



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E
BIOLÓGICAS BACHARELADO EM BIOLOGIA



Amanda Oliveira Silva

**SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR PARA *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant
(BROMELIACEAE), DESENHOS DE PRIMERS TRAP E RT-qPCR PARA
ABACAXI (*Ananas comosus* (L.) Merrill) VISANDO A TRANSFERIBILIDADE PARA
Alcantarea nahoumii (BROMELIACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso

Cruz das Almas – BA

2021

Amanda Oliveira Silva

**SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR PARA *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant
(BROMELIACEAE), DESENHOS DE PRIMERS TRAP E RT-qPCR PARA
ABACAXI (*Ananas comosus* (L.) Merrill) VISANDO A TRANSFERIBILIDADE PARA
Alcantarea nahoumii (BROMELIACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Biologia, CCAAB, da Universidade Federal
do Recôncavo da Bahia, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Edna Lôbo Machado

Cruz das Almas – BA

2021

TERMO DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Amanda Oliveira Silva

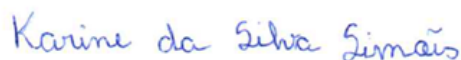
SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR PARA *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (BROMELIACEAE), DESENHOS DE PRIMERS TRAP E RT-qPCR PARA ABACAXI (*Ananas comosus* (L.) Merrill) VISANDO A TRANSFERIBILIDADE PARA *Alcantarea nahoumii* (BROMELIACEAE)

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Edna Lôbo Machado
orientador(a)

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



Prof^a. Dr^a. Karine da Silva Simões
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



Prof^a. Dr^a. Cátia Dias do Carmo
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Cruz das Almas-BA

Setembro-2021

“Nunca deixe que lhe digam que não
vale a pena acreditar no sonho que se tem,
ou que seus planos nunca vão dar certo,
ou que você nunca vai ser alguém...”

(Renato Russo)

Aos meus pais, Ana Rita e
Leilton, por me ensinarem a ser uma
pessoa melhor a cada dia, por tudo que
fizeram e fazem por mim e ao meu avô
Manoel, que por todos esses anos, me
esperou voltar para casa para receber meu
cheiro e não me esqueceu até o seu
último suspiro,
dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me tornado forte e corajosa para chegar até aqui.

Aos meus pais Leilton e Ana Rita, por abdicarem de tantas coisas para que eu estivesse aqui hoje. Sou grata a todo incentivo, suporte, carinho e dedicação.

A minha vó Roquelina, que mesmo não tendo a oportunidade de estudar, fez o possível para que não faltasse educação aos seus.

A toda minha família por todo zelo, amor, estímulo e suporte durante toda a minha vida.

A todos os meus amigos e amigas que compartilharam vários momentos nessa jornada e me acalmaram todas as vezes que pensei em desistir, além de terem se tornado minha segunda família.

A minha professora orientadora Edna por todas as contribuições ao longo dessa jornada, por todo incentivo, paciência e dedicação.

A todos os professores que passaram por minha vida e que compartilharam um pouco de seus conhecimentos. Um agradecimento especial ao corpo docente do curso de Ciências Biológicas da UFRB por serem excelentes profissionais.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação, o meu muito obrigada.

SILVA, Amanda Oliveira, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, setembro de 2021. **SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR PARA *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (BROMELIACEAE), DESENHOS DE PRIMERS TRAP E RT-qPCR PARA ABACAXI (*Ananas comosus* (L.) Merrill) VISANDO A TRANSFERIBILIDADE PARA *Alcantarea nahoumii* (BROMELIACEAE).** Orientadora: Edna Lobo Machado.

RESUMO

A Mata Atlântica brasileira compreende uma vegetação notavelmente heterogênea, incluindo vários ecossistemas relacionados, como aqueles que ocorrem em afloramentos rochosos. A família Bromeliaceae tem se destacado como uma das famílias mais diversas, frequentes nesses ambientes rochosos. Esta família engloba várias espécies: algumas com grande potencial ornamental e ameaçada de extinção, a exemplo da *Alcantarea nahoumii* e outras de grande importância econômica, como o popular abacaxi. Apesar de apresentar grande vulnerabilidade ao risco de extinção, não há estudos sobre a diversidade genética com marcadores moleculares pra *A. nahoumii*, e tão pouco estudos de expressão gênica. Diante do exposto e visando estudos moleculares, este trabalho teve como objetivo amplificar o DNA genômico de *A. nahoumii* com primer ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), desenhar primer TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) e RT- qPCR (*Reverse Transcription Quantitative PCR*) utilizando o genoma referência do abacaxizeiro visando a transferibilidade para *A. nahoumii*, cujo genoma ainda não foi sequenciado. Para a seleção de primers ISSR, foram utilizados 10 primers para amplificação do DNA de *A. nahoumii*. Para o desenho de primers TRAP e RT-qPCR, as sequências ESTs selecionadas foram as que codificam enzimas envolvidas em processo de embriogênese e estresse abiótico. Essas sequências ESTs correspondem a regiões genômicas altamente conservadas entre os vegetais, o que aumenta a probabilidade da transferibilidade entre espécies da mesma família. Dos 10 primers ISSR testados, 4 apresentaram um bom padrão de amplificação podendo ser utilizados para futura genotipagem e estudos de variabilidade genética de *A. nahoumii*. Foram desenvolvidos 144 primers fixos TRAP, dos quais 43 foram indicados como os mais promissores. Além disso, foram desenhados 255 pares de primers RT-qPCR, dos quais 130 atenderam aos parâmetros ideais. A obtenção de primers é de suma importância para as pesquisas moleculares. Através de técnicas simples, fazendo uso de programas de bioinformática, torna-se possível adquirir resultados satisfatórios no que tange à amplificação das sequências de DNA desejadas.

Palavras-chave: Mata Atlântica, Conservação, Bioinformática, mRNA, ESTs.

SILVA, Amanda Oliveira, Federal University of Recôncavo da Bahia, september 2021. **SELECTION OF ISSR PRIMERS FOR *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (BROMELIACEAE), PRIMERS TRAP AND RT-qPCR DRAWINGS FOR PINEAPPLE (*Ananas comosus* (L.) Merrill) AIMING TRANSFERABILITY TO *Alcantarea nahoumii* (BROMELIACEAE).** Advisor: Edna Lobo Machado.

ABSTRACT

The Brazilian Atlantic Forest comprises a remarkably heterogeneous vegetation, including several related ecosystems, such as those that occur in rocky outcrops. The Bromeliaceae family has stood out as one of the most diverse families, frequent in these rocky environments. This family includes several species: some with great ornamental potential and threatened with extinction, such as *Alcantarea nahoumii* and others of great economic importance, such as the popular pineapple. Despite being highly vulnerable to the risk of extinction, there are no studies on genetic diversity with molecular markers for *A. nahoumii*, and no studies on gene expression. Given the above and aiming at molecular studies, this work aimed to amplify the genomic DNA of *A. nahoumii* with ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) primer, design TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) and RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative PCR) using the pineapple reference genome aiming at transferability to *A. nahoumii*, whose genome has not yet been sequenced. For the selection of ISSR primers, 10 primers were used for amplification of *A. nahoumii* DNA. For the design of TRAP and RT-qPCR primers, the selected EST sequences were those that encode enzymes involved in the process of embryogenesis and abiotic stress. These EST sequences correspond to highly conserved genomic regions among plants, which increases the probability of transferability between species of the same family. Of the 10 ISSR primers tested, 4 showed a good amplification pattern and could be used for future genotyping and genetic variability studies of *A. nahoumii*. 144 TRAP fixed primers were developed, of which 43 were indicated as the most promising. In addition, 255 pairs of RT-qPCR primers were designed, of which 130 met the ideal parameters. Obtaining primers is of paramount importance for molecular research. Through simple techniques, making use of bioinformatics programs, it becomes possible to acquire satisfactory results regarding the amplification of the desired DNA sequences.

Keywords: Atlantic Forest, Conservation, Bioinformatics, mRNA, ESTs.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	9
CAPÍTULO I - SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR PARA ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM <i>Alcantarea nahoumii</i> (BROMELIACEAE).....	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1. Extração do DNA.....	14
2.2. Avaliação e quantificação do DNA extraído.....	15
2.3. Otimização dos iniciadores ISSR.....	15
2.4. Condições da PCR.....	15
2.5. Visualização dos locus amplificados.....	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4. CONCLUSÃO.....	18
5. REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES TRAP PARA ABACAXI (<i>Ananas comosus</i> (L.) MERRILL) VISANDO TRANSFERIBILIDADE PARA <i>Alcantarea nahoumii</i> (LEME) J.R. GRANT (BROMELIACEAE).....	19
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4. CONCLUSÃO.....	28
5. REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DE PRIMERS RT-qPCR EM ABACAXI (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill) VISANDO TRANSFERIBILIDADE PARA <i>Alcantarea nahoumii</i> (Leme) J. R. Grant (BROMELIACEAE).....	33
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
3.1. Sequências ESTs para desenho dos primers.....	35
3.1.1. Genes SERK.....	41
3.1.2. Genes LEA.....	41
3.1.3. Genes NHL.....	42
3.1.4. Genes SAP.....	42
3.1.5. Genes USP.....	42
3.1.6. Genes HSF.....	43
3.1.7. Genes ASR.....	43
3.2. Descrição dos iniciadores desenvolvidos.....	44

4.	CONCLUSÃO.....	49
5.	REFERÊNCIAS.....	49
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
	REFERÊNCIAS.....	54

INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é considerada um hotspot de biodiversidade por apresentar um grande número de espécies endêmicas e ameaçadas (MYERS et al., 2000). É um dos oito hotspots mais criticamente ameaçados, pois apenas 12,4% da floresta original permanece (Fundação SOS Mata Atlântica, 2019). Todavia, é o domínio fitogeográfico brasileiro mais rico em diversidade vegetal, com 8.409 espécies endêmicas de angiospermas (FLORA DO BRASIL, 2020).

A Mata Atlântica brasileira compreende uma vegetação notavelmente heterogênea, incluindo vários ecossistemas relacionados, como aqueles que ocorrem em afloramentos rochosos (SCARANO, 2002; LEÃO et al., 2014). A família Bromeliaceae tem se destacado como uma das famílias mais diversas, frequentes em ambientes rochosos (ROCHA et al., 2015; DE PAULA et al., 2016). Essa diversidade provavelmente está relacionada à presença de várias estratégias para suportar o estresse hídrico, como a suculência foliar, a formação peculiar de caixas d'água e os tricomas absorventes nas folhas, todas com a função primária de captação e retenção de água (BENZING, 2000; DE PAULA et al., 2016). Além disso, representam um dos grupos taxonômicos de maior importância nas florestas úmidas da América do Sul, devido ao alto grau de diversidade e endemismo, e à alta importância ecológica, especialmente pelas muitas interações com outros organismos (MARTINELLI et al., 2008).

A família Bromeliaceae abrange 77 gêneros e 3.629 espécies (GOUDA et al., 2020), das quais 40% são encontradas no Brasil, sendo 70% delas endêmicas da Mata Atlântica (Instituto Brasileiro de Florestas - IBF, 2015). É considerada a segunda maior família de epífitas vasculares neste bioma (KERSTEN, 2010), e muitas espécies são consideradas vulneráveis devido à degradação ambiental, causada principalmente por atividades extrativas e outras ações antrópicas.

Dentre essas espécies, *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant é classificada como ameaçada de extinção devido às queimadas frequentes de habitat e extração generalizada para uso como planta ornamental (Figura 1). *A. nahoumii* é uma espécie silvestre pertencente à subfamília Tillandsioidea e ocorre principalmente no estado da Bahia (VERSIEUX & WANDERLEY, 2010; FORZZA et al., 2013).

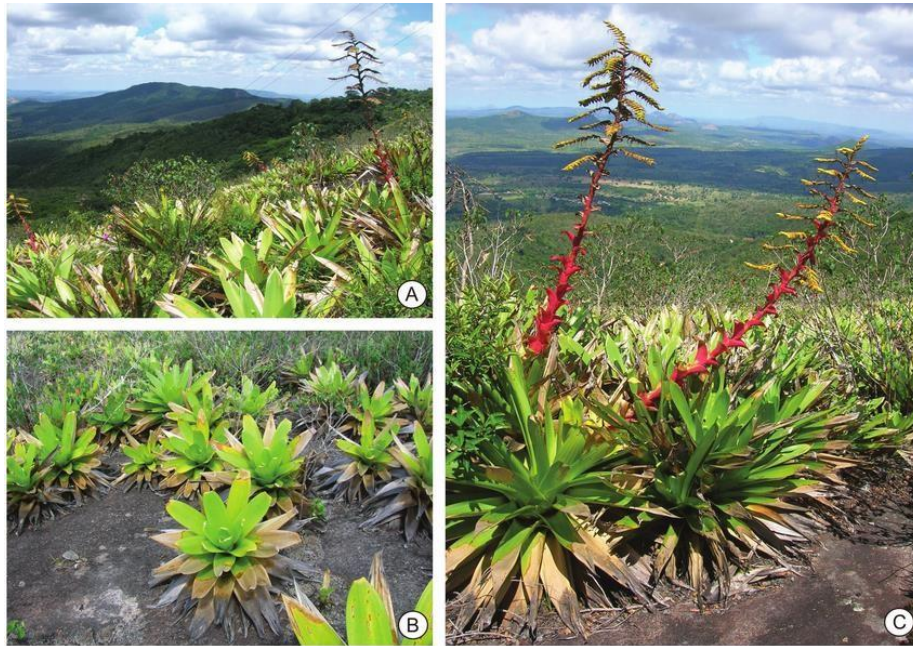


Figura 1: A) Cume do Morro da Pioneira; B) Aspecto geral de *Alcantarea nahoumii*; C) Detalhe de *A. nahoumii* crescendo em afloramento rochoso. Fonte: RAMOS et al., 2011.

Técnicas biotecnológicas têm sido utilizadas como alternativa para preservação da família Bromeliaceae (SIMÃO et al., 2016). A inclusão de espécies silvestres em programas de conservação é necessária, uma vez que são fontes de variabilidade e possuem genes valiosos que podem ser introduzidos nas espécies cultivadas (BERGOUIGNOUX, 2014). Estudos acerca da distribuição de variação genética dentro e entre as populações é de extrema necessidade para projetar estratégias de conservação e manejo de plantas nativas. (TABIN et al., 2016; HERISON et al., 2018; ALI et al., 2020).

Os marcadores moleculares permitem uma avaliação mais completa do genoma de uma determinada espécie, são pouco afetados pelo ambiente, possibilitam estudos em qualquer fase do desenvolvimento da planta e revelam polimorfismo ao nível do DNA, portanto, é uma técnica amplamente utilizada na caracterização da diversidade genética (FALEIRO, 2007; ANSARI et al., 2016).

Esses estudos auxiliam o acesso as informações em relação à base genética das espécies, ajudando para um melhor entendimento do status da variabilidade genética. Um estágio que antecede o início de análises baseadas em marcação molecular é a descrição do perfil de marcação e seleção de primers adequados, sendo uma fase preliminar de triagem daqueles que possuam a melhor visualização dos amplicons, reprodutibilidade e existência de polimorfismo, subsidiando informações cruciais para os resultados posteriores em estudos de genética populacional (COSTA et al., 2015; MATOS-OLIVEIRA, et al., 2018; SILVA et al.,

2018).

Os marcadores ISSR são fragmentos de DNA obtidos a partir da amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando-se de único primer, com tamanho entre 16 a 20 pares de bases. Durante a PCR, o iniciador (primer) amplifica diversas regiões intermicrosatélites do DNA-alvo, produzindo múltiplos fragmentos de tamanhos variados, que são posteriormente separados por eletroforese para a visualização dos fragmentos (locos). Por ser um marcador dominante, a presença de um loco pode significar um homozigoto para um dos alelos ou heterozigoto, enquanto sua ausência representa um homozigoto para um outro alelo. O ISSR não requer conhecimento prévio da região genômica (CANÇADO et al., 2012) e portanto, é considerado um primer semi-específico.

Para um estudo mais amplo da diversidade genética de *Alcantarea nahoumii*, adicionalmente aos primers ISSR (primers semi-específicos), faz-se necessário o desenvolvimento de outros tipos primers mais específicos. No entanto, *A. nahoumii* ainda não possui seu genoma sequenciado, o que dificulta esta ação. Uma alternativa para solucionar esse impasse, é a técnica de transferibilidade: desenvolver primers para uma espécie cujo genoma está disponível em Bancos de Dados, a exemplo do abacaxizeiro, e utilizar em uma espécie correlata, a exemplo de *A. nahoumi*. A alta taxa de transferibilidade é um dos fatores que contribuem para que estes sejam empregados mais amplamente em estudos de genética de populações, diversidade genética, expressão gênica e várias outras pesquisas (SOARES, 2019). *A. nahoumii* é uma espécie selvagem que ainda não possui genoma sequenciado. Tanto *A. nahoumii* como o abacaxi (*Ananas comosus*) pertencem à família Bromeliaceae e possuem número cromossômico $2n = 50$ (CEITA et al., 2008), sendo assim, por já ter o genoma sequenciado (MING et al., 2015) e possuir uma distância evolutiva relativamente pequena, o abacaxi se torna um candidato promissor para os testes de transferibilidade de primers para *A. nahoumii*.

