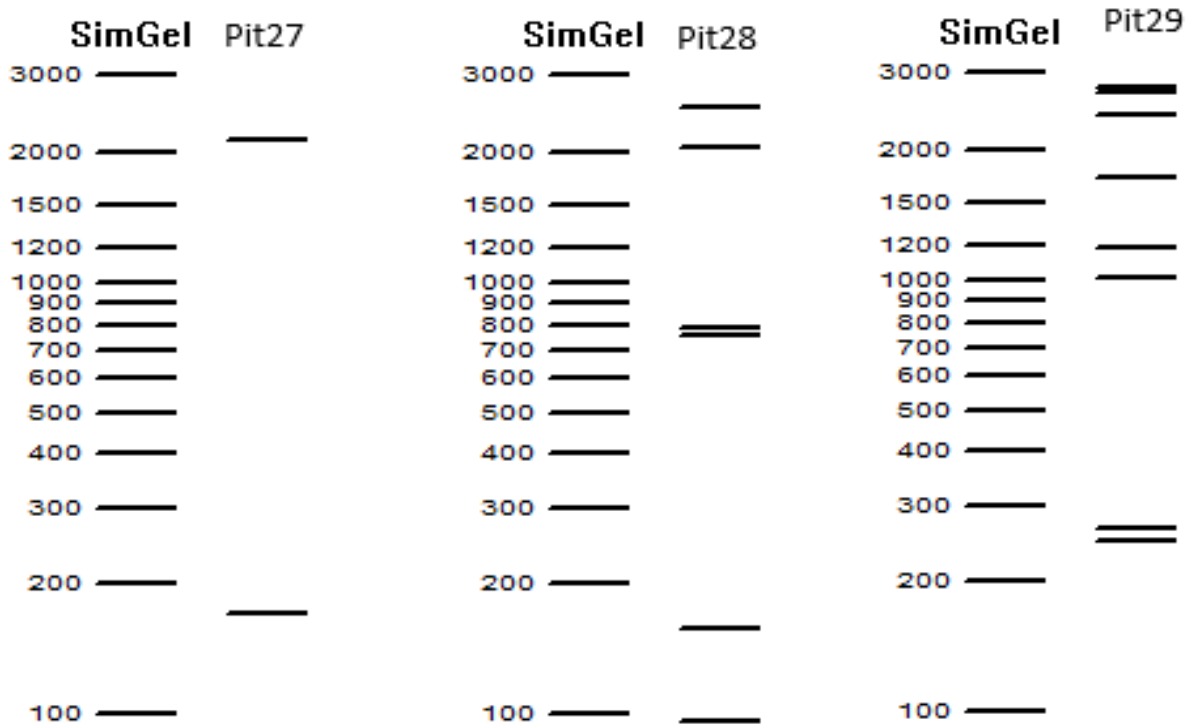
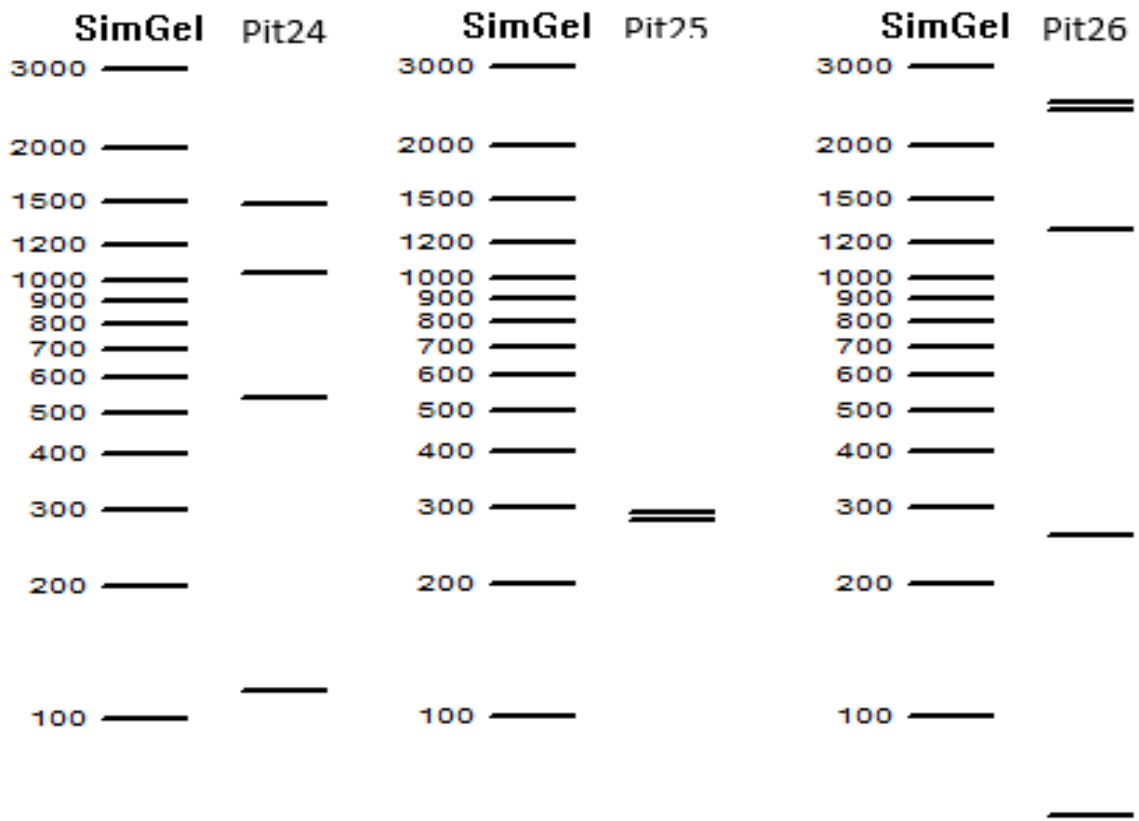
## ANEXOS

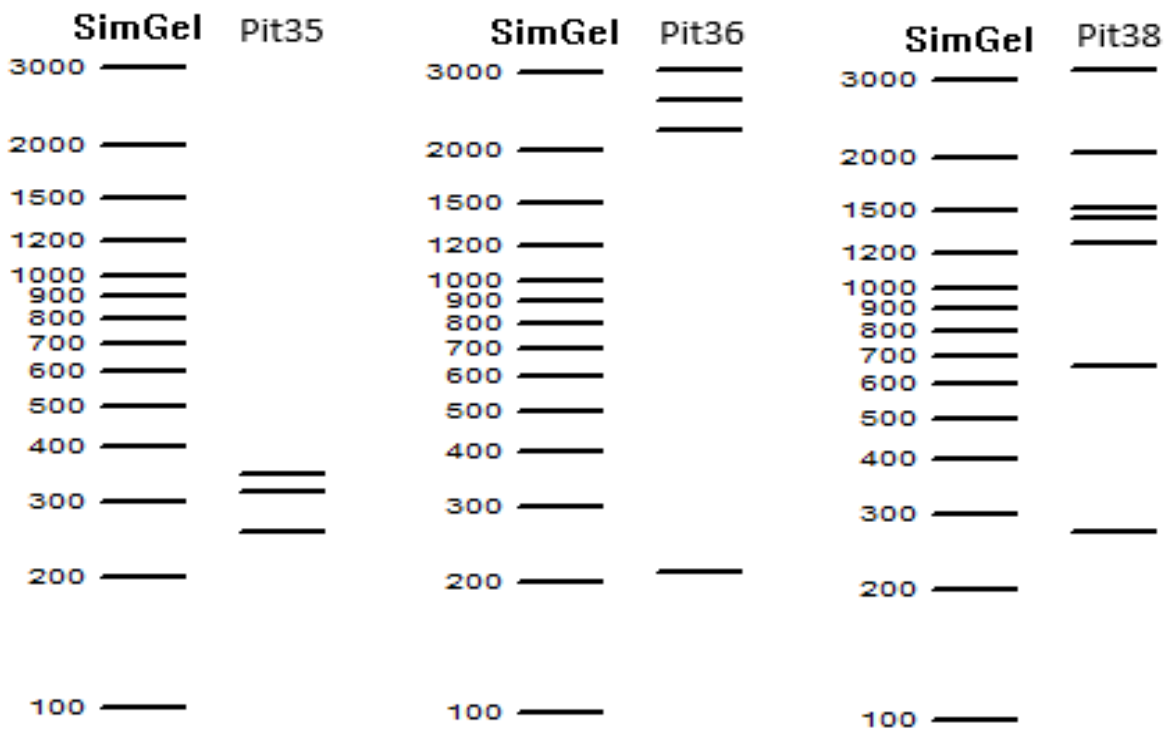
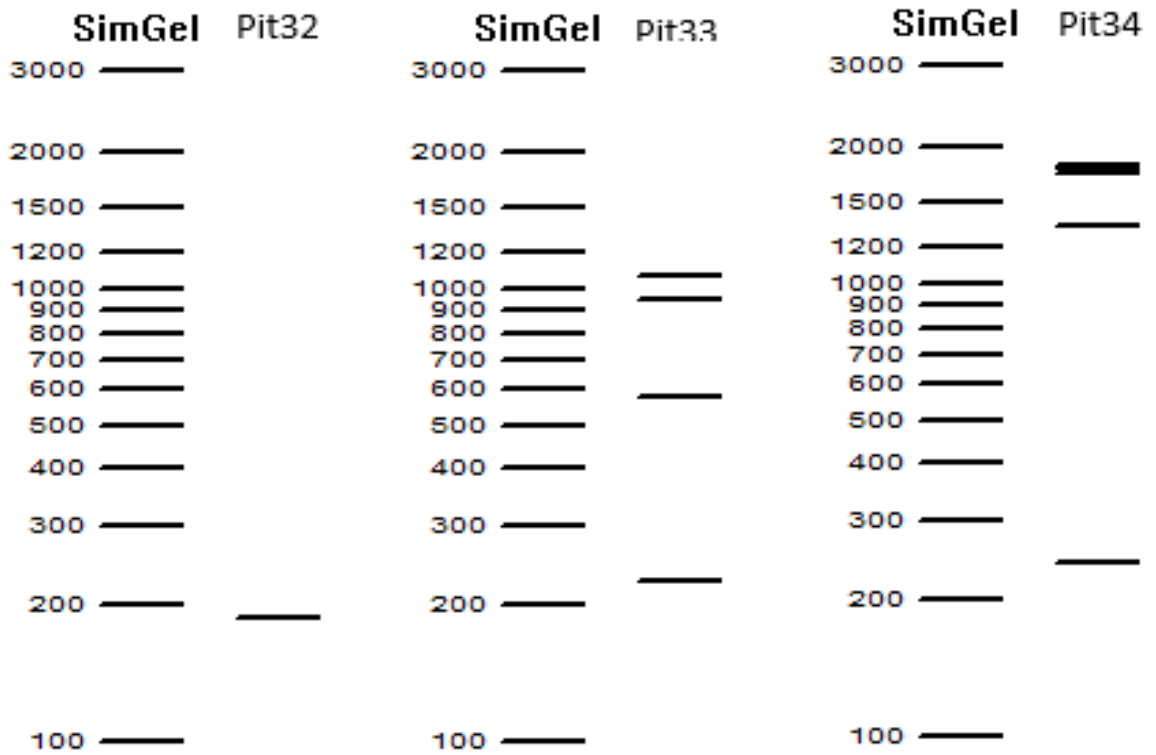
ANEXO I - Amplificações em géis de eletroforese *in silico* obtidos a partir do software SIM-GEL, incluído no pacote SPCR

