



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



Daniel Rocha de Santana

**Extração e amplificação de DNA em *Alcantarea nahoumii* (Leme) J.R.Grant. e
desenho de primers SSR em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. var.
comosus) visando transferibilidade e estudos de diversidade genética**

Trabalho de Conclusão de Curso

Cruz das Almas - BA

2021

Daniel Rocha de Santana

**Extração e amplificação de DNA em *Alcantarea nahoumii* (Leme) J.R.Grant. e
desenho de primers SSR em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. var.
comosus) visando transferibilidade e estudos de diversidade genética**

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

Daniel Rocha de Santana

“Extração e amplificação de DNA em *Alcantarea nahoumii*
(Leme) J.R.Grant. e desenho de primers SSR em abacaxizeiro
(*Ananas comosus* (L.) Merr. var. *comosus*) visando
transferibilidade e estudos de diversidade genética”

BANCA EXAMINADORA

Edna Lôbo Machado

Profa. Dra. Edna Lôbo Machado
orientador(a)

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Manoela Caldas Santos

Mestranda Manoela Caldas Santos

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Bruna Leite Vieira do Nascimento

Mestranda Bruna Leite Vieira do Nascimento

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

CRUZ DAS ALMAS

Maio-2021

“Por isso não temas, estou contigo; não te assustes, porque sou o teu Deus; Eu te fortaleço, ajudo e sustento com a mão direita da minha justiça. ”

(Isaías 41:10)

A Deus, por ter me concedido esta oportunidade e ter me ajudado até aqui e aos meus pais, Valdilson e Edlene, por tudo que me ensinaram e fizeram por mim, dedico...

Agradecimentos

A Deus por toda ajuda e sustento durante toda a minha vida, e também por ter me conduzido e fortalecido até aqui.

Aos meus pais Valdilson e Edlene por todo apoio, incentivo e tempo dedicados a mim, os quais serviram de alicerce para as minhas realizações.

Aos meus irmãos Caíque e Yan pela amizade e companheirismo durante toda minha vida.

As minhas avós, Rene e Maria Luz, por todo amor, carinho, suporte e estímulo.

Aos meus familiares, tios e tias, primos e primas, por todo carinho e cuidado.

A todos os meus amigos e amigas que compartilharam dos inúmeros desafios que enfrentamos, sempre dispostos (as) a me ajudar.

A minha professora orientadora Edna por todas imprescindíveis contribuições dadas durante todo este processo, por seu empenho e dedicação na minha formação e pela sua paciência.

Também quero agradecer à UFRB e o corpo docente do curso de Ciências Biológicas que sempre demonstraram estar comprometidos com a qualidade e excelência do ensino.

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

DE SANTANA, Daniel Rocha, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, maio de 2021. **Extração e amplificação de DNA em *Alcantarea nahoumii* (Leme) R.J.Grant. e desenho de primers SSR em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. *comosus*) visando transferibilidade e estudos de diversidade genética.** Orientadora: Edna Lôbo Machado.

Resumo

A Mata Atlântica é considerada um dos biomas mais ricos em biodiversidade, ao mesmo tempo que é, um dos mais ameaçados do planeta. Devido à grande alteração de seus ecossistemas naturais e a fragmentação a qual vem sendo acometido, este bioma tem sido considerado como uma das prioridades em termos de conservação. Diante da problemática apresentada, faz-se necessário o estudo da diversidade genética das populações presentes nesse bioma, a exemplo da *Alcantarea nahoumii*; uma espécie pertencente à família Bromeliaceae, que cresce em afloramentos rochosos, fazendo com que de forma natural ela apresente uma estrutura populacional bastante fragmentada. Para estudo de diversidade genética da espécie, à nível molecular, é necessário a otimização de um protocolo de extração de DNA genômico e de amplificação desse DNA por meio de primers aleatórios, como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Também, pode-se amplificar o DNA de *A. nahoumii* por meios de primers específicos como os SSRs (Simple Sequence Repeats). No entanto, esta espécie ainda não tem seu genoma sequenciado, o que dificulta o desenvolvimento desses primers específicos. Uma alternativa para solucionar este problema é a transferibilidade, processo que consiste em utilizar o genoma de uma espécie correlata para desenho de primers específicos. *Ananas comosus* var. *comosus* (Abacaxi), também pertencente à família Bromeliaceae, encontra-se entre as culturas de plantas mais importantes do mundo, por conta do seu alto valor agroeconômico, portanto, já tem seu genoma sequenciado e disponível em bancos de dados para desenho de primers SSRs. Para obtenção de DNA genômico de *A. nahoumii* foram realizadas modificações em protocolo já estabelecido. Também, testaram-se duas composições de reação (denominadas A e B) e duas condições da PCR (A e B) para amplificação do DNA. O GenBank/NCBI foi utilizado para o vasculhamento do genoma de *A. comosus* var. *comosus*. O software Websat foi a ferramenta utilizada para o desenho dos pares de primers SSR (primers diretos e reversos). A qualidade dos desenhos dos primers foi verificada via software NetPrime. Por meio das modificações foi possível a obtenção de DNA para a espécie. A reação (B) e condição (B) foram as que permitiram a amplificação do DNA. De um total de 10 primers RAPD testados, 8 apresentaram bom padrão de amplificação. Esses primers serão selecionados para estudos de diversidade genética da espécie. Foram identificadas e selecionadas um total de 250 regiões microssatélites (SSR). Estas regiões foram compostas de repetições mono, di, tri tetra, penta e hexanucleotídeos. Sendo que para cada cromossomo, foram selecionadas aleatoriamente 10 regiões SSRs para desenho dos pares de primers SSR, totalizando 250 pares de primers. Os resultados obtidos nesse trabalho

poderão ser utilizados tanto para estudos genéticos em *A. nahoumii* quanto no abacaxizeiro e outras em espécies correlatas por meio de testes de transferibilidade.

Palavras-chave: Mata Atlântica, conservação, abacaxi, bromélias, genoma

DE SANTANA, Daniel Rocha, Federal University of Recôncavo da Bahia, May 2021. **DNA extraction and amplification in *Alcantarea nahoumii* (Leme) R.J.Grant. and design of SSR primers in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. *comosus*) for transferability and genetic diversity studies.** Advisor: Edna Lôbo Machado.

Abstract

The Atlantic Forest is considered one of the richest biomes in terms of biodiversity, at the same time as it is one of the most threatened on the planet. Due to the great alteration of its natural ecosystems and the fragmentation that has been affected, this biome has been considered as one of the priorities in terms of conservation. In view of the presented problem, it is necessary to study the genetic diversity of the populations present in this biome, such as *Alcantarea nahoumii*; a species belonging to the Bromeliaceae family, which grows on rocky outcrops, causing it to naturally present a very fragmented population structure. For the study of the genetic diversity of the species, at the molecular level, it is necessary to optimize a genomic DNA extraction and amplification protocol using random primers, such as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Also, the DNA of *A. nahoumii* can be amplified by means of specific primers such as SSRs (Simple Sequence Repeats). However, this species still does not have its genome sequenced, which makes it difficult to develop these specific primers. An alternative to solve this problem is transferability, a process that consists of using the genome of a related species to design specific primers. *Ananas comosus* var. *comosus* (Pineapple), also belonging to the Bromeliaceae family, is among the most important plant crops in the world, due to its high agroeconomic value, therefore, it already has its genome sequenced and available in databases for SSR primer design. To obtain genomic DNA from *A. nahoumii*, modifications were made to an already established protocol. Also, two reaction compositions (named A and B) and two PCR conditions (A and B) for DNA amplification were tested. GenBank / NCBI was used to search the genome of *A. comosus* var. *comosus*. The Websat software was the tool used to design the SSR primer pairs (forward and reverse primers). The quality of the primer designs was verified using NetPrime software. Through the modifications it was possible to obtain DNA for the species. The reaction (B) and condition (B) were the ones that allowed the amplification of the DNA. Out of a total of 10 tested RAPD primers, 8 showed a good amplification pattern. These primers will be selected for studies on the genetic diversity of the species. A total of 250 microsatellite regions (SSR) were identified and selected. These regions were composed of mono, di, tri tetra, penta and hexanucleotide repeats. For each chromosome, 10 SSR regions were randomly selected to design the SSR primer pairs, totaling 250 primer pairs. The results obtained in this work can be used both for genetic studies in *A. nahoumii* and in pineapples and others in related species by means of transferability tests.

Key words: Atlantic Forest, conservation, pineapple, bromeliads, genome

Lista de Ilustrações

- Figura 1** – A) *Alcantarea nahoumii* (Leme) R.J.Grant; crescendo em afloramentos rochosos; B) detalhe da planta com inflorescência14
- Figura 2** – A – F: DNA genômico de *A. nahoumii* extraído por meio de modificações do protocolo CTAB para abacaxizeiro.....22
- Figura 3** – Produtos de amplificação do DNA genômico de *A. nahoumii* por meio de primers RAPD utilizando a reação (B) e ciclos de temperatura (B)23
- Figura 4** – Caracterização quanto aos motivos de repetições microssatélites identificados em 250 regiões do genoma de *A. comosus* var. *comosus*.....54
- Figura 5** – Porcentagem das repetições de dinucleotídeos selecionadas do genoma de *A. comosus* var. *comosus*.....55
- Figura 6** – Distribuição das repetições de trinucleotídeos selecionados do genoma de *A. comosus* var. *comosus*.....55
- Figura 7** – Distribuição das repetições de tetranucleotídeos selecionados do genoma de *A. comosus* var. *comosus*.....56
- Figura 8** – Médias das porcentagens de GC (guanina e citosina), dos tamanhos (pb) e das temperaturas de melting (°C) dos pares de primers SSR desenhados.....56

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Composição do Tampão de extração de DNA.....	19
Tabela 2 – Composição da reação (A) de PCR utilizado na amplificação do DNA de <i>A. nahoumii</i>	20
Tabela 3 – Ciclos de temperatura (A) utilizados na amplificação via PCR.....	20
Tabela 4 – Composição da reação (B) de PCR utilizado na amplificação do DNA de <i>A. nahoumii</i>	20
Tabela 5 – Ciclos de temperatura (B) utilizados na amplificação via PCR.....	21
Tabela 6 – Primers RAPD utilizados na amplificação do DNA da espécie.....	21
Tabela 7 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828281.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	29
Tabela 8 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828282.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	30
Tabela 9 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828283.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	31
Tabela 10 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828284.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	32
Tabela 11 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828285.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	33
Tabela 12 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828286.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	34
Tabela 13 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828287.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	35
Tabela 14 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828288.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	36
Tabela 15 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828289.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	37
Tabela 16 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828290.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	38

Tabela 17 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828291.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	39
Tabela 18 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828292.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	40
Tabela 19 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828293.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	41
Tabela 20 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828294.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	42
Tabela 21 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828295.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	43
Tabela 22 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828296.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	44
Tabela 23 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828297.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	45
Tabela 24 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828298.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	46
Tabela 25 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828299.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	47
Tabela 26 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828300.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	48
Tabela 27 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828301.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	49
Tabela 28 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828302.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	50
Tabela 29 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828303.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	51
Tabela 30 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo LR828304.1 do genoma de abacaxizeiro (<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>) depositadas no GenBank/NCBI.....	52

Tabela 31 – Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828305.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI.....**53**

Sumário

Introdução Geral	13
Justificativa	15
Objetivo Geral	15
Capítulo I - Extração e amplificação de DNA em <i>Alcantarea nahoumii</i> (Leme) J.R.Grant. (BROMELIACEAE) utilizando primers RAPD	16
Introdução	16
Material e Métodos	17
Coleta, acondicionamento e dessecação das amostras	17
Otimização do protocolo de extração de DNA	18
Avaliação e quantificação do DNA extraído	20
Reações e condições da PCR utilizados nos testes de amplificação do DNA	20
Visualização dos locus amplificados	21
Resultados e Discussão	22
Capítulo II - Desenho de primers SSR em abacaxizeiro (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. var. <i>comosus</i>) visando a transferibilidade (BROMELIACEAE)	24
Introdução	24
Material e Métodos	27
Resultados e Discussão	29
Considerações Finais	57
Referências Bibliográficas	57

Introdução Geral

A Mata Atlântica é uma das mais importantes florestas tropicais do mundo, sendo esta, um dos 35 hotspots mundiais de biodiversidade (MITTERMEIER et al., 2011). Bastante heterogênea no que diz respeito a sua composição, a Mata Atlântica abrange um grande rol de zonas climáticas e formações vegetacionais, que vão de tropicais a subtropicais (TABARELLI et al., 2005; VITÓRIA et al., 2019).

A fragmentação de habitats, põe em risco a megadiversidade, pois fazem com que populações de determinadas espécies fiquem restritas em áreas menores, promovendo então, o isolamento parcial ou total delas para com outras populações, de tal maneira que o fluxo gênico entre as populações seja comprometido, e assim, as tornam mais vulneráveis à deriva genética e endogamia. Dessa forma, a fragmentação é uma das principais ameaças a conservação da biodiversidade desse bioma (GALETTI JUNIOR et al., 2008; RIBEIRO et al., 2011).

A família Bromeliaceae Juss. compreende aproximadamente 77 gêneros e 3630 espécies (GOUDA et al., 2020). É tradicionalmente constituída de três subfamílias, a Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae (LEME e MARIGO, 1993). A família destaca-se por ser um dos principais componentes da flora brasileira, e é bastante representativa na Bahia, apresentando alto grau de endemismo (VERSIEUX e WANDERLEY, 2010).