Sequências depositadas em banco de dados genômicos tornaram possível o desenvolvimento de marcadores moleculares e primers para estudos de expressão gênica. Um marcador conhecido como pós-genômico é o TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) (BUYARAPU et al., 2011). O marcador TRAP utiliza um par de primers: o primer fixo e o aleatório. O primer fixo é desenhado a partir de EST (*Expressed Sequence Tags*) e o aleatório é uma sequência descrita na literatura, rica em CG, que irá se anelar em éxons ou íntrons (ZHANG et al., 2012). As combinações desses primers amplificam regiões funcionais do genoma. Esse diferencial torna o TRAP uma ferramenta valiosa para estudos de

diversidade genética de espécies (AGARWAL et al., 2008).

A Reação em cadeia da Polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (RT-qPCR ou qPCR) é uma técnica experimental que permite a validação de genes envolvidos nesses processos biológicos e possibilita o refinamento de dados de bibliotecas de cDNA e transcrito (RNA-Seq). A qPCR consiste em uma amplificação exponencial de determinado fragmento de DNA ou cDNA seguida de uma quantificação, por meio de medidas de fluorescência, associada à síntese de um amplicon. A combinação de amplificação e quantificação confere a essa técnica robustez, sensibilidade e alta reprodutibilidade para medidas quantitativas da expressão gênica (MORGANTE & BLAWID, 2016).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo selecionar primers ISSR para análises moleculares em *Alcantarea nahoumii* e projetar primers TRAP e RT-qPCR para abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill), a partir de ESTs obtidos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), visando futura transferibilidade para *A. nahoumii*.

CAPÍTULO I - SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR PARA ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Alcantarea nahoumii* (BROMELIACEAE)

1. INTRODUÇÃO

Alcantarea nahoumii é uma espécie pertencente à família Bromeliaceae. Esta família de plantas compreende cerca de 77 gêneros e 3.629 espécies (GOUDA et al., 2020) e possui uma grande taxa de endemismo devido ao alto grau de radiação adaptativa. Isso a coloca em posição de suma importância no cenário nacional de conservação à biodiversidade (MARTINELLI et al., 2008).

A. nahoumii costuma crescer em afloramentos rochosos e em solos rochosos rasos, preferindo locais com alta incidência de luz solar. Esses habitats são constantemente atingidos por incêndios e essas espécies também sofrem ações antrópicas, como a exploração predatória para fins ornamentais (FORZZA et al., 2013). Considerando que *A. Nahoumii* ocorre exclusivamente nos *inselbergs* da Bahia, a espécie tem sido considerada vulnerável ao risco de extinção nos últimos anos (BAHIA, 2017; IUCN, 2021). Sendo assim, estudos acerca da sua variabilidade genética e conservação se tornam cada vez mais necessários.

A variabilidade genética de uma espécie possibilita a adaptação das populações às oscilações ambientais em um meio que sofre constante modificação, sendo isso de extrema importância para a conservação. O potencial evolutivo das espécies pode ser prejudicado pela perda da diversidade genética, isso pode vir a interferir no sucesso reprodutivo destas (FRANKHAM et al., 2008).

A perda da biodiversidade vem preocupando cada vez mais o meio científico e foi demonstrada com o diagnóstico das regiões mais ricas e ameaçadas do mundo (MYERS et al., 2000), que foram consideradas como hotspots de biodiversidade.

Cada vez mais as técnicas moleculares têm sido empregadas nos estudos de diversidade genética (ZORTÉA et al., 2016). Graças aos avanços na biologia molecular, métodos de identificação e caracterização baseados no uso de marcadores moleculares foram desenvolvidos, os quais, na maioria dos casos, excedem as limitações dos métodos tradicionais (AZOFEIFA-DELGADO, 2006).

Para espécies cujo genoma ainda não foi sequenciado, o marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) ganha destaque porque se baseia na amplificação de regiões entre seqüências microssatélites adjacentes do DNA via PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase)

e não exige um conhecimento prévio do genoma (GONZÁLEZ et al., 2002). Além disso, este marcador apresenta elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo relativo.

Segundo Corrêa e Gaiotto (2009), quanto maior a variabilidade existente na população, maiores são suas chances de perpetuação. As técnicas de obtenção das informações sobre os polimorfismos genéticos diretamente em nível do DNA passaram a ser bastante utilizadas durante a década de 90. Dentre essas técnicas destacam-se os marcadores ISSR que podem ser usados em estudos genéticos populacionais de espécies vegetais, pois detectam efetivamente níveis muito baixos de variação genética (ZIETKIEWICZ et al.1994), eles também podem ter uma aplicação potencial na análise de padrões biogeográficos entre populações de uma única espécie de planta.

Pouco se conhece sobre a diversidade genética de *Alcantarea nahoumii*. Assim, o objetivo deste trabalho foi selecionar primers ISSR visando o estudo da variabilidade genética de *A. nahoumii* (Bromeliaceae).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, que se encontra no setor de Ciências Biológicas Prof. Elinsmar Adorno da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), na cidade de Cruz das Almas-BA.

2.1. Extração do DNA

Folhas jovens e saudáveis foram coletadas de genótipos de seis indivíduos de *A. nahoumii*, pertencentes à uma população da Serra do Jatobá, na cidade de Milagres-BA. O DNA genômico foi extraído tendo como base o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987), com modificações, a ser: as amostras foram armazenadas em sílica por 7 dias para a desidratação das folhas; a maceração foi realizada em almofariz gelado e mantido em gelo, contendo areia autoclavada e solução tampão de extração (CTAB 10% (2,4 M); NaCl 5M (1,7 M); Tris HCl 1M pH 8,0 (0,1 M); EDTA 0,5M (20 Mm); 2- Mercaptoetanol (0,4%); PVP 0,1% (0,1g) pré-aquecidos a 65°C em banho-maria); Foi feita a transferência de 1000 µL da solução para microtubos de 2 mL; o pellet foi ressuscitado com 100 µL de TE e só depois foi adicionado 1 µL de ribonuclease (RNAse 10 mg/mL) e incubado em banho maria a 37 °C por 1 hora. O DNA foi armazenado em freezer -20°C até sua utilização.

2.2. Avaliação e quantificação do DNA extraído

As amostras foram avaliadas quanto a qualidade e quantidade de DNA através de eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 1x (0,045 M Tris-Borato e 0,001 M EDTA). O gel foi corado com brometo de etídeo. As amostras foram visualizadas por meio de transluminador e fotodocumentadas. Para tanto, foram aplicados 10 µL da amostra de DNA mais 5 µL de tampão de amostra (30 % de Glicerol e 0,25% de Azul de Bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada por 60 minutos a 80 V. A quantificação foi feita por comparação do DNA isolado com um DNA de concentração conhecida (DNA Lambda, Invitrogen).

2.3. Otimização dos iniciadores ISSR

Foram utilizados DNA genômico de 3 indivíduos da população, selecionados aleatoriamente, para proceder com os testes de otimização da reação de amplificação com os primers ISSR. Foram testados 10 primers ISSR (Tabela 1).

Tabela 1: Primers ISSR utilizados nos testes de amplificação do DNA genômico de *A. nahoumii*

Nome do primer	Sequência 5'→3'
TRITTG 3 RC	TTG TTG TTG TTG TTG RC
TRICGG 3 RC	CGG CGG CGG CGG CGG RC
UBC835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC815	CTC TCT CTC TCT CTC TG
UBC817	CAC ACA CAC ACA CAC AA
UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG
UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC826	ACA CAC ACA CAC ACA CC
UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG

2.4. Condições da PCR

As reações de PCR foram realizadas num volume final de 20 µL. Cada uma delas foi composta por 3,0 µL de DNA genômico (5 ng/µL); 2,0 µL de tampão da enzima (10 x), 0,80 µL de dNTP mix (2,5 mM de cada), 0,60 µL de MgCl₂ (50 mM), 3,20 µL de

primer (2mM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (1 U/ 2 µL - Invitrogen) e 10,2 µL água ultrapura autoclavada.

A reação foi realizada em termociclador SimpliAmp, da marca Life Technologies, cujo programa constou de: desnaturação inicial de 3 minutos a 94 °C, seguida por 39 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 50 °C e 1 minuto a 72 °C para anelamento, extensão e amplificação, respectivamente. O ciclo final foi seguido por uma extensão de 5 minutos a 72 °C.

2.5. Visualização dos locus amplificados e seleção de primers

As amostras foram preparadas para a eletroforese adicionando 5µl do tampão da amostra (30 % de Glicerol e 0,25% de Azul de Bromofenol) nos tubos contendo as reações. A eletroforese dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose 1,5%, a 80 v, durante 3 horas, corado com brometo de etídio (0,15 µL/mL), em tampão TBE 1X. Os fragmentos foram visualizados sob luz UV e fotografados com o sistema de foto documentação. Em seguida, foi feita a análise dos fragmentos em comparação com um marcador de tamanho de pares de bases conhecido (DNA ladder 100pb). Foram selecionados os primers que revelaram um bom perfil de amplificação com número considerável de locos e bandas nítidas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 2 mostra o perfil eletroforético do DNA genômico obtido de seis indivíduos (A-F) de *A. nahoumii* e utilizados na amplificação com os primers ISSR.

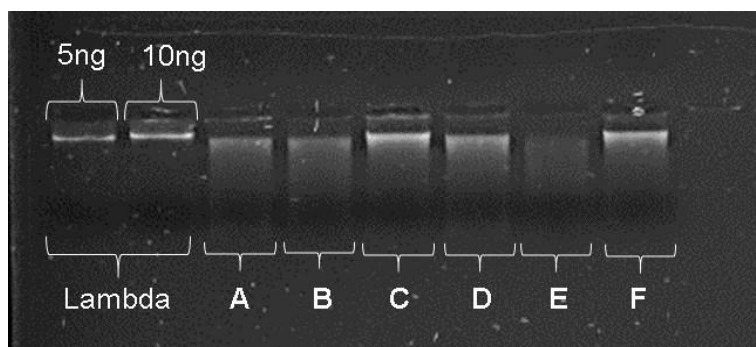


Figura 2: Perfil eletroforético do DNA genômico de *A. nahoumii*

Dos 10 primers ISSR testados, 4 apresentaram um padrão de amplificação satisfatório (Tabela 2; Figura 3). Desta, forma, estes primers podem ser utilizados para a genotipagem e estudos de diversidade genética de *A. nahoumii*.

Tabela 2: Primers ISSR com bom padrão de amplificação

Nome do primer	Sequência 5'→3'
TRICGG 3 RC	CGG CGG CGG CGG CGG RC
UBC835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
UBC817	CAC ACA CAC ACA CAC AA
UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT

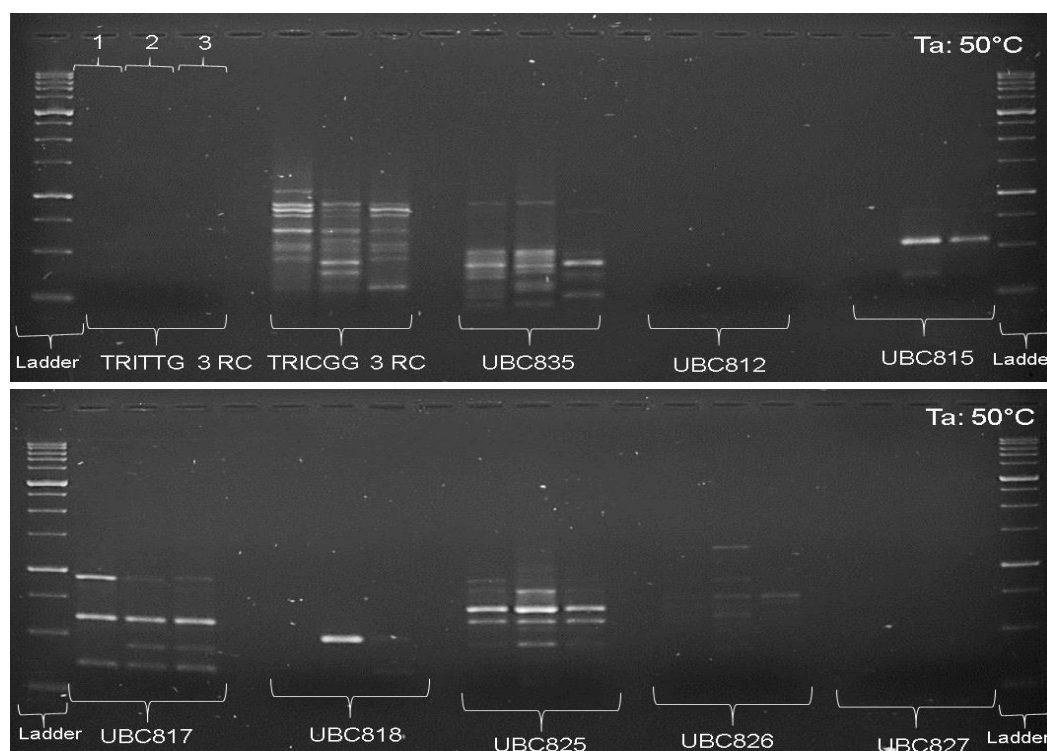


Figura 3: Primers ISSR com bom padrão de amplificação

Em Souza et al. (2018), de 28 primers testados, cinco foram selecionados para as análises moleculares por possuírem número considerável de locos e um bom perfil de amplificação em *Plathymenia reticulata*. Em trabalho realizado por Vieira et al. (2019), de um total de 23 primers ISSR testados em *Melocactus conoideus*, 15 apresentaram marcas nítidas e possibilitaram a realização da análise de polimorfismo. Já em trabalho realizado por Felix et al. (2020), de 28 primers ISSR testados, sete foram selecionados para estudos de diversidade genética em *Pityrocarpa moniliformis*.

4. CONCLUSÃO

Dos 10 primers ISSR testados, quatro apresentaram um bom padrão de amplificação podendo ser utilizados para futura genotipagem e estudos de variabilidade genética de *Alcantarea nahoumii*.

5. REFERÊNCIAS

AZOFEIFA-DELGADO, A. Uso de marcadores moleculares en plantas; Aplicaciones en frutales del trópico. **Agronomía Mesoamericana**, [S.l.], v.17, n. 2, p.221, fev. 2006.

BAHIA. **Lista Vermelha da Bahia 2017**. Disponível em: <<http://www.listavermelhabahia.org.br>>. Acesso em: 15 de julho de 2021.

CORRÊA, R. X.; GAIOTTO, F. A. Princípios genéticos para o manejo e a conservação de espécies arbóreas. In: SAMBUICHI, R. H. R.; MIELKE, M. S.; PEREIRA, C. E. **Nossas Árvores: Conservação, uso e manejo de árvores nativas no sul da Bahia**. Ilhéus: Editora da UESC, 2009, p. 50-59.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, [S.l.], v. 19, p. 11-15, 1987.

FELIX, F. C. et al. Aplicações de marcadores ISSR em estudos de diversidade genética de *Pityrocarpa moniliformis*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 33, n. 4, p. 1017-1024, dez. 2020.

FORZZA, F.C. et al. Bromeliaceae. In: MARTINELLI, G. & MORAES, M.A. (Orgs.) **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. p. 326.

FRANKHAM, R. et al. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008, p. 280.

GONZÁLEZ, A.; COULSON, M.; BRETTELL, R. Development of DNA markers (ISSRs) in mango. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 575, p.139-143, dez. 2002.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D.; GOUDA, C. S. **Encyclopaedia of Bromeliads**, Version. 4. University Botanic Gardens, Utrecht University. Utrecht, Netherlands. 2020.

IUCN. **International Union for Conservation of Nature**. Red List of Threatened Species Version 2021. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/22685521/0>>. Acesso em: 20 de julho de 2021.

MARTINELLI, G. et al. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, [S.l.], v. 59, p. 209-258, mar. 2008.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, United Kingdom, v. 403, n. 6772, p. 853-858, fev. 2000.

SOUZA, L. C. et al. Validação do marcador molecular ISSR para detecção de diversidade genética em *Plathyenia reticulata* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 13, n. 1, p. 5491, out. 2018.

VIEIRA, A. et al. Seleção de primers *Inter Simple Sequence Repeat* em *Melocactus conoideus* Buin. & Bred.(Cactaceae), espécie endêmica do sudoeste da Bahia, Brasil. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 16, n. 29, jun. 2019.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, n. 2, p. 176-183, mar. 1994.

ZORTÉA, K. E. M. et al. Estabelecimento de protocolo de extração de DNA para *Eugênia stipitata* MC. VAUNG, visando estudos moleculares. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.13, n.24, p. 495-502, dez. 2016.

CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES TRAP PARA ABACAXI (*Ananas comosus* (L.) MERRILL) VISANDO TRANSFERIBILIDADE PARA *Alcantarea nahoumii* (LEME) J.R. GRANT (BROMELIACEAE)

1. INTRODUÇÃO

Bromeliaceae é uma família de plantas que compreende cerca de 77 gêneros e 3.629 espécies (GOUDA et al., 2020). Devido ao alto grau de radiação adaptativa, esta família possui uma grande taxa de endemismo. Isso a coloca em posição de suma importância no cenário nacional de conservação da biodiversidade (MARTINELLI et al., 2008).

Nessa família há muitas espécies que possuem valor econômico, como o popular abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill). No paisagismo, destacam-se espécies dos gêneros *Aechmea*, *Alcantarea*, *Billbergia*, *Gusmania*, *Tillandsia*, dentre outros. O crescente interesse nessas espécies ornamentais com importância econômica, vem aumentando a demanda do mercado e conseqüentemente o cultivo e comercialização, assim como o extrativismo ilegal (MANHÃES et al., 2016).