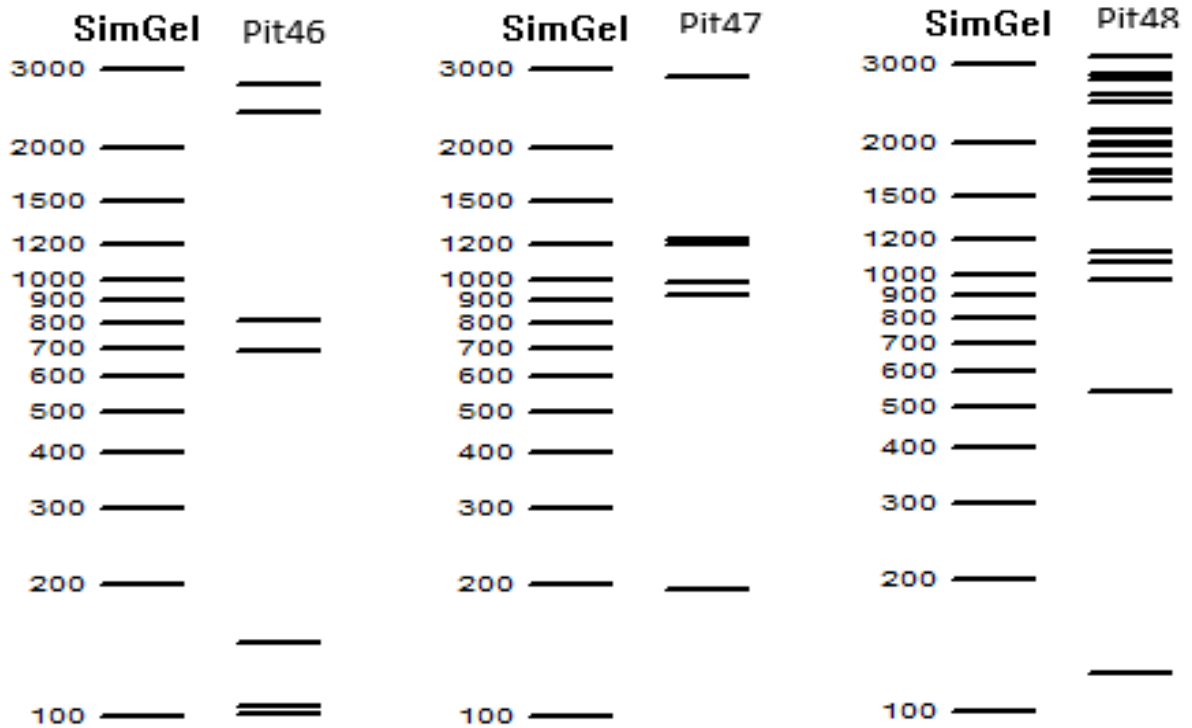
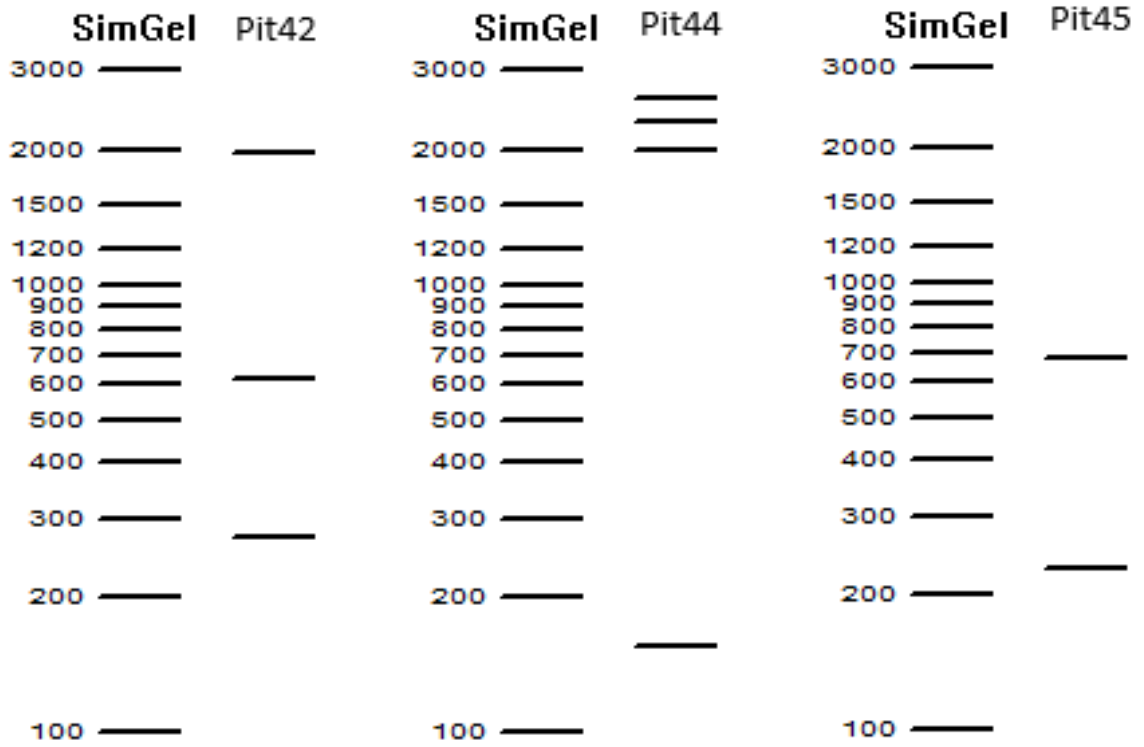


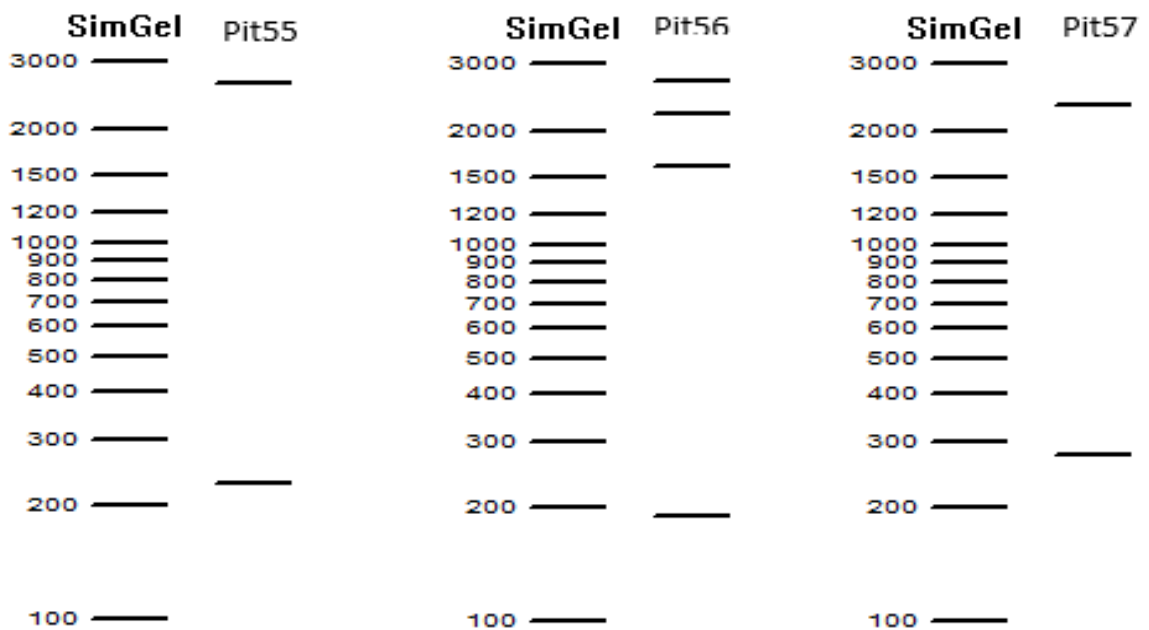
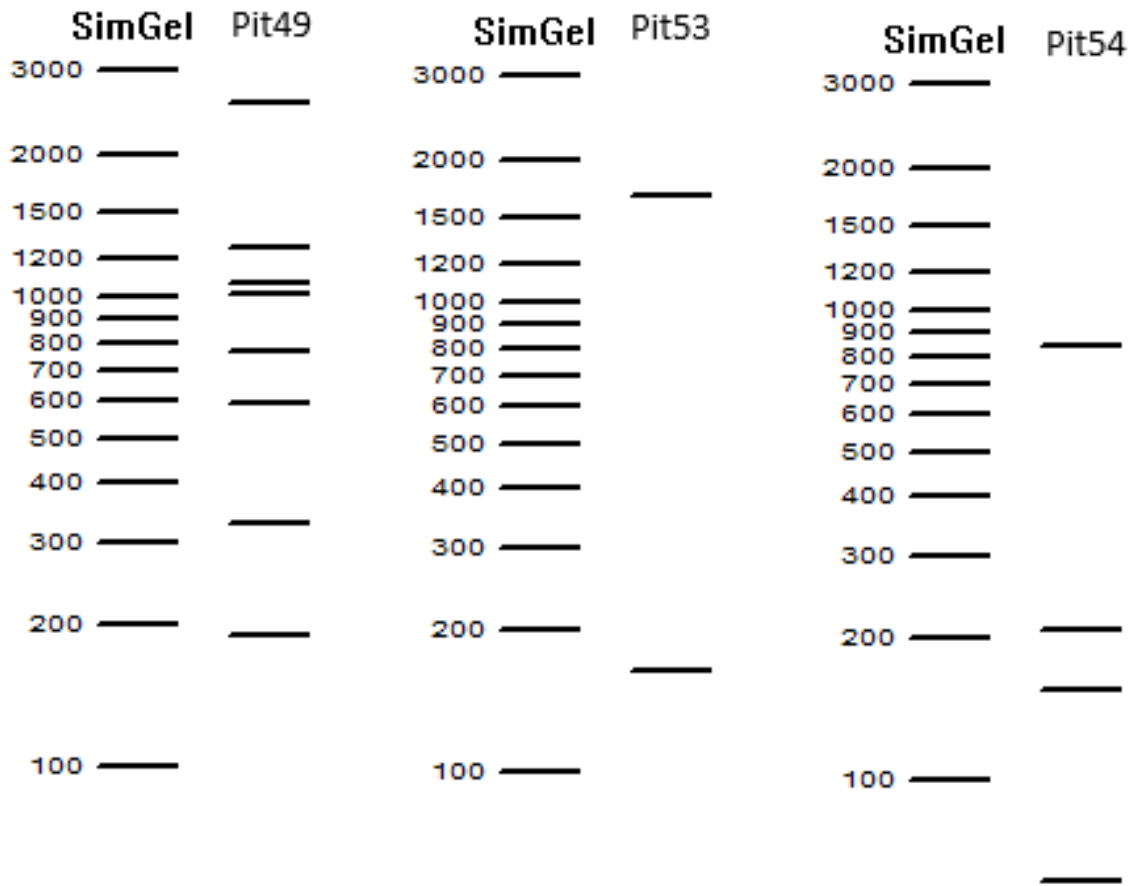