O gênero *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms, possui aproximadamente 39 espécies, todas endêmicas do Brasil, apresentando ocorrência em inselbergs, nos domínios da Mata Atlântica dos Estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (VERSIEUX e WANDERLEY, 2010).

Dentre essas espécies está a *Alcantarea nahoumii*, ela cresce em afloramentos rochosos em populações bastante fragmentadas (Figura 1A), além disso, é uma espécie endêmica da Bahia e é classificada como vulnerável em relação ao risco de extinção (VERSIEUX e WANDERLEY, 2010; FORZZA et al., 2013). Assim, é de grande importância estudar estratégias de identificação e diversidade genética da espécie.



Figura 1 – A) *Alcantarea nahoumii* (Leme) J.R.Grant; crescendo em afloramentos rochosos; B) detalhe da planta com inflorescência. Fonte: L.M. Versieux (VERSIEUX e WANDERLEY, 2010).

De acordo com Primarck et al. (2001), estudos genéticos possibilitam o entendimento da adaptação das populações às oscilações ambientais, em um meio que sofre constante modificação, sendo de extrema importância para a conservação. O potencial evolutivo das espécies pode ser prejudicado pela perda de diversidade genética, isso pode vir a interferir no sucesso reprodutivo (FRANKHAM et al., 2004).

É imprescindível compreender como a diversidade genética está difundida nas populações das espécies, principalmente quando se tem em vista a exploração dos recursos naturais (GOMES e MOURA, 2010). Com o auxílio dessas informações é possível investir em estratégias que favoreçam as melhores formas de conservação e de uso sustentável da biodiversidade das espécies nativas (GARCIA, 2020).

Cada vez mais, as técnicas moleculares têm sido empregadas nos estudos de diversidade genética. Para tanto, é necessário a obtenção de DNA de qualidade. Tendo em vista que o procedimento de extração do material genômico é uma etapa essencial para obtenção eficaz de bons padrões de amplificação em processos que utilizam PCR (ROMANO e BRASILEIRO, 1999). Os protocolos para obtenção de DNA mais utilizados são aqueles que contém CTAB em sua constituição (DEVI et al., 2013).

Para a caracterização da diversidade genética, são utilizados, essencialmente, quatro tipos de marcadores, que são, os morfológicos, bioquímicos, moleculares e citológicos. Sendo que, os moleculares proporcionam certas vantagens em comparação aos outros marcadores (KAMADA et al., 2009), tendo em vistas que não são influenciados pelo

meio.

Para espécies, cujo genoma ainda não foi sequenciado, os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ganham destaque, pois não é necessário o conhecimento prévio do seu genoma e baseiam-se na técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction). Além disso, é considerado o marcador de DNA mais simples e mais barato, sendo este, amplamente utilizado para identificação rápida de genótipos de plantas (ARUMUGAM et al.,2019).

Outro marcador molecular vastamente utilizado para genotipagem de plantas são os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), visto que são marcadores genéticos multialélicos, codominantes, e estes possibilitam o processo de transferibilidade entre espécies relacionadas (MASON, 2015), como no caso de *Ananas comosus* var. *comosus* que já possui o genoma sequenciado e pode servir como modelo para desenho de primers específicos para regiões microssatélites SSR de *A. nahoumii*.

Justificativa

Assim, devido ao fato da *A. nahoumii* ser uma espécie classificada como endêmica e vulnerável em relação ao risco de extinção (VERSIEUX e WANDERLEY, 2010; FORZZA et al., 2013), fazem-se necessários estudos da diversidade genética da espécie. Para tanto, é necessário a obtenção de DNA genômico em boa quantidade e qualidade, seleção de primers RAPD e o desenvolvimento de primers específicos como o SSR.

Objetivo Geral

- Obter de DNA genômico de qualidade e em boa quantidade de *A.nahoumii*,
- Selecionar primers RAPD com bom padrão de amplificação.
- Identificar regiões microssatélites no genoma de *A. comosus* var. *comosus*
- Desenhar primers SSR para o abacaxizeiro visando estudo de transferibilidade para a *A. nahoumii*.

Capítulo I - Extração e amplificação de DNA em *Alcantarea nahoumii* (Leme) J.R.Grant. (BROMELIACEAE) utilizando primers RAPD

Introdução

O gênero *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms é endêmico do Brasil apresentando ocorrência em inselbergs, nos domínios da Mata Atlântica dos Estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Grande parte das espécies de *Alcantarea* são empregadas na jardinagem (VERSIEUX e WANDERLEY, 2010), como é o caso da *Alcantarea nahoumii* (Leme) J.R.Grant.

Dentre as espécies de Bromeliaceae catalogadas na Mata Atlântica, aproximadamente 40% apresentam-se sob alguma categoria de ameaça. Vale ressaltar que este número pode estar subestimado, pois o conhecimento do real estado de conservação das populações em ambientes naturais ainda é escasso (MARTINELLI et al., 2008).

A *A. nahoumii* é uma espécie da família Bromeliaceae, pertencente a subfamília Tillandsioideae, que cresce em afloramentos rochosos, que de forma natural, faz com que ela apresente uma estrutura populacional bastante fragmentada, além disso, é uma espécie endêmica do estado da Bahia, e é classificada como vulnerável em relação ao risco de extinção (VERSIEUX e WANDERLEY, 2007; FORZZA et al., 2013), devido ao aumento da frequência de incêndios florestais e ações antrópicas, incluindo principalmente o extrativismo das espécies para fins ornamentais (VERSIEUX, 2009), geraram um aumento dessa vulnerabilidade nos últimos anos. Assim, é de grande importância estratégias de identificação e estudos sobre a diversidade genética da espécie.

Uma das maneiras de guiar estratégias para conservação da biodiversidade fazem-se por meio do entendimento dos mecanismos que controlam as populações da espécie em questão (SANTOS et al., 2018), para tanto as análises da estruturação genética são de grande importância. Este tipo de estudo pode ser auxiliado pela utilização de análises moleculares, a exemplo de marcadores moleculares. Para tanto, é necessário à obtenção de DNA de qualidade e primers que permitam à amplificação de diferentes regiões genômicas.

O isolamento de DNA de plantas é uma etapa essencial na análise da estrutura e organização do genoma vegetal. Os DNAs vegetais extraídos são utilizados geralmente

como base em reações de PCR para estudos filogenéticos, estudo de diversidade genética e conservação. Independentemente do tipo de estudo molecular, o protocolo de isolamento de DNA deve possibilitar a obtenção de amostras puras suficientes para não impedir os tratamentos enzimáticos ou causar distorção nos padrões de migração em gel de eletroforese (ROMANO e BRASILEIRO, 1999).

A diversidade genética pode ser avaliada utilizando-se marcadores de DNA por conta do seu potencial de distinção, precisão e rapidez (LIMA et al., 2010), isso porque os marcadores moleculares não são afetados pela influência ambiental e detectam o polimorfismo diretamente ao nível de DNA. (SOUZA, 2001). Além disso, alguns marcadores são mais adequados que outros, quando se almeja obter informações a respeito da diversidade genética de diferentes genótipos. (FALEIRO, 2007).

Dentre os marcadores de DNA, os de RAPD, que se baseiam na técnica de PCR, possuem certas vantagens em comparação aos outros marcadores, como por exemplo, o baixo custo, estrutura laboratorial simples e de fácil implementação (LIMA et al., 2010); além disso, outra vantagem do marcador RAPD, é que os primers utilizados podem localizar, de modo aleatório, regiões de homologia no DNA e, deste modo, não carece do conhecimento prévio de sequências do genoma a ser analisado (CAIXETA et al., 2003), sendo assim seu uso é interessante para espécies que ainda não tiveram seu genoma sequenciado, como é caso da espécie em questão.

Este estudo teve como objetivo obter DNA de qualidade e em quantidade de *A. nahoumii* por meio da otimização de um protocolo da extração. Bem como, padronizar a reação e condições da PCR e selecionar primers RAPD com bom padrão de amplificação, visando o estudo de diversidade genética da espécie.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal (LaMol), que se encontra no prédio de Ciências Biológicas Prof. Elinsmar Adorno, situado no Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

Coleta, acondicionamento e dessecação das amostras

Para a otimização do protocolo de extração de DNA foram utilizadas folhas jovens e saudáveis de genótipos *A. nahoumii*, coletados de uma população natural da Serra do

Jatobá, na cidade de Milagres- BA.

As amostras foliares foram coletadas e levadas para o laboratório, onde foi separada a parte aclorofilada (basal) do tecido foliar, com o auxílio de uma tesoura desinfestada com álcool 70%, o processo de desinfestação foi realizado para evitar a contaminação cruzada do DNA. Após a separação, as partes aclorofiladas de cada indivíduo foram acondicionadas em pacotes de papel toalha, com devida identificação, e armazenadas em sílica por 7 dias para a desidratação.

Otimização do protocolo de extração de DNA

A extração do DNA, inicialmente, teve por base o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações, utilizado na EMBRAPA – Mandioca e Fruticultura para a extração do DNA genômico do abacaxizeiro. Segue abaixo o protocolo:

- 01- De modo geral deve-se utilizar a parte aclorofilada (basal) do tecido foliar e cortá-las em fatias bem finas para facilitar a maceração
- 02- Macerar o tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido ou diretamente no tubo usando um micro-pistilo.
- 03- Transferir o tecido pulverizado para tubos eppendorf de 2 mL e adicionar 1000 µL da solução tampão de extração (Tabela 1).
- 04- Adicionar 200 µL SDS 10%. Vortexar rapidamente, durante 5 segundos.
- 05- Incubar os tubos em banho-maria a 65°C por 45 - 60 minutos, e homogeneizar a cada 10 minutos.
- 06- Retirar do banho-maria e esfriar em gelo.
- 07- Adicionar 600 µL da mistura; clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1), e vortexar rapidamente durante 5 segundos.
- 08- Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm.
- 09- Coletar o sobrenadante (± 700 µL), e transferir para novos tubos (eppendorf de 1,5 mL) previamente identificados.
- 10- Adicionar 490 µL álcool isopropílico (-20°C) incubar no freezer durante 1 h no mínimo.
- 11-. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm.
- 12- Descartar o sobrenadante.
- 13- Lavar o pellet com etanol 70%. Colocar ± 500 µL de etanol 70% deixar o tubo com a solução em repouso durante cinco minutos a 4°C (geladeira) – Centrifugar por 5 minutos

a 10.000 rpm. (Repetir o processo mais uma vez)

14 - Secar o pellet em temperatura ambiente

15- Ressuspender o pellet com 100 μ L de TE + 1 μ L de ribonuclease (RNase 10 mg/mL) e incubar em estufa a 37°C por 1 hora.

16 - Esfriar em temperatura ambiente, conservar a solução no freezer (-20°C)

Obs: Os tubos e ponteiras contaminados com clorofórmio, devem ser descartados em recipiente apropriado.

As alterações realizadas foram as seguintes:

1- Foram utilizadas folhas desidratadas em sílica

2- As folhas desidratadas foram cortadas em pedaços bem pequenos com auxílio de uma tesoura desinfestada com álcool 70%;

3- A maceração foi realizada em almofariz com auxílio de pistilo, previamente refrigerados, para evitar que o aumento de temperatura gerado pelo atrito no momento da maceração degradasse o DNA

4- A maceração foi realizada na presença de areia autoclavada e solução tampão de extração;

5-Os passos seguintes foram de acordo com o protocolo original, descrito acima.

Tabela 1: Composição do Tampão de extração de DNA

Soluções estoque	[] final
CTAB 10%	2,4M
NaCl 5M	1,7M
Tris HCl 1M pH 8,0	0,1M
EDTA 0,5M	20mM
2- Mercaptoetanol	0,4%
PVP 0,1%	0,1 g
H ₂ O Mili-Q (q.s.p.)	-

Avaliação e quantificação do DNA extraído

As amostras foram avaliadas quanto à 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), 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, acrescido de 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).

Reações e condições da PCR utilizados nos testes de amplificação do DNA

Foram testadas duas reações de PCR (A e B, tabelas 2 e 4, respectivamente), e dois programas de amplificação (A e B, tabelas 3 e 5, respectivamente).

Tabela 2: Composição da reação (A) de PCR utilizado na amplificação do DNA de *A. nahoumii*

Reagentes	Concentrações
Água ultrapura	9,2µL
Tampão PCR 10X	2,5 µL
MgCl 2, 50mM	2,5 µL
dNTP 2,5mM	2,0 µL
Enzima Taq DNA polimerase 0.3	0,3 µL
Primer 2mM	3,5 µL
DNA genômico total 5.0	5,0 µL
Volume final: 25 µL	

Tabela 3: Ciclos de temperatura (A) utilizados na amplificação via PCR

Desnaturação				Extensão
inicial	Desnaturação	Anelamento	Amplificação	Final
94°C / 3min	94°C / 40seg	37°C / 40seg	72°C / 1min	72°C / 5min
1x		45x		1x

Tabela 4: Composição da reação (B) de PCR utilizada na amplificação do DNA de *A. nahoumii*.

Reagentes	Concentrações
Água ultrapura	12,55 µL

Tampão PCR 10X	2,5 µL
MgCl 2, 50mM	1,25 µL
dNTP 2,5mM	1,0 µL
Enzima Taq DNA polimerase 0.3	0,2 µL
Primer 4mM	2,5 µL
DNA genômico total 5.0	5,0 µL
Volume final: 24 µL	

Tabela 5: Ciclos de temperatura (B) utilizados na amplificação via PCR

						Extensão
Desnaturação inicial			Desnaturação	Anelamento	Amplificação	Final
94°C/ 1min	35°C/ 30seg	72°C/ 1min	94°C/ 1min	35°C/ 30seg	72°C/ 1min	72°C/ 7min
2x				40x	1x	

Os primers testados na amplificação do DNA genômico da espécie estão descritos na tabela 6.