Apesar de possuir grande importância ecológica e econômica, ainda há poucos estudos sobre a estrutura genética e a diversidade em populações naturais de Bromélias. Segundo Cavallari et al. (2006), preservar a diversidade genética tornou-se o principal objetivo da maioria dos programas de conservação e conhecer a distribuição dessa diversidade dentro e entre as populações naturais é o primeiro passo. Isso é essencial para o estabelecimento de formas sustentáveis de exploração econômica (MIRANDA et al., 2012).

Alcantarea nahoumii (Leme) JR Grant é uma espécie pertencente à família

Bromeliaceae, costuma crescer em afloramentos rochosos e em solos rochosos rasos, todavia estes ambientes são constantemente atingidos por incêndios e a espécie também sofre ações antrópicas, como a exploração predatória para fins ornamentais (FORZZA et al., 2013). Segundo Lees e Pimm (2015) a crescente perda de habitat tem gerado muita preocupação, pois diversas espécies de plantas estão correndo risco de extinção, sendo que muitas delas podem se extinguir antes mesmo de serem conhecidas pela ciência. Ainda há poucos estudos abordando especificamente *A. nahoumii*, principalmente na área molecular. Essa gama de fatores explica a grande vulnerabilidade ao risco de extinção desta espécie nos últimos anos e a necessidade de conservação da espécie.

No Brasil, vários estudos têm relatado o uso de marcadores moleculares para avaliação da diversidade genética de populações de espécies de plantas (NETO et al., 2019; GARCIA et al., 2020; SANTOS et al., 2020). Porém, uma das limitações do uso desses marcadores para análise da diversidade genética em diferentes espécies é o alto custo para o desenvolvimento de primers específicos. Uma abordagem alternativa seria a transferibilidade de primers, que é a capacidade de marcadores moleculares desenvolvidos para uma espécie amplificar segmentos de DNA de outra espécie, a depender da distância evolutiva (SOARES, 2019). Resultados satisfatórios já foram obtidos em estudos voltados para a transferibilidade de marcadores em espécies de Bromeliaceae (MIRANDA et al., 2012; MANHÃES et al., 2016).

Segundo Noor & Feder (2006), os ecologistas moleculares exigem cada vez mais marcadores universais que podem ser facilmente transferidos entre as espécies. Esses marcadores transferíveis facilitam comparações entre táxons intimamente relacionados para abordar os mecanismos envolvidos na divergência e especiação populacional, e comparações entre múltiplas coocorrências de espécies para estudar como os padrões de diversidade nos níveis genético e comunitário interagem (WHITHAM et al. 2006).

Sequências depositadas em banco de dados genômicos tornaram possível o desenvolvimento de marcadores conhecidos como marcadores pós-genômicos (BUYARAPU et al., 2011). Entre eles está o TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*), que utiliza dois primers: o fixo e o aleatório. O primer fixo é desenhado a partir de EST (*Expressed Sequence Tags*) e o aleatório é uma sequência descrita na literatura, rica em CG, que irá se anelar em éxons ou íntrons (ZHANG et al., 2012). As combinações desses primers amplificam regiões funcionais do genoma, esse diferencial torna o TRAP uma ferramenta valiosa para estudos de diversidade genética em programas de melhoramento (AGARWAL et al., 2008).

O marcador TRAP ganha destaque por apresentar uma técnica simples, de baixo custo

e alta reprodutibilidade, que vem sendo aplicada em estudos de diversidade, mapeamentos e quantificação de genes (ALWALA et al., 2006; KHAN et al., 2011).

Inicialmente, os marcadores TRAP foram desenvolvidos para amostrar DNA do girassol comum (HU e VICK, 2003). No entanto, o potencial desse marcador para estudos de diversidade genética foi confirmado em outras espécies, a exemplo do café (ALMURISH et al., 2013), caqui (LUO et al., 2013), trigo (BARAKAT et al., 2013), guaraná (SILVA, 2014) e sorgo doce (KHIDR et al., 2020).

A técnica TRAP traz como vantagem, além da amplificação de genes candidatos, a capacidade de produzir perfil de amplificação com muitas bandas por gel, o que diminui o custo por informação de polimorfismo (CARMO et al., 2013). Visto que os marcadores TRAP são marcadores pós-genômicos e que *Alcantarea nahoumii* é uma espécie selvagem que ainda não possui genoma sequenciado, e tendo em vista que tanto *A. nahoumii*, como o abacaxi (*Ananas comosus*) pertencem à família Bromeliaceae e possuem número cromossômico $2n = 50$ (CEITA et al., 2008), o objetivo deste trabalho foi projetar primers TRAP para abacaxi a partir de ESTs obtidos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), visando a transferibilidade para *A. nahoumii*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os primers foram projetados usando sequências ESTs de abacaxi, obtidas a partir de bancos de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Visando o sucesso na transferibilidade, as sequências ESTs selecionadas foram regiões expressas envolvidas nos processos de embriogênese e estresse abiótico, regiões altamente conservadas entre os vegetais.

Um total de 144 sequências ESTs foram recuperadas em formato FASTA. Os primers foram projetados utilizando-se o software Primer3 (ROZEN & SKALETSKY, 2000). Por se tratar de marcadores TRAP, apenas os primers diretos foram utilizados. Os parâmetros utilizados para o desenho dos primers foram: 1- Tamanho ideal variando entre 19 a 21 nucleotídeos; 2- Temperatura de Melting (T_m) mínima, ótima e máxima foi fixada em 55, 60 e 62° C, respectivamente; 3- Percentual de GC (Guanina/Citosina) entre 40 a 60%. A qualidade dos primers fixos foi verificada por meio do software Net Primer (PREMIER BIOSOFT, 2015), no qual apenas os primers com avaliação igual ou superior a 97% - os mais adequados, livres de grampos, dímeros, dímeros cruzados, sequências palíndroma - foram selecionados.

Para o reverso, foram sugeridos seis primers arbitrários, descritos na literatura segundo

Li e Quiros (2001) e adaptados por Hu e Vick (2003) (Tabela 3). Os iniciadores arbitrários compreendem três nucleotídeos seletivos na extremidade 3', quatro nucleotídeos ricos em adenina / timina (AT) ou guanina / citosina (GC) na região central e cerca de 11 nucleotídeos aleatórios na extremidade 5'.

Tabela 3: Primers arbitrários para validação dos primers TRAP para abacaxi

Nome	Sequência (3'→5')
Arb1	GACTGCGTACGAATTGAC
Arb2	GACTGCGTACGAATTTGA
Arb3	GACTGCGTACGAATTGCA
Arb4	GACTGCGTACGAATTAATT
Arb5	GACTGCGTACGAATTTGCC
Arb6	GACTGCGTACGAATTGACC

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram recuperadas 144 sequências ESTs do genoma de abacaxizeiro para desenho de primers fixos TRAP. De um total de 144 primers fixos TRAP desenhados, 43 primers atenderam aos parâmetros ideais do projeto de primer fixo TRAP. A caracterização das 43 sequências ESTs que geraram os primers considerados ideais, estão caracterizados na tabela 4. Os primers foram denominados pelas abreviações TRAP seguidas de números (Tabela 4). Resultados semelhante foram obtidos por Cheng et al. (2013). Os autores desenharam 100 primers TRAP para rabanete, gerados com sequências análogas de genes de resistências. Destes, 59 primers atenderam aos critérios do projeto de primer fixo TRAP.

Tabela 4: Sequências expressas (ESTs) usadas para desenvolver primers de polimorfismo de amplificação de região alvo (TRAP) para abacaxi

Nome/ID do gene	GENE	Cromossomo localizado	Descrição	Primer
LOC109707542	SERK2	1	Receptor somático de embriogênese semelhante quinase 2	TRAP01
LOC109709233		4	Receptor somático de embriogênese semelhante quinase 1	TRAP02
LOC109727018		22	Embriogênese tardia abundante	TRAP03

			proteína 29-like	
LOC109724188		1	Embriogênese tardia abundante proteína 46-like	TRAP04
LOC109722558		16	Embriogênese tardia abundante semelhante a proteínas	TRAP05
LOC109721371	SERK3	15	Receptor somático de embriogênese quinase 1 semelhante	TRAP06
LOC109717302		1	Embriogênese tardia abundante proteína D-34-like	TRAP07
LOC109711086		5	Embriogênese tardia abundante proteína Lea14-A-like	TRAP08
LOC109707120		3	Embriogênese tardia abundante proteína 18 semelhante	TRAP09
LOC109717047		11	Embriogênese tardia abundante proteína 29-like	TRAP10
LOC109703669		25	Embriogênese tardia abundante proteína 1	TRAP11
LOC109713823		8	Proteína abundante de embriogênese tardia	TRAP12
LOC109713823		8	Proteína abundante de embriogênese tardia	TRAP13
LOC109711034		5	Proteína 12 semelhante a NDR1 / HIN1	TRAP14
LOC109722945		17	Proteína estromal de 70 kDa relacionada ao choque térmico, semelhante a cloroplástico	TRAP15
LOC109721773		15	Dedo de zinco A20 e domínio AN1 contendo proteína 9 associada ao estresse	TRAP16
LOC109727849		23	Proteína do gene associado à resistência à radiação UV	TRAP17
LOC109727803		23	Proteína universal do estresse semelhante a PHOS34	TRAP18
LOC109726960		2	Dedo de zinco A20 e domínio AN1 contendo proteína 11 associada ao estresse	TRAP19
LOC109726468		21	Fator de transcrição de estresse térmico A-1	TRAP20
LOC109726303		21	Proteína de estresse semelhante a DDR48	TRAP21
LOC109726040		20	Proteína 3 de maturação por	TRAP22

		estresse abscísico	
LOC109726039	20	Abscísico de maturação por estresse de proteína 2	TRAP23
LOC109725112	19	Dedo de zinco A20 e proteína 8 associada ao estresse contendo domínio AN1	TRAP24
LOC109719661	1	Resposta ao estresse A /B contendo proteína semelhante a UP3	TRAP25
LOC109717606	11	Fator de transcrição de estresse térmico A-4b	TRAP26
LOC109711330	6	Fator de transcrição de estresse térmico B-1 semelhante	TRAP27
LOC109710877	5	Dedo de zinco AN1 contendo o domínio 15 da proteína associada ao estresse	TRAP28
LOC109710219	5	Fator de transcrição de estresse térmico A-2	TRAP29
LOC109709329	4	Proteína universal semelhante à proteína A do estresse	TRAP30
LOC109708811	4	Proteína universal do estresse semelhante a PHOS34	TRAP31
LOC109707044	1	Proteína universal de estresse Slr1101	TRAP32
LOC109706813	2	Dedo de zinco AN1 contendo proteína 17 associada ao estresse	TRAP33
LOC109705958	Indefinido	Proteína abscísica de amadurecimento por estresse 1	TRAP34
LOC109705957	Indefinido	Proteína abscísica de amadurecimento por estresse 1	TRAP35
LOC109705547	2	Proteína universal do estresse PHOS32	TRAP36
LOC109705530	Indefinido	Fator de transcrição de estresse térmico B-2b-like	TRAP37
LOC109705504	Indefinido	Fator de transcrição de estresse térmico putativo B-4 ^a	TRAP38
LOC109704982	Indefinido	Fator de transcrição de estresse térmico B-4c-like	TRAP39
LOC109704830	Indefinido	Fator de transcrição de estresse térmico B-2b-like	TRAP40

LOC109719447	13	Proteína HS1 contendo domínio A / B de resposta ao estresse	TRAP41
LOC109718944	12	Proteína 1 reforçada com estresse, cloroplástico	TRAP42
LOC109711246	6	Dedo de zinco A20 e domínio AN1 contendo proteína 11 associada ao estresse	TRAP43

Dentre os primers desenhados, 14 derivaram de sequências ESTs envolvidas nos processos de embriogênese (TRAP1-TRAP14; Tabela 4), e os outros 29 derivaram de sequências expressas relacionadas ao estresse abiótico (TRAP15-TRAP43; Tabela 4). A caracterização de alguns genes utilizados para o desenho dos primers serão discutidos a seguir:

O gene da quinase semelhante ao receptor da embriogênese somática (SERK), é conhecido por realizar um papel importante na indução da embriogênese somática, bem como em outros processos de desenvolvimento. Em trabalho realizado por Santos et al. (2009), foi comprovado que além desses processos, os genes SERK podem estar envolvidos em um mecanismo geral de percepção de estresse biótico e abiótico, que inclui embriogênese somática, pois, ao que tudo indica, uma resposta de estresse de plantas à dessecação e outros fatores estimulam a embriogênese usando auxina como molécula sinalizadora. Este gene é altamente conservado entre as espécies de plantas e foi agrupado em uma pequena família em diferentes espécies de plantas (SANTOS et al., 2005).

Em estudo realizado por Ma et al. (2012), a expressão de SERK2 em abacaxi não foi associada estritamente à embriogênese somática, podendo então desempenhar um papel mais amplo na morfogênese. Foi relatado que AcSERK2 teve mais relevância na aquisição de competência embriogênica do que no desenvolvimento do embrião globular, podendo ser usado como gene marcador para as células competentes. Além disso, foi indicado que o AcSERK2 pode participar da resposta aos hormônios exógenos e da regulação do estresse abiótico no abacaxi.

Já em Ma et al. (2014), foi relatado que o AcSERK3 exerce uma função importante na proliferação e diferenciação de células somáticas no calo e no desenvolvimento da raiz do abacaxizeiro. Além disso, AcSERK3 também pode desempenhar um papel na transição de células somáticas para células competentes.

A família do gene da proteína Abundante da Embriogênese Tardia (LEA), englobam proteínas hidrofílicas e são altamente conservadas (HUANG et al., 2012). Está associada à

tolerância ao estresse por sal e seca em muitas espécies de plantas. Os promotores desses genes contêm elementos da sequência de ação *cis* associados às respostas ao estresse (IBRAHIME et al., 2019).

Os genes semelhantes a NDR1 / HIN1 (NHL) incluem o gene 1 induzido pela proteína harpina (HIN1), que possui papel relevante em várias respostas de defesa da planta, crescimento, desenvolvimento e resistência a estresses abióticos (TAKAHASHI et al., 2004), e o gene 1 de resistência a doença de raças não específicas (NDR1), que foi clonado de *A. thaliana* e está envolvido em várias respostas de resistência a doenças de plantas (CENTURY et al., 1997). Em Bao et al. (2016), foi relatado que com a superexpressão do Gene NHL6 semelhante a NDR1/HIN1, a germinação das sementes modifica em resposta ao ácido abscísico (ABA) e estresses abióticos em *Arabidopsis*.

Proteínas associadas ao estresse (SAP), é uma classe de proteínas de dedo de zinco que contêm domínios A20 N-terminais e/ou domínios AN1 C-terminais, foram relatadas como reguladoras de resposta ao estresse em plantas (GIRI et al., 2013). Em estudo recente, He et al. (2019) identificou proteínas SAP em *Brassica napus* e as classificaram como reguladores essenciais na tolerância das plantas a vários estresses.

Os genes que codificam proteínas com domínio USP (Proteína Universal do Estresse), são conhecidos por estarem envolvidos em uma variedade de respostas ao estresse e qualquer mutação nesses genes pode causar perda de eficácia no combate ao estresse (DRUMM et al., 2009). Em Gou et al. (2020) um USP de *Medicago falcata* (Fabaceae), MfUSP1, foi caracterizado e os resultados mostraram que o transcrito MfUSP1 é regulado positivamente por tratamentos com baixa temperatura, estresse osmótico e salinidade, bem como ABA e H₂O₂. MfUSP1 foi responsivo a múltiplos estresses abióticos, sua superexpressão resultou em acúmulo reduzido de espécies reativas de oxigênio (ROS) e maior tolerância ao frio, estresse osmótico, salinidade e estresse oxidativo. Portanto, foi sugerido que MfUSP1 confere tolerância ao estresse abiótico múltipla, regulando a defesa antioxidante e o acúmulo de prolina sob condições de estresse.

Fatores de transcrição de estresse térmico (Hsfs) são os componentes terminais de uma cadeia de transdução de sinal mediando a ativação de genes responsivos ao estresse térmico e a um grande número de estressores químicos. As plantas Hsfs têm características únicas: alta complexidade da família de genes e a existência de genes Hsf induzidos por estresse por calor (HS), que podem ter um papel importante na modulação da transcrição durante a resposta HS de longo prazo (MORIMOTO, 1998; NOVER et al., 2001; BANIWAL et al., 2004).

As proteínas ABA de amadurecimento por estresse (ASR) são expressos em vários órgãos durante o amadurecimento da fruta em resposta ao ABA e ao estresse abiótico, como osmose, alta salinidade e desidratação (GOLAN et al., 2014; YOON et al., 2019). Em estudo realizado por Zan et al. (2020), foram avaliados os padrões de resposta ao estresse abiótico de membros da família ASR em trigo, os resultados obtidos indicaram que os genes ASR são proteínas multifuncionais do estresse, envolvidas com a resistência das plantas ao estresse e podem ajudar a manter as atividades metabólicas normais de plantas superiores sob condições extremas.