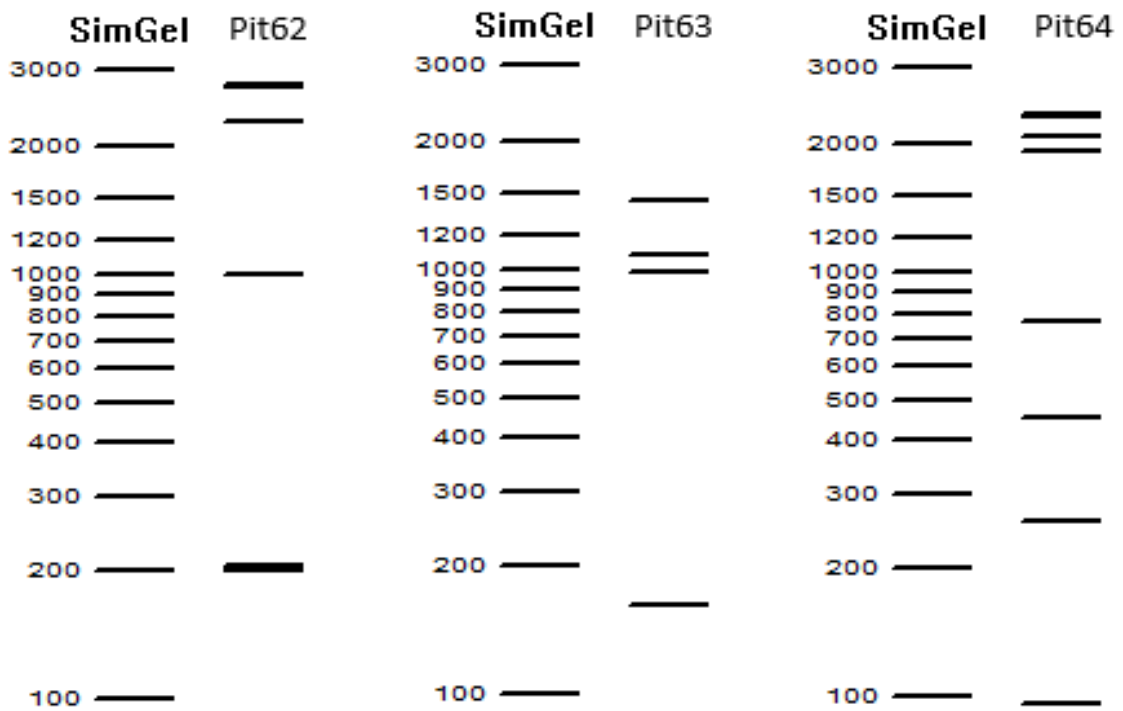
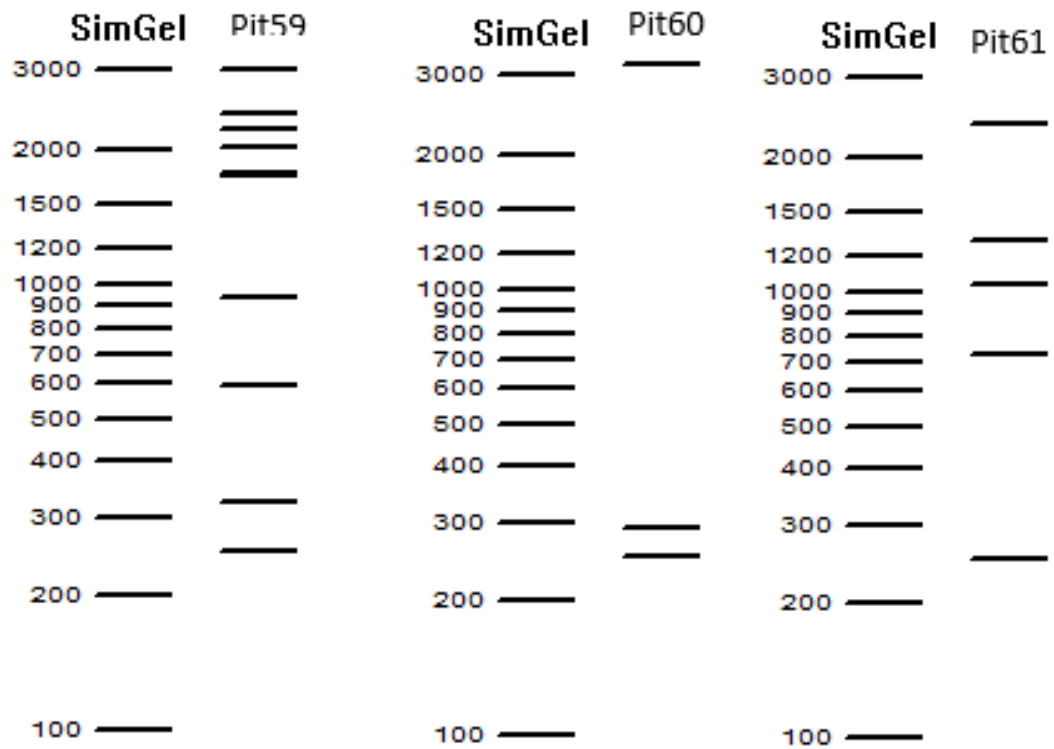


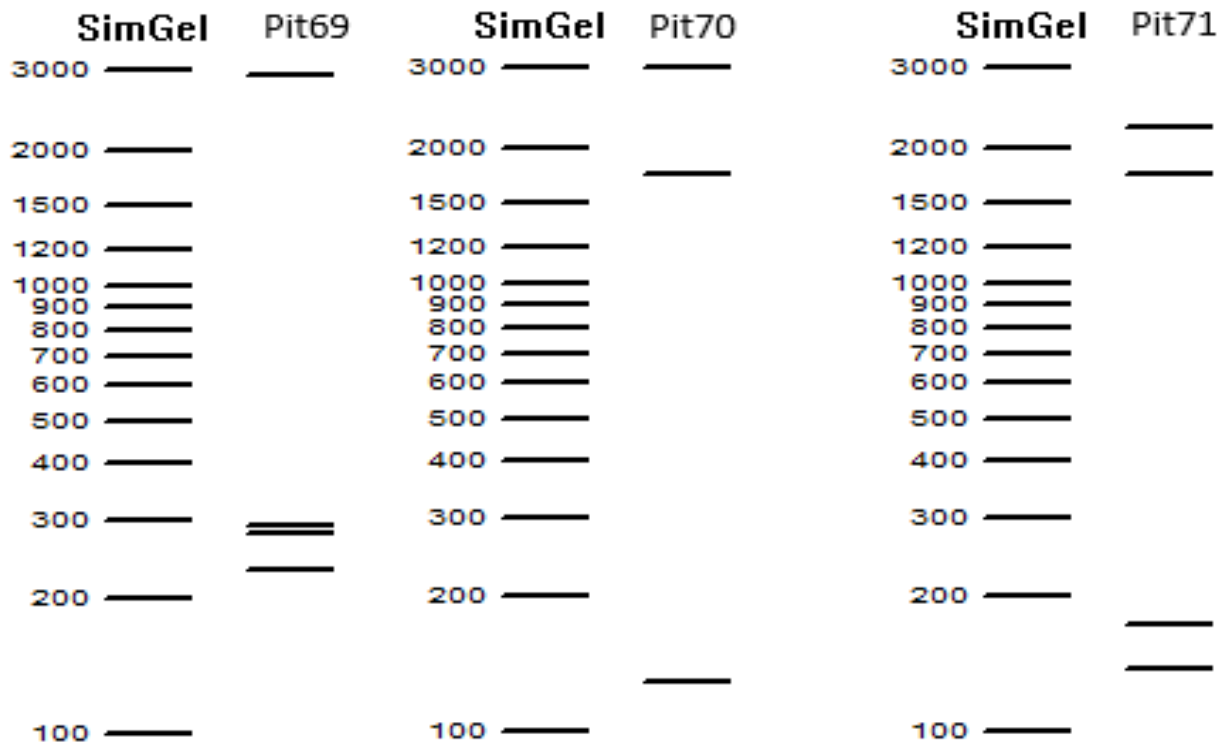
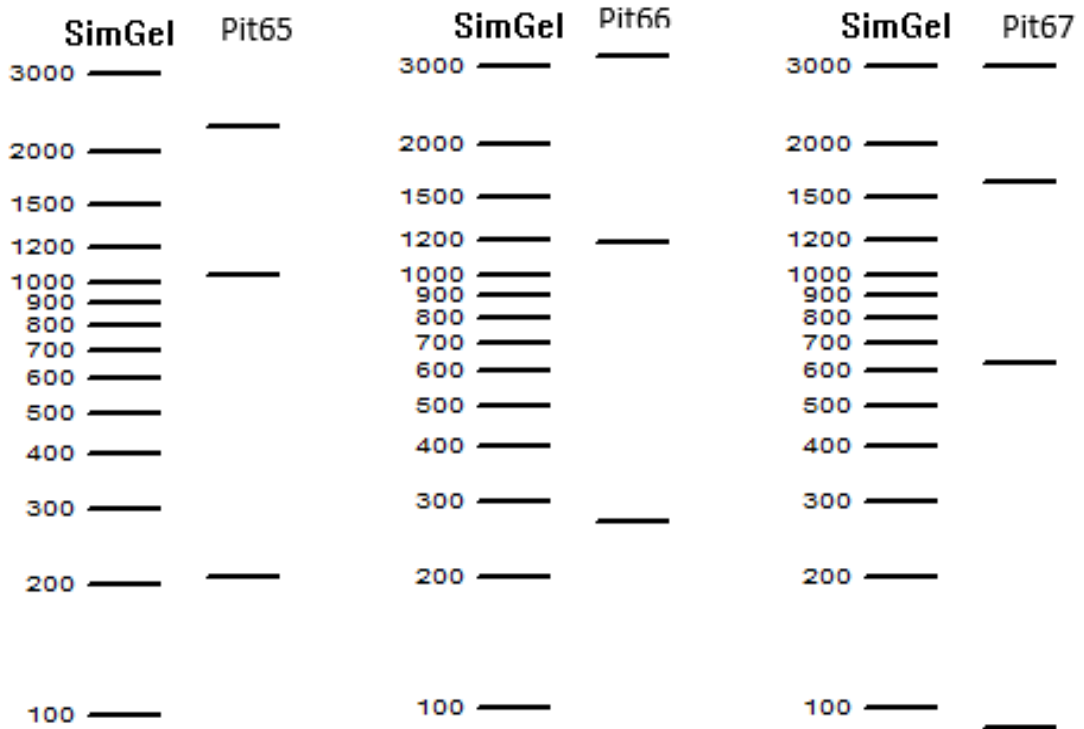