Tabela 6: Primers RAPD utilizados na amplificação do DNA da espécie

Primers RAPD	
Nome do primer	Sequência (5'-3')
OPG 17	ACG ACC GAC A
OPAH 19	GGC AGT TCT C
OPH 18	GAA TCG GCC A
OPZ 14	TCG GAG GTT C
OPAL 06	AAG CGT CCT C
OPAI 08	AAG CCC CCC A
OPAL 08	GTC GCC CTC A
OPC 05	GAT GAC CGC C
OPAT 14	GTG CCG CAC T
OPAL 17	CCG CAA GTG T

Visualização dos locus amplificados

Para a visualização dos produtos amplificados foram adicionados 5µl do tampão da amostra (30 % de Glicerol e 0,25% de Azul de Bromofenol) nos tubos contendo as

reações. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, corado com brometo de etídeo em tampão TBE 1x (0,045 M Tris-Borato e 0,001 M EDTA). A corrida eletroforética foi realizada por 3 horas, a 80 V. A amplitude dos fragmentos amplificados na espécie foi estimada usando o DNA Ladder com 1000 pb. As amostras foram visualizadas por meio de transluminador e fotodocumentadas.

Resultados e Discussão

Por meio das modificações no protocolo de extração, foi possível obter DNA genômico para a espécie em estudo (Figura 2).

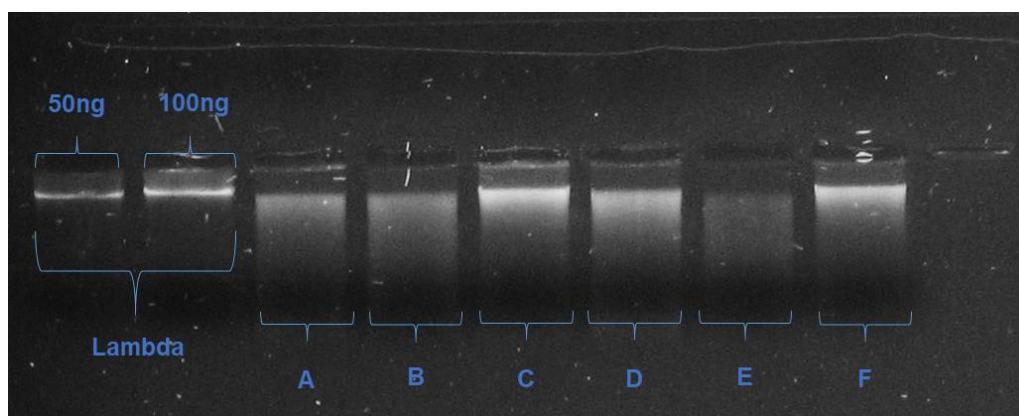


Figura 2. A – F: DNA genômico de *A. nahoumii* extraído por meio de modificações do protocolo CTAB para abacaxizeiro.

Segundo Oliveira et al. (2007), protocolos que empregam o detergente CTAB, como é o caso do protocolo Doyle e Doyle (1987), podem ser modificados de diversas maneiras, para vários tipos e para diferentes quantidades de amostra de folhas. Sendo assim, quando se objetiva otimizar um protocolo de extração para determinadas espécies, é possível realizar adaptações, para que o protocolo se adeque as particularidades da espécie a ser estudada, como foi o caso da *A. nahoumii*.

Segundo Costa e Oliveira (2002), a utilização de nitrogênio líquido faz-se necessária durante a maceração de folhas fibrosas e difíceis de macerar, tendo em vista o rompimento das células com uma maior facilidade. Porém, o custo elevado do nitrogênio líquido impulsiona a busca por meios alternativos para maceração, como é caso da maceração no almofariz e pistilo na presença de tampão de extração e areia autoclavada, método este, que possibilitou resultados satisfatórios na obtenção de DNA genômico de *A. nahoumii*.

A utilização de areia autoclavada fez-se necessária, visto que a espécie apresenta folhas bastante fibrosas e difíceis de macerar, sendo assim, a areia ajuda a gerar um atrito maior no momento da maceração, facilitando o processo. Mota (2019), trabalhando com *Physalis ixocarpa* e *Physalis Philadelphica*, também utilizou a areia no momento da maceração e obtiveram bons resultados.

Para evitar que as amostras esquentassem muito por conta do atrito no momento da maceração, o almofariz e pistilo foram previamente congelados. O mesmo procedimento foi realizado por Costa e Oliveira (2002).

A reação B e o programa de amplificação B possibilitaram um bom padrão de amplificação do DNA da espécie com os primers RAPD (Figura 3).

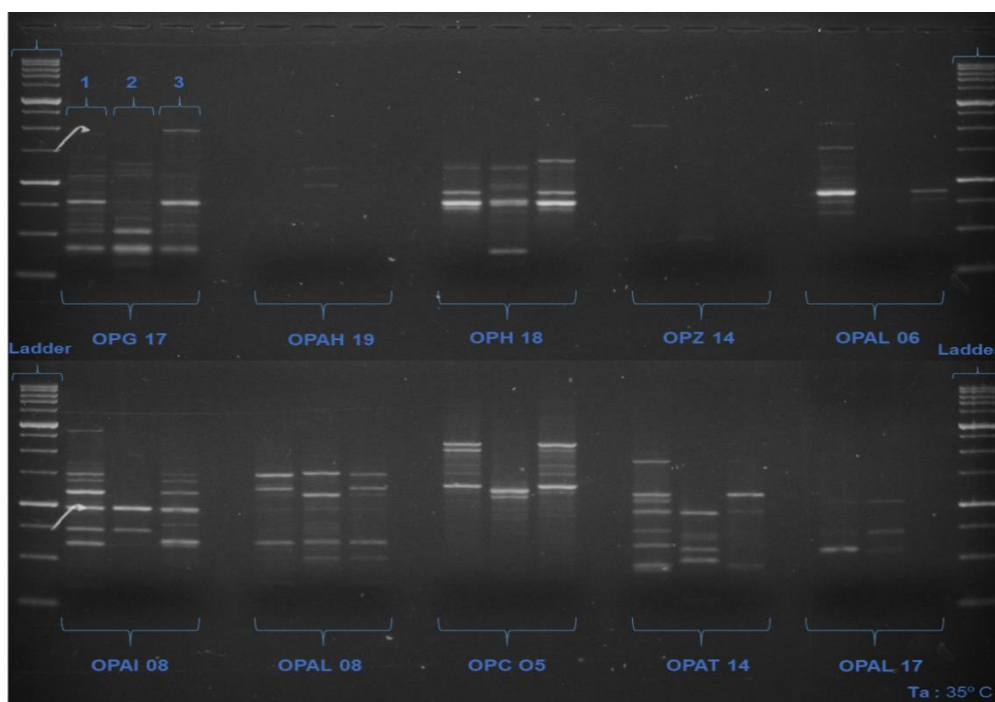


Figura 3. Produtos de amplificação do DNA genômico de *A. nahoumii* por meio de primers RAPD utilizando a reação (B) e ciclos de temperatura (B).

Para fins de determinação de qual fator foi responsável pelo resultado positivo do programa de amplificação B, foi realizado um teste, em que este programa foi testado com a temperatura de anelamento utilizada no programa de amplificação A (37°C), e este procedimento não gerou bons padrões de amplificação.

Dos 10 iniciadores testados, 8 apresentaram um bom padrão de amplificação: OPG 17, OPH 18, OPAL 06, OPAI 08, OPAL 08, OPC 5, OPAT 14, OPAL 17. Estes primers serão utilizados na genotipagem da população de *A. nahoumii*, para estudos de diversidade genética.

Esses mesmos primers apresentaram bom padrão de amplificação e alto grau de polimorfismo em um estudo feito por Favoreto et al. (2010) em que foram selecionados primers RAPD para caracterização molecular da espécie *Aechmea ramosa*.

Dentre as temperaturas de anelamento testadas (Condições A e B), a de 35° C foi a que proporcionou uma melhor amplificação do DNA da espécie. Este resultado está de acordo com o que foi dito por Freitas (2005), que afirma que para primers menores, como os de RAPD, é indicado, de uma forma geral, o uso de temperaturas menores, variando em torno de 35°C.

No que concerne as quantidades de MgCl₂ testadas, a menor (1,25µL) foi a que possibilitou a amplificação dos fragmentos. Isto pode ter ocorrido devido ao fato de que o excesso de MgCl₂ pode proporcionar a acumulação de produtos de amplificação não específicos. No entanto, poucas concentrações podem inviabilizar a amplificação de DNA. Visto que é necessário que haja MgCl₂ disponível para que os dinucleotídeos possam ser acrescidos pela Taq polimerase à nova fita que estará sendo formada (FREITAS, 2005).

Capítulo II - Desenho de primers SSR em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. *comosus*) visando a transferibilidade (BROMELIACEAE)

Introdução

A *Ananas comosus* (L.) Merr. var. *comosus* (Abacaxi), é uma espécie pertencente a subfamília Bromelioideae, e segundo Rodríguez et al. (2013), é a espécie mais vastamente conhecida dos membros cultivados da família Bromeliaceae. Além disso, encontra-se entre as culturas de plantas mais importantes do mundo (DE SOUSA et al., 2013), por conta do seu alto valor econômico, que está associado as diversas formas de uso dos indivíduos dessa espécie. No Brasil, é uma das culturas tropicais mais cultivadas (LOPES NETO et al., 2015).

O abacaxizeiro é cultivado principalmente para o uso de suas frutas frescas, que são consumidas como sobremesa, podendo ser exportadas frescas ou enlatadas, podem também ser utilizadas na produção de bebidas alcoólicas (CARR, 2012). Os caules e folhas são fontes de fibras, que podem ser utilizadas na confecção de papeis e tecidos (CARR, 2012), nas Filipinas por exemplo, as folhas são usadas na produção de fibra têxtil que posteriormente é empregada como componente na confecção de papeis de parede e móveis (BHAGAVATHY et al., 2019). Além disso, os resíduos da produção dessa espécie podem ser utilizados como ração animal (CARR, 2012).

O abacaxi está entre as fontes vegetais mais ricas em proteases (BHAGAVATHY et al., 2019), a exemplo da bromelaína, uma enzima proteolítica que pode ser utilizada na indústria alimentícia (GARCÍA e SERRANO, 2005) como “amaciante de carnes” (BHAGAVATHY et al., 2019). Sendo esta, uma das espécies de plantas tropicais que há muito tempo tem sido utilizada na produção de medicamentos tradicionais (BHAGAVATHY et al., 2019), como por exemplo, na produção de xaropes expectorantes (FRANCO e BARROS, 2006).

A espécie *A. comosus* é subdividida em cinco variedades botânicas: var. *comosus*, var. *ananassoides*, var. *erectifolius*, var. *parguazensis* e var. *bracteatus* (COPPENS D'EECKENBRUGGE e LEAL, 2003). A var. *comosus* apresenta o abacaxi mais cultivado e comercializado (COPPENS D'EECKENBRUGGE et al., 2011). Dentro da var. *comosus*, existem aproximadamente, 30 cultivares que são cultivados comercialmente (CARR, 2012).

Apesar de lentamente, a genômica e a transcriptômica do abacaxi estão sendo desenvolvidas, a maior parte das sequências genômicas carregadas nas principais bases de dados de genoma, pertence à var. *comosus* seguido pela var. *bracteatus* (DE SOUSA et al., 2013).

Com relação ao genoma, o número cromossômico que ocorre com maior frequência entre os membros desta família é $2n=50$ ($n=25$), incluindo as espécies *A. comosus* var. *comosus* (Abacaxi) e a *Alcantarea nahoumii* (Leme) R.J.Grant. (GITAÍ e BENKO-ISEPPON, 2006; CEITA et al., 2008).

Por se tratar de uma cultivar de grande interesse agro econômico, a abacaxi já tem seu genoma sequenciado e suas sequências depositadas em bancos de dados. Sendo assim,

neste trabalho foi utilizado o genoma do abacaxi para identificação e desenho de primers SSR para futuros testes de transferibilidade em *A. nahoumii*.

A diversidade genética pode ser avaliada utilizando-se marcadores tanto morfológicos, quanto isoenzimáticos, e os de DNA. Sendo que este último tem recebido mais atenção, especialmente por conta do seu potencial de distinção, precisão e rapidez (LIMA et al., 2010), isso porque os marcadores moleculares não são afetados pela influência ambiental e detectam o polimorfismo diretamente ao nível de DNA. (SOUZA, 2001). Contudo, alguns marcadores são mais adequados que outros, quando se almeja obter informações a respeito da diversidade genética entre e dentre populações. (FALEIRO, 2007).

Dentre os tipos de marcadores moleculares relatados, os marcadores microssatélites (SSR) possuem diversas vantagens. Esses marcadores são extremamente polimórficos, possuem herança codominante, o que permite a diferenciação de indivíduos heterozigotos e homozigotos, ocorrem em grande quantidade em genomas eucariotos, são altamente reproduzíveis, são multialélicos, estão bem espalhados pelo genoma e os seus locus são constantemente conservados entre espécies relacionadas (BUSO et al., 2003), facilitando o processo de transferibilidade desse marcador entre espécies correlatas.