Os 43 primers fixos TRAP desenhados apresentam uma porcentagem média de GC de 53,12% (Tabela 5). Esse resultado é próximo ao encontrado por Simões et al. (2017), que relataram 53,20% de GC para 56 pares de primers TRAP para mamona, e Machado e Silva (2013), que encontraram um percentual médio de CG de 47,29% para 30 pares de primers SSR também para mamona. A priorização da porcentagem de CG na constituição da fita é explicada devido a ligação entre esses nucleotídeos (através de três pontes de hidrogênio) ser mais forte que a ligação entre AT (Adenina/Timina) constituída de duas pontes de hidrogênio. Tornando assim, mais difícil de separar as fitas nas ligações GC que em AT.

A temperatura de melting (T_m) é definida como a temperatura na qual metade dos fragmentos de DNA está na forma desnaturada, ou seja, não pareados, e a outra metade está pareada. Nos primers desenhados, a T_m média foi de 56,97°C. Quanto ao tamanho do primer, todos possuem 19 nucleotídeos, exceto os primers TRAP09 e TRAP39, que apresentaram tamanho de 20 nucleotídeos. As médias de tamanho e avaliação dos primers desenhados foram, respectivamente, 19,05 pb e 99,84% (Tabela 5).

Tabela 5: Caracterização de primers fixos TRAP desenvolvidos para abacaxi

Primer	Sequência (5'→3')	GC (%)	T_m (°C)	Tamanho (pb)	Avaliação (%)
TRAP01	TGGGAGTGTTGCTTCTTGC	52,63	56,53	19	100
TRAP02	GCACCTGGTTCCACATCAC	57,89	55,93	19	100
TRAP03	GCAGAGGAAGGAGCAAACC	57,89	57,02	19	100
TRAP04	TCCGCCTCCTCTCATTCT	52,63	56,91	19	100
TRAP05	GGGCAAGGAGGAAGAAGAA	52,63	56,64	19	100
TRAP06	CATTTTGGGCAGAGGAGGT	52,63	57,20	19	100
TRAP07	TGGGCGATGCTGATGTAGT	52,63	56,78	19	100
TRAP08	TGAAGGGGAAGGAGACGAC	57,89	56,90	19	100
TRAP09	GGCGAGAACCAAAGAAGAGA	50,00	56,98	20	100
TRAP10	TGTCAGCAAGGCAAAGAGG	52,63	56,78	19	100

TRAP11	GATGTTCAAGTCGGGCAAA	47,37	56,45	19	100
TRAP12	CTCGTCAAGAGCGTGGTGT	57,89	56,27	19	100
TRAP13	CTACCGCCGCTAAAACCAT	52,63	58,10	19	100
TRAP14	CGTCATCCTCATCGTCTGG	57,89	56,28	19	100
TRAP15	CCGATGAGGTGGAGAGGAT	57,89	56,60	19	100
TRAP16	GAGGAACCCCGAATGCTTA	52,63	57,48	19	100
TRAP17	TGATTTGCGTTTTGGAGGA	42,11	57,16	19	100
TRAP18	TAGCCAGGCAAAAGGAGGT	52,63	57,35	19	100
TRAP19	CAATCACAGCCCCACAAAA	47,37	57,21	19	100
TRAP20	ATGCCACCATCAGTGCCTA	52,63	56,58	19	100
TRAP21	ACGGCGATGACGATTACAA	47,37	57,04	19	100
TRAP22	CACCACTTCCCCTTTCCAC	57,89	57,19	19	100
TRAP23	GCACAAGCACAAGGAGCAT	52,63	56,55	19	100
TRAP24	AGGCGACCTTTGAAGCAGT	52,63	57,22	19	100
TRAP25	TTGGCGAAGTCCAGTTACG	52,63	56,89	19	98
TRAP26	GCTGGCGGAATCCACTAAT	52,63	57,49	19	98
TRAP27	CCTTCCTCCGTCACCAACT	57,89	56,91	19	100
TRAP28	AGCACCTCCACCAATACCC	57,89	56,83	19	100
TRAP29	AGGACGAGCAGCAGGAGAT	57,88	56,82	19	100
TRAP30	TAAACCCCAAATCCCAAA	42,11	57,81	19	100
TRAP31	TTCACCGACCTCTCCCTCT	57,89	56,41	19	100
TRAP32	GGTGGGGAAGCAGTGTTTT	52,63	57,11	19	100
TRAP33	ACTGCGAGCACGAAGATTG	52,63	56,79	19	100
TRAP34	AGGAGAAGCACCACAAGCA	52,63	56,04	19	100
TRAP35	GCACTTGTCCTCCATTT	52,63	56,97	19	100
TRAP36	AAGAAATGGGAGGCAATCG	47,37	57,48	19	100
TRAP37	TTCTCCTCCTCCCCTTTT	52,63	57,63	19	100
TRAP38	ATACGATTGCGTCGGCTTT	47,37	58,30	19	98
TRAP39	TGGTTTTGGAGAACGAGGAC	50,00	57,30	20	100
TRAP40	CGTTCCTGATGAAGGCGTA	52,63	56,74	19	99
TRAP41	CGGAGGAGAAGGATGTGGT	57,89	56,75	19	100
TRAP42	CCCTTCTCTCTCCCAACGA	57,89	57,14	19	100
TRAP43	GATTACCGACCGACCGACT	57,89	57,02	19	100

4. CONCLUSÃO

De 144 primers fixos TRAP desenhados, 43 primers atenderam aos parâmetros ideais. Sendo os marcadores TRAP pós-genômicos, e sabendo que a espécie *Alcantarea nahoumii* ainda não possui seu genoma sequenciado, os primers fixos desenhados para

abacaxi possuem potencial para serem usados em estudos visando a transferibilidade para *A. nahoumii*.

5. REFERÊNCIAS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant cell reports**, Springer, v. 27, n. 4, p. 617-631, fev. 2008.

ALMURISH, T.M. et al. Genetic diversity of coffee (*Coffea arabica* L.) in Yemen via SRAP, TRAP and SSR markers. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 11, n. 2, p. 411-416, abr. 2013.

ALWALA, S. et al. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 1, p. 448-455, jan. 2006.

BANIWAL, S.K. et al. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. **Journal of biosciences**, Dordrecht, v. 29, n. 4, p. 471-487, dez. 2004.

BAO, Y. et al. Overexpression of the NDR1/HIN1-like gene NHL6 modifies seed germination in response to abscisic acid and abiotic stresses in *Arabidopsis*. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 2, p.1-16, fev. 2016.

BARAKAT, M.N. et al. Assessment of genetic diversity among wheat doubled haploid plants using TRAP markers and morpho-agronomic traits. **Australian Journal of Crop Science**, New South Wales, v. 7, n. 1, p. 104-111, jan. 2013.

BUYARAPU, R. et al. Development of new candidate gene and EST-based molecular markers for *Gossypium* species. **International journal of plant genomics**, New York, v. 2011, p.1-9, jan. 2011.

CARMO, C.D.; SANTOS, D.B.; OLIVEIRA, E.J. Polimorfismo da técnica Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) para estudos moleculares em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 15., 2013, Salvador. **Anais...** Salvador: CBM: Embrapa, 2013. 1 CD-ROM. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95576/1/POLIMORFISMO-DA-TECNICA105-melhoram-21488-EDER.pdf>>. Acesso em: 15/07/2021.

CAVALLARI, M.M. et al. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, Selected using RAPD Markers. **Biodiversity & Conservation**, Dordrecht, v. 15, n. 14, p. 4357-4373, fev. 2006.

CEITA, G.O. et al. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 158, p. 189-193, set. 2008.

CENTURY, K.S. et al. NDR1, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis*

disease resistance. **Science**, Washington, v. 278, n. 5345, p. 1963-1965, dez. 1997.

CHENG, D. et al. TRAP markers generated with resistant gene analog sequences and their application to genetic diversity analysis of radish germplasm. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 161, p. 153-159, set. 2013.

DRUMM, J.E. et al. *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein Rv2623 regulates bacillary growth by ATP-Binding: requirement for establishing chronic persistent infection. **PLoS Pathogens**, The USA, v. 5, n. 5, p. e1000460, mai. 2009.

FORZZA, F.C. et al. Bromeliaceae. In: MARTINELLI, G. & MORAES, M.A. (Orgs.) **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. p. 326.

GARCIA, D.C.F. et al. Análise da Diversidade Genética do Baru usando Marcadores Moleculares ISSR. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 7, p. 48494-48459, jul. 2020.

GIRI, J. et al. SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants. **Bioessays**, Hoboken, v. 35, n. 7, p. 639-648, mai. 2013.

GOLAN, I. et al. Tomato abscisic acid stress ripening (ASR) gene family revisited. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. 1-8, out. 2014.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D.; GOUDA, C. S. **Encyclopaedia of Bromeliads**, Version. 4. University Botanic Gardens, Utrecht University. Utrecht, Netherlands. 2020.

GOU, L. et al. A Universal Stress Protein from *Medicago falcata* (MfUSP1) confers multiple stress tolerance by regulating antioxidant defense and proline accumulation. **Environmental and Experimental Botany**, [S.l.], v. 178, p. 104168, out. 2020.

HE, X. et al. Genome-wide identification of stress-associated proteins (SAP) with A20/AN1 zinc finger domains associated with abiotic stresses responses in *Brassica napus*. **Environmental and Experimental Botany**, [S.l.], v. 165, p. 108-119, set. 2019.

HUANG, H.; MOLLER, I.M.; SONG, S.Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. **Journal of Proteomics**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 1247-1262, fev. 2012.

HU, J.; VICK, B.A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 21, n. 3, p. 289-294, set. 2003.

IBRAHIME, M. et al. Genome-wide identification of the LEA protein gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 15, n. 4, p. 55, jun. 2019.

KHAN, I.A. et al. Identification of elite sugarcane clones through TRAP. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 43, n. 1, p. 261-269, mar. 2011.

- KHIDR, Y.A. et al. Suitability of target region amplified polymorphism (TRAP) markers to discern genetic variability in sweet sorghum. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 1-11, out. 2020.
- LEES, A.C.; PIMM, S.L. Species, extinct before we know them?. **Current Biology**, [S.l.], v. 25, n. 5, p. R177-R180, mar. 2015.
- LI, G.; QUIROS, C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theoretical and applied genetics**, Heidelberg, v. 103, n. 2-3, p. 455-461, ago. 2001.
- LUO, C. et al. Characterization and comparison of EST-SSR and TRAP markers for genetic analysis of the Japanese persimmon *Diospyros kaki*. **Genetic and Molecular Research**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 2841-2851, jan. 2013.
- MA, J. et al. Characterization and expression analysis of AcSERK2, a somatic embryogenesis and stress resistance related gene in pineapple. **Gene**, Oxford, v. 500, p. 115-123, mai. 2012.
- MA, J. et al. Characterization of the third SERK gene in pineapple (*Ananas comosus*) and analysis of its expression and autophosphorylation activity in vitro. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 3, p. 530-539, set. 2014.
- MACHADO, E.L.; SILVA, S.A. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 11, p. 1457-1463, nov. 2013.
- MANHÃES, V.C. et al. **Estudos em *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica de inselbergues da Floresta Atlântica**. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, 2016.
- MARTINELLI, G. et al. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, [S.l.], v. 59, p. 209-258, mar. 2008.
- MIRANDA, F.D. et al. Transferability and characterization of microsatellite markers in five Bromeliaceae species belonging to the subfamilies *Pitcairnioideae* and *Bromelioideae*. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 12, n. 3, p. 319-323, set. 2012.
- MORIMOTO, R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes & development**, [S.l.], v. 12, n. 24, p. 3788-3796, dez. 1998.
- National Center for Biotechnology Information – **NCBI**: Gene. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=ananas+comosus>>. Acesso em: 13/07/2021.
- NETO, J.X.A. et al. Diversidade genética entre e dentro de populações de feijão-bravo (*Capparis flexuosa* L.) usando marcadores RAPD. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 32, p. 81-91, mar. 2019.
- NOOR, M.A.F.; FEDER, J.L. Speciation genetics: evolving approaches. **Nature Reviews**

Genetics, [S.l.], v. 7, n. 11, p. 851-861, out. 2006.

NOVER, L. et al. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? **Cell Stress & Chaperones**, [S.l.] v. 6, n. 3, p. 177, jul. 2001.

PREMIER BIOSOFT. **NetPrimer**. Disponível em:
<<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>>. Acesso em: 20/03/2021.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (eds) **Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology**. Humana Press: Totowa, NJ, 2000. p. 365-386.

SANTOS, M.O. et al. Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, [S.l.], v. 168, n. 3, p. 723-729, mar. 2005.

SANTOS, M.O. et al. Suppression of SERK gene expression affects fungus tolerance and somatic embryogenesis in transgenic lettuce. **Plant Biology**, Oxford v. 11, n. 1, p. 83-89, jan. 2009.

SANTOS, S.K.S. et al. Transferibilidade de marcadores SSR, diversidade e estrutura genética em *Syagrus oleracea*. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 8, p. 59931-59947, ago. 2020.

SILVA, E.F. **Diversidade genética do programa de melhoramento do guaranazeiro (*Paullinia Cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke), utilizando marcadores Trap e Srap**. 2014. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

SIMÕES, K.S. et al. Development of TRAP primers for *Ricinus communis* L. **Genetics and Molecular Research**, [S.l.], v. 16, n. 2, p. 100-113, abr. 2017.

SOARES, T.S. **Transferibilidade de primers microssatélites entre espécies vegetais**. 2019. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2019.

TAKAHASHI, Y. et al. Identification of tobacco HIN1 and two closely related genes as spermine-responsive genes and their differential expression during the *Tobacco mosaic virus*-induced hypersensitive response and during leaf- and flower-senescence. **Plant molecular biology**, [S.l.], v. 54, n. 4, p. 613-622, mar. 2004.

WHITHAM, T.G. et al. A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 7, n. 7, p. 510-523, jul. 2006.

YOON, J.S. et al. Over-expression of the *Brachypodium* ASR gene, BdASR4, enhances drought tolerance in *Brachypodium distachyon*. **Plant cell reports**, [S.l.], v. 38, n. 9, p. 1109-1125, mai. 2019.

ZAN, T. et al. Genome-wide identification and abiotic stress response patterns of abscisic acid

stress ripening protein family members in *Triticum aestivum* L. **Genomics**, [S.l.], v. 112, n. 5, p. 3794-3802, set. 2020.

ZHANG, J.J. et al. Two EST-derived marker systems for cultivar identification in tree peony. **Plant cell reports**, Heidelberg, v. 31, n. 2, p. 299-310, out. 2012.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DE PRIMERS RT-qPCR EM ABACAXI (*Ananas comosus* (L.) Merrill) VISANDO TRANSFERIBILIDADE PARA *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (BROMELIACEAE)

1. INTRODUÇÃO

A análise da expressão gênica é de fundamental importância para o estudo das vias metabólicas e de sinalização, as quais sustentam processos celulares e de desenvolvimento (MONTEIRO et al., 2015). De acordo com Peron (2018), com o avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), o sequenciamento do mRNA (RNA-seq) expandiu a área experimental e acelerou pesquisas de expressão gênica. A identificação de genes expressos de abacaxi se tornou possível com o genoma de referência sequenciado (MING et al., 2015).

O sequenciamento do mRNA (RNA-seq) fornece uma abundância de informações a respeito dos níveis de expressão gênica do organismo em várias condições. Surge então o conceito de genes expressos diferencialmente (DEGs), que são genes que possuem níveis de expressão determinados para serem expressos diferencialmente em duas ou mais condições (FINOTELLO & DI CAMILLO, 2015). Segundo Amorim (2016), além de ser uma das bases da biologia molecular moderna, a análise do nível de transcrição do gene é de suma importância para compreender o padrão de expressão do gene e revelar a função do mesmo.

Uma das principais técnicas utilizadas em biologia molecular é a reação em cadeia da polimerase (PCR). Através desse método é possível amplificar milhares de vezes um fragmento de DNA (GARCÊS & LIMA, 2004). Graças aos avanços na biotecnologia, tornou-se possível determinar o nível de expressão gênica em diferentes células e em diferentes condições, através da quantificação do mRNA em uma amostra, combinando a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) com a PCR de transcriptase reversa (RT-PCR) (PIERCE, 2016).

De acordo com Rodríguez et al. (2015), a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é muito usada para quantificar sequências de ácido nucléico (DNA ou RNA). É uma técnica sensível e específica na qual a quantidade de DNA é monitorada durante a reação por meio de

corantes fluorescentes que são incorporados ao produto de PCR. Diferente da PCR convencional, na qPCR o aumento das sequências é registrado em tempo real. Por outro lado, é necessária uma atenção especial ao desenho do primer e da sonda para qPCR de transcrição reversa (RT-qPCR), que é usado para análise de expressão gênica. Neste método, o RNA é transcrito em cDNA antes de sua quantificação usando qPCR (RODRÍGUEZ et al., 2015).

Para análise da expressão do gene alvo por RT-qPCR, é essencial a normalização da técnica para ajustar variações experimentais (NICOT et al., 2005). Geralmente, são selecionados um ou mais genes de referência – que tem expressão constante na mesma espécie, tecidos, estágios de desenvolvimento e não são afetados por condições experimentais – que normalizam a técnica de quantificação em tempo real, possibilitando avaliar a expressão de genes sob diferentes condições experimentais. Para abacaxizeiro, alguns genes de referência para as condições de estresse abiótico, embriogênese e estresse biótico já foram analisados (MA et al., 2012; AMORIM, 2016).