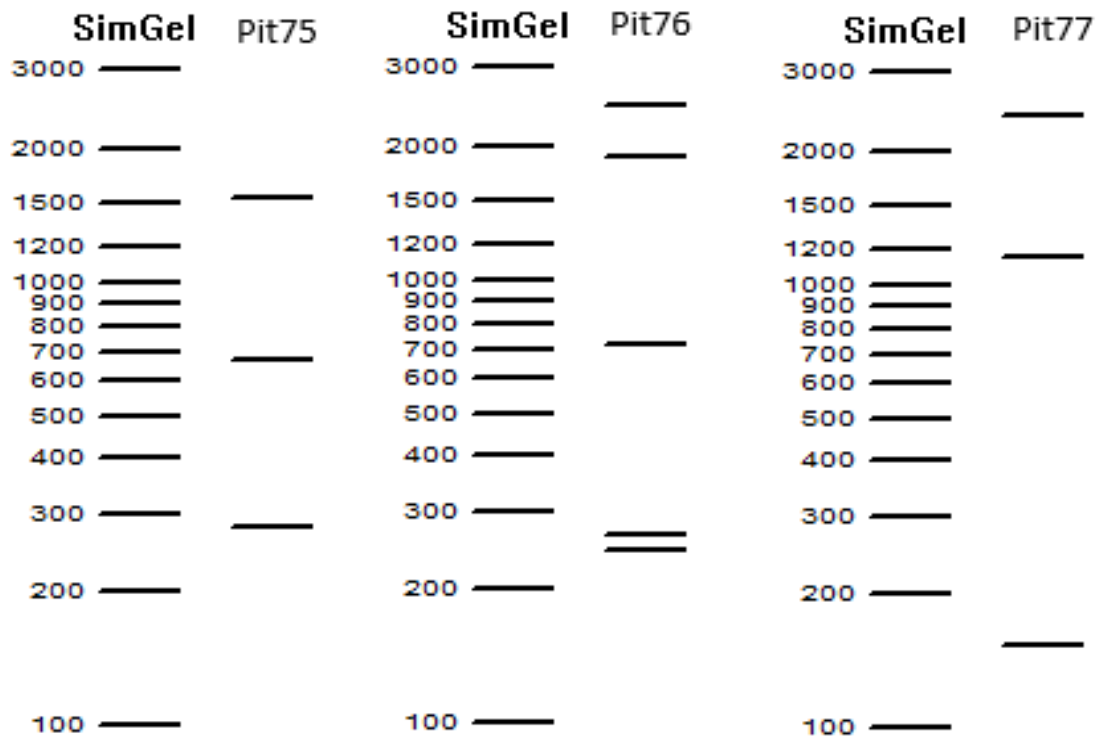
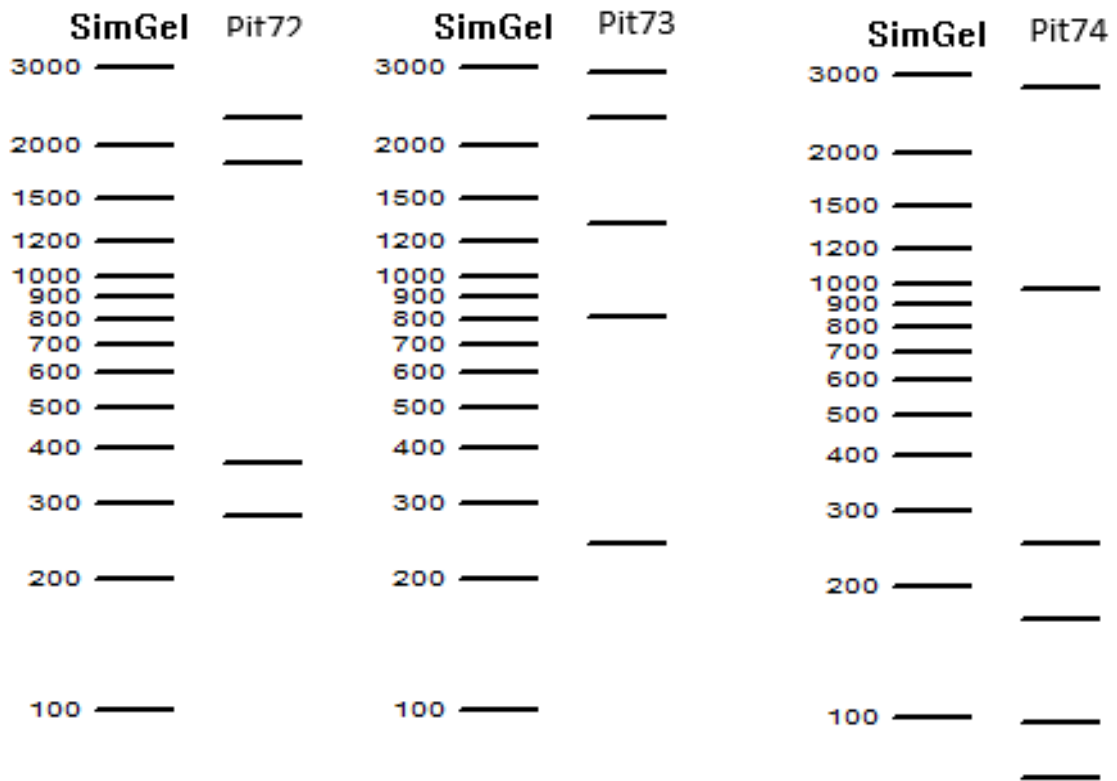


