



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CAMPUS REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Leonardo Carlos Wendhausen de Oliveira

**Citometria de fluxo e prospecção *in silico* de marcadores SSR de *Plinia edulis* (Vell.)
Sobral (Myrtaceae)**

Florianópolis

2024

Leonardo Carlos Wendhausen de Oliveira

**Citometria de fluxo e prospecção *in silico* de marcadores SSR de *Plinia edulis* (Vell.)
Sobral (Myrtaceae)**

Projeto de pesquisa submetido ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon

Coorientadora: Ma. Ingrid Lohani Degering Brand

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Oliveira, Leonardo Carlos Wendhausen de
Citometria de fluxo e prospecção in silico de
marcadores SSR de *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae)
/ Leonardo Carlos Wendhausen de Oliveira ; orientador,
Valdir Marcos Stefenon, coorientadora, Ingrid Lohani
Degering Brand, 2024.
39 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Botânica. 3. Bioinformática.
4. Marcadores moleculares. 5. Citometria de fluxo. I.
Stefenon, Valdir Marcos . II. Brand, Ingrid Lohani
Degering . III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Leonardo Carlos Wendhausen de Oliveira

**Citometria de fluxo e prospecção *in silico* de marcadores SSR de *Plinia edulis* (Vell.)
Sobral (Myrtaceae)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Graduado em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Local Florianópolis, 13 de Dezembro de 2024.

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon, orientador

Ma. Ingrid Lohani Degering Brand, coorientadora

Dr. Yohan Fritsche, UFSC

Dr. Thiago Sanches Ornellas, UFSC

Ma. Evelyn Lopes dos Santos, UFPR

Florianópolis,

2024.

Dedico esse trabalho a todos que acordaram tarde para a vida, aos quais a falta de ação cobrou seu preço. E mesmo assim não desistem de seguir o melhor caminho, seja qual for.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos que tornaram esse trabalho (e o caminho até ele) possível, seja diretamente ou indiretamente. Por todos os gestos de bondade que me prestaram, até mesmo os mínimos. Primeiramente quero honrar meu orientador Valdir Marcos Stefenon e minha coorientadora Ingrid Lohani Degering Brand também aos membros da banca que gentilmente aceitaram o convite: Evelyn Lopes dos Santos, Thiago Sanches Ornellas e Yohan Fritsche, afinal dei mais trabalho que 4 orientados juntos: uma lendária dor de cabeça. Conjuntamente demonstro meu apreço aos meus colegas do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) que me ajudaram nos experimentos e na rotina de laboratório, sem eles explosões ocorreriam. Paralelamente, quero agradecer aos cambucás e, por que não, também aos tomates. Também quero deixar meus reconhecimentos aos meus colegas de universidade que me deram dicas, me ajudaram com os conteúdos, deram apoio moral e estenderam a mão quando precisei, em especial a Ana, mas também Aline, Matheus, Mayara e Jozias. Tal qual devo citar meus professores, a Miolhe e autores que me deram conhecimento durante minha formação.

Do mesmo modo, quero parabenizar a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) como instituição por possibilitar minha formação e disponibilizar recursos e pessoal que foram essenciais para a realização deste trabalho, principalmente ao Centro de Ciências Biológicas (CCB) e ao Centro de Ciências Agrônomicas (CCA). Assim como não devo esquecer dos servidores responsáveis pela limpeza, segurança e alimentação na universidade. Em especial a Camila e a Claudia, vigias do CCB e amigas (espero que consiga realizar teu sonho de ser mãe, Claudia) e ao Restaurante Universitário (RU) por todas as refeições. Quero agradecer à PRAE, em especial a Cristina Levandovski. Quero apontar aqui também funcionários da UFSC dos quais não pude saber o nome ou não interagiram tão diretamente comigo, entretanto foram atenciosos com os meus problemas. Vale aqui ressaltar o LAMEB que disponibilizou o uso de equipamentos e esclarecimentos de dúvidas, à exemplo da Flávia.

Deixo aqui meu sincero reconhecimento aos meus familiares (uma *pencajada* de tios e tias, sem falar nos irmãos, animais de estimação, genitores e etc.) que me deram suporte moral, emocional, financeiro e, mesmo com algumas brigas, continuaram do meu lado durante esta jornada. Em especial, a minha irmã, o Jerry, a Samira e a minha avó que desempenham papel fundamental na minha vida e, infelizmente, as duas últimas não podem estar presentes para participar desta etapa devido ao câncer. Da mesma maneira que venho elogiar as vozes da minha cabeça por sempre estarem comigo, mesmo que me deem conselhos errados às vezes.

Por último, quero agradecer a você leitor, “O Náufrago *Náugrafo*” de Leminski. E deixo mais um “Aviso aos Náufragos”, sem você tudo o que foi escrito não teria ou seria sentido.

“A verdade nasce neste mundo apenas com dores e tribulações e cada nova verdade é recebida a contragosto.”

(Alfred Russel Wallace)

RESUMO

Este trabalho analisou o tamanho do genoma de *Plinia edulis* (Vell.) Sobral, conhecido como cambucá, utilizando citometria de fluxo, e validou *in silico* marcadores moleculares. Para isso, foram realizados testes de citometria de fluxo visando à caracterização do valor 2C e, paralelamente, uma comparação entre softwares de análise de dados, buscando identificar uma alternativa gratuita e eficiente. Além disso, foram realizadas prospecções de marcadores moleculares SSR com o auxílio de diferentes *softwares* e caracterizações via BLASTn. Os resultados da citometria de fluxo não puderam ser concluídos devido à manutenção do equipamento e à ausência de um padrão interno mais adequado para *P. edulis*. Entre os softwares analisados, Flowing Software 2.5.1 e MACSQuantify™ Software 3.0.2 destacaram-se como as ferramentas mais eficientes, embora o último apresente uma interface de difícil utilização. Quanto aos marcadores, foram desenvolvidos 17 marcadores moleculares promissores, a maioria correlacionada com mRNA e com tamanhos adequados, oferecendo novas ferramentas para estudos genéticos de Myrtaceae. Apesar das limitações técnicas, este joga luz sobre lacunas de conhecimento e demonstrando o potencial da integração de abordagens biotecnológicas e experimentais para o entendimento da biodiversidade.

Palavras-chaves: Bioinformática; cambucá; validação; Myrteae; microsatélite.

ABSTRACT

This study analyzed the genome size of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral, also known as cambucá, using flow cytometry and validated molecular markers *in silico*. For this purpose, flow cytometry tests were performed to characterize the 2C Value and, in parallel, a comparison between data analysis software programs was performed, seeking to identify a free and efficient alternative. In addition, prospecting for SSR molecular markers through different softwares and characterizations via BLASTn were performed. The flow cytometry results could not be concluded due to equipment maintenance and the absence of a more suitable internal standard for *P. edulis*. Among the software programs analyzed, Flowing Software 2.5.1 and MACSQuantify™ Software 3.0.2 stood out as the most efficient tools, although the latter has a difficult-to-use interface. Regarding the markers, 17 promising molecular markers were developed, most of them correlated with mRNA and with adequate sizes, offering new tools for genetic studies of Myrtaceae. Despite technical limitations, this sheds light on knowledge gaps and demonstrates the potential of integrating biotechnological and experimental approaches for understanding biodiversity.

Key-words: Bioinformatics; cambuca; validation; Myrteae; microsatellite.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Resumo do método utilizado neste trabalho com a diagrama de fluxo para a validação dos marcadores SSR e da citometria de fluxo	17
Figura 2 – Germinação <i>in vitro</i> de <i>P. edulis</i> à esquerda e cultivo de plântulas de <i>S. lycopersicum</i> ‘Stupické’ à direita	18
Figura 3 – Cultivo de <i>P. edulis</i> com câmara úmida e <i>S. lycopersicum</i> ‘Stupické’ em túnel seco	19
Figura 4 – Gráficos produzidos no Macsquantify™ Software 3.0.2 apresentando os picos amarelo e pico vermelho do Dia 1 e o pico verde obtidos nos diferentes dias.....	22
Figura 5 – Exemplo de gráficos produzidos pelos diferentes <i>softwares</i> e como seus picos podem ser diferenciados	23

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 – Tabela criada com bases nos gráficos da Figura 5 apresentando os valores obtidos para o pico 1 somente.	22
Tabela 2 – Tabela criada com bases nos gráficos da Figura 6 fazendo para comparação de valores obtidos nos softwares	24
Quadro1 – Comparação entre os <i>softwares</i> com base nos critérios propostos no item 3.3.2...	24

LISTA DE ABREVIATURAS

bp	Pares de base
CV	Coeficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FASTA	FAST-ALL
FSC-A	Área de dispersão frontal de luz
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Mbp	Mega pares de base
IP	Iodeto de Proprídio
pg	Picogramas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SSR	Sequências Simples Repetidas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 MÉTODO	16
3.1 CULTIVO E OBTENÇÃO DE MATERIAL	18
3.3 CITOMETRIA DE FLUXO.....	19
3.3.1 Preparo de material	19
3.3.2 Comparação entre os softwares	20
3.4 MARCADORES.....	20
4 RESULTADOS	21
4.1 CITOMETRIA DE FLUXO.....	21
4.1.1 Resultados da citometria	21
4.1.2 Resultados da comparação entre softwares	23
4.3 MARCADORES E <i>PRIMERS</i>	25
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	28
GLOSSÁRIO	31
ANEXO A - Amplificações em gel virtual obtidas com o <i>software</i> Simgel	33
ANEXO B – Lista dos <i>primers</i> dos marcadores moleculares SSR validados, assim como <i>motifs</i> encontrados e tamanho das sequências amplificadas.	36
ANEXO C – Análise de regiões gênicas com o banco de dados Blastn de alta similaridade.	37
ANEXO D – Sequências amplificadas dos marcadores SSR validados em formato FASTA	38

1 INTRODUÇÃO

Myrtaceae possui aproximadamente 132 gêneros e 5950 espécies no mundo (Christenhusz; Byng, 2016) e 23 gêneros e 1.034 espécies no Brasil sendo 12,7% dessas endêmicas no país, além de ser uma das 10 maiores famílias de angiospermas em território nacional. (Zappi *et al.*, 2015). Entre elas existem membros de interesse econômico, como o gênero *Plinia* (Franzon *et al.*, 2009), com cerca de 80 espécies no mundo (Govaerts *et al.*, 2008), qual foi inicialmente descrito por Plumier em 1703 (Plumier; Tournefort 1703), o nome sendo uma homenagem a Plínio, O Velho, e só tendo descrição formal em 1753 com a espécie *Plinia pinnata* L. (Linné, 1753).