Embora marcadores SSR possuam uma alta aplicabilidade, algumas espécies possuem poucos ou nenhum locus microssatélite descrito, pelo fato de não possuírem seu genoma sequenciado, como é o caso da *A. nahoumii*, e com isso, a utilidade desses marcadores se torna limitada por conta do alto custo e do consumo de tempo que é empregado para o desenvolvimento de primers espécie-específicos (DE RUSSO GODOY et al., 2019). Uma alternativa bastante conhecida para contornar este problema, é o desenvolvimento de primers em espécies relacionadas, visando uma futura transferência para as espécies que ainda carecem de informações.

A transferência de primers SSR entre espécies vegetais vem sendo estudada e realizada. Barbará et al. (2007)⁽¹⁾, relataram uma taxa de sucesso de transferibilidade dentro de gêneros de aproximadamente 60% para eudicotiledôneas e próximo a 40% em monocotiledôneas, entre gêneros, as taxas de sucesso são menores, chegando a aproximadamente 10%, mas há exceção para os membros da família Bromeliaceae, tendo em vista, que em alguns estudos, marcadores polimórficos já foram transferidos tanto

entre membros da mesma subfamília quanto entre membros de subfamílias diferentes (PALMA-SILVA et al. 2006; BARBARÁ et al. 2007⁽²⁾).

Os bancos de dados de genomas são uma das principais ferramentas de suporte para os estudos voltados para essa área. Para que seja possível levantar dados para análises biológicas, é de extrema importância a realização de cadastros de sequências e de algumas anotações relacionadas, e também, a realização de consultas nestes bancos. A comparação de sequências, o descobrimento de novos genes, funções e características de uma nova sequência (SEIBEL et al., 2000) e a identificação de regiões microssatélites, são exemplos de análises possíveis.

Dessa forma, este estudo teve como objetivo vasculhar o genoma de *A. comosus* var. *comosus*, identificar e selecionar regiões microssatélites, bem como, desenhar primers SSR para as regiões selecionadas, visando estudos de genética molecular na espécie e em espécies aparentadas, a exemplo de *A. nahoumii*, por meio de testes de transferibilidade de primers.

Material e Métodos

Foram utilizadas sequências dos 25 cromossomos do genoma de *A. comosus* var. *comosus* que se encontram depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information – NCBI, no formato Fasta, para a identificação de regiões SSR. A identificação das regiões genômicas contendo os microssatélites foi feita com uso do aplicativo Websat (MARTINS et al., 2009).

Os parâmetros utilizados na identificação das regiões SSR foram os seguintes: SSR compostos por motivos mono e dinucleotídeos, com no mínimo sete repetições por motivo; SSR compostos por motivos tri, tetra e pentanucleotídeos com no mínimo cinco repetições por motivo; e SSR compostos por hexanucleotídeos com no mínimo três repetições do motivo.

Para fins de padronizar as reações da PCR, utilizaram-se os seguintes critérios na seleção dos pares de iniciadores: produto final da amplificação no intervalo de 150 a 300 pb, tamanhos dos iniciadores entre 19 e 22 pb; percentagem de GC no intervalo de 40 a 60%; e temperatura média entre 55 e 62°C, com diferença máxima de 1°C entre os iniciadores de cada par.

Para cada cromossomo, foram selecionadas 10 regiões SSR aleatoriamente, totalizando 250 regiões SSR. Para cada região, foi desenhado um par de primers SSR (direto e reverso). A porcentagem de GC dos iniciadores, que flanqueiam as regiões microssatélites, foi verificada por meio do aplicativo NetPrimer (PREMIER BIOSOFT, 2013).

Resultados e Discussão

Foram identificadas e selecionadas um total de 250 regiões microssatélites após o vasculhamento dos 25 cromossomos do genoma do abacaxizeiro, sendo que para cada cromossomo foram selecionadas 10 regiões, e para cada região foi desenhada um par de primers SSR (Tabelas 7 a 31).

Tabela 7. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828281.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
			PRODUTO								
LR828281.1	1	(TA)16	297	GGAATAAACCAGGGACAACG	50	20	59.288	AACAACCTTACAAGCACGGGG	50	20	60.030
	2	(CT)13	296	GCCTCCATCCTCTCCTCTCT	60	20	59.913	AACACAGTAGGGTCGCCATC	55	20	59.997
	3	(GAA)7	232	ATAACCCCATTTGCTCCGTTC	50	20	61.072	TAATAAAAAGCCCCTCCCCTG	50	20	60.265
	4	(AGGGTT)4	201	CATTGATTACGACGCCGAG	52,63	19	60.227	GCCTTTTCTCTCCAATCCCT	50	20	59.651
	5	(TA)29	284	TGGTTGCTATGCTGGTGCTA	50	20	60.423	CATGGGTGAGTAAGTGTGTTGG	50	22	60.326
	6	(GGA)9	286	AGAGAGAGAGGGGCTTACGG	60	20	59.972	CACGGAATGAAACACACAGG	50	20	60.001
	7	(AATTTG)3	285	CGCTGACGGATTTTGATTTT	40	20	60.074	TGTTTCGTTTCGATTTGGTCA	40	20	60.088
	8	(T)30	291	TTGCTAAAGAGAAAGTCGGGTT	40,91	22	59.433	GCTGCTCGGTTGCTGTAAT	52,63	19	59.042
	9	(AGAT)7	281	ACCTGTACCCCAAACCACA	50	20	60.126	TTGTGAGTCGAGCGAGTGAG	55	20	60.333
	10	(A)32	235	AACACTTTGACTTTTGTGGCCT	40,91	22	60.075	GGGGCTCATCCTCTTCTTTT	50	20	59.651

Tabela 8. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828282.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828282.1	1	(CAA)8	242	GAATGACAACAGCAACAACAG	42,86	21	56.805	TCGCATATTACTTATGAGGTGG	40,91	22	56.890
	2	(GAGGTG)3	271	AAACGAAACCGACCCTCTCT	50	20	60.110	TGGATCTCTTGTGAAGGGG	50	20	60.042
	3	(GA)11	203	AACTTGGTACGCTGGAGCC	57,89	19	60.270	CCGAATCAAACGGAAACAAC	45	20	60.344
	4	(A)17	173	TCCTTGCTTTGGTGAGTGC	52,63	19	59.976	AGCGAGAAATTAGAAGCCCC	50	20	59.820
	5	(AAC)8	244	TCTCCACCGACAATGAAACA	45	20	60.088	GTAATCTTTCCGCAATCCCA	45	20	59.901
	6	(TATG)7	249	GGAGCCCCTTTGCTATTGAT	50	20	61.333	CAACCGACTTCGCACTTTG	52,63	19	60.433
	7	(TAAT)6	232	CTTTCAGCTTCGTA CTGCGCC	55	20	60.154	AAAGGGCCATGAGAGAGAGG	55	20	60.725
	8	(ATTTT)5	261	CGGTTGCGTGTGACTTCTTA	50	20	59.904	GTGGGTCCAAATCCATCAAA	45	20	60.560
	9	(GA)17	300	GCCTGGAAC TTTTCTTACTGGG	50	22	61.313	GAGCATCCCATGTCAACCAT	50	20	60.758
	10	(AG)19	199	ATTACAAGGCAGGGAGAGCA	50	20	59.836	GGATTTACCAACTCGCAGGT	50	20	59.056

Tabela 9. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828283.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
PRODUTO											
LR828283.1	1	(CCCACC)4	207	GGTGGCATCCTCTTTCTTCC	55	20	60.970	ACGGTATCCTCCACTCCGAA	55	20	61.805
	2	(CGC)5	178	CTTTGCCCTCTACCTTGTCG	55	20	59.869	TGTCCCTCCAAAACCTCCAAC	50	20	59.943
	3	(AG)8	215	ACCAGTGCGAATTTGGTAGG	50	20	59.993	TTCACCCTCCTTCTTCTCC	55	20	60.565
	4	(TATC)5	223	GCCACAGATTGGGTAAATGG	50	20	60.192	GGTCCAAGTGGGCACAAGTA	55	20	60.954
	5	(TA)30	221	TAGGATTGAGTGGTCCCTGC	55	20	60.073	TCGAATTAGGCTCGAAAAGC	45	20	59.569
	6	(A)28	151	ATTACCTGCACCCCGTGTAT	50	20	59.198	ACGTACATTTTGGGCATCAA	40	20	58.895
	7	(GAGGCG)3	233	ATCAGCTCCCTGGAATTGG	52,63	19	60.019	TCGTACTCCACCCTCGTCTC	60	20	60.261
	8	(AG)20	300	AGGGAGGGTACATGGTCTCC	60	20	60.194	TCTCTCTACGAGCGCACAAG	55	20	59.490
	9	(ATT)8	300	CGAAGAAAAGCACAAGCTGA	45	20	59.342	ATCGTTTGGTGGTGGGTAT	45	20	59.031
	10	(TTAAT)5	259	AATGTATCGGGGAAGGAAGC	50	20	60.286	TCCTCGTGGGGCAATAAATA	45	20	60.281

Tabela 10. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828284.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ-ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828284.1	1	(ATTCT)6	257	CCATTCGTCCATCCGTTTAT	45	20	59.645	GGGTGTCCCAGAGAGAAAGA	55	20	59.228
	2	(ATCT)7	277	CTTCTGGGATTCTCTTCAAACA	40,91	22	58.435	GCTGCACATCCTGCTAATG	52,63	19	57.951
	3	(TA)16	197	AATTTGACAGGTTGCGATCC	45	20	59.939	TCGGCTTAGTTAAAACGGCT	45	20	59.033
	4	(TTA)7	231	CACATTACGCCCTAGCTGT	55	20	60.154	GCCCCAATAGTCCTACATCG	55	20	59.410
	5	(TC)17	167	TCGAAGCACCAAGGAGTTG	52,63	19	59.968	AGGATTATAGTACCGCAGCCC	52,38	21	59.498
	6	(T)27	291	AAACGGAGGAGATGATGTGG	50	20	59.927	CTCAGCCCAATTACCCAAAA	45	20	59.931
	7	(ATTT)6	181	TTTTCTATCAGCCCGTAGGC	50	20	59.320	AGGAGGAGGGACAATTCGTT	50	20	59.935
	8	(ACCCGA)3	165	CCAACCAGCCCGTAAGTAGA	55	20	60.125	GGGTTCGGGTTTTGGATTT	47,37	19	60.905
	9	(GAA)10	224	TGGTGAGGACGAACTTGAGA	50	20	59.388	CGCCTCTACAAACCCTAACG	55	20	59.763
	10	(TTAT)8	283	TGGAGAGCGGGTATAGATG	55	20	60.051	CCTACCACCACCTACCTCACA	57,14	21	59.892

Tabela 11. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828285.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ-ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828285.1	1	(CTCC)6	290	CGACTTGGGATGGGAAGATA	50	20	59.887	GTGGCCCTTACTGGTTGCTA	55	20	60.132
	2	(TA)15	268	ATTACAAGGAGCGATTTCCG	45	20	59.182	TCAATTTCCACCGTCCATTT	40	20	60.170
	3	(A)59	269	CAACGGCGGAGGATACTAGA	55	20	60.227	AAAACGGCTCTGATTGATGG	45	20	60.074
	4	(CT)25	205	AAATGGGTGACAACGAAACT	40	20	57.018	TCGGAAGCTCTATCATCAAA	40	20	56.060
	5	(AAT)8	154	AATGAATGAAGCGGATAGCG	45	20	60.196	AGGGGCCAAAGTGTAGGTTT	50	20	59.864
	6	(AT)30	300	GCTAACAGACCAGCCGTAT	52,63	19	55.420	GAGTGGGTAGTTGGTTGAATAA	40,91	22	55.832
	7	(GGATTA)3	237	TTCAACGTGTCAATTTTCGTG	40	20	58.158	GCTAGTTGCTTGGGAGAAAA	45	20	57.246
	8	(T)42	175	TTCATGTCCAATGACCCAC	50	20	59.318	CTTTACCAATTTTACAAGCACC	40,91	22	58.676
	9	(TATCTA)5	281	AGCTATTGCAGGGCATGAAG	50	20	60.374	GCAGTTCCACTCAAATGGGTA	47,62	21	59.985
	10	(TACA)5	232	CAAGCCCTAAAGCCATCAC	52,63	19	58.312	CAAGTGAGAAAGTGTGAAACCA	40,91	22	57.914

Tabela 12. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828286.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
PRODUTO											
LR828286.1	1	(A)57	192	TCAATGGGCGTTTCCTAAAG	45	20	60.067	ATAGCCCCAAAATGGAACG	47,37	19	59.770
	2	(AGT)9	176	ATCACTTTGGGATCGGTGAG	50	20	59.927	GTGAACATGGTGCGAACATC	50	20	59.975
	3	(TATT)6	207	CTGATTCTCGGTGCTGGTATTT	45,45	22	60.503	GCAAGAAACGGAACGGAAC	52,63	19	60.630
	4	(T)12	259	GCCACCTTTAACCCCATTTT	45	20	60.055	TGGTCCCTAACACACGATTTT	42,86	21	59.345
	5	(TCTA)5	289	GACTGGAGCCACGAAACTTG	55	20	60.833	TGTGTGTACCTGTCCCCAAAA	47,62	21	61.228
	6	(TTC)5	183	CCAATCCACCTTCTTCTCCA	50	20	60.042	GGGCAGATCAATGGGAAAC	52,63	19	60.274
	7	(GT)9	185	TTTCTACCTGATCGGCATCC	50	20	60.036	TTCAGCACAACCGAGACATC	50	20	59.837
	8	(TTATTT)3	237	TAGGACGGATCAAGGGAAGA	50	20	59.623	AAGGGGTATTTGTCGAGCAC	50	20	59.056
	9	(TC)15	279	TCCTCGGATCATTTTCAACC	45	20	59.871	GGCTCGCTCATTTATTCGAT	45	20	59.281
	10	(TCT)5	159	ATTCCCTTGAAATCCGAACC	45	20	60.131	CCTCGCTCATCTCCTAATGG	55	20	59.790