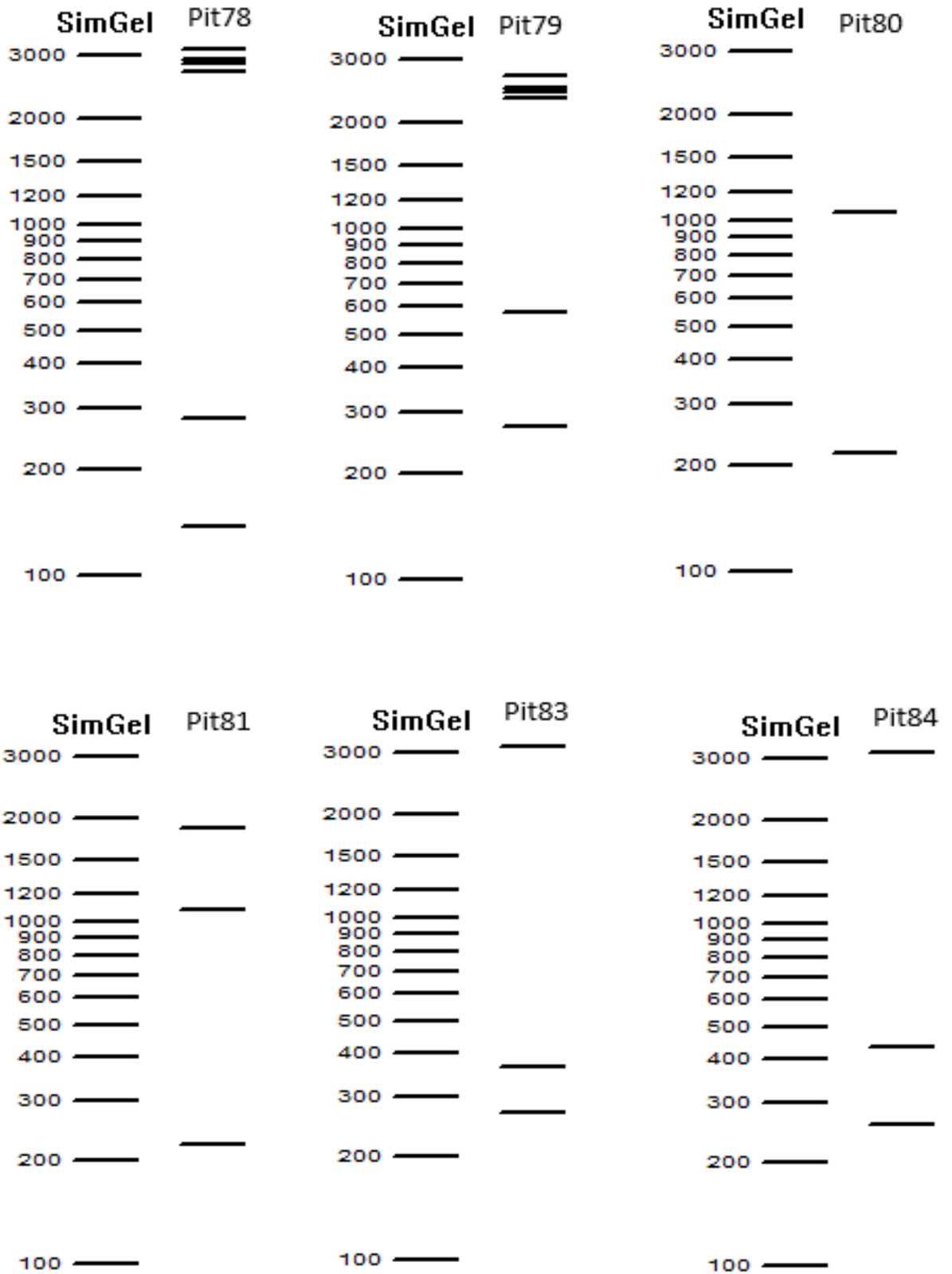


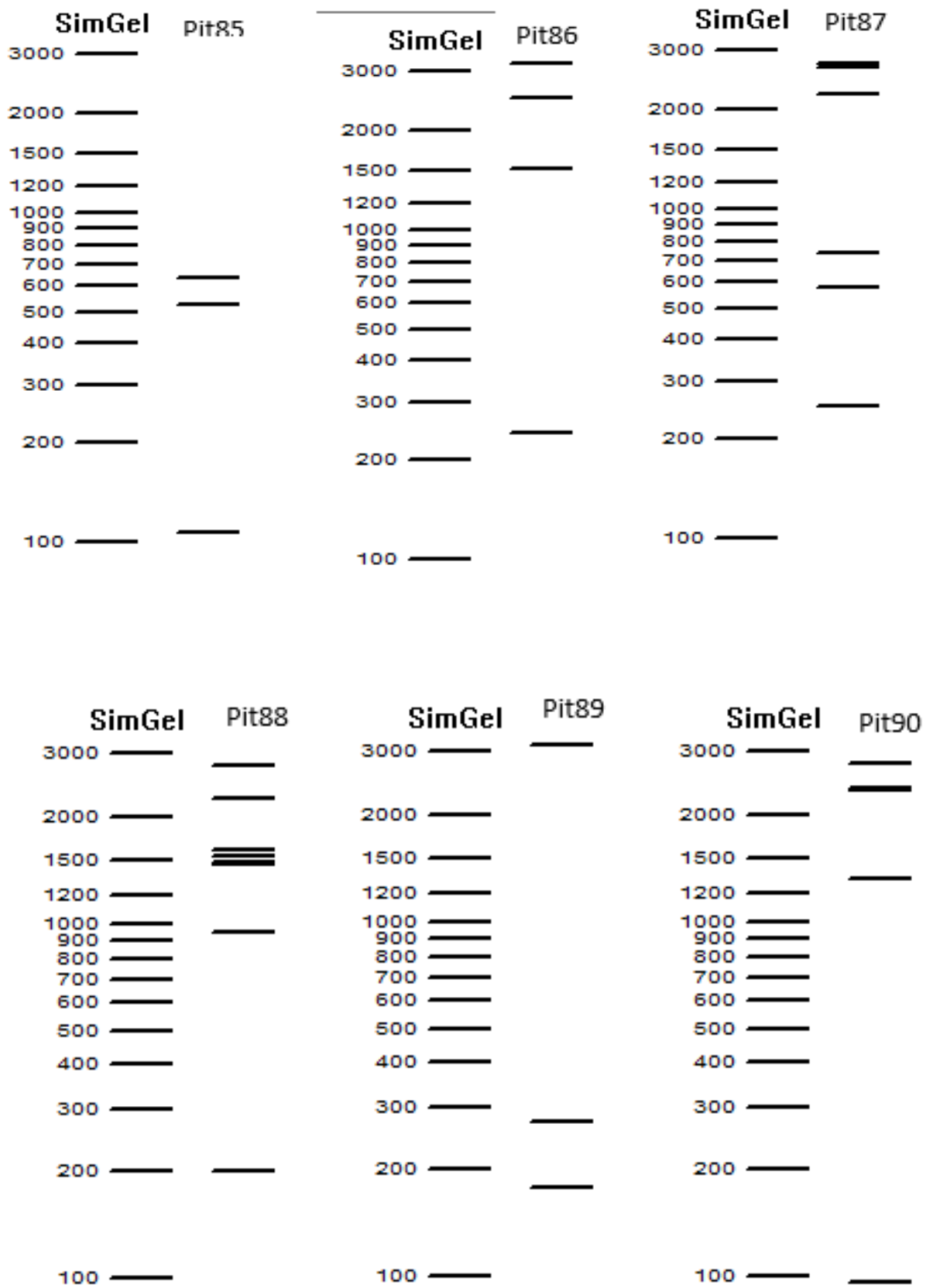


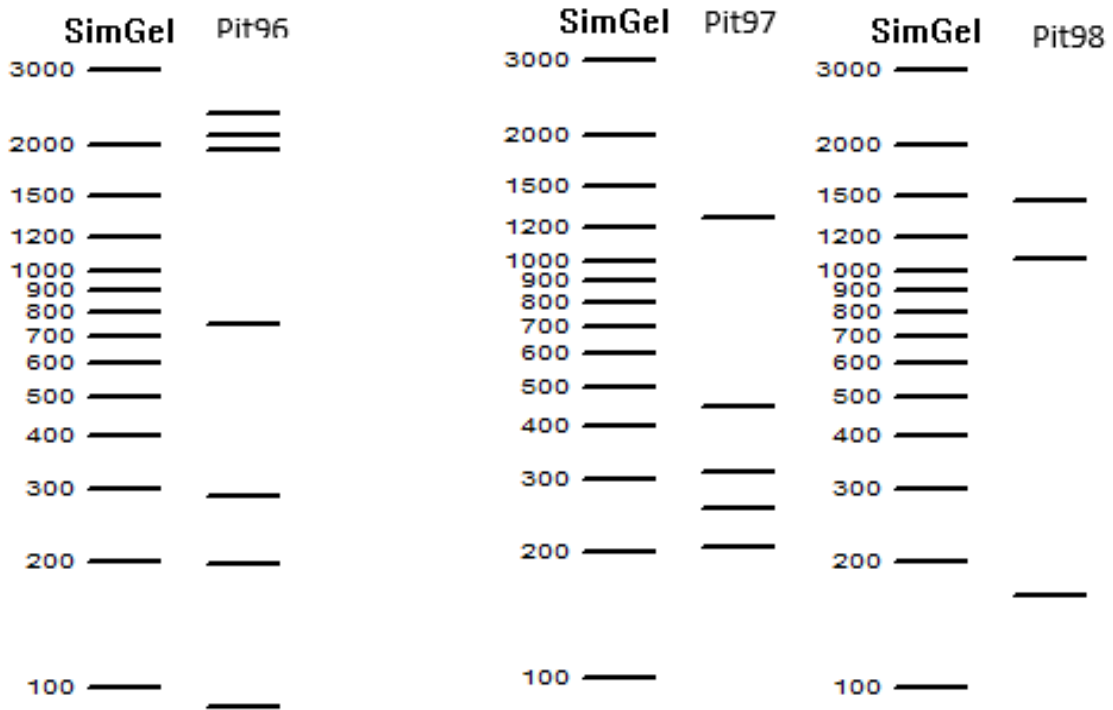
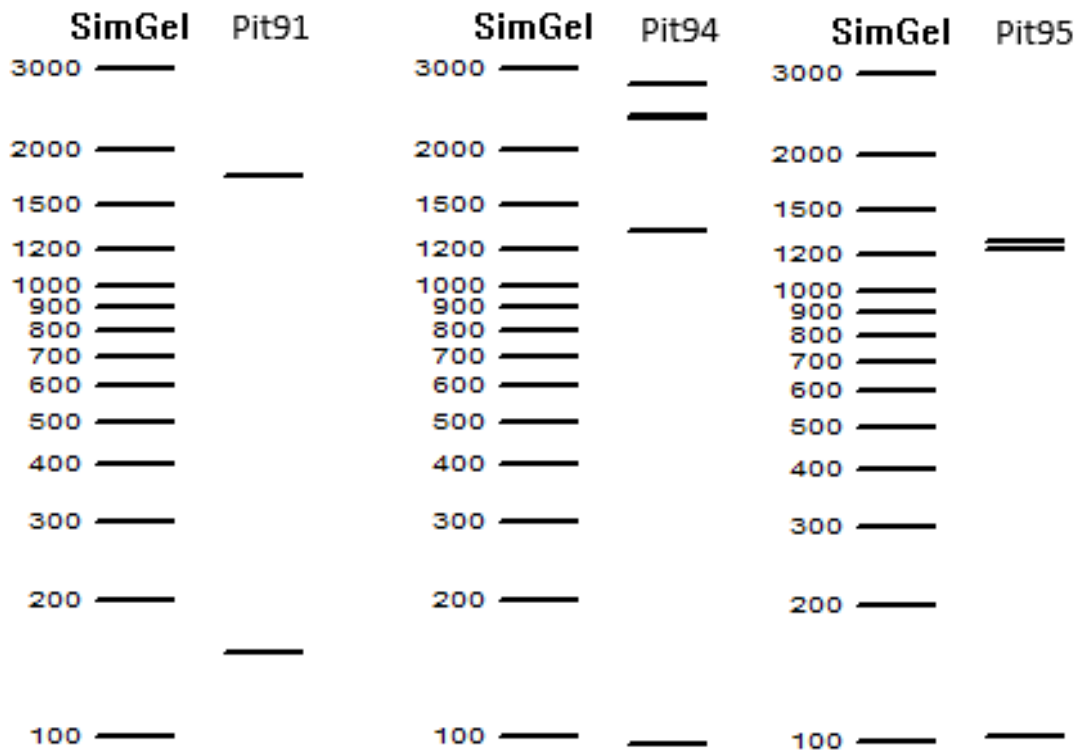