Segundo Amorim (2016), a análise de bioinformática para avaliar os genes e o desenho dos primers é fundamental para o sucesso no diagnóstico RT-qPCR. Porém, uma das limitações para a análise da expressão gênica em diferentes espécies é o alto custo para o desenvolvimento de primers específicos. Uma abordagem alternativa seria a transferibilidade de primers, que é a capacidade de marcadores moleculares desenvolvidos para uma espécie amplificar segmentos de DNA de outra espécie, a depender da distância evolutiva (SOARES, 2019).

Resultados satisfatórios já foram obtidos em estudos voltados para a transferibilidade de marcadores em espécies de Bromeliaceae (MIRANDA et al., 2012; MANHÃES et al., 2016). Wöhrmann e Weising (2011) desenvolveram pares de marcadores microssatélites baseados em ESTs (EST-SSR) e testaram a transferibilidade do marcador dentro do gênero *Ananas*, bem como para membros mais distantes da família Bromeliaceae, obtendo resultados satisfatórios. Porém ainda não foram realizados estudos de transferibilidade de primers com a espécie *A. nahoumii*.

Até o momento, vários tipos de marcadores de DNA foram desenvolvidos para abacaxi, incluindo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (DUVAL et al., 2001), SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (ZHOU et al., 2015), Microssatélites (SSR) (FENG et al., 2013; NASHIMA et al., 2020). No entanto, ainda não há relatos de primers RT-qPCR desenvolvidos para abacaxi.

A partir de sequências expressas (ESTs) depositadas em banco de dados genômicos do National Center for Biotechnology Information (NCBI), é possível desenvolver primer *s* para

análise de expressão gênica. Visto que *Alcantarea nahoumii* é uma espécie selvagem que ainda não possui genoma sequenciado e que, tanto ela como o abacaxi pertencem à família Bromeliaceae e possuem número cromossômico $2n = 50$ (CEITA et al., 2008), o objetivo deste trabalho foi projetar primers RT-qPCR em abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill), visando a transferibilidade para *A. nahoumii*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os primers foram projetados usando sequências expressas (ESTs) do genoma de *A. comosus*, obtidas a partir de bancos de dados genômicos do National Center for Biotechnology Information – NCBI. As sequências ESTs selecionadas foram as que codificam enzimas envolvidas em processo de embriogênese e estresse abiótico. Essas sequências ESTs correspondem a regiões genômicas altamente conservadas entre os vegetais, o que aumenta a probabilidade da transferibilidade entre espécies da mesma família. Foi feita uma revisão a respeito das famílias dos genes encontrados.

As sequências ESTs foram recuperadas em formato FASTA. Para cada sequência foi desenhado um par de primers (direto e reverso), projetados utilizando o software Primer3 (ROZEN & SKALETSKY, 2000).

Os parâmetros utilizados para o desenho dos primers foram: Tamanho mínimo, ótimo e máximo de 19, 20 e 21pb, respectivamente; Temperatura de Melting (T_m) variando entre 55 a 62° C; Percentual de GC (Guanina/Citosina) mínimo, ótimo e máximo de 40, 50 e 60%, respectivamente. A qualidade dos primers foi verificada por meio do software Net Primer (PREMIER BIOSOFT, 2015), no qual apenas os primers com avaliação igual ou superior a 97% para pelo menos um dos pares de primers (direto ou reverso) foram selecionados - os mais adequados, livres de grampos, dímeros, dímeros cruzados, sequências palíndroma.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Sequências ESTs para desenho dos primers

Foram recuperadas 255 sequências ESTs que codificam enzimas envolvidas em processo de embriogênese e estresse abiótico de abacaxizeiro para o desenho dos pares de primers. Dos 255 pares de primers desenhados, 130 atenderam aos parâmetros ideais do projeto de primers. Já em trabalho realizado por Cheng et al. (2013), os autores desenharam 100 primers tipo TRAP para rabanete, gerados com sequências ESTs análogas de genes de

resistências. Destes, 59 primers atenderam aos critérios do projeto de primer.

Em trabalho realizado por Nascimento (2017), de 30 sequências ESTs envolvidos em vias de transdução de sinal por fitormônios em cana-de-açúcar sob estresse hídrico, foram desenhados 20 pares de primers, tendo como objetivo contribuir para futuros desenvolvimento de marcadores moleculares funcionais para seleção assistida envolvendo o estresse abiótico. Já em Correia e Kido (2010), foram selecionadas 30 sequências ESTs envolvidos em respostas ao estresse salino em cana-de-açúcar e, a partir dessas, 14 pares de primers foram desenhados para RT-qPCR, dentro de condições semelhante às aqui propostas: tamanho do primer e percentual de GC ótimos de 20 pb e 50%, respectivamente.

A caracterização das sequências ESTs que geraram os primers considerados ideais, está descrita nas tabelas 6 e 7. Os primers foram denominados pelas abreviações AC seguidas de números (Tabelas 6, 7 e 8). Dentre os primers desenhados, 25 derivaram de sequências ESTs envolvidas nos processos de embriogênese (Tabela 6), e os outros 105 derivaram de sequências expressas relacionadas ao estresse abiótico (Tabela 7).

Tabela 6: Sequências expressas (ESTs) relacionadas à embriogênese usadas para desenvolver primers RT-qPCR em abacaxi

ID do Gene	Símbolo do Gene	Cromossomo localizado	Descrição	Primer
109724188	LOC109724188	1	Embriogênese tardia abundante proteína 46 semelhante	AC01
109707120	LOC109707120	3	Embriogênese tardia abundante proteína 18 semelhante	AC02
109707542	LOC109707542	1	Receptor somático de embriogênese quinase 2 semelhante	AC03
109722015	LOC109722015	16	Embriogênese tardia abundante proteína 7 semelhante	AC04
109721371	LOC109721371	15	Receptor somático de embriogênese quinase 1 semelhante	AC05
109717389	LOC109717389	11	Embriogênese tardia abundante proteína D-29 semelhante	AC06
109705624	LOC109705624	2	Receptor somático de embriogênese quinase 2 semelhante	AC07
109721692	LOC109721692	15	Receptor somático de embriogênese quinase 1 semelhante	AC08
109728446	LOC109728446	23	Receptor somático de embriogênese quinase 2 semelhante	AC09
109727018	LOC109727018	22	Embriogênese tardia abundante proteína 29 semelhante	AC10
109722558	LOC109722558	16	Embriogênese tardia abundante semelhante à proteína	AC11
109717302	LOC109717302	1	Embriogênese tardia abundante proteína D-34 semelhante	AC12
109717047	LOC109717047	11	Embriogênese tardia abundante proteína 29 semelhante	AC13
109728261	LOC109728261	23	Proteína 13 semelhante a NDR1 / HIN1	AC14
109723299	LOC109723299	17	Proteína 10 semelhante a NDR1 / HIN1	AC15

109722715	LOC109722715	17	Proteína 12 semelhante a NDR1 / HIN1	AC16
109721734	LOC109721734	15	Proteína 13 semelhante a NDR1 / HIN1	AC17
109720621	LOC109720621	14	Proteína 13 semelhante a NDR1 / HIN1	AC18
109718315	LOC109718315	12	Proteína contendo bromodomínio semelhante a DDB_G0271118	AC19
109713619	LOC109713619	8	Proteína 13 semelhante a NDR1 / HIN1	AC20
109713264	LOC109713264	7	Proteína 13 semelhante a NDR1 / HIN1	AC21
109709370	LOC109709370	4	Proteína 13 semelhante a NDR1 / HIN1	AC22
109708047	LOC109708047	3	Proteína não caracterizada do tipo At1g08160	AC23
109705471	LOC109705471	Indefinido	Proteína não caracterizada do tipo At1g08160	AC24
109703541	LOC109703541	25	Proteína 13 semelhante a NDR1 / HIN1	AC25

Tabela 7: Sequências expressas (ESTs) relacionadas à estresses abióticos usadas para desenvolver primers RT-qPCR em abacaxi

ID do Gene	Símbolo do Gene	Cromossomo localizado	Descrição	Primer
109728149	LOC109728149	23	Proteína universal do estresse PHOS34	AC26
109717468	LOC109717468	11	Proteína universal semelhante à proteína A do estresse	AC27
109714364	LOC109714364	8	Resposta ao estresse A/B contendo proteína semelhante a UP3	AC28
109712626	LOC109712626	7	Proteína universal de estresse semelhante a PHOS32	AC29
109725464	LOC109725464	20	Proteína universal de estresse semelhante a Sll1388	AC30
109707044	LOC109707044	1	Proteína universal de estresse Slr1101	AC31
109723895	LOC109723895	18	Fator de transcrição de estresse térmico B-4b semelhante	AC32
109715555	LOC109715555	9	Proteína universal de estresse semelhante a PHOS34	AC33
109708811	LOC109708811	4	Proteína universal de estresse semelhante a PHOS34	AC34
109727803	LOC109727803	23	Proteína universal de estresse semelhante a PHOS34	AC35
109719661	LOC109719661		Resposta ao estresse A/B contendo proteína semelhante a UP3	AC36
109719447	LOC109719447	13	Proteína HS1 contendo domínio barrel A / B de resposta ao estresse	AC37
109709329	LOC109709329	4	Proteína universal semelhante à proteína A do estresse	AC38
109704318	LOC109704318	Indefinido	Resposta ao estresse A/B contendo proteína semelhante a UP3	AC39
109720756	LOC109720756	14	Proteína associada à estresse térmico 32	AC40
109726612	LOC109726612	21	Fator de transcrição de estresse térmico A-5	AC41
109720232	LOC109720232	14	Dedo de zinco A20 e domínio AN1 contendo proteína associada ao estresse 8	AC42

109723593	LOC109723593	17	Dedo de zinco AN1 contendo o domínio 15 da proteína associada ao estresse	AC43
109721843	LOC109721843	15	Estresse associado à proteína 2 do retículo endoplasmático	AC44
109727754	LOC109727754	2	Fator de transcrição de estresse térmico B-4c semelhante	AC45
109726857	LOC109726857	21	Dedo de zinco AN1 contendo o domínio 15 da proteína associada ao estresse	AC46
109726468	LOC109726468	21	Fator de transcrição de estresse térmico A-1	AC47
109726040	LOC109726040	20	Proteína de maturação por estresse abscísico 3 semelhante	AC48
109725821	LOC109725821	20	Proteína de amadurecimento por estresse abscísico 1	AC49
109724899	LOC109724899	2	Fator de transcrição de estresse térmico B-1 semelhante	AC50
109723450	LOC109723450	17	Proteína 2 de amadurecimento por estresse abscísico	AC51
109723407	LOC109723407	17	Fator de transcrição de térmico A-3	AC52
109722116	LOC109722116	16	Fator de transcrição de estresse térmico C-1b semelhante	AC53
109721998	LOC109721998	16	Dedo de zinco A20 e domínio AN1 contendo proteína 6 associada ao estresse	AC54
109720476	LOC109720476	14	Dedo de zinco AN1 e domínio C2H2 contendo proteína 16 associada ao estresse	AC55
109719633	LOC109719633	13	Tipo de proteína induzida por estresse salino	AC56
109719350	LOC109719350	13	Proteína de resposta ao estresse semelhante a nst1	AC57
109719289	LOC109719289	13	Tipo de proteína induzida por estresse salino	AC58
109718398	LOC109718398	12	Dedo de zinco A20 e domínio AN1 contendo proteína 6 associada ao estresse	AC59
109717606	LOC109717606	11	Fator de transcrição de estresse térmico A-4b	AC60
109716612	LOC109716612	10	Fator de transcrição de estresse térmico C-2a semelhante	AC61
109714582	LOC109714582	8	Fator de transcrição de estresse térmico A-1	AC62
109712269	LOC109712269	7	Fosfoproteína 1 induzida por estresse	AC63
109712057	LOC109712057	6	Fator de transcrição de estresse térmico B-4c semelhante	AC64
109711246	LOC109711246	6	Dedo de zinco A20 e domínio AN1 contendo proteína 11 associada ao estresse	AC65
109711031	LOC109711031	5	Proteína de resposta ao estresse NST1	AC66
109710219	LOC109710219	5	Fator de transcrição de estresse térmico semelhante a A-2	AC67
109709783	LOC109709783	5	Fator de transcrição de estresse térmico C-2b semelhante	AC68
109709580	LOC109709580	4	Peptídeo hidrofóbico ESI3 induzido por estresse salino	AC69
109709349	LOC109709349	4	Proteína do cloroplasto aumento da tolerância de estresse	AC70
109705958	LOC109705958	Indefinido	Proteína de amadurecimento por estresse abscísico 1	AC71
109705957	LOC109705957	Indefinido	Proteína de amadurecimento por estresse abscísico 1	AC72

109705530	LOC109705530	Indefinido	Fator de transcrição de estresse térmico B-2b semelhante	AC73
109705504	LOC109705504	Indefinido	Fator de transcrição de estresse térmico putativo B-4 ^a	AC74
109704982	LOC109704982	Indefinido	Fator de transcrição de estresse térmico B-4c semelhante	AC75
109704739	LOC109704739	Indefinido	Fator de transcrição de estresse térmico B-1 semelhante	AC76
109707911	LOC109707911	3	Proteína secretória de repetição 3 semelhante rica em cisteína	AC77
109713033	LOC109713033	7	Proteína quinase semelhante a receptor putativo At4g00960	AC78
109708410	LOC109708410	4	Proteína quinase 2 semelhante ao receptor rico em cisteína	AC79
109717259	LOC109717259	11	Proteína quinase 2 semelhante ao receptor rico em cisteína	AC80
109709445	LOC109709445	4	Proteína induzida por desidratação 19 homólogo 2	AC81
109704466	LOC109704466	Indefinido	Proteína quinase semelhante ao receptor rico em cisteína 10	AC82
109704016	LOC109704016	Indefinido	Proteína secretória de repetição rica em cisteína 3	AC83
109722419	LOC109722419	16	Proteína quinase semelhante a receptor putativo At4g00960	AC84
109720773	LOC109720773	14	Proteína induzida por desidratação 19 homólogo 2	AC85
109715115	LOC109715115	9	Proteína quinase semelhante ao receptor rico em cisteína 10	AC86
109712976	LOC109712976	7	Proteína quinase semelhante ao receptor rico em cisteína 25	AC87
109709468	LOC109709468	4	Proteína quinase semelhante a receptor putativo At4g00960	AC88
109709467	LOC109709467	4	Proteína quinase 6 semelhante ao receptor rico em cisteína	AC89
109704467	LOC109704467	Indefinido	Proteína quinase semelhante a receptor putativo At4g00960	AC90
109719956	LOC109719956	14	Provável proteína quinase semelhante ao receptor serina / treonina	AC91
109719574	LOC109719574	13	Proteína induzida por desidratação 19 homólogo 2	AC92
109706906	LOC109706906	2	Proteína de choque térmico de 24,1 kDa, mitocondrial	AC93
109728075	LOC109728075	2	Proteína secretora de repetição rica em cisteína semelhante a 60	AC94
109724578	LOC109724578	19	Domínio interativo rico em AT contendo proteína semelhante a 3	AC95
109723739	LOC109723739	18	Proteína induzida por desidratação 19 homólogo 2	AC96
109722420	LOC109722420	16	Proteína quinase semelhante a receptor putativo At4g00960	AC97
109722418	LOC109722418	16	Proteína quinase semelhante a receptor putativo At4g00960	AC98
109719268	LOC109719268	13	Proteína secretora de repetição rica em cisteína 38 semelhante	AC99
109717325	LOC109717325	1	Proteína secretora de repetição rica em cisteína 38 semelhante	AC100
109714854	LOC109714854	9	Proteína secretora de repetição rica em cisteína 38 semelhante	AC101
109714835	LOC109714835	9	Proteína secretora de repetição rica em cisteína 38 semelhante	AC102

109714834	LOC109714834	9	Proteína secretora de repetição rica em cisteína 38 semelhante	AC103
109713633	LOC109713633	8	Proteína quinase 2 semelhante ao receptor rico em cisteína	AC104
109713295	LOC109713295	7	Proteína secretória de repetição rica em cisteína semelhante a 55	AC105
109713294	LOC109713294	7	Proteína secretora de repetição rica em cisteína 38 semelhante	AC106
109713293	LOC109713293	7	Proteína quinase semelhante ao receptor rico em cisteína 10	AC107
109713291	LOC109713291	7	Proteína secretora de repetição rica em cisteína 38 semelhante	AC108
109713289	LOC109713289	7	Proteína quinase 6 semelhante ao receptor rico em cisteína	AC109
109712599	LOC109712599	7	Proteína quinase 6 semelhante ao receptor rico em cisteína	AC110
109708886	LOC109708886	4	Proteína secretória de repetição rica em cisteína semelhante a 55	AC111
109707069	LOC109707069	3	Proteína secretora de repetição rica em cisteína 15	AC112
109704587	LOC109704587	Indefinido	Domínio PLAT contendo proteína 3 semelhante	AC113
109704465	LOC109704465	Indefinido	Proteína secretora de repetição rica em cisteína 38 semelhante	AC114
109703942	LOC109703942	Indefinido	Proteína quinase 6 semelhante ao receptor rico em cisteína	AC115
109727136	LOC109727136	22	Domínio U-box contendo proteína 33 semelhante	AC116
109723681	LOC109723681	18	Proteína de choque térmico de 17,4 kDa classe I	AC117
109723479	LOC109723479	17	Provável proteína quinase PBL6 serina / treonina	AC118
109723373	LOC109723373	17	Proteína de choque térmico de 22,0 kDa classe IV	AC119
109722287	LOC109722287	16	Proteína quinase inativa SELMODRAFT_444075 semelhante	AC120
109721028	LOC109721028	15	Pequena proteína de choque térmico, semelhante ao cloroplástico	AC121
109715945	LOC109715945	10	Proteína de choque térmico 2 de 16,9 kDa classe I	AC122
109713280	LOC109713280	7	Proteína semelhante à formina 3	AC123
109712039	LOC109712039	6	Proteína de choque térmico 1 de 16,9 kDa classe I	AC124
109710398	LOC109710398	5	Proteína induzida por desidratação 19 semelhante	AC125
109710042	LOC109710042	5	Proteína de choque térmico de 26,5 kDa, mitocondrial	AC126
109709938	LOC109709938	5	Proteína de choque térmico de 19,0 kDa classe II	AC127
109709935	LOC109709935	5	Proteína de choque térmico de 19,0 kDa classe II	AC128
109708760	LOC109708760	4	Proteína de choque térmico de 17,9 kDa classe I	AC129
109705166	LOC109705166	Indefinido	Proteína de choque térmico de 22,0 kDa classe IV	AC130

Com base na literatura, segue a caracterização de alguns genes utilizados para o desenho dos primers:

3.1.1. Genes SERK

O gene receptor de quinase na embriogênese somática (SERK), é conhecido por realizar um papel importante na indução da embriogênese somática, bem como em outros processos de desenvolvimento. Em trabalho realizado por Santos et al. (2009), foi comprovado que além desses processos, os genes SERK podem estar envolvidos em um mecanismo geral de percepção de estresse biótico e abiótico, que inclui embriogênese somática, pois, ao que tudo indica, uma resposta de estresse de plantas à dessecação e outros fatores estimulam a embriogênese usando auxina como molécula sinalizadora. Este gene é altamente conservado entre as espécies de plantas e foi agrupado em uma pequena família em diferentes espécies de plantas (SANTOS et al., 2005).