Tabela 13. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828287.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
PRODUTO											
LR828287.1	1	(TC)7	273	GTGCGAAATCGTCTCTGGAT	50	20	60.226	AATCGTTCAAAAGGACGTGG	45	20	59.971
	2	(A)16	199	CTATTTGAGGGAATGGGCCT	50	20	60.278	CGAGCCACCAGAAGGTAAAG	55	20	59.869
	3	(AAG)5	242	TCTTAAACGCCGAAAGAGA	45	20	59.953	ACGGTGAATAAAGCGTACCG	50	20	60.018
	4	(GTA)7	249	AGGTGTTGGAGGTGGAATTG	50	20	59.820	CCCTCTTCTTCTCCCTTGCT	55	20	59.950
	5	(AAAG)6	231	GCTGTTGCAGGGAAAGAAAG	50	20	59.993	GGTCAATTCGCGTTAGGAC	50	20	59.574
	6	(AAGCCC)3	299	CAGGTGGTCGGGGTACTAGA	60	20	59.982	GGGGTTAGAAGGAAGGAGGA	55	20	59.508
	7	(AGAT)5	226	CCAAGTGGGCACAAGTAACA	50	20	59.609	GGTCTCGCCACAGATTGAGT	55	20	60.269
	8	(T)19	241	GGTTTGTACGAGGCACATGA	50	20	59.572	CGTTACTGCGGGTTGATTTT	45	20	59.996
	9	(TA)17	194	GTTGAGTGGGTGGTTGGTTT	50	20	59.721	ACGATGGACCTCTCTCCCTT	55	20	60.073
	10	(TTTAA)5	202	TGGGTTATCTGGGAGGTCAG	55	20	59.920	AAGGGTGAGGCAACAATAGG	50	20	59.052

Tabela 14. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de seqüências do cromossomo **LR828288.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828288.1	1	(TCGG)7	298	TGGCGATTTCTTCGCTATTC	45	20	60.310	CTCTTTCTTCGATTTTCGCGT	45	20	59.592
	2	(AT)19	227	CAACATCCCACAGAAGCAAA	45	20	59.691	GAGTCACAGCTCGATCCACA	55	20	59.988
	3	(ATTTT)5	286	GGATGGTTCTAGGGGCTATG	55	20	58.478	TGGAAACCTCTTGTGGTGAT	45	20	57.971
	4	(TTTAAA)3	231	TCAATCTGTAGTCGGCAATATG	40,91	22	57.808	CAAATCATCTCGACAAGCAA	40	20	57.412
	5	(GA)7	212	ACGAAGAAGATGGAGAGCCA	50	20	59.950	AGGTGAGAAGTGGAGCGTGT	55	20	59.907
	6	(ATC)5	292	CGTTTTCATCTTTCTTTCCCC	42,86	21	59.932	TGATGTCGATCCAGGTGTTG	50	20	60.534
	7	(AAAAT)6	189	TGCTCCACACATAGACCTGC	55	20	59.862	TTACCACCTGGGGACAACAT	50	20	60.088
	8	(A)11	270	AGTCCTACGAACGATTGCTCA	47,62	21	59.890	AAGGCGTGACTTTGGATTTG	45	20	60.110
	9	(A)15	183	GGGTGGTTGTATTTTCGATGG	50	20	60.051	TTTCACTTGAGCTTCATGGCT	42,86	21	60.008
	10	(GGGGTT)3	300	GATGAGGAGAGGATGGGGAT	55	20	60.242	ATCAGCAAGAACGACTTCCG	50	20	60.397

Tabela 15. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828289.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ-ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828289.1	1	(ACA)8	222	AAATCTGACGATCTTTGCACAC	40,91	22	59.246	TGGAACTCTGATGCTTGTGG	50	20	59.831
	2	(GA)30	174	CCACAAGCTCACAAAGCTCA	50	20	60.175	TCCACCAATTCTCTTCACC	50	20	59.903
	3	(ATT)5	154	TGCGATACAGTTCAGACAGTGA	45,45	22	59.515	GCAGAGATGCCAACGAAAA	47,37	19	59.940
	4	(A)10	189	TGTTTCATCCTGTGCAAAAGC	45	20	59.847	CAAGTCGTATCCCCAAGCAT	50	20	59.955
	5	(CT)27	286	GGAGCCCGTTTGCTACTGA	57,89	19	61.332	AAAACCTTGCGTGTATCATCGT	40,91	22	60.779
	6	(AGAT)5	244	CCAAGTAGGCACAAGCAACA	50	20	59.904	GTGAGTTATTGGCGAACCT	50	20	59.056
	7	(T)45	255	TCGACTATCCTGCTGTAAACG	47,62	21	58.068	AAGTACCCACAGTTACCGGC	55	20	58.983
	8	(AACCCG)3	168	TAGAGATGTCAACGGGTCGG	55	20	61.055	AATTTTCGGGTTTCGGGTTTC	47,37	19	61.038
	9	(TCC)5	291	TCTCCGACCTCGAATCCTTA	50	20	59.767	AGATGAGGGTGTCCAGACG	55	20	60.112
	10	(TAA)7	296	TGCAAAGGTTTCGGAGTTTCT	45	20	59.853	CTAGATGTGGCGGGTTTAGG	55	20	59.587

Tabela 16. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de seqüências do cromossomo **LR828290.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ-ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828290.1	1	(ATT)10	294	TCGTTGTCCTCGCATATCCT	50	20	60.624	TGAAAGGGGAAGGAAGGAAG	50	20	60.540
	2	(TTTTAA)5	186	AGAGCTGGTTCCTCTCCTCC	60	20	59.952	GCTGTATTCTGACCTCGTCGT	52,38	21	59.372
	3	(TATT)6	250	TGGTGGATTATTTGGAAGGC	45	20	59.762	GCACGCTACCTGCTTCATTT	50	20	60.416
	4	(A)17	212	TATAGCAAGTGCCAAAGGGC	50	20	60.230	CAAGTAAGAGATGAAATGGCGA	40,91	22	59.361
	5	(AG)20	235	AAAGTTGCAGGATGTGAGGG	50	20	60.111	ATTGGGAACCCGAAAAGAGT	45	20	59.805
	6	(CGT)5	300	CGGGTCAACCTATCACGAAG	55	20	60.508	AGAAGAGAGCGACGGCAAC	57,89	19	60.694
	7	(AGA)7	275	AGCCCACTCCCTCTCTCATT	55	20	60.216	CCAAAGCTCAAACCCAAAA	40	20	60.081
	8	(GA)15	297	GGTCGGTTCGGTAAAGAATCA	50	20	59.933	GTTTCGGGGTTATAGCAGCA	50	20	60.096
	9	(GGGTG)5	300	GGAAAAGGGGAGATGGTGAT	50	20	60.133	GCCCTAAACCCTAAACCCAA	50	20	60.177
	10	(CGGAAT)3	175	GGCGTGTTTGGTTCACCTCT	50	20	60.156	ATTCAACTTCCAATCCGGC	47.37	19	59.886

Tabela 17. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828291.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828291.1	1	(TAAGG)8	297	CGCTCTCGATACCCTGAAAA	50	20	60.344	CGCCCTGACCTTACCTTACC	60	20	60.865
	2	(TA)26	195	TCACCAAGTGCTTCATGCTA	45	20	57.997	CATGCTTACAAACTTCCGTAGA	40,91	22	57.168
	3	(CCG)7	260	CCTTCGGTGTAGGGCATCT	57,89	19	60.081	ATCAAGAACCCTTCGACGCAT	45	20	59.700
	4	(GAAGAT)3	288	ACTAGCAAATCCACCAAATCG	42,86	21	59.101	TGCAAGGGGAGGAGAAGAAGA	50	20	60.065
	5	(A)39	194	GTGAGAGGGTCTGTGGGAAA	55	20	60.088	AAGGAGTGGGATTCGGTTCT	50	20	59.935
	6	(TCT)5	257	TCACACTTACTGCATGGGGA	50	20	60.112	GCAGGGATAAACTGCACAGA	47,62	21	60.264
	7	(T)16	279	CGAGTTCCATTGTCACCCAT	50	20	60.780	GGTTGGCAGTTAGTACCCGA	55	20	59.993
	8	(G)11	204	AGGAGCGAGAAGAGGTTTTG	50	20	58.670	TGGTTCAAAGAGGGGAGAAA	45	20	59.641
	9	(AATA)7	275	CGATAGTTAATGGAGTTTCCG	42,86	21	56.472	TTCAGTGGTTTTGATGCTTG	40	20	57.316
	10	(CACG)8	152	GATTGCGATTTTGCGAGAG	47,37	19	59.514	CTTCAACAACCCATCCATCC	50	20	60.173

Tabela 18. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828292.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ-ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828292.1	1	(AAAAG)5	213	GGGCAATACCTTTCCCTTTC	50	20	59.777	TATAGTGCTGGATGGCGGA	52,63	19	60.189
	2	(ATTTTT)3	232	TCCAAAGATGTAGCAAGTTCCC	45,45	22	60.483	GCATTGTGAGAGAGGGTTTCTT	45,45	22	59.757
	3	(GA)7	209	ACGAGAGGAGGGAGAAGAGG	60	20	59.945	ACCCACCGCCCCTATAAAT	52,63	19	60.405
	4	(AAAT)8	286	TTGTTGTGCCATTACTGAA	40	20	57.605	TGAATGAATGTCAAGCACG	42,11	19	56.614
	5	(A)10	281	GGCTCAAATCGGCTTAAATTC	42,86	21	60.055	TGTGAGGCCGGAAAGATTAG	50	20	60.206
	6	(T)57	224	CTCGGTTTCTTCTTCTTCTTCT	40,91	22	56.191	TCCTAAAGCAAGTGGCAAA	42,11	19	57.087
	7	(GAT)5	299	CACGACATCCTCTCATTCCA	50	20	59.631	TCCTTCATCTACGCTATCCCC	52,38	21	60.425
	8	(AG)17	282	CGTCAGATCAAGGAGATCCA	50	20	58.747	GGGTTCCGTCATTAGCTCAC	55	20	59.556
	9	(AT)44	274	GCCCGACAAAGGTATGAAAA	45	20	59.938	CCTCCAACACATGCAGCTTA	50	20	59.864
	10	(AAGA)5	272	TATTGGATCGCTCTTTTGGG	45	20	60.031	CTTTGCCCTCTTCAACCAAG	50	20	59.846

Tabela 19. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828293.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828293.1	1	(TG)12	298	TGGATAACTTTGCTTGGCAT	40	20	58.241	TGTCACGTTTACAGGAGCAG	47,62	21	58.986
	2	(AAACA)5	264	GTTGGAGAACCAATGTCAAA	40	20	55.985	CAGAGGTACTGGTGGGAAAT	50	20	56.543
	3	(A)61	234	TGCATCTATGTGGTTTGATTGG	40,91	22	60.752	GGCCTTCTTTATGGCAAAGC	50	20	61.058
	4	(TTTA)6	209	CCAGGTGCGTTATTTTGTTA	40	20	56.345	AGGAAGGCTCGTGCTAAAG	52,63	19	57.315
	5	(TA)31	268	AGAGAGAGAGAGAGTCCGGCTA	54,55	22	58.998	AATCATAGGAGGGATCGCAA	45	20	59.486
	6	(GGC)5	157	GGAATGAAAGCTACCTCGGG	55	20	60.949	TCCCAACTCTGTCTCGCTCT	55	20	60.135
	7	(A)86	297	AGCCAGCGATTTACCACAAA	45	20	60.637	CTCCCTCTCCTCCCATCAAT	55	20	60.412
	8	(TATC)5	274	GGATCTTTGGCGAGGTAGC	57,89	19	59.788	CCGTCGATCTTCCACTAGA	55	20	60.210
	9	(TTTA)8	262	CTTAGATAGGTACGGGCGCA	55	20	60.244	AGGTCAAAGGACTGTGTGGTG	52,38	21	60.057
	10	(GAGATC)3	293	TCCCCATCCCCATTTTATTT	40	20	60.199	CGTCGCCATCGACTAGGAT	57,89	19	61.184

Tabela 20. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828294.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828294.1	1	(CCTAAA)3	245	ACCACCTAAACCCTAAACCC	50	20	56.947	CCGGTAGTCTTAGTTACGGC	55	20	56.577
	2	(AGAT)5	216	ATGCGTGCGGTAGATGAAA	47,37	19	60.235	GTCCTCCTGTTCTGCTCTG	60	20	59.986
	3	(GAAA)7	213	AATAGCAAGGTAGGCAACGG	50	20	59.248	GCCCATGAAAACAAACCAAT	40	20	59.668
	4	(CCTCG)6	157	CGACTCCTTTTCCTTTCCCT	50	20	59.685	GAACGATCTCAATTCGCACA	45	20	59.805
	5	(GA)20	253	GGTGCAGGCAACAAGTCTCT	55	20	60.453	GCAGGGGAGTTAGGGTTAGG	60	20	59.955
	6	(TA)10	246	AAACAACATGGGTGCTAGGC	50	20	60.000	CCGTGGGTTTAATTGTGAGG	50	20	60.220
	7	(A)22	249	TGTCCGTGTGAACAGTGGAT	50	20	60.005	TGTACTTCGTTCTCCCCTCC	55	20	59.137
	8	(TAT)5	150	CATGTACCCATCAGAGCAACA	47,62	21	59.581	ACCCTGCCACAGAAGAAGAA	50	20	59.844
	9	(G)11	233	AACAGTGCTGAGTTAAGTGCC	47,62	21	57.156	GCCAGAACAGAGTGCTCAAT	50	20	58.028
	10	(AATA)6	273	CACAGGGAGACAAAGTGAGA	50	20	56.280	GGGGCAAAGTGTAGGTTTT	47,37	19	56.650