Mesmo tendo estudos que datam a séculos atrás e com grande potencial nutracêutico e farmacológico, continua sendo um gênero negligenciado. Exemplo disso é a *Plinia edulis* (Vell.) Sobral, espécie com grande atividade antioxidante (Štěpánková, 2024; Ishikawa *et al.*, 2008), gastroprotetoras (Rosa *et al.*, 2017) e parte da medicina tradicional caiçara (Ishikawa *et al.*, 2008), mas que frequentemente tem o suas ameaças de extinção negligenciadas. Isso ocorre mesmo com seu grande potencial para consumo sustentável, considerando que o uso comercial, ao preservar as sementes e retirar pouca biomassa da planta, não exerce pressão significativa sobre a população natural (Lima *et al.*, 2020). Ademais, o uso desta espécie, por ser nessas condições, pode ser usado na preservação do germoplasma por meio de propagação. Entretanto não se possui informações sobre sua genética como o tamanho de seu genoma diploide ou possíveis marcadores moleculares, como os marcadores moleculares de Sequências Simples Repetidas (SSR), impossibilitando estudos mais aprofundados. E de acordo com Dos Santos *et al.* (2021), são necessários mais estudos com abordagens moleculares, tanto para resolução de incertezas filogenéticas, quanto para avanços na tecnologia de micropropagação.

Saber o tamanho do genoma é importante, uma vez que genomas maiores são correlacionados com divisão celular mais lenta, maior consumo de nutrientes para replicação do DNA e maior volume tanto do núcleo quanto da célula (Gregory, 2001). Além do mais, o tamanho do genoma é uma informação necessária para determinar se houve a duplicação do genoma completo evento que ocorreu cerca de 50 vezes independentemente na evolução de angiospermas (Landis *et al.*, 2018) podendo ser de um “beco sem saída”, até surgimento de novidades evolutivas e possível aumento da complexidade biológica a longo prazo (Van De Peer; Mizrachi; Marchal, 2017). Em suma, descobrir o Valor 2C é um passo necessário que possibilita futuras pesquisas variando de determinar o quanto se falta sequenciar do genoma, descrever o processo evolutivo de *taxa*, até inferir questões metabólicas. E no caso de Myrtaceae, poucos gêneros e espécies da família possuem o tamanho de seu genoma descrito,

acima de que existem níveis de discrepância entre valores estimados na literatura especializada (Grattapaglia *et al.*, 2012). Mesmo assim, um estudo com citometria de fluxo demonstrou que a maioria das espécies estudadas possuem o Valor 2C entre 0,4 e 0,6 picogramas (pg), entretanto no mesmo estudo se levanta a dúvida sobre a ocorrência ou não de redução do genoma nuclear em *Plinia* (Costa; Dornelas; Forni-Martins, 2008). Vale ressaltar que estudos mais recentes encontraram espécies de Myrtaceae com uma maior quantidade de genoma como 1,37 pg (Carvalho; Carvalho; Soares, 2017).

A citometria de fluxo, nesse contexto, consiste em medir a fluorescência emitida pelos núcleos das células suspensas em fluido quando são atingidas por feixes de luz ao passar pelo citômetro. Esse teste é comumente e preferencialmente utilizado para se descobrir o tamanho do genoma de diferentes grupos de seres vivos como animais, fungos e plantas. Esse tipo de teste é utilizado para se calcular o Valor 2C — quantidade de DNA do genoma diploide, geralmente dado em pg ou mega pares de base (Mbp) — (Costa; Dornelas; Forni-Martins, 2008; Doležel; Bartos, 2005; Doležel *et al.*, 2003; Doležel, Greilhuber e Suda, 2007; e Fritsche, 2012). Todavia, encontrar um *software* gratuito e eficiente é uma tarefa significativamente desafiadora.

Já os marcadores moleculares são ferramentas essenciais para estudos genéticos, sendo amplamente utilizados para caracterizar variações em populações para o manejo florestal e conservação, assim como para melhoramento genético em diferentes espécies. Sendo amplamente aplicados em Myrtaceae, o tipo de marcador molecular mais comumente utilizado são os SSR, também conhecidos como microssatélites. Inclusive a transferência desses marcadores entre as espécies de Myrtaceae é suficientemente eficiente para viabilizar estudos genéticos em toda a família. Algo visto com o sequenciamento do genoma de *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden, apesar disso apenas 4 das 17 tribos de Myrtaceae possuem marcadores SSR catalogados (Grattapaglia *et al.*, 2012). Prospector e validar marcadores SSR *in silico* possibilita redução do tempo e recursos gastos por melhor selecionar previamente os marcadores.

Neste trabalho se procurou averiguar o tamanho do genoma de *P. edulis*, tal qual apontar uma alternativa gratuita e efetiva de software de análise de dados, por fim se validou *in silico* marcadores SSR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar marcadores SSR *in silico*, caracterizar o tamanho do genoma e estabelecer diretrizes para o estudo da espécie *P.edulis*.

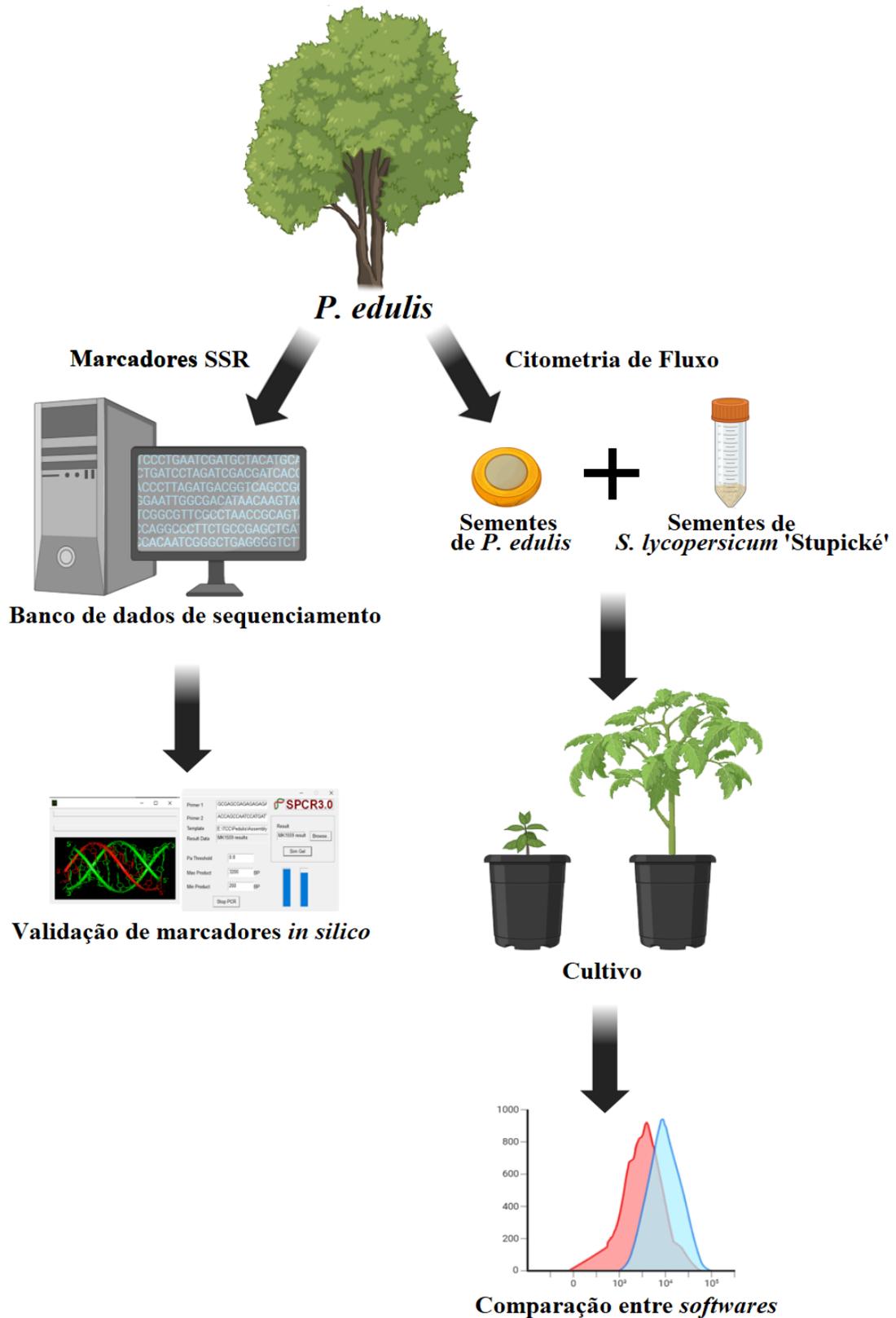
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir resultados preliminares sobre o Valor 2C de *P. edulis*.
- Determinar o melhor *software* para análise de dados de citometria.
- Prospectar *in silico* marcadores genéticos para a espécie *P. edulis*.
- Redução de custos e melhores condições de delineamento para futuras pesquisas.

3 MÉTODO

Para a realização deste trabalho foi efetuado o cultivo de plantas de *P. edulis* e *Solanum lycopersicum* L., cultivar ‘Stupické’ para obtenção de material para citometria de fluxo visando determinar o tamanho do genoma (Figura 1). Além de determinar o tamanho do genoma foi realizada a validação *in silico* de marcadores moleculares SSR utilizando diferentes *softwares* (Figura 1).