Em estudo realizado por Ma et al. (2012), a expressão de SERK2 em abacaxi não foi associada estritamente à embriogênese somática, podendo então desempenhar um papel mais amplo na morfogênese. Foi relatado que AcSERK2 teve mais relevância na aquisição de competência embriogênica do que no desenvolvimento do embrião, podendo ser usado como gene marcador para as células competentes. Além disso, foi indicado que o AcSERK2 pode participar da resposta aos hormônios exógenos e da regulação do estresse abiótico no abacaxi.

Já em Ma et al. (2014), foi relatado que o AcSERK3 exerce uma função importante na proliferação e diferenciação de células somáticas no calo e no desenvolvimento da raiz do abacaxizeiro. Além disso, AcSERK3 também pode desempenhar um papel na transição de células somáticas para células competentes.

3.1.2. Genes LEA

A família do gene da proteína Abundante da Embriogênese Tardia (LEA), engloba proteínas hidrofílicas e são altamente conservadas (HUANG et al., 2012). Originalmente, as proteínas LEA foram associadas à aquisição de tolerância à dessecação em embriões de plantas devido à alta expressão gênica e acúmulo de proteínas nos estágios posteriores da maturação da semente (DELAHAIE et al., 2013; HUNDERTMARK et al., 2011). Atualmente, as proteínas LEA estão associadas à tolerância ao estresse por sal e seca em muitas espécies de plantas. Os promotores desses genes contêm elementos da sequência de ação *cis* associados às respostas ao estresse (IBRAHIME et al., 2019).

Em trabalho realizado por Artur et al. (2019), os resultados indicaram que a maioria dos genes LEA estão localizados em regiões genômicas conservadas de todas as angiospermas, ao passo que a descoberta de cópias de genes específicos de clado, bem como

de espécies específicas, revela que a expansão contínua e diversificação de genomas de angiospermas contribuíram para a evolução de famílias de genes LEA.

3.1.3. Genes NHL

Os genes semelhantes a NDR1 / HIN1 (NHL) incluem o gene 1 induzido pela proteína harpina (HIN1), que possui papel relevante em várias respostas de defesa da planta, crescimento, desenvolvimento e resistência a estresses abióticos (TAKAHASHI et al., 2004), e o gene 1 de resistência a doença de raças não específicas (NDR1), que foi clonado de *A. thaliana* e está envolvido em várias respostas de resistência a doenças de plantas (CENTURY et al., 1997).

Em Bao et al. (2016), foi relatado que com a superexpressão do gene NHL6 semelhante a NDR1/HIN1, a germinação das sementes modifica em resposta ao ácido abscísico (ABA) e estresses abióticos em *Arabidopsis*. Já em trabalho realizado por Liu et al. (2020), foi revelado que genes NHL desempenham importante papel na aquisição de resistência à estresses bióticos e abióticos em pimenta (*Capsicum annuum* L.).

3.1.4. Genes SAP

Proteínas associadas ao estresse (SAPs), é uma classe de proteínas de dedo de zinco que contêm domínios A20 N-terminais e/ou domínios AN1 C-terminais, são conhecidas por desempenhar papéis importantes nos processos de desenvolvimento, na regulação de respostas a vários estresses e na estimulação hormonal nas plantas (GIRI et al., 2013; ZHOU et al., 2018).

Em estudo recente, He et al. (2019) identificou proteínas SAP em *Brassica napus* e as classificaram como reguladores essenciais na tolerância das plantas a vários estresses. Em Lai et al. (2020), resultados semelhantes foram encontrados para pepino (*Cucumis sativus* L.), onde ao realizar a análise de expressão gênica, os resultados da RT-qPCR indicaram que os genes SAP podem ter funções regulatórias vitais em resposta a uma variedade de estresses abióticos, e o pepino pode ter desenvolvido diversos mecanismos regulatórios ao sofrer de diferentes estímulos ambientais.

3.1.5. Genes USP

Os genes que codificam proteínas com domínio USP (Proteína Universal do Estresse), são conhecidos por estarem envolvidos em uma variedade de respostas ao estresse e qualquer

mutação nesses genes pode causar perda de eficácia no combate ao estresse (DRUMM et al., 2009).

Em Gou et al. (2020) um USP de *Medicago falcata* (Fabaceae), MfUSP1, foi caracterizado e os resultados mostraram que o transcrito MfUSP1 é regulado positivamente por tratamentos com baixa temperatura, estresse osmótico e salinidade, bem como ABA e H₂O₂. MfUSP1 foi responsivo a múltiplos estresses abióticos, sua superexpressão resultou em acúmulo reduzido de espécies reativas de oxigênio (ROS) e maior tolerância ao frio, estresse osmótico, salinidade e estresse oxidativo. Portanto, foi sugerido que MfUSP1 confere tolerância ao estresse abiótico múltipla, regulando a defesa antioxidante e o acúmulo de prolina sob condições de estresse.

3.1.6. Genes HSF

Fatores de transcrição de estresse térmico (HSFs), controlam a expressão de genes responsivos a vários estresses abióticos (calor, seca e salinidade), recentemente uma importante função na regulação do desenvolvimento também foi revelada (MITTAL et al., 2009; CHIDAMBARANATHAN et al., 2018).

As plantas HSFs têm características únicas: alta complexidade da família de genes e a existência de genes HSF induzidos por estresse por calor (HS), que podem ter um papel importante na modulação da transcrição durante a resposta HS de longo prazo (MORIMOTO, 1998; NOVER et al., 2001; BANIWAL et al., 2004).

Em estudo realizado por Xue et al. (2015), por meio da identificação de genes alvo HSFs em trigo (*Triticum aestivum* L.), foi mostrado que esse gene é um dos reguladores da adaptação do trigo ao estresse térmico.

3.1.7. Genes ASR

As proteínas ABA de amadurecimento por estresse (ASR) são expressos em vários órgãos durante o amadurecimento da fruta em resposta ao ABA e ao estresse abiótico, como osmose, alta salinidade e desidratação (GOLAN et al., 2014; YOON et al., 2019).

Em estudo realizado por Zan et al. (2020), foram avaliados os padrões de resposta ao estresse abiótico de membros da família ASR em trigo, os resultados obtidos indicaram que os genes ASR são proteínas multifuncionais do estresse, envolvidas com a resistência das plantas ao estresse e podem ajudar a manter as atividades metabólicas normais de plantas superiores sob condições extremas.

3.2. Descrição dos iniciadores desenvolvidos

Os 130 pares de primers desenhados apresentam uma porcentagem média de GC de 50,91% (Tabela 8; Figura 4). As porcentagens médias de GC do primers diretos e reversos foram de 51,42 e 50,40%, respectivamente (Figura 4). Esse resultado é próximo ao encontrado por Simões et al. (2017), que relataram 53,20% para 56 pares de primers TRAP para mamona, e Machado e Silva (2013), que encontraram um percentual médio de GC de 47,29% para 30 pares de primers SSR também para mamona.

Tabela 8: Caracterização dos pares de primers diretos (F) e reversos (R) desenvolvidos para abacaxi a partir de sequências ESTs

Primer	Sequência (5' → 3')	GC (%)	Tm (°C)	Tamanho (pb)	Avaliação (%)
AC01	F: TCCGCCTCCTCTCATTCT	52.63	56.91	19	100
	R: GTCGATCCTCTCCTGCTTGT	55.00	56.36	20	87
AC02	F: GGCGAGAACCAAAGAAGAGA	50.00	56.98	20	100
	R: GCACGACCATTGACGATCTA	50.00	56.51	20	89
AC03	F: TGGGAAGAGTGGCAGAGAGT	55.00	56.77	20	100
	R: TGGGAAGAGTGGCAGAGAGT	45.00	58.14	20	100
AC04	F: CCGACGGAACGGATTTACTA	50.00	57.92	20	96
	R: GCCCGACACTTTCTCAACAT	50.00	57.31	20	100
AC05	F: ACATCGCCCCTGAATACTTG	50.00	57.49	20	100
	R: AAGCGACTCGACTTCGACAT	50.00	57.23	20	77
AC06	F: AAGGAGACGATGACGGAGAA	50.00	56.88	20	100
	R: TAAAAACCTCCCCAGCCTCT	50.00	58.19	20	100
AC07	F: GTCTTCGTGGGTTTTTGCAT	45.00	57.54	20	85
	R: AGGATAGTCCCCTCGCAGAT	55.00	57.69	20	99
AC08	F: AGGGGAGATTCCAAAGTCGT	50.00	57.60	20	100
	R: GCTCTGAAGGGTGAAAGTCG	55.00	57.21	20	100
AC09	F: GCCTTTTGAGCACATTCCAT	45.00	57.58	20	100
	R: CCGCATTGATCTGCAAGTA	45.00	57.19	20	85
AC10	F: CAGCAGAGGAAGGAGCAAAC	55.00	57.40	20	100
	R: CAAAATCTCAGCGGCAAAT	40.00	58.18	20	100
AC11	F: GGCAAGGAGGAAGAAGAAAGA	47.6	58.02	21	100
	R: TGAAGCCCTTCTTCTCATGG	50.00	57.57	20	83
AC12	F: GGGACGCAGAGAAGATAACG	55.00	57.36	20	100
	R: ACGTCGCCAATTGAGAGTTT	45.00	57.27	20	83
AC13	F: GTCAGCAAGGCAAAGAGGAG	55.00	57.40	20	100
	R: GGATCAGTTCATGGCTTGGT	50.00	56.97	20	90
AC14	F: CCACCTCCTCAAATCCTACG	55.00	57.02	20	100
	R: GGAGTAGGAGGGGAGTTTGG	60.00	57.64	20	100
AC15	F: GTGCGGAACCCTAACAAGAA	50.00	57.76	20	100
	R: ATCTAACAGCGCCATTACCG	50.00	58.10	20	92
AC16	F: ATCCACTCCCTTCTCCACCT	55.00	57.19	20	100
	R: CCTGTTTCAGTGAATCGAGCA	50.00	56.59	20	86
AC17	F: CCTCCTCCTCTCTCCTGCTT	60.00	57.47	20	100
	R: TTGGGCACTTGGACAATGTA	45.00	56.99	20	92
AC18	F: CAAGGAGAACAGGGGAAGCAG	55.00	57.25	20	100
	R: GTCGTTGCTATCGTTGCTGA	50.00	57.05	20	100
AC19	F: TGCACCACACTCTCCATCAT	50.00	56.20	20	87
	R: GGCTCCACCTTTGTTGTTGT	50.00	57.27	20	100

AC20	F: GCACTCTCCCAGTCGTCTTC R: ACGGAGTACTTCGGGAGCTT	60.00	56.73	20	100
AC21	F: GTCGCTTTTACGCTTCTTGC R: CATCTTCGCATTTCGGGTTAT	50.00	58.20	20	100
AC22	F: CGGTCTTTTCCCCTTCTAC R: GTCGACGTAGAGGTGGTGGT	55.00	58.02	20	100
AC23	F: TCCGGTTCAAGGTAGGAGTG R: TCCAACCTCGTCAAACAACA	55.00	57.39	20	80
AC24	F: ATCGCACCATCTCAAAACCT R: TGAGGAGGTGTATGGGGGTA	45.00	56.94	20	100
AC25	F: ACCTTCTCATGCCATTTTGC R: GGCTTCTTCGGTCTTGTGTCAG	45.00	57.58	20	90
AC26	F: AGCTCTGCAAATCGGTGAGT R: CGCTTTGTGTTTCGGTTTCT	55.00	57.21	20	100
AC27	F: GCCATAGTCGTGGACCCTTA R: CAAGATCTCGCCAACCTCTC	50.00	57.23	20	86
AC28	F: GATTGCGCTACATTGTCGT R: TCCCCCTGGTGCTACTATTG	45.00	58.07	20	100
AC29	F: TCAGAGACGATGACGACGAC R: GTTCCGAGCGTTGTTTCTTC	55.00	57.49	20	98
AC30	F: GTCCAACACCCTCTGTCCAT R: AGATCATGACCTTCGGATCG	55.00	57.07	20	85
AC31	F: ATCTGCTTGCGTGTGAGTG R: TTGAGGAGGTGGTCGATAGC	50.00	57.63	20	100
AC32	F: TCAATCTCACAAGCCAGTGC R: TTGGCAAACCTCCACCTATC	50.00	57.53	20	100
AC33	F: GGGAATTCAGGGTTACAGCA R: AGCGAGAGTTGGCAAGGTAA	50.00	57.44	20	100
AC34	F: TGTCGTTCGTGTCAGGTATC R: GGAGAAGCATCAACGGATGT	50.00	56.19	20	87
AC35	F: GACCCTGGTATTGCGAAGAA R: TGGAGCATTGTTACCACAT	50.00	57.17	20	100
AC36	F: GTCGCCGATTTTCGTAGTTTC R: CCCATTTTCGACGATTCTCAT	45.00	57.62	20	87
AC37	F: GGAGGAGAAGGATGTGGTGA R: TCCTTGATGCATGTTTTCCA	50.00	57.54	20	100
AC38	F: GAAGTCGGTGTGAGGAAAGG R: AGTGA CTGCTCACGCTTCT	40.00	57.30	20	87
AC39	F: GTCGCCGATTTTCGTAGTTTC R: CCCATTTTCGACGATTCTCAT	55.00	56.70	20	100
AC40	F: CCCGAAGAAGCACTTTTGAG R: TCTCTCGGCCCTTCTGATTA	55.00	56.98	20	82
AC41	F: GCGGATTCTGTGGATGCTAT R: CGTCATCCGAGCACTGAGTA	55.00	56.68	20	100
AC42	F: AGGGGCCGATCTCTCTGTAT R: CTGCCACTCCCATTTACGAT	55.00	57.13	20	90
AC43	F: TTCTCCCACCATCTCAAAG R: ATCGAACACGCCAAATAAGG	50.00	57.54	20	100
AC44	F: TCATTTTTGTGGTCGTTGGA R: AAACCATCTTTGCCATCTGC	45.00	57.30	20	87
AC45	F: TTTGGAGAACGAGGACTTGG R: CTCCCACCAGCAAGGATAAA	40.00	57.66	20	100
AC46	F: ACAACAATTCCCCAACA R: ATGAATCGGTTCGGTGTAAGC	40.00	57.39	20	83
AC47	F: GGGATTCCTAAGGGACCAAA R: AGCTCCTGCATGAGGACAGT	50.00	57.50	20	100
AC48	F: AATCACCATTCCCCTTCC R: CCTCCTGCTCGATCTTATGC	55.00	56.64	20	91
AC49	F: AAGGAGGAGAAGCACCACAA R: TCTTTTCATGGTGCTCATGG	55.00	57.69	20	83
		50.00	57.49	20	100
		45.00	57.88	20	87
		40.00	56.93	20	100
		45.00	57.58	20	100
		50.00	57.52	20	100
		50.00	57.66	20	99
		40.00	57.66	20	90
		50.00	57.45	20	100
		50.00	58.14	20	99
		55.00	56.78	20	84
		50.00	57.86	20	100
		55.00	57.40	20	87
		50.00	57.02	20	100
		45.00	56.50	20	85