Tabela 21. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828295.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ-ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828295.1	1	(CTTCT)6	300	AAAACCATCTTAGCCACCACC	47,62	21	60.235	AGTCCATCCCTGGTCAATCA	50	20	60.326
	2	(AATT)6	266	CCCCACGGTAATCACTCTTTT	47,62	21	60.228	ACCCAAGATTCCACTCCACA	50	20	60.363
	3	(TCG)5	230	TCCTCCTCCTTTTCTTCTCCA	47,62	21	60.305	CTCTTCCTCTTCCGGCTTG	57,89	19	60.073
	4	(TTAT)5	275	TTTAGTGCCCTTTTGTGGA	40	20	58.267	TTAGAGCCACAGGAGAGGTAAG	50	22	57.779
	5	(AGT)7	216	CGTATGAAGACGAAGCGAAA	45	20	59.062	CGTACTGGAAGCTGGCCTAC	60	20	59.898
	6	(T)37	297	GGGTGCTCTGCTTTAATTGC	50	20	59.851	CTTGATAGCCTCCCCTCAA	50	20	59.264
	7	(AT)38	290	ACTAGGTTGATGCCACACC	55	20	59.997	TGACGAGAATGCTAAGTGAAGG	45,45	22	59.517
	8	(GT)12	275	AAAAGTTGGAGAAGCCCAT	45	20	59.940	GAGAAGGGGAAAGGGAAGT	55	20	60.045
	9	(AGAT)5	281	ACTCAGCCCTGCAACAAAGT	50	20	59.914	TCGGGTTAGTCAAGTGATTGG	47,62	21	59.978
	10	(TTCTGC)3	298	CCTTTGAGGACCATTACCTCC	52,38	21	59.813	TCATGTGTATGTTGCCCGTT	45	20	59.847

Tabela 22. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828296.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ-ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828296.1	1	(AT)16	272	GAATCCAACCCGACTACCAA	50	20	59.790	TTTGTTTATACCCGATCCGAG	42,86	21	58.953
	2	(AAGA)5	293	CGCAGAAAGGATGAGAGGTC	55	20	59.950	TTGAGAGGTCCGAAGAAACG	50	20	60.366
	3	(CTT)7	170	GTCTCAAACAGCGCAACTTCT	47,62	21	59.676	GACCACTATATGCCGTGGCT	55	20	59.985
	4	(C)10	236	CCGCGACTTTATTTGGAATG	45	20	60.448	GCTTGATGGGAATTGGAAGA	45	20	60.014
	5	(CTATTG)6	270	CACCTTGAACCATGAGACC	55	20	60.363	CTGAACTCGCGTGGAGGTAG	60	20	60.984
	6	(CT)17	209	AGTCAGCAACAAAAGAAGTGC	42,86	21	57.279	GGTATGAACCACAACCACG	52,63	19	57.189
	7	(ATTT)6	220	CGATCCAATAGGGAGGCTTT	50	20	60.411	ACAATTCACAAGGACAGGGTTT	40,91	22	59.773
	8	(TGCA)5	170	GTGGTGAGCTGTGTTCCCTT	55	20	60.159	AAAGGAGGTGGTCACAATGC	50	20	59.973
	9	(CA)17	206	TCCCTCGAAACACACACAAA	45	20	60.128	GAGTTGGGAGTAAACGGGGT	55	20	60.225
	10	(AGCCG)6	161	GCTCAATTTTCATCGCCATT	40	20	60.045	GATGTTCGGCACTCTTTTCC	50	20	59.676

Tabela 23. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828297.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
PRODUTO											
LR828297.1	1	(TTG)11	272	ATTGCCACCATCTCGTCCT	52,63	19	60.491	GTCTACAGTTTCGGCGTGCT	55	20	60.462
	2	(GGGGGA)3	290	AGAGAGAGAGAAAATGCCCGC	55	20	61.010	AAGAGGATCACCCGGAAGCTC	55	20	60.456
	3	(TA)15	240	TTACTTCCTTCGGGAATGGTC	47,62	21	60.305	CATCATCGAAAACGGCTCA	47,37	19	60.763
	4	(A)21	300	CTTTGCCACTTGTTCTAGGGA	47,62	21	59.364	TCGTCAGCTTCTCCGCTAAT	50	20	60.118
	5	(GAA)17	178	CTCGTCATCAATGTCCGCTA	50	20	59.823	GTAGCACAGGGGAAGCAAAG	55	20	59.875
	6	(TTTA)5	298	TATCGAACACCAGCGAGATG	50	20	59.823	GCAGGGGCACTAACTTTTGA	50	20	60.249
	7	(ATCT)6	203	AGCAAAAATGGTAGGCTTGTT	40	20	56.541	CCTGCAATAAAAATGGGGTAA	40	20	57.520
	8	(AT)12	197	AGAGGTTCTTCGGCACTTGA	50	20	59.989	GTCGCCATCTTGCTCTATCC	55	20	59.803
	9	(AT)29	274	AATCGAACGACCAGAAGCAC	50	20	60.263	GCTAGATCCCTGTCCATCCC	60	20	60.822
	10	(AAATTA)4	290	CTGAGCCTTGGTGTAAGTGA	47,62	21	58.023	TCGAGTCCCAAATCAAAG	40	20	57.795

Tabela 24. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828298.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828298.1	1	(CCG) ₆	247	TTTCTCTCGTCGTCTCGGAT	50	20	59.950	GGGGTTTGGATTTGTAGGGT	50	20	59.919
	2	(T) ₁₉	182	ACCAACTTAATAGGGTCCGTG	47,62	21	57.996	AGCCACAGAAGAGGGACAAT	50	20	58.744
	3	(AAGA) ₅	268	GCCAGTCAGCAGCAGTAACA	55	20	60.207	GCCCAAGAACCTCAAAACAA	45	20	60.088
	4	(TA) ₁₄	295	ATTCGGAGTGGATCGTGATT	45	20	59.366	AATAGCAGCCTACCGGACCT	55	20	60.117
	5	(CT) ₁₇	222	TCAGGCTAATGATGTCGAAAAG	40,91	22	59.361	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	50	22	58.828
	6	(T) ₂₇	272	ACATTCTTGATGGACGGACA	45	20	58.933	TAGAGCAAGTGGCAAAGGGT	50	20	59.875
	7	(AAATAT) ₆	264	ACAAAGTTCAGGGCTCATGC	50	20	60.263	CCACATCATTATCCGAACGA	45	20	59.350
	8	(TTAT) ₅	251	ATGCACCGTTTCCTTTTGAC	45	20	59.978	ATAAATCCCCTTGGCAGCTT	45	20	59.930
	9	(CCAC) ₅	172	CTCTCTCTCTCTCTACCCGA	54,55	22	57.096	CTTTAGTGTGTGTTTGGATTGG	40,91	22	57.220
	10	(GTA) ₅	245	AAACGACATCCTCTCCGTG	50	20	60.111	AGCGAGAAGGGTGAGACAAA	50	20	59.989

Tabela 25. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828299.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
PRODUTO											
LR828299.1	1	(TCC)5	163	GCTTTCTTGACCGCTACTGC	55	20	60.162	TCTCAGGTGTTTGGGCTCTT	50	20	59.844
	2	(TTAAAA)3	291	ACTACCCCATCTCCAATCCC	55	20	60.015	TAATCGCAAATGAGTTCGCA	40	20	60.356
	3	(AATA)7	269	CCATATCGTCGTCGCTCTCT	55	20	60.384	TTTTGCTGATGGTTTTGCAG	40	20	59.849
	4	(AT)16	298	AATTGAGGAAGACGGCGAAT	45	20	60.959	CTTGGTGGTTGGTATCCGAG	55	20	60.366
	5	(GATA)5	172	CTCCACCGATCTTCCCACTA	55	20	60.065	TGAGGCATAGTCGCATGTGT	50	20	60.296
	6	(AT)28	300	ACCTGGCGTTTTATTGTTGG	45	20	59.861	GATTTGCCATTGATTGATGC	40	20	58.923
	7	(AACCCG)4	276	ATATGCCTCCTCTTTGTCGG	50	20	59.150	TTCGGGTTTGGATATGGATT	40	20	59.091
	8	(CGG)8	150	AGAGCGAGAGCGATTTGGT	52,63	19	60.111	TCTTGCAGTTCTTCCAGTCG	50	20	59.161
	9	(ATTT)5	300	AACCCACCACCTTTTCCTG	52,63	19	59.805	GTCCAAGGGCAACTCTCAAG	55	20	59.844
	10	(A)60	288	TTCTCCTCCTCCCTTACTCA	50	22	60.239	TTCTCCCGGTCGTTTACATC	50	20	59.933

Tabela 26. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828300.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828300.1	1	(AAAG)8	202	GATCAGCCCGGAATAGGAA	52,63	19	59.983	CTGACTAAGGCCCACTACGG	60	20	59.751
	2	(TA)31	206	GAAACCCGAACCTGAACCTA	50	20	59.028	CGACCTGAACCCGAATTTAT	45	20	58.903
	3	(AG)20	244	AAGTGCTAGGCATTGTTCTGC	47,62	21	59.536	TTCACCTTGATCCCATTGA	40	20	58.897
	4	(TGTA)6	276	ACGAAGCGAAGAAGTGATGAA	42,86	21	60.008	ACACACACACACACACGCAC	55	20	60.177
	5	(AGA)5	238	TTGAGGGGTTTGGTTGGATA	45	20	60.162	TGGTGAGGAGAGGAAGAGGA	55	20	59.913
	6	(A)16	291	GCCAACGCAATTAGAAAGA	42,11	19	56.562	TAGTTATCTCTTGCCATGC	42,86	21	55.587
	7	(TTAT)5	194	TTGGATATTCTTCGGTTGCT	40	20	57.306	AAGGAAAGTCTGCCAAATCA	40	20	57.393
	8	(GTAT)7	182	TTAACACACAACAACCTTGGGG	40,91	22	59.801	GTGAATCCTCTGCTCCAACC	55	20	59.661
	9	(TCGGAA)3	280	GAGCCAGTTCGCTTCTCATC	55	20	60.104	CCGATTTTCGATTCCACCTTA	45	20	59.894
	10	(ATT)9	272	CCGCTAATCGTCAGTTTCATC	47,62	21	59.722	CGCAGATTCCCTTTCAGATT	45	20	59.269

Tabela 27. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828301.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828301.1	1	(AATA)6	300	TCTTTTGTACGCTCTGCCC	50	20	60.386	TGAAAGTAAATGACGAGCCCA	42,86	21	60.623
	2	(AATTT)5	278	TTTGAAGAGGAAACAGGGGA	45	20	59.641	CACCGAAGAGAGAACCCAGA	55	20	60.377
	3	(TG)21	297	CGAGGGCAATAAAGTCTCCA	50	20	60.206	CCAAACAAAATATCGGGACG	45	20	60.181
	4	(A)49	243	CGTCATCATCATCAGGCAAG	50	20	60.225	GAATTAGGCGACATTAGCGG	50	20	59.704
	5	(AGCT)6	242	GGAGAAGGCAGCAGCAGTAT	55	20	59.603	AAATGCAGTCCACAGGTTCC	50	20	59.973
	6	(ATCCAT)3	216	AAAATAAATTCGGGTTCTGGG	40	20	60.016	GGGATGTCAATGGGTATGGA	50	20	60.404
	7	(AATATA)4	182	TTTGTGCATGTCTAATGGCTG	42,86	21	59.744	AAGCCCCTATCACTCTTTGATG	45,45	22	59.615
	8	(AG)26	163	ACAAGTGTTCCACCAAACC	50	20	59.721	GCCTCAGAAAATGCAGGAAA	45	20	60.331
	9	(TATT)6	279	GTTTCGCCACGACTTTTAG	50	20	59.747	CGGTCCTGATCTTTGAATCG	50	20	60.594
	10	(GAG)9	177	AGGGTTTCGTTTCTTCAGCA	45	20	59.853	CCTCCACCTCCTCATCTTCA	55	20	60.191

Tabela 28. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828302.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828302.1	1	(CCTAAA)3	227	TGAGAACCCTAACAACCCTG	50	20	57.644	TTAAGGCGTTTAGCTGGTT	40	20	56.808
	2	(AT)26	189	CTTGGAAGTACGGAAGGCTC	55	20	58.934	CTTGAATCCTTGCATGTGGA	45	20	59.648
	3	(ATT)9	247	CTATTCGATATGTTTCGCGG	45	20	58.278	GCTTAGGGGTCTTGCACATT	50	20	59.198
	4	(A)35	247	CCGATCCCATTGAAAGAAAA	40	20	59.872	CGAGCTTTGTAGCACAGACG	55	20	59.805
	5	(AGA)5	241	ATAGCCATTCCACCCTCTCC	55	20	60.293	CTCTCAAGACGCCTCCAAAC	55	20	59.989
	6	(GA)14	216	CACCGTACTCGCCTACCCTA	60	20	60.147	TCTCTCTCTCGCTCTCTGGC	60	20	60.120
	7	(TATAT)7	293	TTATGGGGCCTTAGCAAATC	45	20	59.035	TTTTGAATTGTGTCATCGGC	40	20	59.523
	8	(C)10	201	GACAGAAGCGGCACTACACA	55	20	60.056	CCTCTGAAATGAACCATCCAA	42,86	21	59.918
	9	(ATTA)7	244	GATTGAGATTGAGATCCGTGG	47,62	21	59.498	TATAAACACCCCACCCCTTC	50	20	58.620
	10	(GATC)5	300	ATGGTCGAATTGCAGTCACA	45	20	60.120	CGTAAGATCCTCGGCTAACG	55	20	59.861