Figura 1 – Resumo do método utilizado neste trabalho com a diagrama de fluxo para a validação dos marcadores SSR e da citometria de fluxo



3.1 CULTIVO E OBTENÇÃO DE MATERIAL

Foi utilizado de sementes de *P. edulis* coletadas em diferentes sítios de Santa Catarina. Para o cultivo, realizou-se o despolpamento dessas sementes com um processo de desinfestação baseado em Jobim (2014) com modificações: 1 minuto submerso em álcool 70%, indo para 15 minutos em NaClO 2% com agitação e 30 minutos em água destilada. Depois foram mantidas *in vitro* em meio ágar até o surgimento de folhas saudáveis e depois serem passadas a vasos comuns com câmara úmida para a aclimação. Sendo então colocadas em estufa tipo túnel seco para crescimento.

Para determinar o tamanho do genoma da *P.edulis* se é necessário um padrão de referência e, por isso, se foram cultivadas sementes de *S. lycopersicum* ‘Stupické’ gentilmente cedidas por Dr. Jaroslav Doležel do Instituto de Experimentação Botânica da Academia de Ciências da Tchêquia que foram cultivadas em vasos comuns numa estufa tipo túnel seco para crescimento junto às *P. edulis* como pode ser observado na Figura2.

Figura 2 – Germinação *in vitro* de *P. edulis* à esquerda e cultivo de plântulas de *S. lycopersicum* ‘Stupické’ à direita



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3 – Cultivo de *P. edulis* com câmara úmida e *S. lycopersicum* ‘Stupické’ em túnel seco



Fonte: Elaborado pelo autor

Notas: existem outras plantas também sendo cultivadas, mas um exemplo *S. lycopersicum* ‘Stupické’ podem ser diferenciados pela presença de tubos *falcon* com a tampa vermelha, já os com a tampa azul são *Pisum sativum* L.

3.3 CITOMETRIA DE FLUXO

3.3.1 Preparo de material

No intuito de descobrir o tamanho do genoma de *P. edulis* por meio do Valor 2C. Mudanças desta planta foram cultivadas junto às de *S. lycopersicum* ‘Stupické’, sendo esse segundo usado como padrão de referência ($2C = 1.96$ pg DNA) para a retirada de material genético pelas folhas (Doležel, Greilhuber e Suda, 2007).

Após a retirada de uma porção das folhas de ambas as plantas, cerca de 150 mg de tecido de folhas saudáveis foram picotados em pedaços menores com uma lâmina de barbear, sendo então mergulhados em 2ml de tampão Otto I para a redução dos compostos fenólicos. O procedimento foi feito tanto sobre o gelo e gelo gel artificial para manter temperaturas abaixo de 18° C. Após isso, a solução passará por um filtro de malha de nylon 40 µm (BD Falcon) para então ser centrifugada a 150g por 5 minutos a temperatura de 5 °C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspenso em 100 µL de tampão Otto I. A suspensão dos núcleos foi deixada no escuro por 30 minutos em 500 µL de Otto-II buffer (Otto, 1990) suplementado com 50 µg mL⁻¹ de Iodeto de Propídeo (IP; Biotium) e RNase-A (Fritsche, 2012 e Costa; Dornelas; Forni-Martins, 2008).

A medição da fluorescência IP foi realizada com o citômetro de fluxo do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina

(LAMEB/UFSC) modelo BD® FACSCanto™ II, equipado com *Argon Laser* de emissão de luz no comprimento de onda de 488 a 633 nm. A tensão do equipamento foi mantida constante durante as análises, os picos foram designados para canais específicos, assim como a posições dos picos das amostras e do padrão de referência foi estabelecido analisando a primeira execução com cada amostra separadamente. Enquanto à análise dos dados, diferentes *softwares* foram contrapostos para categorizá-los conforme sua performance, se fora realizado um histograma junto ao número de eventos para se obter resultados preliminares do Valor 2C. Para validação dos dados o experimento deve ser realizado em triplicata e em 3 dias distintos.

Por fim, para a realização dos cálculos foi considerado que $1 \text{ pg DNA} = 0,978 \times 10^9 \text{ bp}$ (Doležel *et al.*, 2003), o valor C do DNA seria calculado conforme a seguinte equação (Doležel & Bartos, 2005):

$$\text{Amostra 2C de DNA} = \frac{(\text{pico da média da amostra G1}) \cdot \text{padrão de referência 2C (pg DNA)}}{(\text{pico padrão das amostras de G1})}$$

3.3.2 Comparação entre os *softwares*

Os programas selecionados para a comparação foram Floreada.io (<https://floreada.io>), Flowing Software 2.5.1 (<https://flowingsoftware.com/>) e Macsquantify™ Software 3.0.2 (<https://www.miltenyibiotec.com/UN-en/products/macsquantify-software.html#160-003-800>) fora utilizado somente um dos resultados da citometria para realização da contraposição, Dia 1, onde se verificou a capacidade de se analisar os dados, assim como capacidade de customizar o gráfico para se obter melhor visualização dos dados. Os critérios para se avaliar esses programas foram estes (Beeston *et. al.*, 2016):

- Etapas para a instalação.
- Gratuidade.
- Presença em artigos científicos nos últimos cinco anos.
- Possibilidade de acentuar a visualização de picos do gráfico por cores diferentes.

3.4 MARCADORES

Foram utilizados dados do genoma já sequenciado de *P. edulis* cedido por cortesia do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV - UFSC), *assembles* foram utilizados para a prospecção, desenho e mapeamento dos *primers* e *motifs* para os marcadores se empregando o GMATA (Wang; Wang, 2016). Para então, com o uso de utilitários do pacote SPCR (Cao *et al.*, 2005), foi realizada a validação desses marcadores por meio de simulação de PCR no SPCR 3.0 e, com o Simgel, a produção dos géis virtuais com

base na simulação obtida. Os géis com a melhor visualização das bandas de interesse foram selecionados para verificação da existência de dois ou mais loci na região desejada ao verificar as sequências amplificadas (Silva, 2016 e Sarzi, 2017). Os critérios para selecionar os marcadores foram:

- Alelos devem estar entre 100 e 800 bp.
- *Motifs* devem apresentar um mínimo de 6 repetições se forem dímeros e trímeros, 5 repetições se forem quadrímeros ou pentâmeros.
- Não apresentar loci sobrepostos.

Após isso ocorreu a caracterização *in vitro* dos marcadores por meio do BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4 RESULTADOS

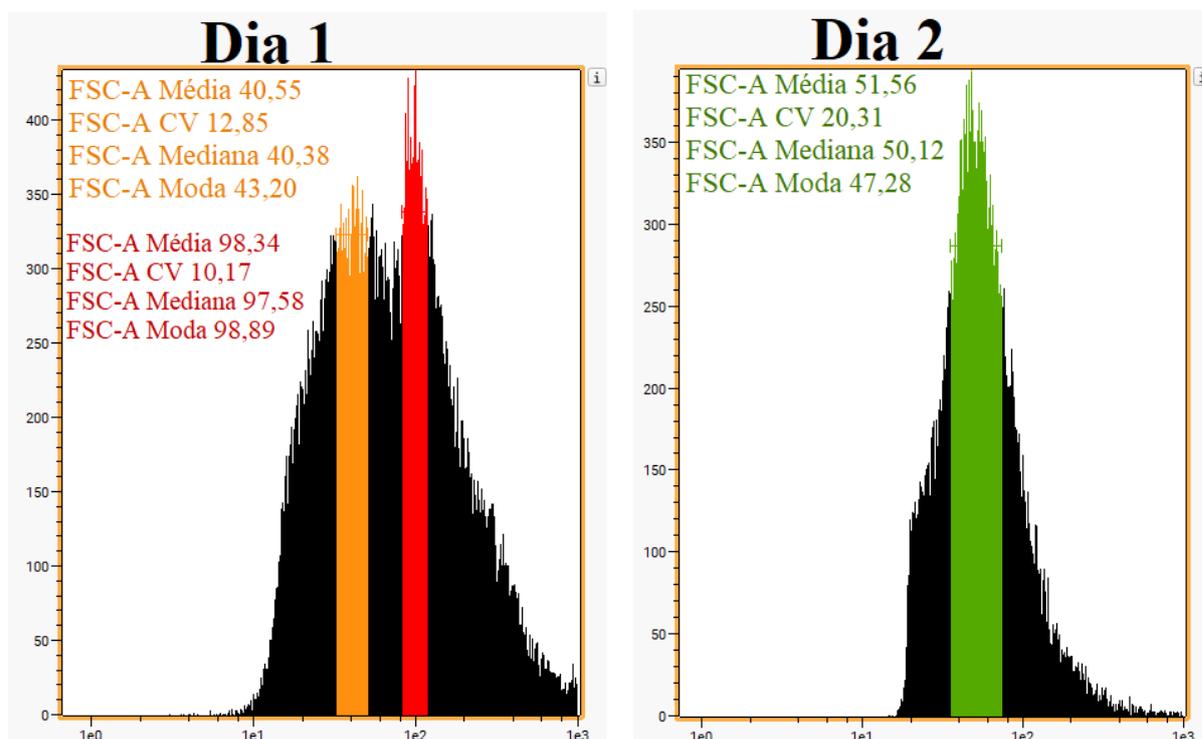
4.1 CITOMETRIA DE FLUXO

4.1.1 Resultados da citometria

O genoma de *S. lycopersicum* 'Stupické' apresentar ser significativamente maior do que *P. edulis*, a ponto de aparecerem apenas seus picos (Figura 5). Vale ressaltar que não foi possível realizar as 3 repetições necessárias, uma vez que o citômetro de fluxo BD FACS Canto II ficou fora de operação devido a um erro de comunicação no carrinho de fluidos ocorrido durante a realização dos testes.