AC50	F: TAGCGGAGGAGACGATTGAT R: CGCCATTCCAGAATTGATTT	50.00 40.00	57.21 57.70	20 20	100 85
AC51	F: ATCCACCAAATCATCCCAA R: GAGTACGCGGTCTCCTGAAC	40.00 60.00	57.38 57.04	20 20	100 81
AC52	F: GAAGCAGGAGCACATCACAA R: TGCAGACAACCTCTTGATGC	50.00 50.00	56.54 56.54	20 20	100 86
AC53	F: GAATGAACAATCGAGCAGCA R: AGCCTTAGCGAGGAACAACA	45.00 50.00	56.85 57.67	20 20	87 99
AC54	F: ACAAGAAGATCGGGTTGCTG R: CGAAGCATAATCGCATAGCA	50.00 45.00	57.54 57.69	20 20	90 98
AC55	F: GCCCTTATGGAGCAATGTGT R: AGTTCCTCCATGGTCCCTCT	50.00 55.00	57.45 57.19	20 20	100 79
AC56	F: GAAATGGGGGAAATCCTTGT R: TGGCGATGTTGCTATATGGA	45.00 45.00	57.94 57.37	20 20	100 91
AC57	F: CCGCATATCGGAAGTCTGTT R: CTCAAAAGAGGCGAAGGTG	50.00 50.00	57.67 57.66	20 20	89 100
AC58	F: TTGTCTGGGTTGTCCTCCTC R: CGCATGACCGCTATGAATTA	55.00 45.00	56.86 57.33	20 20	100 88
AC59	F: CTCGTGATCGAGCTTTTTCC R: GCCGCCCATAGAAGATTACA	50.00 50.00	57.49 57.93	20 20	84 100
AC60	F: CCCTGCTCTTCCTTTGACAG R: GCGTCTCTTCTTTCCGATTG	55.00 50.00	57.25 57.49	20 20	91 100
AC61	F: CTCTTCCCTCTCCGATCTC R: CCCCCGCTACCGTTATTACT	60.00 55.00	57.60 58.75	20 20	89 100
AC62	F: CCCGATTTCCAGAGTTACA R: TCCTCCGAGTCGCCTAGTAA	50.00 55.00	57.48 57.58	20 20	100 90
AC63	F: AAAATGTGGAGATGCGGAAG R: GAAACAACCTGCTGTGCGTGT	45.00 50.00	57.62 56.67	20 20	100 92
AC64	F: GCTCAACACCTACGGCTTTC R: GAAATGGAGAGGGGAGGAAG	55.00 55.00	57.46 57.63	20 20	100 100
AC65	F: GATTACCGACCGACCGACTA R: GATTTTCCTTGTGGGGGATT	55.00 45.00	57.49 57.94	20 20	100 87
AC66	F: GCTGGACCAAAGAAACAAGC R: AGTAGCAGCACCTCTTGGA	50.00 55.00	57.41 57.27	20 20	89 100
AC67	F: CCCTCCTCCCAGATACTTC R: CGCTTGATGTTCTTCAGCAG	60.00 50.00	57.50 56.76	20 20	100 87
AC68	F: ACCTATGGCTTTCGGAAGGT R: AACAAGCCGACGAAGAAGAA	50.00 45.00	58.03 57.63	20 20	84 100
AC69	F: TGTGGTGTGGAGTTTTTGGA R: TCGGTTCCCTCCATCTTCATC	45.00 50.00	56.63 57.01	20 20	100 100
AC70	F: GCTGTGGGATATGGTGCTCT R: CGAACGAACCCATCATCTCT	55.00 50.00	57.22 57.21	20 20	92 100
AC71	F: AAGGAGGAGAAGCACCACAA R: TCTTTTCATGGTGCTCATGG	50.00 45.00	57.02 56.50	20 20	100 85
AC72	F: CTTCTCCCTTTCCACCACA R: GCTCCGGATCTTTCTTCTCC	50.00 55.00	57.34 57.96	20 20	100 74
AC73	F: CTTTCCCAACCTTCTCTCC R: TCAAACCCTCGACCTCAATC	55.00 50.00	57.77 57.15	20 20	100 87
AC74	F: CTTCCTCCCCTCTCCATTTC R: AAAGCCGACGCAATCGTAT	55.00 47.40	57.63 58.30	20 19	100 86
AC75	F: TGGTTTTGGAGAACGAGGAC R: CTCCCACCAGCAAGGATAAA	50.00 50.00	57.30 57.66	20 20	100 99
AC76	F: TAGCGGAGGAGACGATTGAT R: CGCCATTCCAGAATTGATTT	50.00 40.00	57.21 57.70	20 20	100 85
AC77	F: CCCTTTGGAGTTGAATGGAA R: ACACACCGAACACACAGCAT	45.00 50.00	57.43 56.33	20 20	100 100
AC78	F: TAGGGAGGCTGATGGACAAC R: CCTGAGGACGCAGTTTCTTC	55.00 55.00	57.21 57.21	20 20	100 100
AC79	F: GCGGGTATGGCTCAGTGTAT R: AGGAGACTCTCTGGCCCTTC	55.00 60.00	57.50 57.24	20 20	100 82

AC80	F: TGCTGGTTCCTTGAAGTCGTG	50.00	56.74	20	100
	R: TATGTCCTCCTTTGCGCTCT	50.00	57.54	20	80
AC81	F: GAGTTCAACTGCCCTTCTG	55.00	57.02	20	91
	R: CTCTCAAGTCCTTCCGCAAC	55.00	57.21	20	100
AC82	F: AATACGGGTAATGGCAGCAG	50.00	57.93	20	100
	R: CAATAGAGATTCCGCGCTTC	50.00	57.80	20	80
AC83	F: CCCTTTGGAGTTGAATGGAA	45.00	57.43	20	100
	R: CACAGCATCTTCCAACAGGA	50.00	56.38	20	88
AC84	F: CTATGGAGCCTTCCCTTTC	55.00	58.06	20	99
	R: GCTTGAGGTTGACTGGAAG	55.00	57.21	20	87
AC85	F: CCTCCGCCTATCATTGTTGT	50.00	57.49	20	100
	R: ATACATTTTCGTGCGCCTTC	45.00	58.02	20	82
AC86	F: AAGGCGAAGACGAACAGAAA	45.00	57.63	20	100
	R: CCTTGTAACAGGCCCAAAA	45.00	58.00	20	82
AC87	F: CATGGCTCAACTGCAGAAAA	45.00	57.04	20	81
	R: TCACACTCTTTTGCCACTCG	50.00	56.74	20	100
AC88	F: TTTGTGTGCTTCTCCTGTGCG	50.00	56.74	20	100
	R: CCTTCGCCAAGCTTATTGAC	50.00	57.75	20	80
AC89	F: CATTCTCGAGCACAAGACCA	50.00	56.59	20	81
	R: CCGTGTAGTTGCCATTGTTG	50.00	57.19	20	100
AC90	F: AATACGGGTAATGGCAGCAG	50.00	57.93	20	100
	R: CAATAGAGATTCCGCGCTTC	50.00	57.80	20	80
AC91	F: AACCGATGTTTTTGCTTTG	40.00	57.96	20	100
	R: TCGGATGCAGTAAGATGCAG	50.00	56.95	20	80
AC92	F: ACCAGGGTCGCACTCTACAC	60.00	57.08	20	100
	R: TCGCTTGACAAATCAACAGC	45.00	57.00	20	88
AC93	F: CCGACTGCTTCAAGATGGAT	50.00	57.40	20	100
	R: CCGAAGAGACGCGAATTAAG	50.00	57.96	20	81
AC94	F: GGCTCCTCTCTCACCTTCCT	60.00	57.24	20	100
	R: GAGGATCGAGTCCACGTAGC	60.00	56.89	20	86
AC95	F: GAAGGAGACACCCGGTGATA	55.00	57.01	20	82
	R: GTCTTTGGCGGTCTCTTCAG	55.00	57.21	20	100
AC96	F: AATGGGGTCTGTCTGTTTG	50.00	56.97	20	100
	R: GCAGATTGCCGTCTCTTAGG	55.00	57.54	20	100
AC97	F: GGTTTCGAGTCAACACCGTTT	50.00	57.27	20	87
	R: CTTTGTTCCTTCGGCAGAG	50.00	57.66	20	100
AC98	F: CTCTGCCGAAGGAAACAAAG	50.00	57.66	20	100
	R: TGGTCCAAATCCACCTTCTC	50.00	56.96	20	98
AC99	F: CTTCTACCCGAAACGATGGA	50.00	57.66	20	100
	R: CTCTGAGGGAGCTGAGGATG	60.00	56.86	20	88
AC100	F: TCCGACCAGAACTTCACCTC	55.00	57.06	20	100
	R: GCGAACATTTTGACGGAGTT	45.00	57.72	20	92
AC101	F: TTACCTCCGCCTTCAACAAC	50.00	57.76	20	100
	R: CGCATTGAGCTAACCCGTAT	50.00	58.10	20	88
AC102	F: CTTGCTCCCTCCTGTGTCTC	60.00	56.77	20	100
	R: CTTTGTAACAGGCCCAAAA	45.00	58.00	20	82
AC103	F: CAACAGCACCTACGAGTCCA	55.00	56.60	20	100
	R: GCAGTCGTGTAACAGATGA	55.00	56.40	20	93
AC104	F: ACGGTCGAGAAAGCTTGAAA	45.00	57.63	20	81
	R: ACATCTCCAAAACCCCTTC	50.00	57.86	20	100
AC105	F: ATGGCTCTGTCTCTTCCA	50.00	56.88	20	88
	R: GGAAGTCCGTGAACTGGGTA	55.00	57.16	20	100
AC106	F: TTGCTTGAAGAACGCTACGA	45.00	57.20	20	100
	R: CCGTGTCCATCAACTTTCCT	50.00	57.16	20	100
AC107	F: GGTTGCTATGGGTGCTTGAT	50.00	57.45	20	100
	R: TTGACTGCTGCCATTACCAG	50.00	56.90	20	91
AC108	F: TCCTCATTCTCCTCCACACC	55.00	56.70	20	100
	R: GTAGACTTGGTCGGCACCAT	55.00	57.17	20	82
AC109	F: GCTATCCAAGAAGCGAGGTG	55.00	57.54	20	99
	R: CATTCCAATGCAAAAATGCTG	40.00	57.46	20	82

AC110	F: CCTCAGATCTGCCCTGCTAC	60.00	57.12	20	78
	R: CCTGTTGAATCGGTTGGAGT	50.00	57.16	20	100
AC111	F: AAGCCAACATCAACCTCGTC	50.00	57.31	20	100
	R: CGTAGCGCATGAAGCAGTAG	55.00	57.30	20	82
AC112	F: CCCAATCATGACATGCACTC	50.00	56.32	20	84
	R: GTGCTTTTGCTTTTCGCTTTT	40.00	57.92	20	100
AC113	F: CTGCAACTACGTGGAGGTGA	55.00	56.60	20	87
	R: CAGAGACAGGGAAGCGAGAC	60.00	56.97	20	100
AC114	F: GAACTACACGGCAAACAGCA	50.00	57.01	20	100
	R: GTGTTGCAGTCGACAGAGGA	55.00	56.21	20	82
AC115	F: CCAATGTGTTTCGACGAAATG	45.00	56.99	20	85
	R: GTTGAACCACTTGGGCATCT	50.00	57.12	20	100
AC116	F: CGAGTTCCAGCAAGAGGTTC	55.00	57.21	20	100
	R: CGTATGGCTTGTTTGTGTGG	50.00	57.19	20	100
AC117	F: AGGGAGCAGGAGGAGAAGAC	60.00	57.24	20	100
	R: CTTGACCTCAGGCTTCTTGG	55.00	57.25	20	100
AC118	F: CCCAATCTCGTCCTCGAATA	50.00	57.52	20	83
	R: GGAAGTGTTTGCTGTGACGA	50.00	56.50	20	100
AC119	F: TAAAGAGAACGGCGATGAGG	50.00	58.02	20	100
	R: TTCAGCTCCTCCCTCTTCAA	50.00	57.25	20	88
AC120	F: AAGGCCACAAAGGACATACG	50.00	57.63	20	83
	R: TGCTTGCCCCTCTTTCTTTA	45.00	57.92	20	100
AC121	F: AGATGAAGAACGGGTTGCTG	50.00	57.54	20	100
	R: AAACCAAACAGACCCTGCAC	50.00	57.27	20	85
AC122	F: GTGAAGGTGGAAGTGGAGGA	55.00	56.86	20	100
	R: CTTGACCTCAGGCTTCTTG	55.00	57.25	20	99
AC123	F: GAGAAAGCCCGTTCTGATT	50.00	58.39	20	81
	R: ACCAGAGCAGAGCATCACCT	55.00	56.78	20	100
AC124	F: CAGCAGCAGCAGTAGGAGTG	60.00	56.71	20	100
	R: CTCCTCCATCTCCTGAACCA	55.00	56.95	20	100
AC125	F: AAATCTTTCCTTCCCGCTGT	45.00	58.16	20	100
	R: AGCGACGGTACATTCCAAAC	50.00	57.59	20	93
AC126	F: CAAGCGAAGGCGAGAACTAC	55.00	57.85	20	100
	R: GCAATTCCAAGAATCCTCCA	45.00	57.43	20	90
AC127	F: AGGAGGATGGGGAAGTTCAT	50.00	57.28	20	91
	R: TACTCTCGCAACACCACCTC	55.00	56.35	20	100
AC128	F: GAGGAGGGAGAAGGAGGAGA	60.00	57.08	20	100
	R: GACCTTGACCTCGATGCTCT	55.00	56.36	20	87
AC129	F: CAGGTCAAGTCCGTCCAGAT	55.00	56.91	20	100
	R: CGAACCGACCCTAACGAGTA	55.00	57.84	20	100
AC130	F: GCCCGAGAGTAGTGAGCATC	60.00	57.08	20	100
	R: AACAAACAAGGCACCAAAGC	45.00	57.85	20	100

Nos primers desenhados, a T_m média foi de 57,31°C. Sendo a média da T_m dos primers diretos 57,30°C e dos primers reversos 57,32% (Figura 4). Quanto ao tamanho dos primers, maioria possui 20 nucleotídeos, exceto os primers diretos AC01, AC11, que apresentaram tamanhos de 19 e 21 nucleotídeos, respectivamente, e o primer reverso AC74, que apresentou um tamanho de 19 nucleotídeos (Tabela 8). A avaliação média dos 130 pares de primers foi de 94,24%, com avaliações médias de primers diretos e reversos de 96,35 e 92,12%, respectivamente (Figura 4).

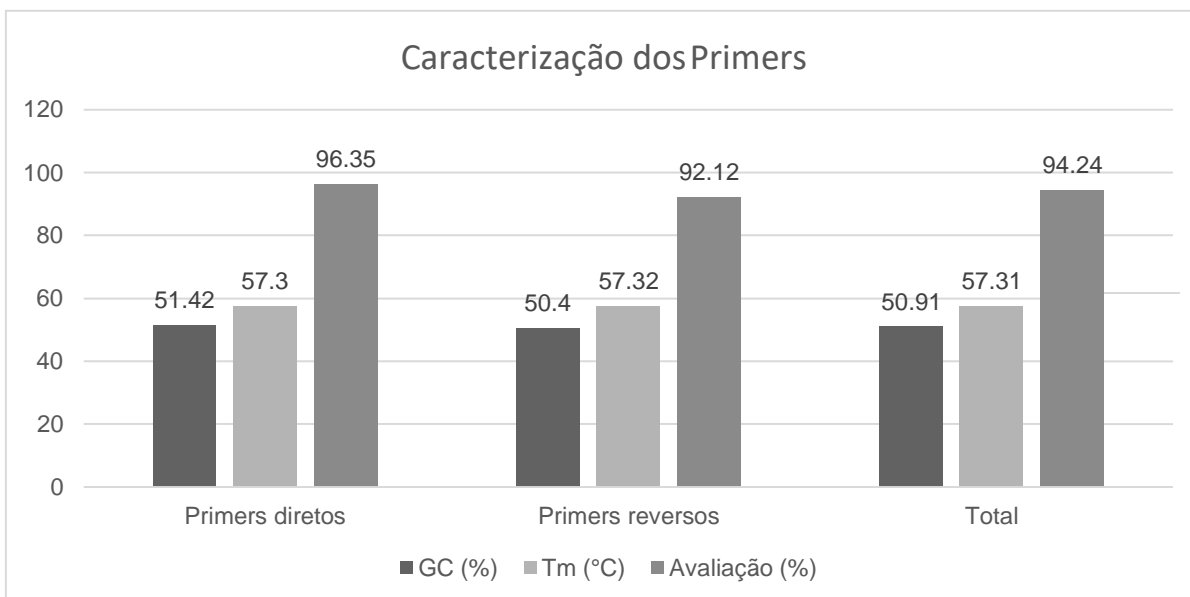


Figura 4: Médias das porcentagens de GC (%), das temperaturas de melting (°C) e das avaliações dos pares de primers desenhados

4. CONCLUSÃO

Dos 255 pares de primers RT-qPCR desenhados, 130 foram indicados como os mais promissores. Podendo ser utilizados em futuros estudos de expressão gênica em abacaxi e em estudos de transferibilidade para *A.nahoumii*.

5. REFERÊNCIAS

AMORIM, W.A. **Desenvolvimento de um método para o diagnóstico do complexo do Pineapple mealybug wilt-associated virus**. 2016. 104 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências da Saúde, Espírito Santo, 2016.