Tabela 29. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828303.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
PRODUTO											
LR828303.1	1	(ATA)11	259	GGAAGCACTATCATCGAAAACA	40,91	22	59.229	TTCCAGCCCAACTCTCTCTC	55	20	59.530
	2	(TCAC)6	229	CCACTTTCTCTCGTCCCCTT	55	20	60.619	AGAGCCGTTTCCGTCTCAC	57,89	19	60.402
	3	(AAAT)5	255	CATTTGCTGTCCTTGGGAAT	45	20	59.933	ATCCTGGGGAAAGTCCATTT	45	20	59.629
	4	(CGGCT)6	193	CTCGGGTATTGGACTCATCCT	52,38	21	60.334	GAGAACGAAAGCTCGTCGC	57,89	19	61.224
	5	(AAAAAG)3	296	TGCCATGTTGCATAGAGTGA	45	20	58.810	CGACACATTGAAAATAAGTGCC	40,91	22	59.519
	6	(G)10	162	GGGTAGGTGAGGGGTTGTTT	55	20	60.088	ACCGTGTTCCTCCTCCTT	55	20	60.111
	7	(TGTA)5	177	TCAACCAATCACCCACTCAA	45	20	59.935	CTTGACGTATCCTCCAAGTGC	52,38	21	59.749
	8	(A)66	267	TCCAATTCCACCACTAGG	52,63	19	58.344	GGCTTGTGAAGAGTTTATTTGG	40,91	22	57.940
	9	(AG)7	267	GCATCGGTACAGGGGTAAGA	55	20	59.955	AACCTCTCCCCGCATTTTAG	50	20	60.443
	10	(TG)7	279	CCCTCCTAGCTCCACCTCTT	60	20	59.834	TCAGTGTGAGACCAGACCCA	55	20	60.293

Tabela 30. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828304.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
PRODUTO											
LR828304.1	1	(TAA)5	209	TTCTCCAACAAAGCAAATCC	40	20	57.793	CAGCAAAGGTTCCCTACACA	50	20	58.773
	2	(TA)28	266	TGGATGGGGAGTTTAGGTTG	50	20	59.784	ACTTTTAAGGACGAAGGGCTC	47,62	21	58.904
	3	(A)41	285	TCTCCACCCTATCCCTTTCA	50	20	59.478	TTGGCAGGCTATTTGACCTC	50	20	60.214
	4	(GTA)8	220	CGTGCGGAAAAGAGGATTAG	50	20	59.839	AGCACACGTACAAAGCAAGC	50	20	59.151
	5	(GAA)5	230	GTGCCCCGTGTTCTTACAG	57,89	19	59.150	CAAACCTGACCAAATGCCCT	45	20	59.971
	6	(T)26	280	GCGTGAACAATAACTCCCCT	50	20	59.056	GCCTCCTACGCTGTGTCTTC	60	20	60.020
	7	(GAATTT)3	188	GTGGGTGGTTGGGTGAGTAG	60	20	60.275	AACGCTTTTCGCAGTACCAG	50	20	60.440
	8	(AGAGGG)3	293	TTCTTTCCCTTTCTCCCTC	50	20	59.623	CCCTCTTTCTCTTCGCCTTT	50	20	59.955
	9	(CTAT)5	220	TGTTGCGAGTATTGTGTGGG	50	20	60.574	CAATCCCAGGTCTTCATGCT	50	20	60.073
	10	(GATA)5	160	CGCATCAACAGCCTTACAGA	50	20	60.011	CCCTTCTTCCCTCGTCTCTT	55	20	59.811

Tabela 31. Regiões microssatélites e primers SSR desenhados a partir de sequências do cromossomo **LR828305.1** do genoma de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) depositadas no GenBank/NCBI

CÓDIGO GENBANK	SEQ- ID	MOTIVO	TAMANHO DO PRODUTO	PRIMER - DIRETO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)	PRIMER - REVERSO	GC (%)	Nº DE pb	TM (°C)
LR828305.1	1	(CCCTAA)3	300	AAACCCAAAACCCTAAACCC	45	20	59.088	TGGCACAGGTTGATCCATTA	45	20	59.924
	2	(A)50	289	AATGAATGAAGCGGGTAGCA	45	20	60.606	CCATCGGCCCAAATACTTA	45	20	59.789
	3	(G)15	298	TTTCTCTCCTCCTTCTGCCTC	52,38	21	60.081	TCTTTCTCATTCCCCTCTGC	50	20	59.361
	4	(ATTT)5	227	CATACGCCAAGTGAAGCTGA	50	20	60.011	CCTGCAAACCGAAATAGGA	45	20	60.067
	5	(AAAGA)6	288	GCAGCAGCCTAAGAAGGAAC	55	20	59.222	GCCCAAATACTTCAATTCCG	45	20	59.411
	6	(TA)16	172	ATTTTCGGCAAGTGATTTTCG	40	20	60.074	ATATAGAGTGCGTCTGGGGTG	52,38	21	59.091
	7	(GCG)5	298	CGCTTTTCTCCTCCTCCTCT	55	20	60.088	TGCTCCCGAACAATTCAAAC	45	20	61.012
	8	(TTTA)6	293	CAATTCACATTTTGGGTCTGC	42,86	21	60.359	GGGCATCTCAACCTCTTTTG	50	20	59.670
	9	(TATAT)8	225	CGCTGAAAATAGAGTCGGTTCA	45,45	22	61.621	TTTGGGCTTCTCCATAAACCTT	40,91	22	61.133
	10	(ATTTTT)3	256	CGACTCTCCTCCTCCTCAA	55	20	59.525	TATGTTTCTCTCGGCCTTCG	50	20	60.344

Desse total, foi possível observar que as repetições de tetranucleotídeos tiveram uma maior predominância (23%) em relação aos outros tipos de repetições. As porcentagens para os outros tipos de repetições foram: dinucleotídeos (22%) e trinucleotídeos (18%). As repetições de mono, hexa e pentanucleotídeos foram menos predominantes (16, 14 e 7%, respectivamente) (Figura 4).

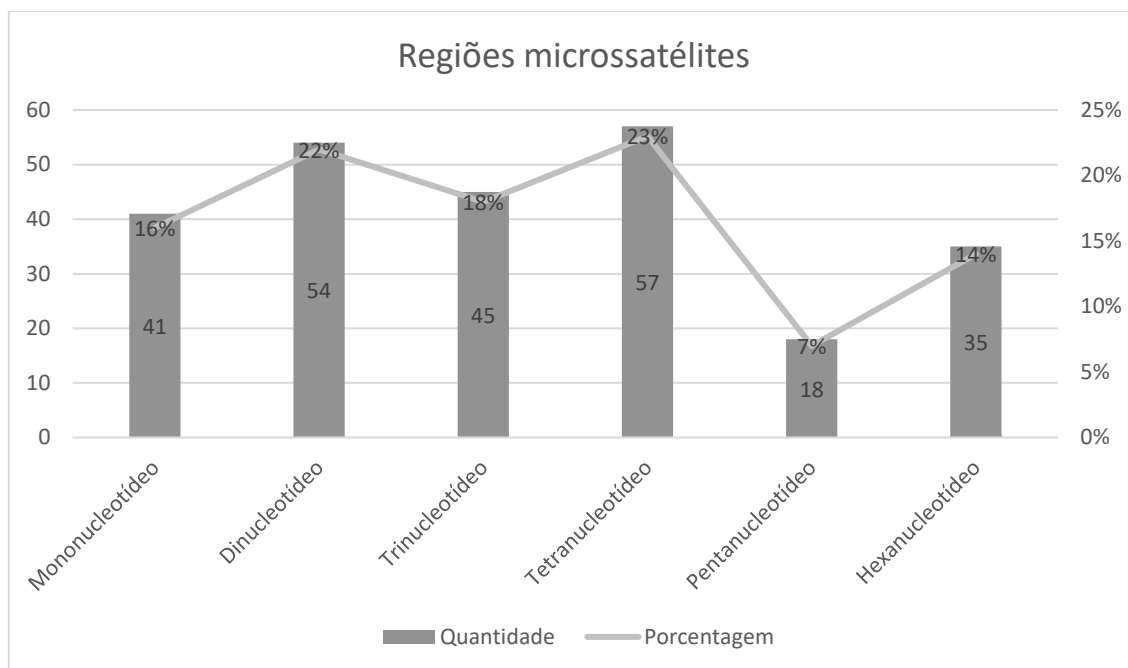


Figura 4. Caracterização quanto aos motivos de repetições microssatélites identificados em 250 regiões do genoma de *A. comosus* var. *comosus*.

Das repetições de dinucleotídeos, os motivos AT/TA (44%) e AG/GA (30%) foram os mais abundantes, em contrapartida não foram identificados motivos GC/CG (Figura 5), resultado similar ao encontrado por Gupta et al. (2010) em um estudo sobre a família Solanaceae, em que os motivos AT/TA foram os mais frequentes e os motivos GC/CG tiveram a menor frequência. Segundo Benor et al. (2008) as repetições AT/TA, seguidas das repetições CT/GA, são os tipos de SSR mais frequentes em plantas e de acordo com Buso et al (2003) o motivo (CA)_n é o menos frequente.

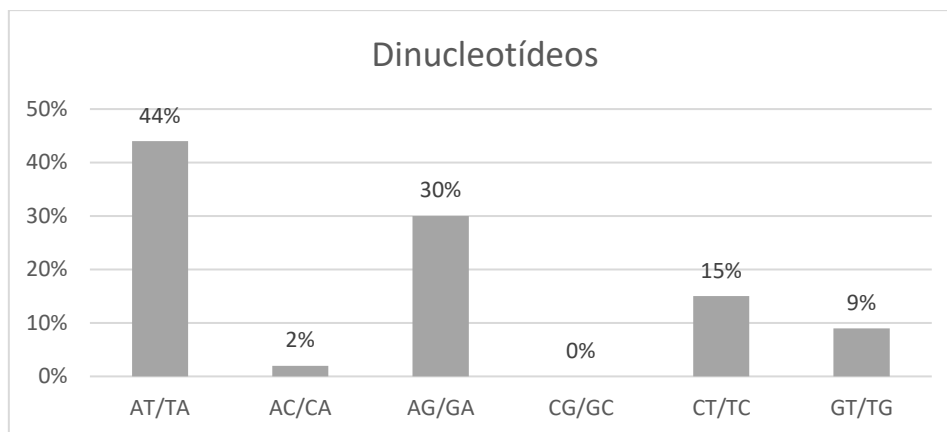


Figura 5. Porcentagem das repetições de dinucleotídeos selecionadas do genoma de *A. comosus* var. *comosus*.

Dentre as repetições de trinucleotídeos, os motivos mais frequentes foram ATT/TAA/AAT/TTA/ATA/TAT (24%), seguidos dos motivos GAA/AAG/AGA/GAG (22%) (Figura 6).

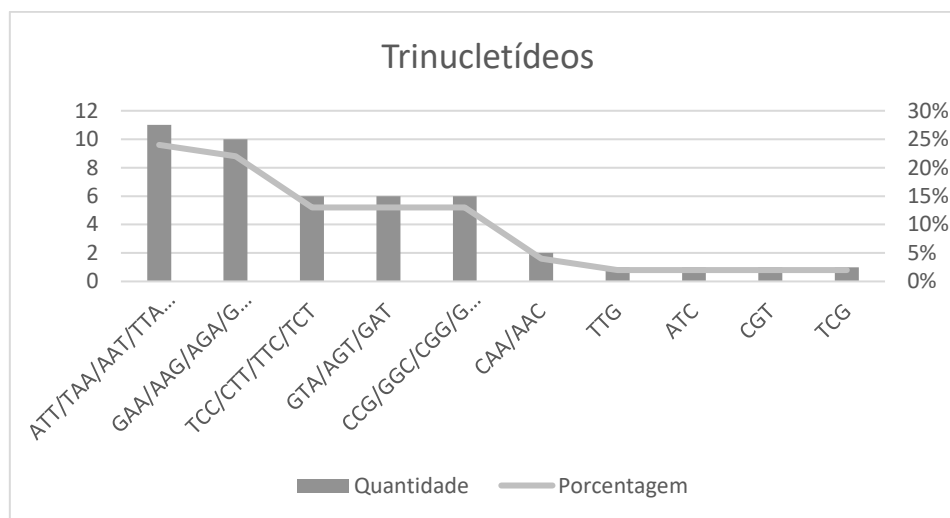


Figura 6. Distribuição das repetições de trinucleotídeos selecionados do genoma de *A. comosus* var. *comosus*.

De forma semelhante, os tetranucleotídeos compostos somente por adenina (A) e timina (T), os motivos ATTT/TTTA/AATA/TTAT/AAAT/TATT/ATTA/AATT/TAAT (42%), foram os mais abundantes, seguidos de AGAT/TATG/TGTA/GTAT/GATA (19%) (Figura 7), esse resultado assemelha-se ao de Gupta et al. (2010).