Assim como um maior detalhamento dos dados obtidos pode ser visto na Tabela 1, relevante ressaltar que nos gráficos a Área de Dispersão Frontal de Luz (FSC-A) indica a luz captada pelo sensor frontal do citômetro, logo medindo a fluorescência emitida no eixo X, já no eixo Y está o número de eventos. Assim como o Coeficiente de Variação (CV) encontra-se também na Tabela 1.

Figura 4 – Gráficos produzidos no Macsquantify™ Software 3.0.2 apresentando os picos amarelo e pico vermelho do Dia 1 e o pico verde obtidos nos diferentes dias



Fonte: Elaborado pelo autor

Notas: Uma vez que a moda, a mediana e a média não apresentam grandes variações, significa que a média não está sendo enviesada.

Tabela 1 – Tabela criada com bases nos gráficos da Figura 5 apresentando os valores obtidos para o pico 1 somente.

Valores	Dia 1 - pico amarelo	Dia 1 - pico vermelho	Dia 2 - pico verde
Número total de eventos	50054	50054	26158
Média FSC-A	40,55	98,34	51,56
Valor 2C*	0,92 pg		

Fonte: Elaborado pelo autor

Notas: Vale ressaltar que não foi possível obter a média do Dia 3 ou dois picos em todos os gráficos, logo foi impossível calcular o Valor 2C com alto grau de confiança.

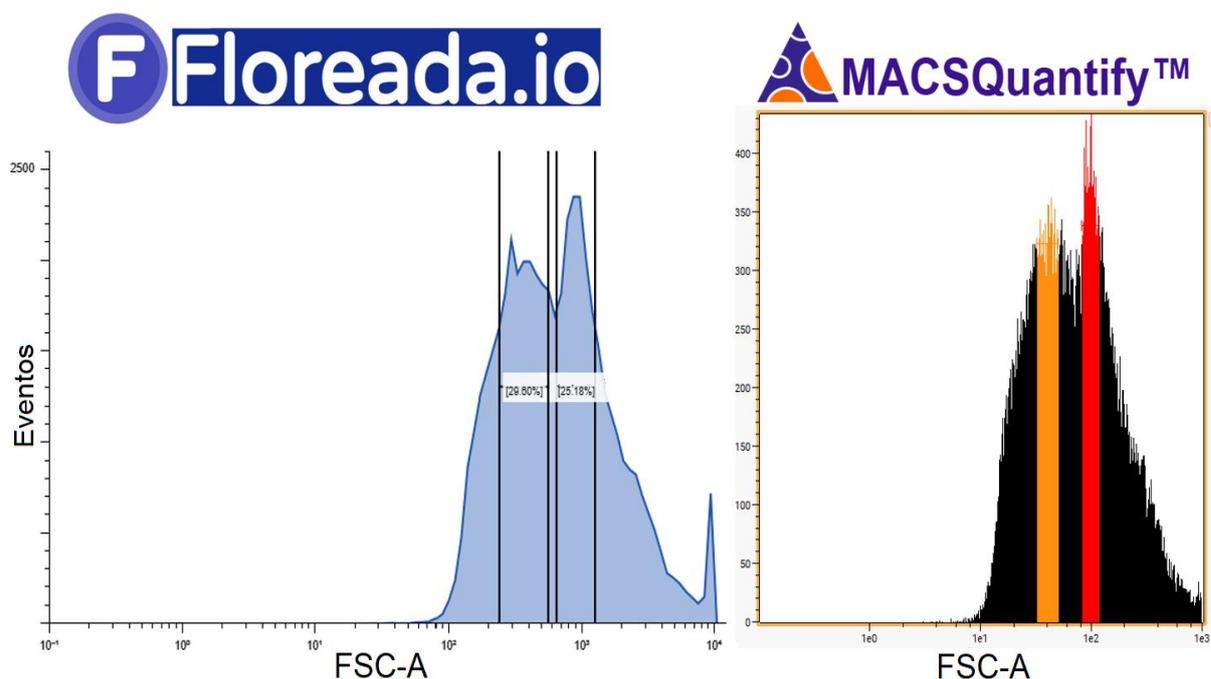
O cálculo utilizado pode ser descrito da seguinte maneira:
Média de G1 amostra = Média FSC-A de pico amarelo e pico verde = $(40,55+51,56)/2 = 46,05$
Média de G1 padrão = Média FSC-A de pico vermelho = 98,07.
(Média de G1 amostra/ Média de G1 padrão). (Valor 2C de referência) =
 $(46,05/98,07).1,96 = 0,92$

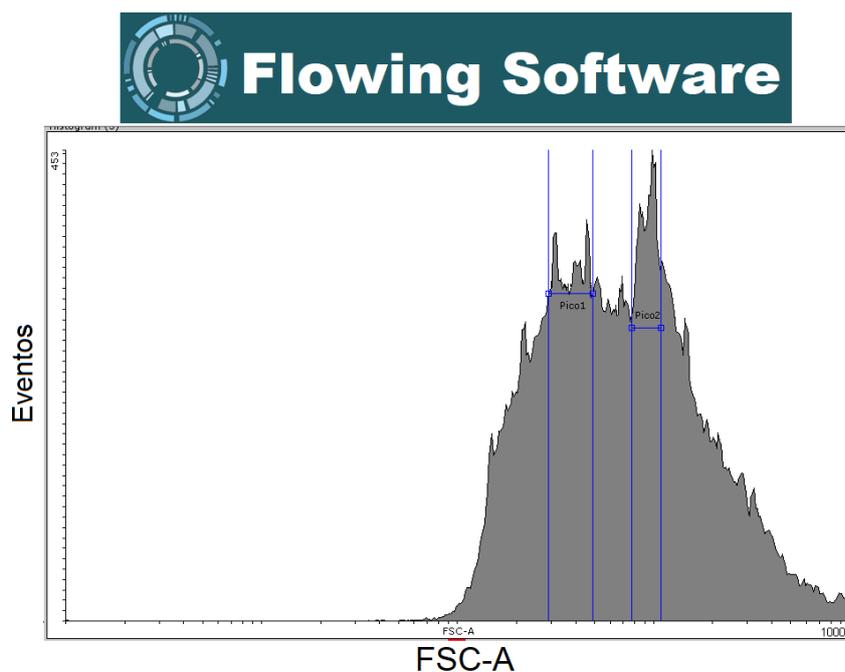
É de extrema importância ressaltar que devido à falta das triplicatas, **se torna impossível calcular com confiança o Valor 2C**, sendo o valor aqui obtido somente um resultado preliminar. O pico vermelho foi considerado G1 padrão uma vez que seu valor de fluorescência é similar o encontrado para o mesmo cultivar por Carvalho, Carvalho e Soares (2017). E tanto o pico amarelo quanto o verde foram agrupados juntos por possuem a média de FSC-A similar.

4.1.2 Resultados da comparação entre softwares

Os resultados obtidos da comparação podem ser visualizados na Tabela 2 e no Quadro 1, a primeira apresenta os dados obtidos pelos softwares e o segundo descreve a comparação com base nos critérios estabelecidos. Assim como uma exemplificação dos gráficos que podem ser produzidos nos softwares se encontra na Figura 5.

Figura 5 – Exemplo de gráficos produzidos pelos diferentes *softwares* e como seus picos podem ser diferenciados





Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 2 – Tabela criada com bases nos gráficos da Figura 6 fazendo para comparação de valores obtidos nos softwares

<i>Software</i>	Floreada.Oi	Flowing Software 2.5.1	Macsquantify™ Software 3.0.2
Número de eventos de pico 1	14817	9435	8164
Número de eventos de pico 2	12602	7187	7468
Número total de eventos	50054	50054	50054

Fonte: Elaborado pelo autor

Notas: dos valores calculados pelos softwares, o Floreada. Oi é o que apresenta maior discrepância e diferente do que se geralmente espera encontrar com os dados obtidos na espécie apontada.

Quadro1 – Comparação entre os *softwares* com base nos critérios propostos no item 3.3.2

<i>Software</i>	Floreada.oi	Flowing Software 2.5.1	MACSQuantify™ Software 3.0.2

Etapas para a instalação	É realizado pelo site somente precisando de ter acesso a internet.	Necessita se ir ao site — logo precisa de acesso à internet — sendo que a instalação ocorre por meio do Gerenciador de Instalação.	Necessita se ir ao site — logo precisa de acesso à internet — sendo que a instalação ocorre por meio do Gerenciador de Instalação. Além de que tem de se realizar o cadastro para acessar (pode ser mantido o cadastro padrão, usuário e senha: <i>first_setup_account</i>)
Gratuidade	Sim	Sim	Sim
Presença em artigos científicos últimos 5 anos	Não	Sim	Sim
Possibilidade de acentuar picos do gráfico por cores diferente	Não	Sim, mas não na mesma aba.	Sim

Fonte: Elaborado pelo autor

4.3 MARCADORES E *PRIMERS*

Os *primers* que não passaram pelos critérios de validação foram descartados, sendo 17 selecionados (Anexo A). Observa-se que a maioria dos marcadores estão entre 200bp e 800bp (Anexo B). É notável que houve frequente aparição de duas espécies de Myrtaceae, a *Rhodamnia argentea* Benth e *Syzygium oleosum* (F.Muell.) B.Hyland, além de que a maioria dos marcadores está relacionada com RNA mensageiro (mRNA) (Anexo C). Por fim, as sequências amplificadas ainda não se encontram no NCBI, mas sim expostas neste trabalho em formato FAST-ALL (FASTA) (Anexo D).

5 DISCUSSÃO

Não foi possível realizar as três repetições em dias diferentes necessárias para a validação do experimento, uma vez que o citômetro entrou em manutenção devido a um erro de comunicação no carrinho de fluidos. E é observado que não foi possível avaliar de maneira confiável o valor 2C do genoma da *P. edulis*. Vale aqui ressaltar que as espécies de Myrtaceae

possuem um genoma de 0,4 a 0,6 pg (Costa; Dornelas; Forni-Martins, 2008) e o Valor 2C obtido foi de 0,92 pg. Entretanto, estudos mais recentes demonstram espécies como *Eucalyptus deglupta* Blume possuem 0,99 pg e *Eucalyptus paniculata* Sm. 1,37 pg (Carvalho; Carvalho; Soares, 2017) demonstrando maior variabilidade no tamanho do genoma antes previsto. Com isso, os resultados obtidos nesse trabalho parecem seguir a segunda tendência.