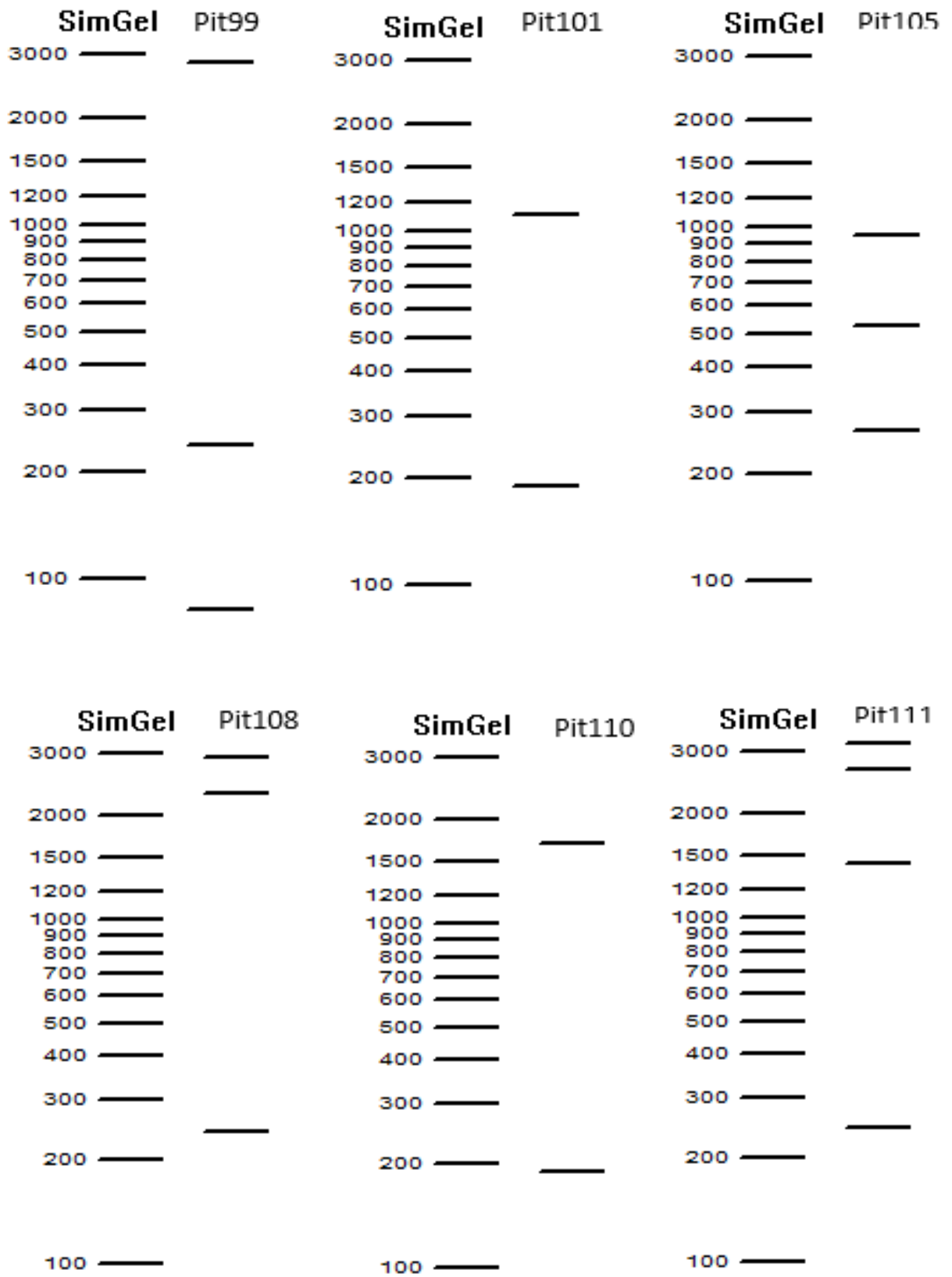


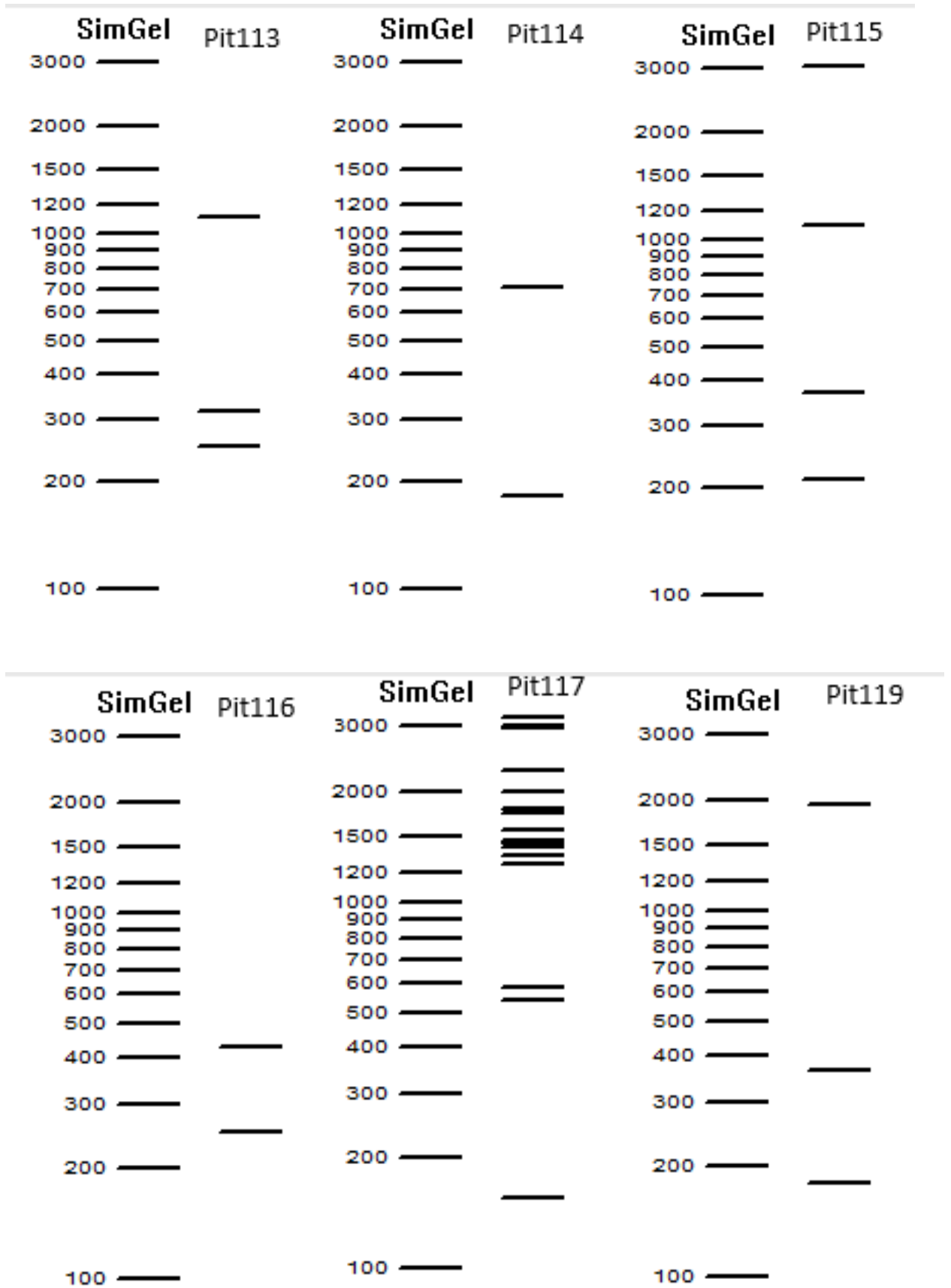




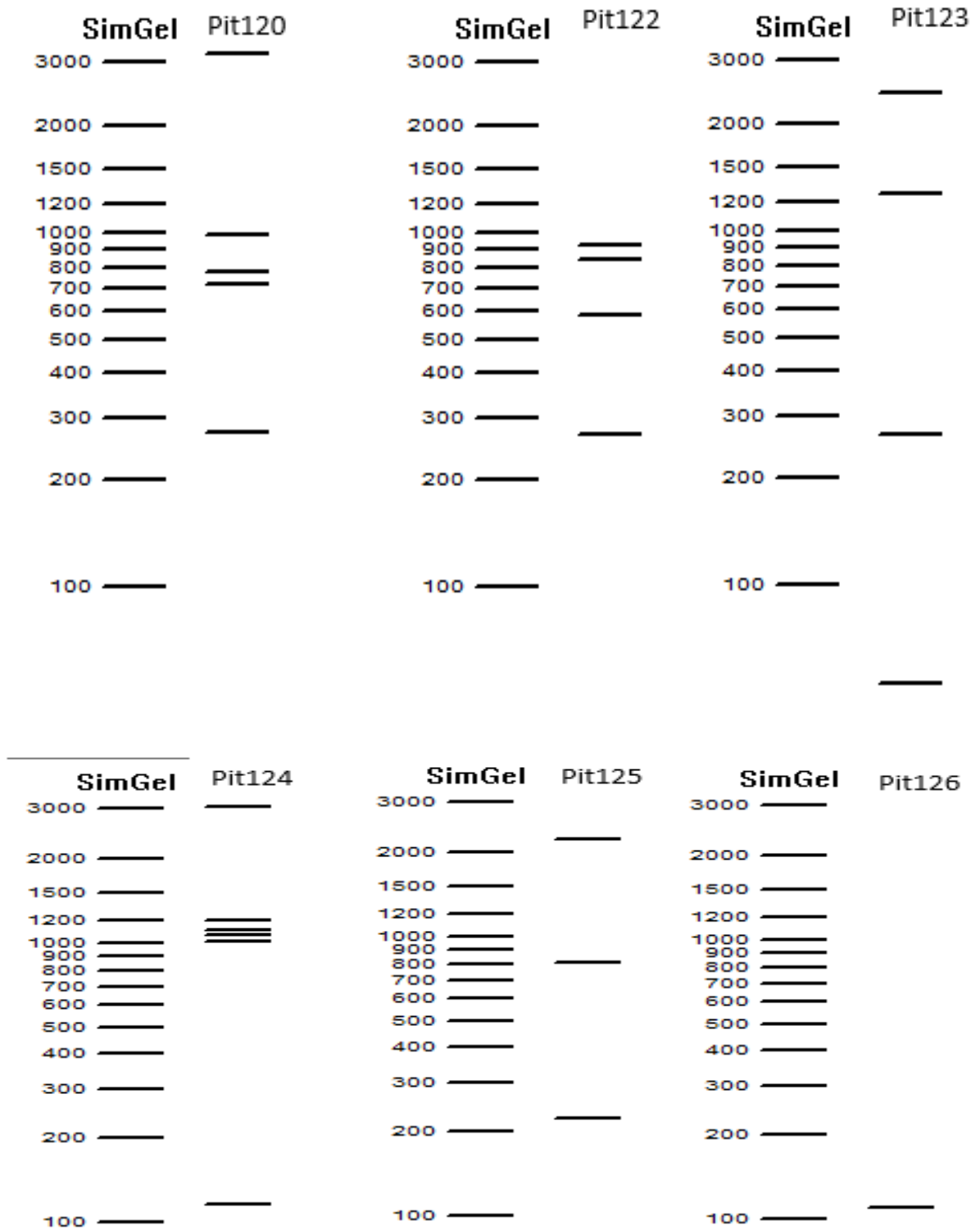


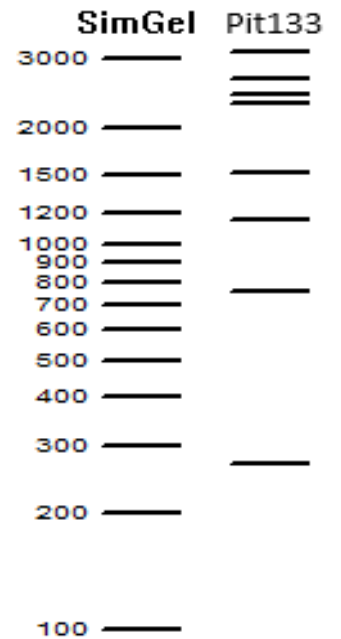
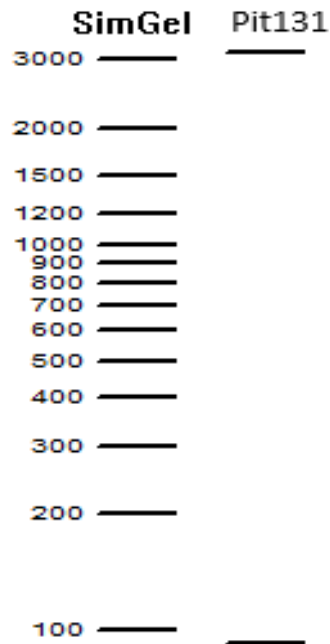
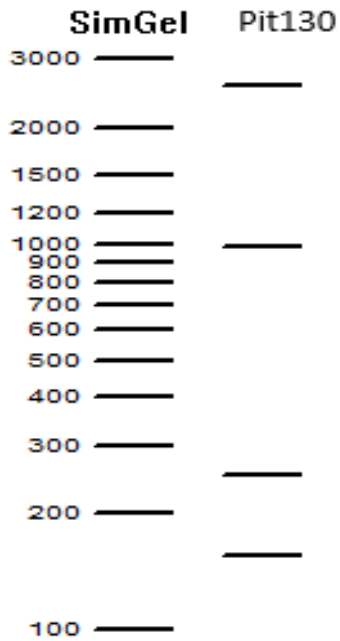
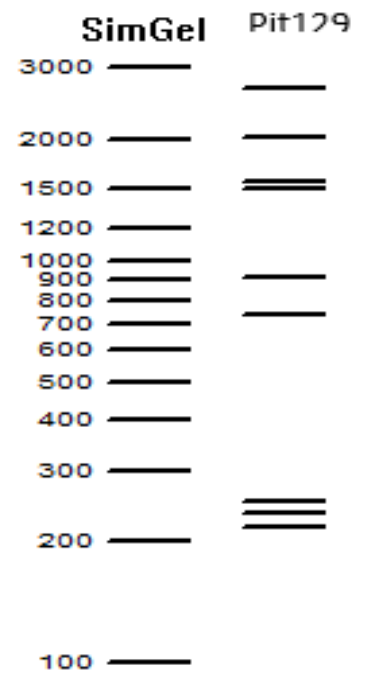
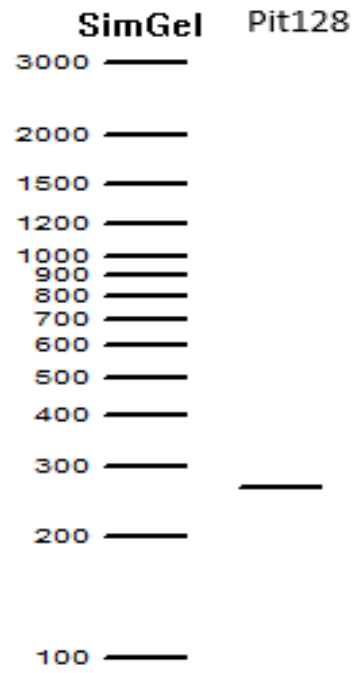
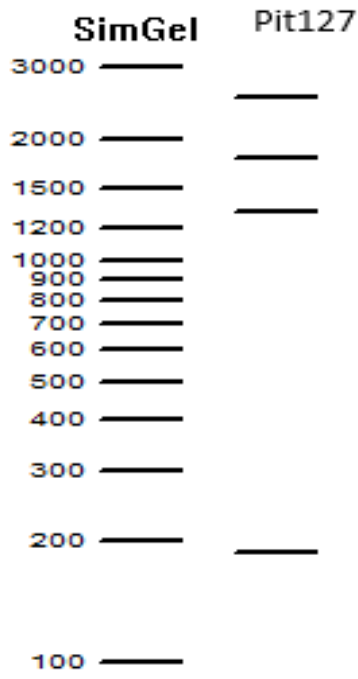


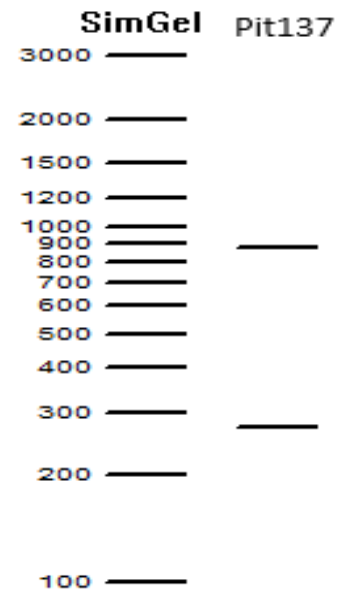
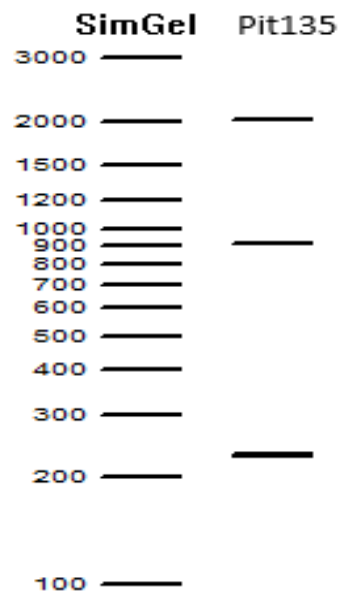
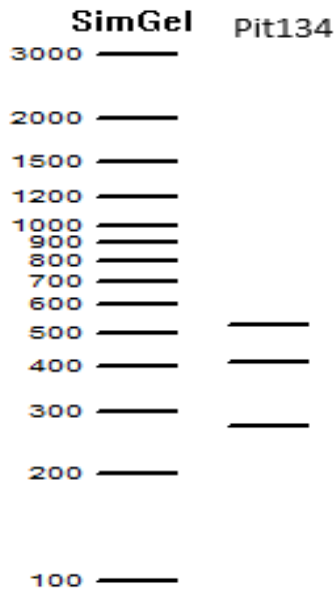