ARTUR, M.A.S. et al. Dissecting the genomic diversification of late embryogenesis abundant (LEA) protein gene families in plants. **Genome biology and evolution**, [S.l.], v. 11, n. 2, p. 459-471, fev. 2019.

BANIWAL, S.K. et al. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. **Journal of biosciences**, Dordrecht, v. 29, n. 4, p. 471-487, dez. 2004.

BAO, Y. et al. Overexpression of the NDR1/HIN1-like gene NHL6 modifies seed germination in response to abscisic acid and abiotic stresses in *Arabidopsis*. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 2, p.1-16, fev. 2016.

CEITA, G.O. et al. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 158, p. 189-193, set. 2008.

CENTURY, K.S. et al. NDR1, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. **Science**, Washington, v. 278, n. 5345, p. 1963-1965, dez. 1997.

CHENG, D. et al. TRAP markers generated with resistant gene analog sequences and their application to genetic diversity analysis of radish germplasm. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 161, p. 153-159, set. 2013.

CHIDAMBARANATHAN, P. et al. Genome-wide analysis identifies chickpea (*Cicer arietinum*) heat stress transcription factors (Hsfs) responsive to heat stress at the pod development stage. **Journal of plant research**, Tokyo, v. 131, n. 3, p. 525-542, mai. 2018.

CORREIA, C.N., KIDO, E.A. **Identificação de genes de cana-de-açúcar envolvidos com a tolerância ao estresse salino**. In: XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA e II CONGRESSO DE INICIAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E INOVAÇÃO, 2010, Recife, PE. Anais... Recife: UFPE/CTG, 2010. p. 1-4.

DELAHAIE, J. et al. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 64, n. 14, p. 4559-4573, nov. 2013.

DRUMM, J.E. et al. *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein Rv2623 regulates bacillary growth by ATP-Binding: requirement for establishing chronic persistent infection. **PLoS Pathogens**, The USA, v. 5, n. 5, p. e1000460, mai. 2009.

DUVAL, M.F. et al. Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers. **Theoretical and applied genetics**, Heidelberg, v. 102, n. 1, p. 83-90, jan. 2001.

FENG, S. et al. Development of pineapple microsatellite markers and germplasm genetic diversity analysis. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, p. 1-11, ago. 2013.

FINOTELLO F.; DI CAMILLO, B. Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis. **Briefings in functional genomics**, [S.l.], v. 14, n. 2, p. 130-142, mar. 2015.

GARCÊS, S.P.S.; LIMA, A.O.S. Desenho e Validação in silico de Primers Intragenéricos. In: II WORKSHOP DE TECNOLOGIA DA INFORMAÇÃO APLICADA AO MEIO AMBIENTE–CBComp. Itajaí, SC, 2004. p. 714-717. Disponível em: <http://www.niee.ufrgs.br/eventos/CBCOMP/2004/pdf/Workshop_Ambiente/Bioinformatica_Sequenciamento_DNA/t170100288_3.pdf>. Acesso em: 23/03/2021.

GIRI, J. et al. SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants. **Bioessays**, Hoboken, v. 35, n. 7, p. 639-648, mai. 2013.

GOLAN, I. et al. Tomato abscisic acid stress ripening (ASR) gene family revisited. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. 1-8, out. 2014.

GOU, L. et al. A Universal Stress Protein from *Medicago falcata* (MfUSP1) confers multiple stress tolerance by regulating antioxidant defense and proline accumulation. **Environmental and Experimental Botany**, [S.l.], v. 178, p. 104168, out. 2020.

- HE, X. et al. Genome-wide identification of stress-associated proteins (SAP) with A20/AN1 zinc finger domains associated with abiotic stresses responses in *Brassica napus*. **Environmental and Experimental Botany**, [S.l.], v. 165, p. 108-119, set. 2019.
- HUANG, H.; MOLLER, I.M.; SONG, S.Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. **Journal of Proteomics**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 1247-1262, fev. 2012.
- HUNDERTMARK, M. et al. The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 21, n. 3, pág. 165, 2011.
- IBRAHIME, M. et al. Genome-wide identification of the LEA protein gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 15, n. 4, p. 55, jun. 2019.
- LAI, W. et al. Identification and Expression Analysis of Stress-Associated Proteins (SAPs) Containing A20/AN1 Zinc Finger in Cucumber. **Plants**, [S.l.], v. 9, n. 3, pág. 400, mar. 2020.
- LIU, C. et al. Genome-wide analysis of NDR1/HIN1-like genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) and functional characterization of CaNHL4 under biotic and abiotic stresses. **Horticulture Research**, [S.l.], v. 7, n. 1, pág. 1-15, jun. 2020.
- MA, J. et al. Characterization and expression analysis of AcSERK2, a somatic embryogenesis and stress resistance related gene in pineapple. **Gene**, Oxford, v. 500, p. 115-123, mai. 2012.
- MA, J. et al. Characterization of the third SERK gene in pineapple (*Ananas comosus*) and analysis of its expression and autophosphorylation activity in vitro. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 3, p. 530-539, set. 2014.
- MA, J. et al. Cloning and selection of reference genes for gene expression studies in *Ananas comosus*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 29, p. 7424-7433, abr. 2012.
- MACHADO, E.L.; SILVA, S.A. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 11, p. 1457-1463, nov. 2013.
- MANHÃES, V.C. et al. **Estudos em *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica de inselbergues da Floresta Atlântica**. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, 2016.
- MING, R. Et al. The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. **Nature Genetics**, [S.l.], v. 47, n. 12, p.1435–1442, 2015.
- MIRANDA, F.D. et al. Transferability and characterization of microsatellite markers in five Bromeliaceae species belonging to the subfamilies *Pitcairnioideae* and *Bromelioideae*. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 12, n. 3, p. 319-323, set. 2012.
- MITTAL, D. et al. Heat shock factor gene family in rice: genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative

stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 47, n. 9, p. 785-795, mai. 2009.

MONTEIRO, A.C.A. et al. Desenho e teste de primers para RT-PCR de genes que codificam enzimas antioxidantes do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 9., 2015, Curitiba, PR. **Resumos expandidos**. Curitiba: SBICafé, 2015. p. 252. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/4137>>. Acesso em: 15/04/2021.

MORIMOTO, R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes & development**, [S.l.], v. 12, n. 24, p. 3788-3796, dez.1998.

NASCIMENTO, A.T.B. **Identificação e validação da expressão de transcritos das vias de transdução de sinais por fitormônios em cana-de-açúcar sob déficit hídrico**. 2017. 111f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco/Centro de Biociências. Genética, Recife, 2017.

NASHIMA, K. et al. SSR markers developed using next-generation sequencing technology in pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. **Breeding Science**, [S.l.], v. 70, n. 3, p. 415-421, mai. 2020.

National Center for Biotechnology Information – **NCBI**: Gene. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=ananas+comosus>>. Acesso em: 13/07/2021.

NICOT, N. et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 56, n. 421, p. 2907-2914, nov. 2005.

NOVER, L. et al. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? **Cell Stress & Chaperones**, [S.l.] v. 6, n. 3, p. 177, jul. 2001.

PERON, F.N. **Análise transcriptômica da interação do abacaxizeiro com o *Pineapple mealybug wilt-associated virus***. 2018. 118 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências da Saúde, Espírito Santo, 2018.

PIERCE, B.A. Análise da Genética Molecular e Biotecnologia. In: _____(Org.). **Genética: um enfoque conceitual**. 2016. Tradução de Beatriz Araújo do Rosário. 5. ed. - [Reimp.] - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p.480-520. Título original: Genetics: a conceptual approach.

PREMIER BIOSOFT. **NetPrimer**. Disponível em: <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>>. Acesso em: 20/03/2021.

RODRÍGUEZ, A. et al. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. In: BASU, C. (ed.). **PCR Primer Design: Methods in Molecular Biology**, v. 1275. New York: Humana Press, 2015. p. 31-56.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist

- programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (eds) **Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology**. Humana Press: Totowa, NJ, 2000. p. 365-386.
- SANTOS, M.O. et al. Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, [S.l.], v. 168, n. 3, p. 723-729, mar. 2005.
- SANTOS, M.O. et al. Suppression of SERK gene expression affects fungus tolerance and somatic embryogenesis in transgenic lettuce. **Plant Biology**, Oxford v. 11, n. 1, p. 83-89, jan. 2009.
- SIMÕES, K.S. et al. Development of TRAP primers for *Ricinus communis* L. **Genetics and Molecular Research**, [S.l.], v. 16, n. 2, p. 100-113, abr. 2017.
- SOARES, T.S. **Transferibilidade de primers microssatélites entre espécies vegetais**. 2019. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2019.
- TAKAHASHI, Y. et al. Identification of tobacco HIN1 and two closely related genes as spermine-responsive genes and their differential expression during the *Tobacco mosaic virus*-induced hypersensitive response and during leaf-and flower-senescence. **Plant molecular biology**, [S.l.], v. 54, n. 4, p. 613-622, mar. 2004.
- WÖHRMANN, T.; WEISING, K. In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. **Theoretical and Applied Genetics**, Kassel, v. 123, n. 4, p. 635-647, mai. 2011.
- XUE, G.P.; DRENTH, J.; MCINTYRE, C.L. TaHsfA6f is a transcriptional activator that regulates a suite of heat stress protection genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) including previously unknown Hsf targets. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 3, p. 1025-1039, fev. 2015.
- YOON, J.S. et al. Over-expression of the *Brachypodium* ASR gene, BdASR4, enhances drought tolerance in *Brachypodium distachyon*. **Plant cell reports**, [S.l.], v. 38, n. 9, p. 1109-1125, mai. 2019.
- ZAN, T. et al. Genome-wide identification and abiotic stress response patterns of abscisic acid stress ripening protein family members in *Triticum aestivum* L. **Genomics**, [S.l.], v. 112, n. 5, p. 3794-3802, set. 2020.
- ZHOU, L. et al. Developing single nucleotide polymorphism markers for the identification of pineapple (*Ananas comosus*) germplasm. **Horticulture research**, London, v. 2, p. 1-12, nov. 2015.
- ZHOU, Y. et al. Genome-wide identification and characterization of stress-associated protein (SAP) gene family encoding A20/AN1 zinc-finger proteins in *Medicago truncatula*. **Archives of Biological Sciences**, Beograd, v. 70, n. 1, p. 087-098, mar. 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dos 10 primers ISSR testados, 4 apresentaram um bom padrão de amplificação podendo ser utilizados para futura genotipagem e estudos de variabilidade genética de *Alcantarea nahoumii*.

Com as sequências obtidas a partir de sequências ESTs de abacaxi envolvidas nos processos de embriogênese e relacionadas ao estresse abiótico, armazenadas no banco de dados do NCBI, foi possível desenvolver 43 primers TRAP fixos e 130 pares de primers RT-qPCR. A obtenção de primers é de suma importância para as pesquisas moleculares. Através de técnicas simples, fazendo uso de programas de bioinformática, torna-se possível adquirir resultados satisfatórios no que tange à amplificação das sequências de DNA desejadas. Sendo os marcadores desenvolvidos pós-genômicos, e sabendo que a espécie *Alcantarea nahoumii* ainda não possui seu genoma sequenciado, os primers desenhados para abacaxi possuem potencial tanto para estudos de expressão gênica na espécie, quanto para serem usados em experimentos visando a transferibilidade para *A. nahoumii*.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant cell reports**, Springer, v. 27, n. 4, p. 617-631, fev. 2008.
- ALI, F. et al. Genetic diversity, population structure and marker-trait association for 100-seed weight in international safflower panel using silicoDArT marker information. **Plants**, [S.l.], v. 9, n. 5, p. 652, mai. 2020.
- ANSARI, A. et al. Genetic diversity clusters in germplasm of Cluster Bean (*Cyamopsis tetragonoloba* L., Taub), an important food and an industrial legume crop. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Tehran, v. 18, n. 5, p. 1407-1418, set. 2016.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae**: profile of an adaptive radiation. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- BERGOUGNOUX, V. The history of tomato: from domestication to biopharming. **Biotechnology advances**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 170-189, fev. 2014.
- BUYARAPU, R. et al. Development of new candidate gene and EST-based molecular markers for *Gossypium* species. **International journal of plant genomics**, New York, v. 2011, p.1-9, jan. 2011.
- CANÇADO, G. M. A.; SANTANA, G. C.; VAL, A. D. B.; FERREIRA, J. L. Marcadores

Moleculares de DNA e suas Aplicações na Caracterização, Identificação e Melhoramento Genético da Oliveira. In: Adelson Francisco de Oliveira. (Org.). **Oliveira no Brasil: Tecnologias de Produção**. 1. ed. Belo Horizonte: EGL Editores Gráficos Ltda., 2012, v.1, p.225-250.

CEITA, G.O. et al. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 158, p. 189-193, set. 2008.

COSTA, D. F. et al. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)(Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, p. 970-976, dez. 2015.

DE PAULA, L. F. A. et al. Sugar Loaf Land in south-eastern Brazil: a centre of diversity for mat-forming bromeliads on inselbergs. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 181, n. 3, p. 459-476, jul. 2016.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007, p. 102.

FLORA DO BRASIL 2020 – Algas, Fungos e Plantas. **Reflora**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=39&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C10%2C11%5D&lingua=&grupo=5&familia=null&genero=&especie=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=SOMENTE_OCORRE&endemismo=TODOS&origem=TODOS®iao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=MATA_ATLANTICA&bacia=QUALQUER&vegetacao=TODOS&mostrarAte=ESPECIES&opcoesBusca=TODOS_OS_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica>. Acesso em: 04/08/2021.

FORZZA, F.C. et al. Bromeliaceae. In: MARTINELLI, G. & MORAES, M.A. (Orgs.) **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. p. 326.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **SOS Mata Atlântica**. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/causas/mata-atlantica/>>. Acesso em: 04/08/2021.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D.; GOUDA, C. S. **Encyclopaedia of Bromeliads**, Version. 4. University Botanic Gardens, Utrecht University. Utrecht, Netherlands. 2020.

HERISON, C. et al. Genetic diversity analysis in 27 tomato accessions using morphological and molecular markers. **AGRIVITA, Journal of Agricultural Science**, Indonesia, v. 40, n. 1, p. 36-44, fev. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS – **IBF**. Disponível em: <<https://www.ibflorestas.org.br/>>. Acesso em: 04/08/2021.

KERSTEN, R. A. Epífitas vasculares: histórico, participação taxonômica e aspectos relevantes, com ênfase na Mata Atlântica. **Hoehnea**, [S.l.], v. 37, p. 09-38, mar. 2010.

LEAO, T. C. C. et al. Predicting extinction risk of Brazilian Atlantic Forest angiosperms. **Conservation Biology**, EUA, v. 28, n. 5, p. 1349-1359, mar. 2014.

MARTINELLI, G. et al. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, [S.l.], v. 59, p. 209-258, mar. 2008.

MATOS-OLIVEIRA, C. F. et al. Caracterização e seleção de marcadores ISSR para análise genético-populacional de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). **Multi-Science Journal**, [S.l.], v. 1, n. 9, p. 4-6, 2018.

MING, R. Et al. The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. **Nature Genetics**, [S.l.], v. 47, n. 12, p.1435–1442, 2015.

MORGANTE, C. V.; BLAWID, R. Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos. **Embrapa Semiárido-Documentos (INFOTECA-E)**, 2016. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1066218>>. Acesso em: 03/08/2021.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, United Kingdom, v. 403, n. 6772, p. 853-858, fev. 2000.

National Center for Biotechnology Information – **NCBI**: Gene. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=ananas+comosus>>. Acesso em: 13/07/2021.

RAMOS, G. J. P.; OLIVEIRA, I. B.; MOURA, C. W. N. Desmídias de ambiente fitotelmata bromelícola da Serra da Jiboia, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 1, p.103-113, mar. 2011.

ROCHA, F.S.; DUARTE, L. S; WAECHTER, J. L. Positive association between *Bromelia balansae* (Bromeliaceae) and tree seedlings on rocky outcrops of Atlantic forest. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 31, n. 2, p. 195-198, mar. 2015.

SCARANO, F. R. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rainforest. **Annals of Botany**, [S.l.], v. 90, n. 4, p. 517-524, out. 2002.

SILVA, T. S. S. et al. Caracterização e seleção de marcadores moleculares em *Croton linearifolius* Mull. Arg. como subsídio para estudos genéticos. **Multi-Science Journal**, [S.l.], v. 1, n. 10, p. 4-8, 2018.

SIMÃO, M. J. et al. Induction of in vitro shoots of *Billbergia euphemiae* E. Morren (Bromeliaceae) from leaf explants. **Acta Scientiarum. Biological Science**, Maringá, v. 38, n. 2, p.207-213, jun. 2016.

SOARES, T.S. **Transferibilidade de primers microssatélites entre espécies vegetais**. 2019. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2019.

TABIN, S. et al. Genetic diversity and population structure of *Rheum* species in Kashmir

Himalaya based on ISSR markers. **Flora**, [S.l.], v. 223, p. 121-128, ago. 2016.

VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. Flora da Bahia: Bromeliaceae-*Alcantarea*. **Sitentibus**, [S.l.], v. 10, p. 147-151, 2010.

ZHANG, J.J. et al. Two EST-derived marker systems for cultivar identification in tree peony. **Plant cell reports**, Heidelberg, v. 31, n. 2, p. 299-310, out. 2012.