Outro ponto mais importante é o de que essa família possui grande quantidade de compostos que interferem nos resultados da citometria, esse empecilho foi contornado congelando as folhas em estudos anteriores (Costa; Dornelas; Forni-Martins, 2008).

Já no que se refere aos *softwares*, Flowing Software 2.5.1 acaba sendo melhor *software* no geral para análises de histogramas de citometria. Entretanto, por haver falta de suporte desde 2013, apresenta menor compatibilidade com sistemas operacionais e computadores mais atuais. Já o Macsquantify™ Software 3.0.2, mesmo necessitando de mais etapas para ser instalado, ainda possui suporte e tem performance similar.

Quanto aos marcadores encontrados, as espécies mais apontadas pelo BLASTn foram *R. argentea* e o *S. oleosum*, porém isso se possivelmente se deve ao fato de existir mais informação das mesmas em relação às demais plantas de Myrtaceae, como observamos em estudos genômicos como o de Chen *et al.* (2024). Sobre esta perspectiva, um trabalho de transferibilidade destes marcadores em espécies do mesmo gênero ou entre *P. edulis*, *R. argentea* e *S. oleosum* se torna requerido, a exemplo do que foi realizado por Silva (2016).

Observa-se também que foram encontrados marcadores com um bom *score* e ligados com áreas de interesse. Como o P8 estar relacionado a proteínas RPP13-like, grupo constantemente relacionado com defesa contra patógenos como fungos (Cheng *et al.*, 2018; Adhikari; Mideros; Jamann, 2021). Também se tem o P10 com os genes da F-box, uma das maiores superfamílias de proteínas e que mesmo assim necessita de estudos mais sistematizados em plantas (Zhang *et al.*, 2019). E por fim P11 possivelmente está relacionado com enzimas fosfolipases A₂ que podem ter uso industrial para emulsificação (Mariani; Fidelio, 2019).

De forma geral, os marcadores encontrados demonstram viáveis para testes de amplificação em laboratório e apresentam alta similaridade gênica, logo necessitam da validação em bancada para comprovar se o que é visto computacionalmente corresponde com o que pode ser reproduzido experimentalmente.

6 CONCLUSÃO

Através das análises e dos resultados obtidos, é evidente que os testes de citometria de fluxo não descreveram o Valor 2C devido a problemas de manutenção no citômetro, entretanto

destacaram a necessidade de otimizar os protocolos para espécies de Myrtaceae. Além disso, a comparação entre softwares de análise evidenciou que o Flowing Software 2.5.1 apenas perde por falta de suporte a anos, sendo o MACSQuantify™ Software 3.0.2 mais confiável no sentido de compatibilidade com computadores e sistemas operacionais mais novos.

Na etapa de validação *in silico*, foram selecionados 17 SSR viáveis, onde a maioria possui alta taxa de correlação com sequências de mRNA e podendo ter transferibilidade entre diferentes espécies. No entanto a validação em bancada ainda é necessária para que esses marcadores possam representar uma maior contribuição da pesquisa genética com *P. edulis* e para outras espécies de Myrtaceae.

Por fim, este estudo reforça a relevância de combinar abordagens experimentais e computacionais no entendimento da diversidade genética, assim como a importância de se aprimorar técnicas analíticas para direcionar futuras investigações.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, Pragya; MIDEROS, Santiago X.; JAMANN, Tiffany M., Differential Regulation of Maize and Sorghum Orthologs in Response to the Fungal Pathogen *Exserohilum turcicum*, **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 675208, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.675208>
- BEESTON, Amy *et al*, Ten simple rules for writing a comparative software review, [s.l.]: **PeerJ Preprints**, 2016. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.2221v1>
- CAO, Youfang *et al*. Information theory-based algorithm for in silico prediction of PCR products with whole genomic sequences as templates. **BMC bioinformatics**, v. 6, n. 1, 26 jul. 2005. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-190>
- CARVALHO, Guilherme M. A.; CARVALHO, Carlos R.; SOARES, Fernanda Aparecida Ferrari, Flow cytometry and cytogenetic tools in eucalypts: genome size variation × karyotype stability, **Tree Genetics & Genomes**, v. 13, n. 5, p. 106, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1186-0>
- CHEN, Stephanie H. *et al*, Chromosome-Level Genome Assembly of the Australian Rainforest Tree *Rhodamnia argentea* (Malletwood), **Genome Biology and Evolution**, v. 16, n. 11, p. evae238, 2024. <https://doi.org/10.1093/gbe/evae238>
- CHENG, Jinjin *et al*, Genome-wide Identification and Expression Analyses of RPP13-like Genes in Barley, **BioChip Journal**, v. 12, n. 2, p. 102–113, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13206-017-2203-y>
- COSTA, Itayguara R.; DORNELAS, Marcelo C.; FORNI-MARTINS, Eliana R., Nuclear genome size variation in fleshy-fruited Neotropical Myrtaceae, **Plant Systematics and Evolution**, v. 276, n. 3–4, p. 209–217, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0088-x>
- CHRISTENHUSZ, Maarten J.M.; BYNG, James W., The number of known plants species in the world and its annual increase, **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201, 2016. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- DOS SANTOS, Daniele D. *et al* . Biotechnology in *Plinia* spp.: needs and perspectives for a neglected group of fruit species. **Biot. Veg.**, Villa Clara , v. 21, n. 1, p. 3-14, mar. 2021.
- DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 99–110, 1 jan. 2005. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
- DOLEŽEL, J. *et al*. Letter to the editor. **Cytometry**, v. 51A, n. 2, p. 127–128, 22 jan. 2003. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.10013>
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2233-2244, set. 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310>

FRANZON, R.C.; CAMPOS, L.Z.O.; PROENÇA, C.E.B.; SOUSA-SILVA, J.C. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Brasília: Embrapa Cerrados, 2009. p 48

FRITSCHÉ, Yohan. **Regeneração de estruturas semelhantes a protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas**. 2012. 138 p. Dissertação de Mestrado — Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

GRATTAPAGLIA, Dario *et al.*, Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus, **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, n. 3, p. 463–508, 2012.
<https://doi.org/10.1007/s11295-012-0491-x>

GREGORY, Ryan T. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cellsize, and the C-value enigma. **Biological Reviews**, v. 76, n. 1, p. 65–101, 2001.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2000.tb00059.x>

GOVAERTS, Rafaël (Org.), **World checklist of Myrtaceae**, Richmond: Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew, 2008. p 455.

ISHIKAWA, Tati *et al.*, Morphoanatomic aspects and phytochemical screening of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae), **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 515–520, 2008. <https://doi.org/10.1590/s1516-93322008000300023>

JOBIM, Laura Honório. **ESTABELECIMENTO IN VITRO DE EXPLANTES DE EUGENIA INVOLUCRATA DC**. 2014. 40 p. Trabalho de Conclusão do Curso — Universidade Federal Do Pampa, São Gabriel, 2014.

LANDIS, Jacob B. *et al.*, Impact of whole-genome duplication events on diversification rates in angiosperms, **American Journal of Botany**, v. 105, n. 3, p. 348–363, 2018. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1060>

LIMA, Valdeir P. *et al.*, Extinction threat to neglected *Plinia edulis* exacerbated by climate change, yet likely mitigated by conservation through sustainable use, **Austral Ecology**, v. 45, n. 3, p. 376–383, 2020. <https://doi.org/10.1111/aec.12867>

LINNÉ, Carl Von, **Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitae ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas**, Vindobonae: Typis Joannis Thomae de Trattner, 1764. p 735. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.65726>

MARIANI, María E.; FIDELIO, Gerardo D., Secretory Phospholipases A2 in Plants, **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 861, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00861>

OTTO, Friedrich, Chapter 11 DAPI Staining of Fixed Cells for High-Resolution Flow Cytometry of Nuclear DNA, *in*: **Methods in Cell Biology**, [s.l.]: Elsevier, 1990, v. 33, p. 105–110. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60516-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60516-6)

PLUMIER, Charles; TOURNEFORT, Joseph Pitton De, **Nova plantarum americanarum genera**, Parisiis: apud Joannem Boudot, 1703. p. 9. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.59135>

ROSA, Roseane L. *et al*, Gastroprotective activity of the methanol extract from peels of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral fruits and its isolated triterpenes: maslinic and ursolic acids, **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 391, n. 1, p. 95–101, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1442-8>

SARZI, Deise Schröder. **Sequenciamento parcial do Genoma de *Eugenia uniflora* L. e desenvolvimento de marcadores microssatélites**. 2017. 75 p. Dissertação de Mestrado — Universidade Federal do Pamp, São Gabriel, 2017.

SILVA, CLARIANE DA. **VALIDAÇÃO *in silico* DE MARCADORES SSR DE *Eugenia uniflora* E TRANSFERIBILIDADE PARA SETE ESPÉCIES DE *Eucalyptus***. 2016. 58 p. Trabalho de Conclusão do Curso — Universidade Federal Do Pampa, São Gabriel, 2016.

ŠTĚPÁNKOVÁ, Lucie. **Use of Plant Extracts to Extend the Shelf Life of Meat in Tropics and Subtropics in South America: The Case Study of Brazil**. 2024. 51 p. Tese de bacharelado — Czech university of life sciences prague, Prague, 2024.