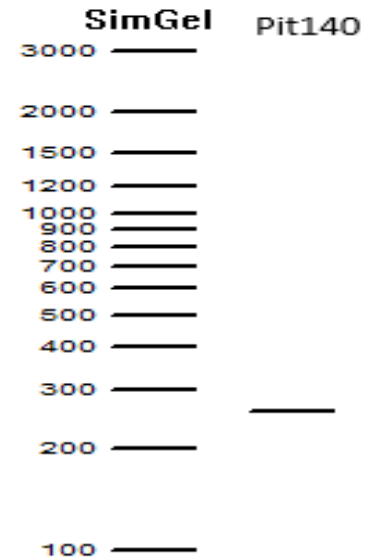
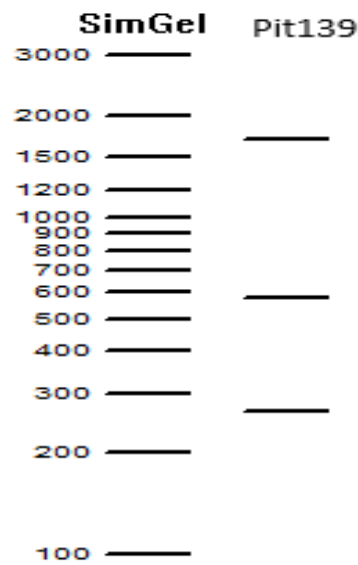
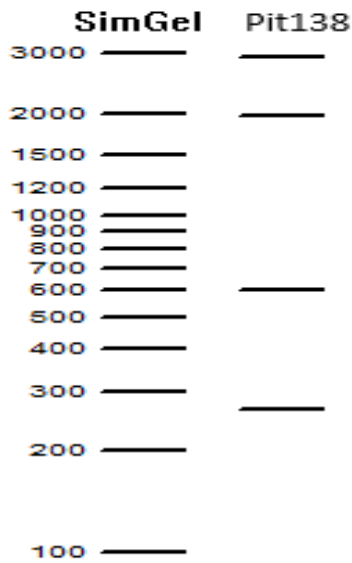


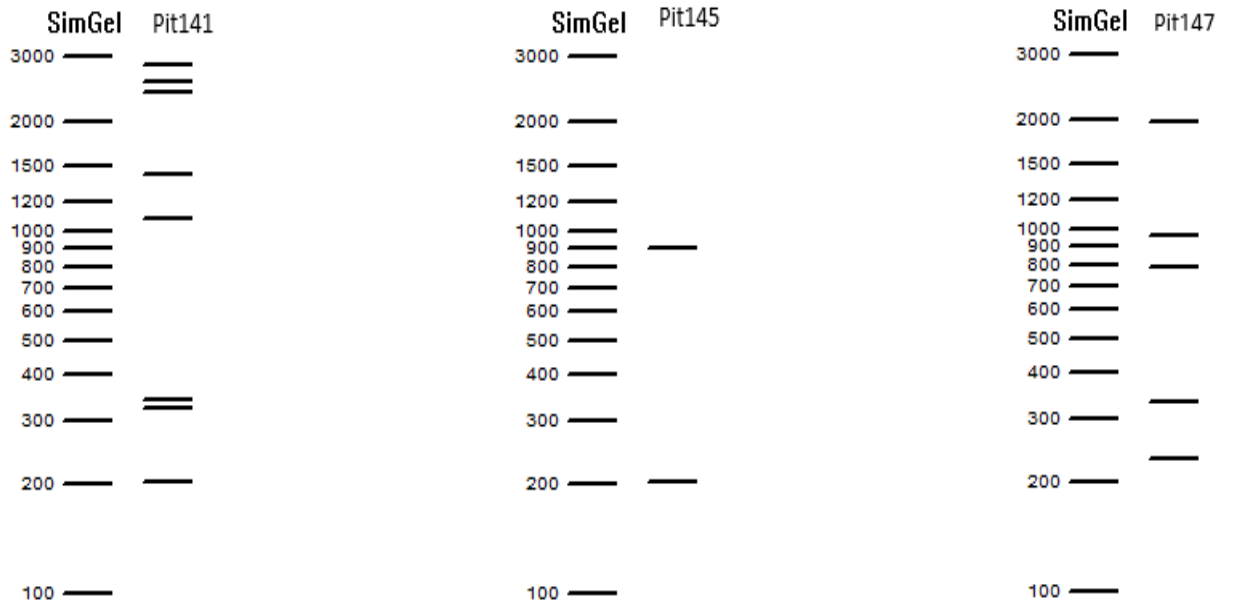






—





ANEXO II- *Primers* desenhados pelo software Primer3 para marcadores SSR de *Eugenia uniflora*

Nome do Primer	Foward	Reverse	Sequência repetida	Número de acesso	Critério de validação
<b>Pit1</b>	AAACCAAATCACATG	ATGTCTGTGAGGAGTA	(AAC)7		ÓTIMO
<b>Pit2</b>	CTAA TTTTAAAATAACGTC	GACA TCAAGTTTTAATTGGAT	(GAA)6	KT873889	ÓTIMO
<b>Pit3</b>	AAACC CATATTTTCCAATGT	TGT TCCACTCTGTCTATGCT	(GAG)6	KT873890	ÓTIMO
<b>Pit5</b>	CAACT CATAATACTGCATTC	AAT TATCTGAAAATTTACCA	(AT)8	KT873891	ÓTIMO
<b>Pit6</b>	GTGTA GCAAAAGCAAACATT	AGC CATTAGTTTCTGCTATC	(AG)12	KT873892	ÓTIMO
<b>Pit7</b>	TA AATTGTATTGACAGA	CAG TGAAAAAGACCGTAAA	(AAT)8	KT873893	ÓTIMO
<b>Pit8</b>	ATTGG TTGACAATTCTTAGC	ATAG TTTTCTCGTATTTGAAT	(GA)6	KT873894	ÓTIMO
<b>Pit9</b>	TTCAT GTAACCTTCAAAAAC	GAT GACTATGGACAACTT	(TTG)6	KT873895	ÓTIMO
<b>Pit10</b>	GAAAA CTCAAATTTTGTTTA	GAGA TATATTTGGACTCTGAC	(AT)6	KT873896	ÓTIMO
<b>Pit12</b>	GCAAT ATTCCTAACAAAATT	CTG GAGATAGAGCATGAGA	(AT)8	KT873897	ÓTIMO
<b>Pit13</b>	GGAAC CTTGCCCTTAGGGT	CAGA AATGACACCATGAGTAA	(AAG)6	KT873898	ÓTIMO
<b>Pit15</b>	TT ATTCACACAGTCTAA	GAT GAAATATCCTGTTTGAC	(TC)6	KT873899	ÓTIMO
<b>Pit16</b>	TTTGG GTATCTTGCATAACC	AGA AGAAGAAGAAGAAGAT	(AG)7	KT873900	INVIÁVEL
<b>Pit17</b>	AAATC TATCTTGCATAACCA	GAGG ATTGGTGAAACATACAA	(TCT)6	KT873901	OTIMIZAR
<b>Pit18</b>	AATCT CAGAGAAATCTTAAT	CAC TGAAATATCCATAAAG	(GA)7	KT873902	ÓTIMO
<b>Pit19</b>	GGTTG TGGTTTAGTGAGTG	AGA GAACTTTTTAATTTGTT	(TC)11	KT873903	ÓTIMO

<b>Pit20</b>	AAAGTT CTCTCAACTCAACCA	GGA ACTGCTTCTCTCCATAC	(CAC)6	KT873904	OTIMIZAR
<b>Pit21</b>	CG AATGTGGTCAAACAA	AC TTGGTACAGCTTCTTGT	(AC)9	KT873905	INVIÁVEL
<b>Pit24</b>	ATTAC GAGCATCATGATTAC	ACT ACAATGTCAGAGAGTC	(GA)10	KT873906	ÓTIMO
<b>Pit25</b>	AGTTT ATCTATAGGTGTGAA	AAAG TCTTGGTGATTTCTATT	(AG)6	KT873907	INVIÁVEL
<b>Pit26</b>	ACGTG GCAGTAAGGTAACA	TGT TCCTGTTTTACAATGAA	(AC)7	KT873908	ÓTIMO
<b>Pit27</b>	AGAGAA TAACAATAATGTAAT	AGT CTTTAACTGGCTTTGAA	(GA)6	KT873909	ÓTIMO
<b>Pit28</b>	GCCC TGTTGTGCACTTGTA	GTA CTCTTATCCTTCGAAAG	(GAA)7	KT873910	OTIMIZAR
<b>Pit29</b>	TTAGA AAAATCATATTCCAAA	TG GTTTAGTTTCCAAGCA	(ACC)7-	KT873911	INVIÁVEL
<b>Pit32</b>	TTCA TTCCAAGTTTCTATT	GTA TGTGTGTGAGTACTTTT	(TC)7 (TTC)7	KT873912	ÓTIMO
<b>Pit33</b>	TTCTG TGGATCCTCAAAGA	GTG GAATACTTCTCAGGGAT	(GA)9	KT873913	ÓTIMO
<b>Pit34</b>	GATAG TTGAAACTACTCCTG	CTT TGGAAGATTTTTGTTAT	(TC)6	KT873914	ÓTIMO
<b>Pit35</b>	AGAAA GAAGATTCTTGACACA	TGT CTCCATATGAGGATCAT	(AT)10	KT873915	ÓTIMO
<b>Pit36</b>	CTTAG AAGTGAATACCTCCT	AGA AATGATGAGACATATTT	(TTC)6	KT873916	ÓTIMO
<b>Pit38</b>	AGAGC GTAGGTATGTCTTCT	TGG TAAAGAAGCTTTCTAAC	(AG)6	KT873917	ÓTIMO
<b>Pit42</b>	TGGCT TCAAGCTTTAATAGG	GAC TTCCAAAATAGAGGATA	(GT)6	KT873918	ÓTIMO
<b>Pit44</b>	ATCTG AAACATTTATCCACT	TGA AATAAGATCATTGCTTT	(AT)6	KT873919	ÓTIMO
<b>Pit45</b>	TGATG GAGGACTTAAACATC	TTG GTTCTTGCTTCTATTTG	(TG)7	KT873920	ÓTIMO
<b>Pit46</b>	TCACA TCATCTTTTCATTAG	CTA GAAAATGAAAGAGAAA	(CT)8	KT873921	INVIÁVEL
<b>Pit47</b>	ACCAC TATGTACGTATCGAA	GAAA ATAGCATAGTTTCAGCA	(ATC)6	KT873922	ÓTIMO
<b>Pit48</b>	TCCTT ACATGTTATCTAAAC	CAT ATTTGCAGATTAATGTT	(AAG)7	KT873923	OTIMIZAR