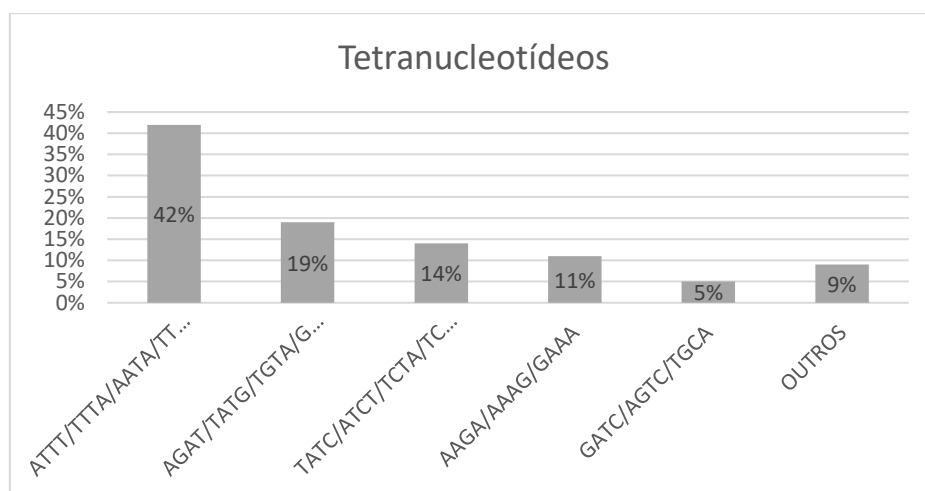


Figura 7. Distribuição das repetições de tetranucleotídeos selecionados do genoma de *A. comosus* var. *comosus*.

No que concerne aos pares de primers SSR desenhados, a concentração média de GC e o tamanho dos pares de primers foram, respectivamente, 49,3% e 20,2 pb (Figura 7), esses valores estão de acordo com o esperado, tendo em vista que, segundo Queiroz et al. (2017) a porcentagem de GC (guanina e citosina) não pode ultrapassar 60% e o tamanho (pb) dever ser de aproximadamente 20pb para que não haja o aumento da temperatura de anelamento e dissociação. A média da temperatura de melting (T_m) foi de 59,652 °C (Figura 8).

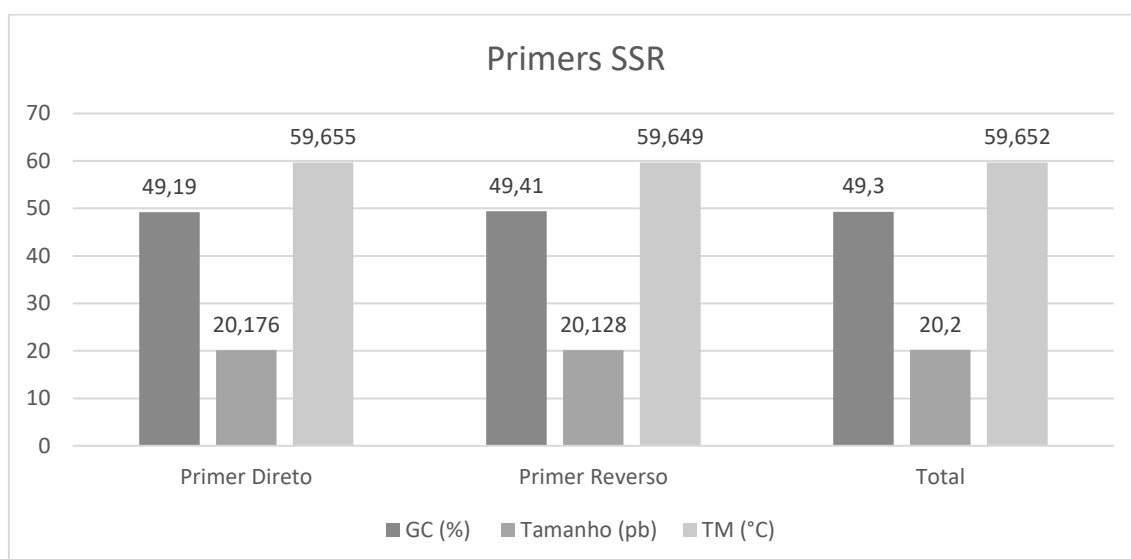


Figura 8. Médias das porcentagens de GC (guanina e citosina), dos tamanhos (pb) e das temperaturas de melting (°C) dos pares de primers SSR desenhados.

Considerações Finais

Conclui-se que é possível extrair DNA de *A. nahoumii* por meio da maceração das folhas desidratadas em sílica e com a utilização do tampão de extração e de areia lavada. A padronização da PCR para iniciadores RAPD, em *A. nahoumii*, foi possível com o ajuste da temperatura de anelamento para 35° C e a utilização de uma menor quantidade de MgCl₂ (1,25µl) no mix de PCR. Dos primers RAPD analisados, oito são indicados para aplicação dos marcadores RAPD na espécie.

Através do vasculhamento do genoma de *A. comosus* var. *comosus* foi possível identificar 250 regiões microssatélites. Destas, foi possível desenhar 250 pares de primers SSR. Dentre as regiões microssatélites identificadas, as repetições de tetra, di e trinucleotídeos foram as mais abundantes. Os primers desenhados apresentaram tanto a porcentagem de GC, quanto o tamanho e a temperatura de melting ideais para a amplificação. Os resultados obtidos nesse trabalho poderão ser utilizados em estudos genéticos em *A. nahoumii* por meio da transferibilidade, bem como no abacaxizeiro e outras espécies correlatas.

Referências Bibliográficas

ARUMUGAM, T.; JAYAPRIYA, G.; SEKAR, T. Molecular fingerprinting of the Indian medicinal plant *Strychnos minor* Dennst. **Biotechnology Reports**, v. 21, p. e00318, 2019.

BARBARÁ, T. et al. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 18, p. 3759-3767, 2007.⁽¹⁾

BARBARÁ, T. et al. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 1981-1992, 2007.⁽²⁾

BENOR, S.; ZHANG, M.; WANG, Z.; ZHANG, H. Assessment of genetic variation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) inbred lines using SSR molecular markers. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 35, n. 6, p. 373-379, 2008.

- BHAGAVATHY, S. et al. Purificação, caracterização e aplicação de bromelaína de *Ananas comosus*. **Journal of Applied and Advanced Research**, v. 4, n. 5, pág. 133-140, 2019.
- BUSO, G. S. C. et al. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2003.
- CAIXETA, R. P. et al. Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectadas por meio de marcadores moleculares. **Revista Árvore**, v. 27, n. 3, p. 357-363, 2003.
- CARR, M. K. V. The water relations and irrigation requirements of pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*): a review. **Experimental Agriculture**, v. 48, n. 4, p. 488, 2012.
- CEITA, G. O. et al. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, n. 1, p. 189-193, 2008.
- COPPENS D'EECKENBRUGGE, Geo. et al. *Ananas*. In: **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 21-41, 2011.
- COPPENS D'EECKENBRUGGE, Geo., Leal, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: **The pineapple: botany, production, and uses**, CABI Publishing, Oxon, UK, p. 13–32, 2003.
- COSTA, M. R.; OLIVEIRA, M. Extração de DNA de açaizeiro a partir de folhas. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2002.
- DE RUSSO GODOY, F. M.; PAGGI, G. M.; PALMA-SILVA, C. Cross-amplification of nuclear microsatellite markers in *Aechmea distichantha* Lem.(Bromeliaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 42, n. 2, p. 353-359, 2019.
- DE SOUSA, N. et al. An integrated genetic map of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). **Scientia Horticulturae**, v. 157, p. 113-118, 2013.
- DEVI, K. D.; PUNYARANI, K.; SINGH, N. S.; DEVI, H. S. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales – suitable for diverse PCR based downstream applications. Springer Plus, v. 2, n. 1, p. 669 - 676, 2013.

DOS SANTOS, A. C. S. et al. Otimização do protocolo de extração de DNA de guajuvira. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 9, n. 11, 2018.

DOYLE, J. J. Arapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.**, v. 19, p. 11-15, 1987.

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

FAVORETO, F. C.; COUTO, D. R. ; NOGUEIRA, E. U. ; MIRANDA, F. D. ; SOARES, T. C. B ; LIMA, A. B. P. L. Seleção de primers RAPD para caracterização molecular de *Aechmea ramosa* (BROMELIACEAE) ocorrentes no Distrito de Burarama, município de Cachoeiro de Itapemirim-ES. In: XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, X Encontro Latino Americano de Pós Graduação, IV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica Júnior - Biodiversidade: Conservação, preservação e Recuperação, 2010, São José dos Campos. XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. São José dos Campos: Universidade Vale do Paraíba, 2010.

FORZZA, R. CAMPOSTRINI et al. Bromeliaceae. **Livro vermelho da flora do Brasil**, p. 315-396, 2013.

FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 78-88, 2006.

FRANKHAM, R. et al. Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto, SP: Editora da Sociedade Brasileira de Genética, 280 p. 2004.

FREITAS, P. D. Estudos de diversidade genética em camarões utilizando marcadores moleculares: manual prático. **São Carlos: UFSCAR**, 2005.

GALETTI JR, P. M. et al. Genética da conservação brasileira. **Fundamentos de Genética da Conservação**, p. 244-274, 2008.

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

GARCÍA, M. D.; SERRANO, H. La piña, *Ananas comosus* (L.) Merr.(Bromeliaceae), algo más que un fruto dulce y jugoso. **ContactoS**, v. 56, p. 55-61, 2005.

GITÁI, J.; BENKO-ISEPPON, A. M. **Contribuição de Características Citogenéticas e Moleculares à Sistemática de Bromeliaceae**. 2006. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

GOMES, C. C.; MOURA, T. M. Estrutura Genética em populações de plantas do cerrado. *Revista Agrotecnologia*, v. 1, n. 1, p. 33-52, 2010. HU, Y. et al. Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis. *Journal Biochemical Systematics and Ecology*. v. 1, n. 38, p. 264-274, 2010.

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

GUPTA, S.; TRIPATHI, K. P.; ROY, S.; SHARMA, A. Analysis of unigene derived microsatellite markers in family Solanaceae. **Bioinformation**, v. 5, n. 3, p. 113, 2010.

KAMADA, T. et al. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 403-409, 2009.

LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. Bromélias na natureza. **Marigo Comunicação Visual, Rio de Janeiro**, 1993.

LIMA, P.S. C. et al. Otimização de reação e seleção de primers RAPD para uso na caracterização molecular de castanha-de-sapucaia (*Lecythis pisonis Cambess*).

In: **Embrapa Meio-Norte-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21., 2010, Natal. Frutas: saúde, inovação e responsabilidade: anais. Natal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2010.

LOPES NETO, J. J. et al. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação de atividades biológicas do fruto de *Ananas comosus* var. *Comosus* (L.) merril (bromeliaceae). **Gaia scientia**, v. 90, p. 164-171, 2015.

MARTINELLI, G. et al. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 209-258, 2008.

- MARTINS, W. S. et al. WebSat-A web software for microsatellite marker development. **Bioinformatics**, v. 3, n. 6, p. 282, 2009.
- MASON, A. S. SSR genotyping. In: **Plant genotyping**. Humana Press, New York, NY, p. 77-89. 2015.
- MITTERMEIER, R. A. et al. Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. **Biodiversity Hotspots**, p. 3–22, 2011.
- MOTA, G. B. Otimização de protocolo para extração de DNA em *Physalis ixocarpa* e *philadelphica*. **Anais Seminário de Iniciação Científica**, n. 22, 2019.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. NCBI shotgun assembly sequences: Genome (WGS) and Transcriptome (TSA). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: Out. 2020.
- OLIVEIRA, MC de S. et al. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE)**, 2007.
- PALMA-SILVA, C. et al. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 4, p. 654-657, 2007.
- PREMIER BIOSOFT. NetPrimer. Available at: <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>>. Acessado em: Out. 2020.
- PRIMARCK, R. B.; RODRIGUES, E. *Biologia a Conservação*. Primeira edição. Londrina: Editora Planta, 328 p. 2001.
- QUEIROZ, J. A. S.; ALVES, L. S.; DALL'ACQUA, D. S. V.; SOUZA, L. F. B. Desenho e Validação de Primers In Silico para Detecção do Vírus Sincicial Respiratório Humano. **Revista FIMCA**, v. 4, n 1, p. 17-30, 2017.
- RIBEIRO M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: A Shrinking Biodiversity Hotspot. In: Zachos F., Habel J. (eds) *Biodiversity Hotspots: Distribution and protection of conservation priority areas*. Berlin, Heidelberg: Ed. Springer, p 405-434. 2011.
- RODRÍGUEZ, D. et al. Polymorphic microsatellite markers in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Scientia Horticulturae**, v. 156, p. 127-130, 2013.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia**, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.

SEIBEL, L. F. B.; LEMOS, M.; LIFSCHITZ, S. Bancos de dados de genoma.

In: **Procs. of the Brazilian Databases Symposium Tutorials**. 2000. p. 514-553.

SIDALC, BDAGBAMB. Título: Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. P. imprensa: Brasília, DF (Brazil). 404 p. 2002.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. **Recursos genéticos e melhoramento—plantas. Rondonópolis: Fundação MT**, p. 939-965, 2001.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*, 1(1), 132-138, 2005.

VERSIEUX, L. M. **Sistemática, filogenia e morfologia de *Alcantarea* (Bromeliaceae)**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. Flora da Bahia: Bromeliaceae-*Alcantarea*. **Sitientibus. Série Ciências Biológicas**, v. 10, p. 147-151, 2010.

VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. Two new species of *Alcantarea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae) from Brazil. *Brittonia*, v. 59, n. 1, p. 57-64, 2007.

VITÓRIA, A. P., ALVES, L. F. E SANTIAGO, L. S. Atlantic forest and leaf traits: an overview. *Trees*, v. 33, p. 1535–1547, 2019.