VAN DE PEER, Yves; MIZRACHI, Eshchar; MARCHAL, Kathleen, The evolutionary significance of polyploidy, **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 7, p. 411–424, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.26>

WANG, Xuewen; WANG, Le, GMATA: An Integrated Software Package for Genome-Scale SSR Mining, Marker Development and Viewing, **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01350>

ZAPPI, Daniela C. *et al*, Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil, **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566411>

ZHANG, Xuebin *et al*, F -Box Proteins in Plants, *in*: ROBERTS, Jeremy A. (Org.), **Annual Plant Reviews online**, 1. ed. [s.l.]: Wiley, 2019, p. 307–328. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0701>

GLOSSÁRIO

B

Banco de germoplasma: coleção de material genético conservado para uso imediato ou futuro.

C

Citometria de fluxo: técnica que se usa da refração da luz para caracterizar características químicas de células suspensas em fluido.

CV: O Coeficiente de Variação é um indicado estatístico que descreve a variabilidade de um conjunto de dados.

F

FSC-A: A Área de Dispersão Frontal de Luz (do inglês *Forward Scatter Area*) é a medida de luz captada pelo sensor frontal do citômetro de fluxo. No caso mede a fluorescência do IP no material genético.

H

Histograma: representação em gráfico da distribuição de frequências em intervalos em barras ou colunas.

I

In silico: Método de investigação que se usa de modelos informáticos para realizar previsões ou simulações.

L

Locus: posição determinada de uma região de interesse no genoma.

M

Motifs: sequências curtas e repetitivas no DNA que, possivelmente, possuem alguma função.

mRNA: Tipo de RNA que carrega o produto da transcrição gênica, transferindo informação do DNA até o ribossomo para a síntese proteica.

P

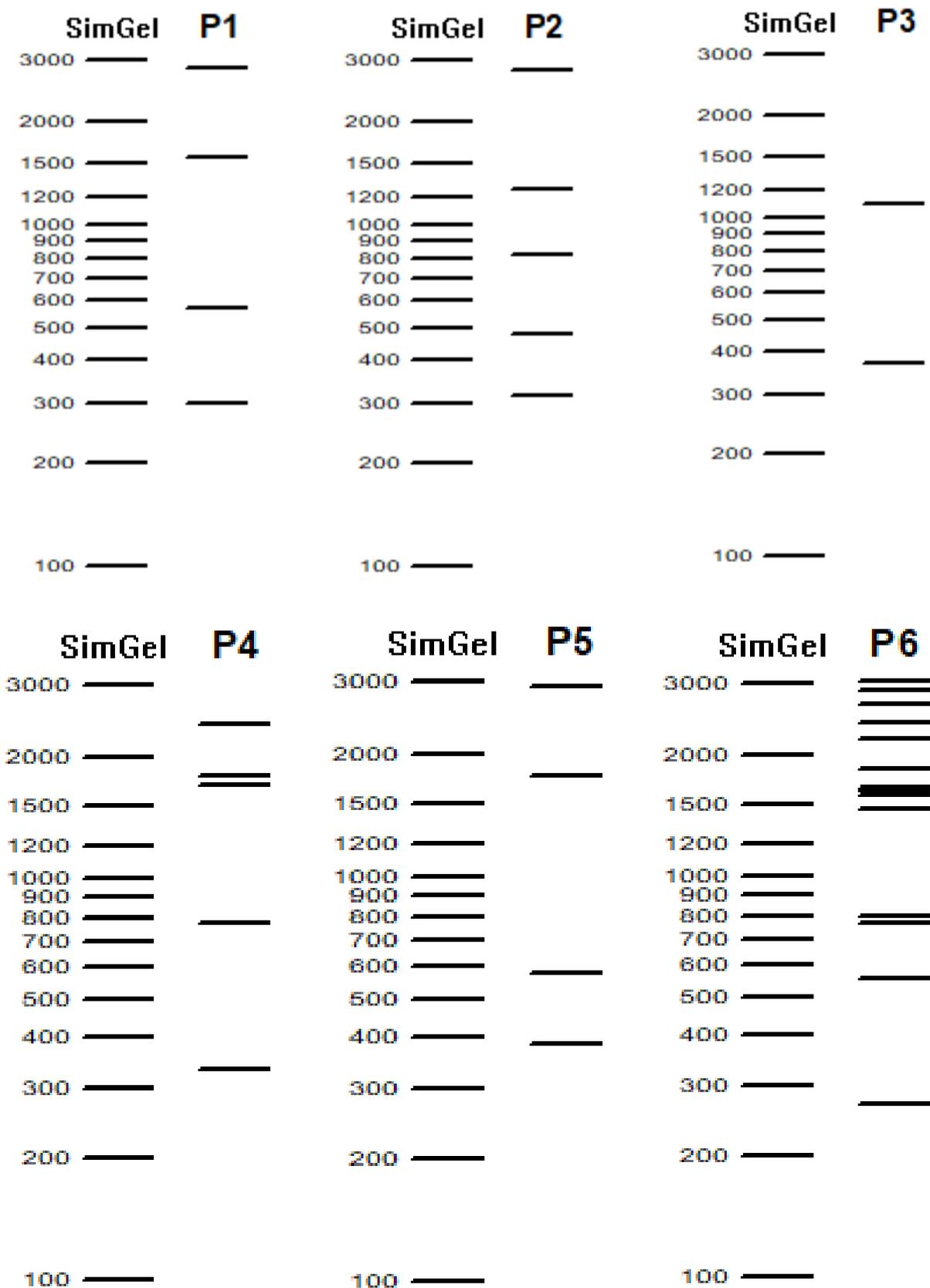
Primers: sequências curtas de DNA de fita simples que iniciam a síntese de DNA, podem ser usados para amplificar partes específicas do genoma.

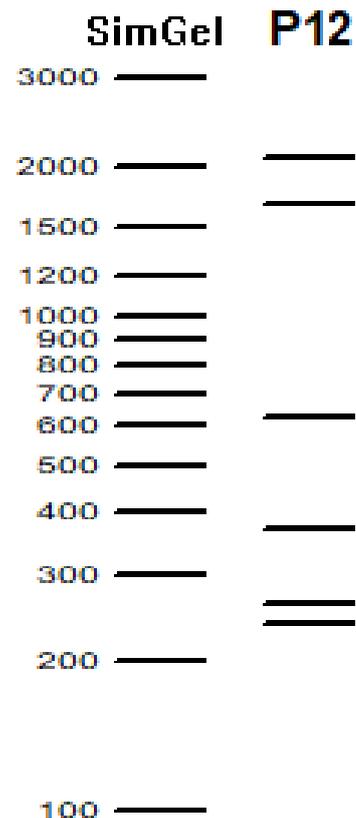
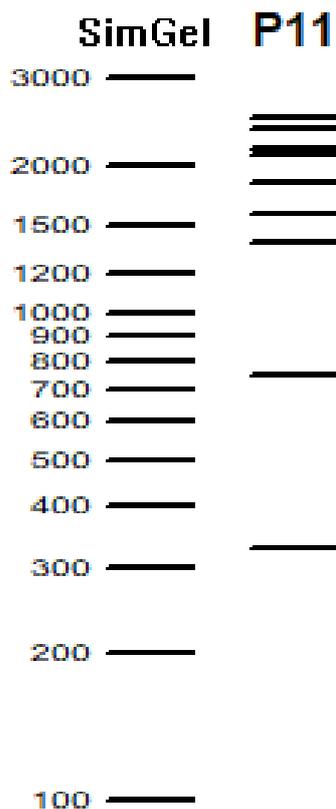
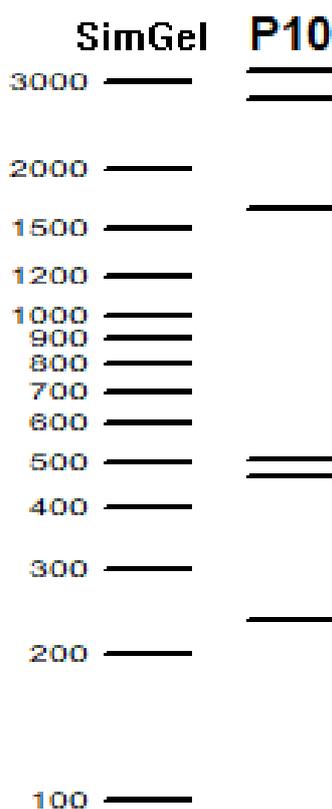
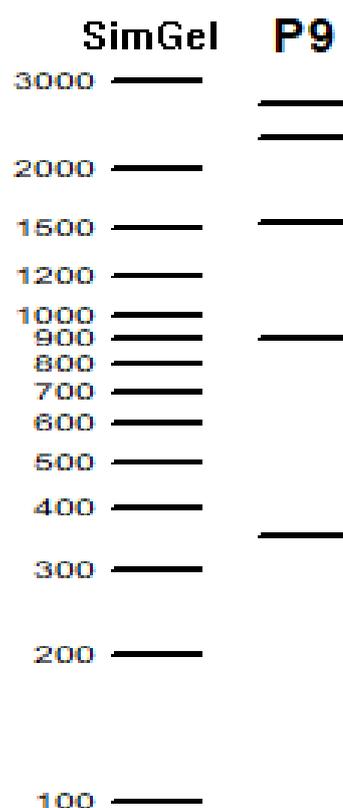
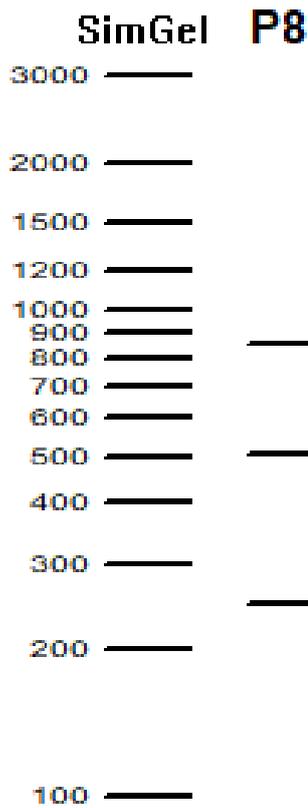
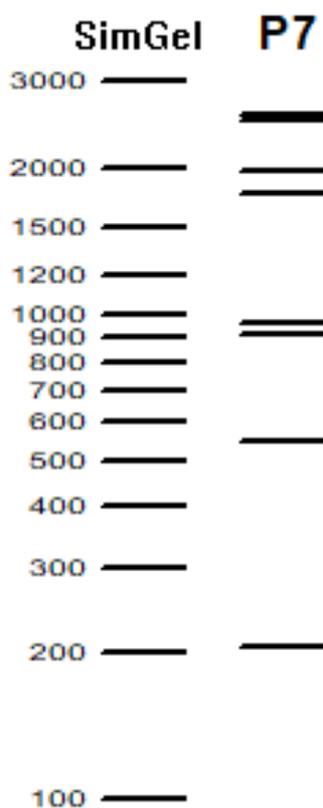
S