<b>Pit49</b>	CGAAA GAGACAGAGAGGAG	GTT AGAAGGGCACTGAATC	(CCT)6	KT873924	ÓTIMO
<b>Pit53</b>	ACAAG AATAGCTTGGTAAAC	T AGTCTTAAGCTGTTTCC	(AGC)8	KT873925	ÓTIMO
<b>Pit54</b>	AAGTG AACATCTAATGGCAC	AGT CTCAGGATTTGTTCAA	(GCA)7	KT873926	OTIMIZAR
<b>Pit55</b>	TACAG CTCACATACCTTGAA	GTAG TAATCAAGCATTTAATA	(AG)6	KT873 927	ÓTIMO
<b>Pit56</b>	AGAAG GACATCACTACTCCT	CGG TAATTTCAATGAACCAA	(GAT)6	KT873928	ÓTIMO
<b>Pit57</b>	TTCAA TGATTTTTATGCTAG	TTT TTTTGGCTTAATAAATAT	(CTC)6	KT873929	ÓTIMO
<b>Pit59</b>	TGGAT GGTCAGATTGAATGT	GG TCTTTTCATTTGAAGTT	(AG)6	KT873930	ÓTIMO
<b>Pit60</b>	CTAAA CGTGAGAAATTTTCA	GTT CGAGAGGTCTTATGTAT	(TC)6	KT873931	OTIMIZAR
<b>Pit61</b>	GTTAC TGAACCATTAAAGAA	TTG AATCTCTACCACTGGG	(GA)9	KT873932	ÓTIMO
<b>Pit62</b>	ACATC TTTTTAAACAAAAAG	TCT AAATCATCCTTCTTCTC	(AG)8	KT873933	INVIÁVEL
<b>Pit63</b>	AGCAC CACTCCAGTCTGTAA	TTC TCAATCTCAACAAGTTC	(GA)8	KT873934	ÓTIMO
<b>Pit64</b>	AACAT AAAGCTAAAATTGAG	TTC CCACTCTTTCTCTCTCT	(CT)7	KT873935	OTIMIZAR
<b>Pit65</b>	CATAA TACATCGGGATTAAA	CTT ATAGCTTTAAGGGTCTT	(TC)6	KT873936	ÓTIMO
<b>Pit66</b>	GACTA TTTCAAAGGAGTAAG	GTT CTCAGTATTTGAAAGCA	(AT)6	KT873937	ÓTIMO
<b>Pit67</b>	AGTCA GATTCTTCATGTCTT	ACT CCAATGTGAACTACTTT	(GA)6	KT873938	ÓTIMO
<b>Pit69</b>	CTTCA ACTTATGGGATACAT	GTC GCAATGAACAAAATAAA	(TG)6	KT873939	INVIÁVEL
<b>Pit70</b>	TGACA TGTCAGATTAAACC	AGT GTGGGTTTAATGGTAAT	(GA)8	KT873940	ÓTIMO
<b>Pit71</b>	TAAGA TTGGTTTAGATTAAA	GTA AGTTAATGTCACAAGAT	(ATT)7	KT873941	OTIMIZAR
<b>Pit72</b>	AATCG GTTGAATGAGAAGA	CCA GTAAGTAGATAAACGCC	(TC)6	KT873942	OTIMIZAR
<b>Pit73</b>	GTGATG GAGATTTTGAGAATT	ACA GAATTCTGTCCTTAATC	(AGA)7	KT873943	ÓTIMO

<b>Pit74</b>	TTGTG TCCCTATGAGCAGAT	AAT AAAAGAAGGACAAAGA	(CTT)6	KT873944	INVIÁVEL
<b>Pit75</b>	ACTAA CAAAAGAGATGGGA	GAAT GATTGCTATGAAGAGAA	(TCT)6	KT873945	ÓTIMO
<b>Pit76</b>	TATACA ACAATATAAGTCAAG	TCA AAAAGAGAGGTTGAAA	(GTA)7	KU519440	INVIÁVEL
<b>Pit77</b>	AGGCA ATATTAAATTGGGTTT	AGAT GATGTTCTCAAGAATCA	(TC)8	KU519441	ÓTIMO
<b>Pit78</b>	CCTT GTTCAGGTCATTTGA	AGA GTATGTATTTGTGGCTC	(CA)6	KU519442	OTIMIZAR
<b>Pit79</b>	CATAC CTTTTCAGATCAACA	AGT ATACCAACAGATGACA	(CT)7	KU519443	ÓTIMO
<b>Pit80</b>	GAGAG CATCATTCTTTGTCT	GAAA AAAGATGATACATATGC	(AG)6	KU519444	ÓTIMO
<b>Pit81</b>	TGATT GGAGTGATCATCATG	CTG TTGGAAATTTGAAGAAT	(AC)6	KU519445	ÓTIMO
<b>Pit83</b>	TAGAG TTGGCAATAGTCTGT	TAG GCTAAAATCATAACTTG	(TC)8	KU519446	OTIMIZAR
<b>Pit84</b>	AATTT ACAATCGAAACAAG	CTC AGTCATGGCCTCTCAA	(TCG)6	KU519447	OTIMIZAR
<b>Pit85</b>	AAGAG TAATTAATGTTAATCT	T GTTTACTCGATCACTTT	(AT)6	KU519448	ÓTIMO
<b>Pit86</b>	CGGG AGAATGTGATTAACT	CAC TTTATCACCTTACACAC	(GA)9	KU519449	ÓTIMO
<b>Pit87</b>	TCCAA GCCTGACAATAACAA	ACC GAAC TTGAATAAAGCA	(AG)7	KU519450	ÓTIMO
<b>Pit88</b>	TTAAC ATTGATAAGTTCATG	AGAA TATCTCTTTCATTTGTC	(CT)7	KU519451	ÓTIMO
<b>Pit89</b>	TCCTG GTAGCATCCTTCATA	GTT TGTTTTAATGAGTGGAA	(AG)6	KU519452	OTIMIZAR
<b>Pit90</b>	AAATG TGAAATTATAGCACT	CTT CAACGAAAGGTAACAA	(AT)7	KU519453	OTIMIZAR
<b>Pit91</b>	TAGGG TTGAAACTACACTAT	TATC AAA ACTAAAGTTATAGA	(AG)7	KU519454	ÓTIMO
<b>Pit94</b>	CCCAC GTATGGTGAATGAAG	AGAACTAA CATATTGCTAAGAAATG	(ATA)6	KU519455	ÓTIMO
<b>Pit95</b>	ATGTC CAAGCACAAGAGTT	ACC TAGCTAAATAAGATGGC	(AG)10	KU519456	ÓTIMO
<b>Pit96</b>	TTTAAT TAAACAAGATTAAG	ATT ATCGAAGTATATCTGCT	(AT)8	KU519457	INVIÁVEL



<b>Pit97</b>	GGCTA CTACCCAACTTATTT	CAA AAGAGTTATGACCCTC	(CT)7	KU519458	INVIÁVEL
<b>Pit98</b>	GAATG ACACATTAATCTTCT	AAGT CATAAACAGATTTTACA	(CAG)6	KU519459	ÓTIMO
<b>Pit99</b>	GCAAC TTTAGATGCTAGTTT	GGG GACATACAGAAGTTCTT	(GT)6	KU519460	OTIMIZAR
<b>Pit101</b>	TCAGG TGAACACTTGTCGAT	CCA GAAGAAGTAAGTTGAG	(CT)6	KU519461	ÓTIMO
<b>Pit105</b>	CAT CTTGACGAACGTAG	ACGA CTTCACATTAGATGCTA	(CA)7	KU519462	ÓTIMO
<b>Pit108</b>	ATAGG ACCCATATAACAATTT	ACC GTACAATGGAGGAAGA	(CT)7	KU519463	ÓTIMO
<b>Pit110</b>	AGCA AGATGAAGAGTTGT	AAGT TCCTAGATGAGGTATGT	(CT)9	KU519464	ÓTIMO
<b>Pit111</b>	GGTATG CATCGATTTTATCAA	CTG GTGGAGAGAAACACTA	(CT)7	KU519465	ÓTIMO
<b>Pit113</b>	GATGT CAGATATCTCGATTT	ACAA CCATATTTCTACTCTCC	(TCT)7	KU519466	OTIMIZAR
<b>Pit114</b>	TCTTG TATGCTTTTAAAGGA	ACA AAATATCATTGTTTAGA	(AT)7	KU519467	ÓTIMO
<b>Pit115</b>	GCTAA CTGGATTCATCATAAC	CGC AGGAGGTCACATTTCT	(AT)10	KU519468	ÓTIMO
<b>Pit116</b>	CTTTA ACACAAAGTACCTG	TTAT GATATTTGGCAGATTTG	(GA)7	KU519469	ÓTIMO
<b>Pit117</b>	CATAAC TATATCAGCATGATC	TAG AAAATTTGTATTGCATT	(CT)8	KU519470	ÓTIMO
<b>Pit119</b>	TCTCC GTTTGCTCTATAATC	GTT TTACCTATGCTATTGTG	(AGA)6	KU519471	ÓTIMO
<b>Pit120</b>	ACTGC TTAGAACCCTGTGA	GTT CTGACAAGTATGTTGA	(CT)6	KU519472	ÓTIMO
<b>Pit122</b>	GATTTA ATTATTACGAGAACT	GGAT GTTGATCTGATTTCTCA	(TC)7	KU519473	ÓTIMO
<b>Pit123</b>	TGCTG GTAACCTCAGTTTTCA	CAC AAATTACAGACACAATC	(GA)8	KU519474	ÓTIMO
<b>Pit124</b>	GCAAC GGATTGTTTTCTACT	CAG AGAGTAGAATTATGGG	(TC)9	KU519475	ÓTIMO
<b>Pit125</b>	CCTTT GATGGAAGTGAAGA	GTTC TTTTGACTAAAGTCATG	(TTA)6	KU519476	ÓTIMO
<b>Pit126</b>	AATTG ATGTAAGTGTCTGTGG	GAT AGTTGGTTAGTCAGTC	(GA)9	KU519477	ÓTIMO

<b>Pit127</b>	TTTGT TTTACGTCTAAACTT	ATTG AGTAAGTAGCAATCGA	(TTA)7	KU519478	ÓTIMO
<b>Pit128</b>	GCTTT CAGCATCCTTACAAA	AATG GATGGTCTAATTATACA	(GA)9	KU519479	ÓTIMO
<b>Pit129</b>	GTTAG CTTCGCTGTTAGTTC	GCG ATTCACACTAGCACATC	(CT)9	KU519480	INVIÁVEL
<b>Pit130</b>	ATACT TCCAAGTCATGGTCT	TTC TCACTAATAACCAGACA	(CT)8	KU519481	OTIMIZAR
<b>Pit131</b>	ATAAG GTGATGATCTCTGTC	ACC CTCATACTCAGCTCCA	(AG)9	KU519482	ÓTIMO
<b>Pit133</b>	AAATC ATCTAATGTTTCGAGA	GATA GAGAGATGAGATGAAA	(TC)7-	KU519483	ÓTIMO
<b>Pit134</b>	GATGC TGTTTTTCATCTCAT	AACA TATCTAAACTGCTCAAA	(CGT)6 (CT)9	KU519484	ÓTIMO
<b>Pit135</b>	CTCTC CTCTCTCTTTTTGTG	ACC GAAAACACTACAAGTTAG	(AG)7	KU519485	INVIÁVEL
<b>Pit137</b>	TTGAG ACATGTGATTTATTAC	GGGT TGGAACCAGTGTTATT	(GT)6	KU519486	ÓTIMO
<b>Pit138</b>	TGGC GACAAGTGTCCCTTC	CTAC CTATCAAACACCTTCAC	(GAA)7	KU519487	ÓTIMO
<b>Pit139</b>	TTGAC CTTTGATATGTTTTTC	CT ACAGACGCTATGGTAG	(AAT)6	KU519488	ÓTIMO
<b>Pit140</b>	CATGT CAGTATTTAGTAGGT	TAGA CTAGGACATTAGCTCAA	(TC)10	KU519489	ÓTIMO
<b>Pit141</b>	GGTCG CAGTCTCGTGTCTT	AGA TGTCCATCTGTTTTACT	(GA)6	KU519490	ÓTIMO
<b>Pit145</b>	GTAGAT ATGTAATTGTGCATT	TTT TATTAGTTTCGTGGTCT	(TC)8	KU519491	ÓTIMO
<b>Pit147</b>	TCTTT GTTAATTCCGTTAAC	TGT AGATAACAACAGGAAA	(GA)6	KU519492	OTIMIZAR
	ATCAG	CGTA			