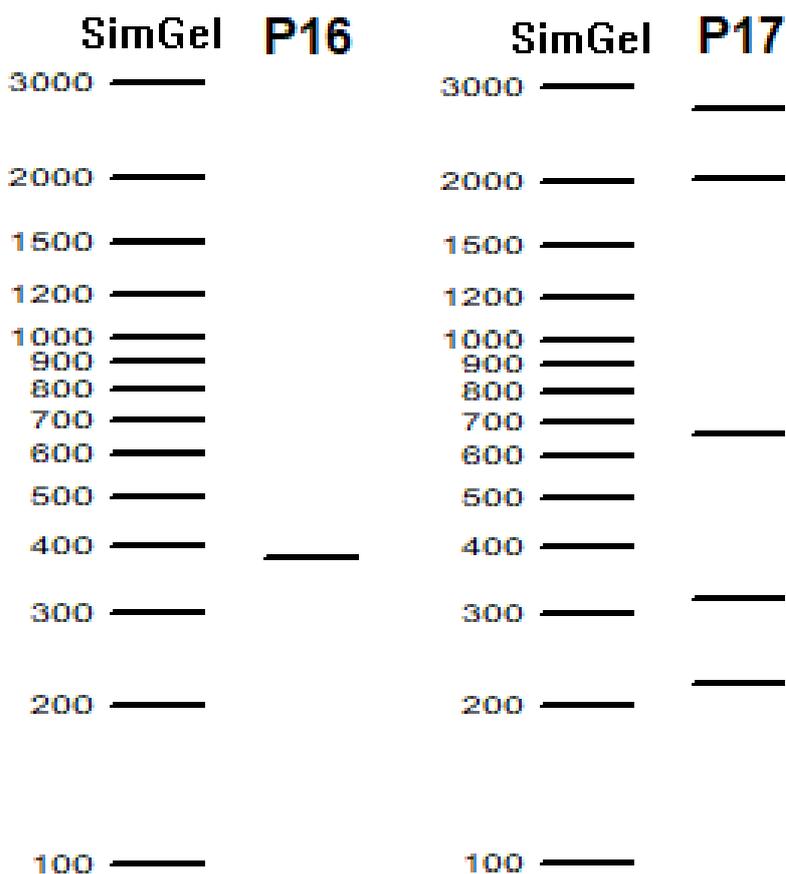
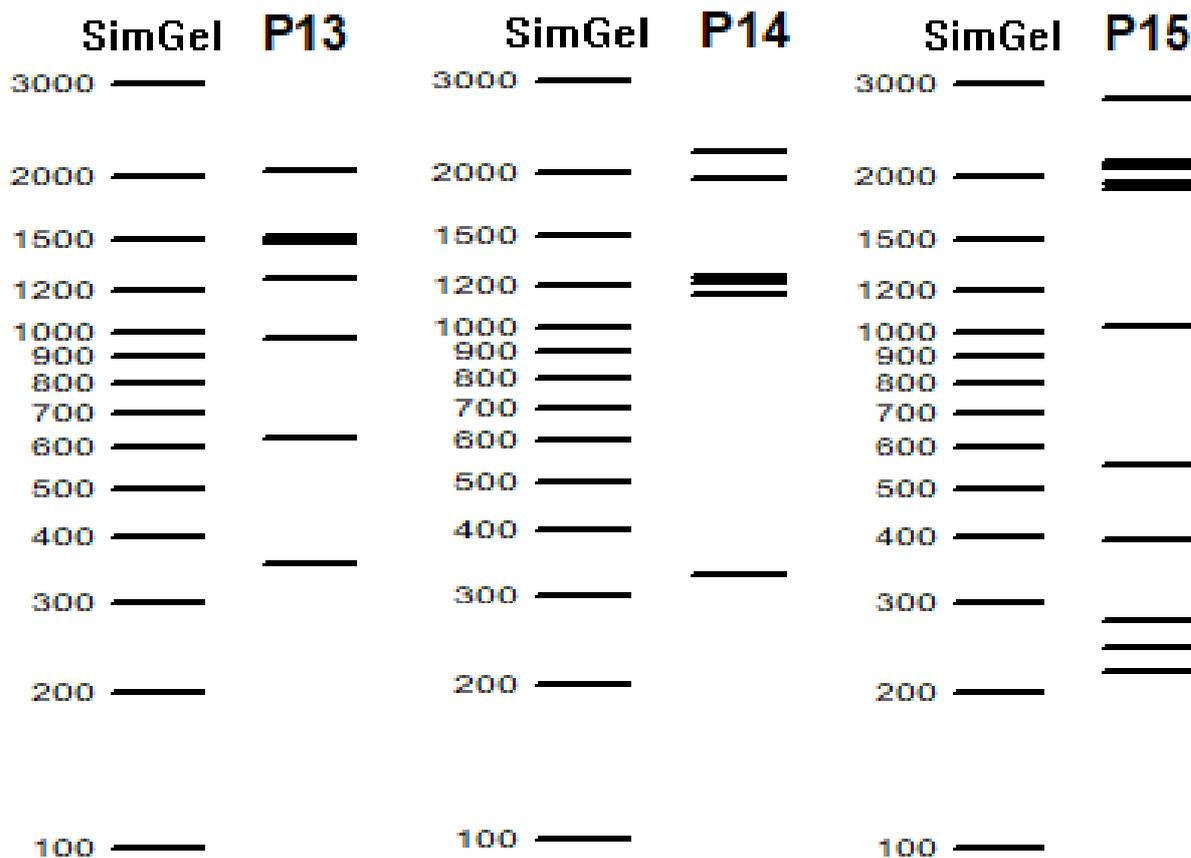
Software: conjunto de instruções determinadas, assim como escritas em alguma linguagem de programação para serem lidas e executadas por um computador na realização de tarefas.

V

Valor 2C: O “C” se refere às palavras: “constante” ou “característico”. Esse valor se refere a quantidade de genoma diplóide (enquanto o Valor C se refere ao haplóide) por núcleo e é normalmente medido em pg ou bp.

ANEXO A - Amplificações em gel virtual obtidas com o *software* Simgel





ANEXO B – Lista dos *primers* dos marcadores moleculares SSR validados, assim como *motifs* encontrados e tamanho das sequências amplificadas.

Nome	Primer 5'→3'	Motif	Tamanho (bp)
P1	TGTGCCTTTTAGGGTTTTGG TGATGAGAGGAGGGCAATCT	(TGTTGC)8	300
P2	AGTGGAACCCCTTCTTCGTT GGGAGGAGCTTCCTTGAGTT	(CTCCAA)5	819
P3	ACCACTCGCACACTTCAC CTACACGGAAAGACGGGAAA	(CTCG)6	370
P4	TGATCGAGCTTGCTTGTGAG GATTGTTTCCGACCATTCCA	(TTAT)5	771
P5	TGACATCTGCAGTTGAGGA ACCCGGTGAGGGAAAATAAC	(TC)8	388
P6	CATTTGCCTCTTCCTCCTTG CATTATTGACCCACGCTCT	(ATCTTC)5	269
P7	GTGGCAGAGCAGATCACAAA TCAATCCGATACAGCACCAA	(AAGC)6	207
P8	GCTGATTCTGCCCTTCAGTC ATCCACCTTCCCATCCCTAA	(TC)12	250
P9	GCCCAAACAACAAGCGTAAT TGACAACCGAACCAAAAATGA	(GAAGAG)6	353
P10	GGGGATCTTCCTCATTCTCC TTCGACACGAATCGACAGAG	(CT)7	235
P11	CCGAGACGAAGTCGCTATGT GCTGGTTTGGTCAGCTTCTT	(CAGA)7	331
P12	GTCCTGCACGTCATTCCATA AGGGTTGCAAGAAGCTTTGA	(GTCC)10	629
P13	CAGCATGTTTCTGAGCGTA CTGCCTTTGTTCCATTCCAT	(GGAG)6	358
P14	ATGCCTTTTCAGGGAGGACT TTCTGCTCAGATGCCAACAC	(GA)19	329
P15	CGCCAAACATTGAGGATTTT GTGAACAGCTGCCATATCCA	(TC)16	397
P16	TGCGCTTTAACAAACCTGAA GGTAGGGCTCTAAGGGATGC	(AGGCA)6	383
P17	GCTGGACATGGACAAAATGA CAGGGTTTCACAACATGCAC	(AGA)7	659

ANEXO C – Análise de regiões gênicas com o banco de dados Blastn de alta similaridade.

Poço	Predicted	Predicted	Cobertura (%)	Percentual identitário (%)	Valor e
P1	XM_056304920.1	PREDICTED: Syzygium oleosum protein SHI RELATED SEQUENCE 1 (LOC115672561), transcript variant X3, mRNA	100	94.00	5e-122
P2	MG557631.1	Campomanesia xanthocarpa clone Cxant36 microsatellite sequence	100	97.44	0.0
P3	XM_039302013.1	PREDICTED: Eucalyptus grandis probable phospholipid-transporting ATPase 8 (LOC104419254), mRNA	97	81.55	4e-74
P4	XM_030675583.1	PREDICTED: Rhodamnia argentea probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase BG4 (LOC115741592), mRNA	71	89.21	0.0
P5	XR_008818329.1	PREDICTED: Syzygium oleosum uncharacterized LOC115676680 (LOC115676680), ncRNA	69	83.52	4e-59
P6	XM_056304823.1	PREDICTED: Syzygium oleosum uncharacterized LOC115692736 (LOC115692736), transcript variant X1, mRNA	67	91.21	6e-61
P7	XM_030678321.2	PREDICTED: Rhodamnia argentea uncharacterized LOC115743510 (LOC115743510), transcript variant X2, mRNA	68	91.84	1e-46
P8	XM_030690393.2	PREDICTED: Rhodamnia argentea disease resistance protein RPP13-like (LOC115752254), transcript variant X1, mRNA	68	89.60	4e-49
P9	XM_030666894.2	PREDICTED: Rhodamnia argentea methyl jasmonate esterase 1-like (LOC115735584), mRNA	60	85.12	2e-51
P10	XR_007199668.1	PREDICTED: Rhodamnia argentea F-box protein At5g46170-like (LOC115755980), transcript variant X2, misc_RNA	57	93.38	4e-47
P11	XM_048272919.1	PREDICTED: Rhodamnia argentea phospholipase A-2-activating protein (LOC115735798), transcript variant X5, mRNA	53	95.49	3e-50
P12	OX637392.1	Ilex aquifolium genome assembly, chromosome: 2	51	71.95	2e-10
P13	XM_030679679.2	PREDICTED: Rhodamnia argentea ribulose biphosphate carboxylase small subunit, chloroplastic 3-like (LOC115744471), mRNA	39	86.62	3e-30
P14	XM_048271966.1	PREDICTED: Rhodamnia argentea ATP-dependent DNA helicase At3g02060, chloroplastic (LOC115756815), transcript variant X2, mRNA	36	95.04	6e-44
P15	XM_030667497.2	PREDICTED: Rhodamnia argentea glycoprotein 3-alpha-L-fucosyltransferase A (LOC115735996), mRNA	33	98.50	3e-57
P16	XM_048272469.1	PREDICTED: Rhodamnia argentea AT-rich interactive domain-containing protein 3-like (LOC115756851), transcript variant X3, mRNA	32	97.26	2e-23
Pit17	XM_030594904.2	PREDICTED: Syzygium oleosum organ-specific protein S2 (LOC115672908), mRNA	32	83.80	4e-42

<p>GCCAAACAACAAGCGTAATCTTCTCAGAACCCAAGATATGGCCGACAAGGATCACTTAATTTGTCCAGTT AAGCTAGACCTTCCATGACATCTCTCAGAGATCGATTTTCAGAGATGTGGTCTGAAGCAGGTCGATCTTGAA AGCGGCCAGGTCAAGTGGAGCGACTTTGTGACCCAATGATCTTAGGAATTTGGCCATCTTTACCAACACCA TCGTGCACCCGCGCCTGATCCATGAACCAGTGCAAAGTGCTTGATTCAAGTGTATGCTTCATTTCTGCTCGAA GCAGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGATGCTTCATTTTGGTTCGGTTGTCA</p>
<p>>P10 GGGATCTTCCCTCATTCTCTCTCTTTACCTGAGCTTGTTCTCTCTCTGTCTCTGTCTCTGTCTCTGTCT CTGTCTCTTCTTTCATCACCTGTAAGCTCTCTCTCTCTCTGTAGGTTTCATAGGTTGTGTCTGATGATCTACTGC AAGGAGAAGCCCCACCCATGTGCGAGTTCCTTCGGATGAGCGTTGCATGACTTCACGACTTTCGAAAGCTC TGTCGATTTCGTGTCGAA</p>
<p>>P11 CCGAGACGAAGTCGCTATGTTGCCGTCCCCGCACACGCATACACCACGAGCCTAAGGATGAATCGACGATC GTTACATAGGCTTAGAAGAGTGGTGAATAAATTCATTTCTAAGCAAACGCGGGATGAGATCGTTTCACGG GGAATGCGGCACAATTCCACCAATGAAGAAATGCTCGGAAATTATCGCATGAACCTACATCGTCCCTCGTG CCACGAAGCTCGCACCGAAGCTGATAATCTTTGAAATCGATATCCATCGCGCAGACAGACAGACAGACAG ACAGACAGAGAGTTGATCAGAGAGGGAAAAGAAGCTGACCAAACCAGC</p>
<p>>P12 GTCCGCTAATATTTCTTAACATTGAGACATGAAAAATGTTGTGCACACCAGACATCCTTGGTGGGAGCG CTAGTCGATACACCTTTTTGCCAACTCTTCTCATATTTTCGAGAGGTCAAACGTACCTCGGGCTAAGCTTTC CTTTCTTTCCAAATCTAGATAGTCTTTTCCATGGCGACACTTTCAAGAATACGTGGTCCGCTTGAATTT GCAACGGTCTGTGTCGATTATCGGCATAGCTTTTCTGTCTACTTCTGCGCTGTCCGCATATGCTCACGAATTA CATTCACTATATCTGAAGTGTACCGCACCAATTCAGGCCTTGTCAATTTCTTCTCCCACTTCGGACCAAC ACGTAGGTGTCTGCACGTCATTCCATATAAGGCTTCGAACGGTGTATGCCAATAGTCTGTGAAAATA TTATTATATGCAAACCTCCGCAATGGCAATTTTTCATTCCAATTTTCTTTAAAATCAATGGCGCACGCACGA AGCATGTCTTCCAAAATTTGATTCACCTTTATCTGTCCGTCCGTCCGTCCGTCCGTCCGTCCGTCCGTCCGT CCGTGAAAAGTAGTGTGAATTGCAACTTCATTCTCAAAGCTTCTTGCAACCT</p>
<p>>P13 CAGCATGTTTCTGAGCGTAATTGAAGAACACGAGTTAGAATGCATAACTCGATTTCACTCGAATTGCAGC CGCGATTGATTTGTCAAGATTCTAATGAGCAAACGAGCAACCATCGTATTAATGAATCTAGTTGTTGTTT CCAGGAGTACGCAGATTATAGGATTCGCGATCTTAGTTACATCAAGTGCCACTTCGAATTCGAGGCACGAG ATCCATCCTTTCTTGTGAGCATATAGTCGATCTCCTTGCAACTGAATCGTTTCGATAGAGGAGGGAGGGAGGG AGGGAGGGAGGAAAGGGTCTCAAACCTTCTGTTGTTGATCGGAATCCATGTCTATGGAATGGAACAAAGG CAG</p>
<p>>P14 GCTGATTCTGCCCTTTCAGTCTTGGGTGGATTATGTTTGGTTCAGCTTTGAGATTCTGCAGCTTCTCTTTGAGC AAGAAAGCAGCGACTTCAGTAGCCATGAGAATCTCTCTCTCTCTCTCTCAAGCAGATGAGAAGCA GAATCAAGAAATGGAAATGGATGTCAAAGCTCTGAGAAGGGGGCTTTTTGTCTGTTCTTTCTTCTCTTTCC TCTTTTTTTTTTTTTAGGGATGGGAAGGTGGAT</p>
<p>>P15 CGCCAAACATTGAGGATTTTGCACCTGCTCCTGGATCATATTTACATATCAAGGAGTTAAAAGATGTTCCA GAAGTCGCCAAGACAATGATTTACCTCTCAGAGAATCCTGTTGCATATAACCAATCATTAAAGGTCTCTCTCT CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCACACACACACACACACGCACGCACGCACGCACGAGCGGATAATTTTTTTT CCTTAGTTTGTCTTTTTTTTTGAAATGCTCATTATTTTCTGATTCTGAGGATTTGTGCTTTGGAATTGCTA CTAATTTCTGTGCTGAAAGACTTTTGACATGAATGTGCCTCTATTAGTTGGAAGTATGAGGGTCCATCGGAT TCTTTCAAGGCCCTTGTGGATATGGCAGCTGTTTAC</p>
<p>>P16 TGCGCTTTAACAACCTGAAGATAACATTGGGAGCCAGTATAGTAAGTCTCATGTAAGGCTATCCAACAAG CACAAAATCAAGAAAATGATTTAAAAGATAACTACCCTTTTATCTGCTTGTACTTTTCTGCGAAAAG TTACATTTCCATCCTGAAAAATGAAATTTTTGTAACCTGGGGACCACAAATGGAATGGATAAAACAGAGG CAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGG AAAATGCCTTAACAATTGGATTGCTAACCTCAGCATTACCAGAACTCTGAGAGTGCCAACCCTGCATAGCA CGAGCAGCAGCATCCCTTAGAGCCCTACC</p>
<p>>P17 GCTGAGAAAGGAGAGGATGAGCGGTTGAAGATGCCTGATGATCAAGATCAGAAGAAGAAGAAGAAGAAG ACATCTGCTTAGTTTGAACCTAGAGAAGGGAAAGAAAACAGGGATTAATAAATAATGTGGTAGATGCTTT TCTGCAGCAGTGCATATGTAGAATCTTTTAATCATAGTATCATTACGCATATGCTTGTGATTAGAGCAC GTCAAGAGTATTGTCCTCGGTTGCAACTTCTCAGATTTAACTACAGTTGTTTATGATTTCATTTTGTCTGT CTCTGTCTGATCTCTCATTACTTCTCAATCATTAGTCCGTTCCCGTATAGCTGGACATGGACAAAATGA TACGATATATCGGATGAGATAACCCGCTTTTACCTATATATATATATATATATGTTGTGTGTGTGTGTGTGT AAAACCCCTCTTCTGATCTTCTTACATAAACAGGAAACATTTCTTGAAGGAAAAGCTTCAGTGTTTTTTTCTTT CTTTCTTTCTTTCCATAGAAAGAAGCCAACAGGCAGACAAAATATATGGAGACAGCCTGATCTTTTTTTTCT TTTTTGGTCTGGGCGTATTCTATCTTATTCTACTATACAAGTCACACTGTATACGCCATGTGCCGTGTGCATG TTGTGAAACCTG</p>