

PRIMER SSR PARA *EUCALYPTUS* DESENHADO A PARTIR DE SEQUÊNCIA GÊNICA EXPRESSA. Deise Reis de Paula, Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva, Hélio Sandoval Junqueira Mendes, Mário Luiz Teixeira de Moraes. Inter-áreas - Agronomia - Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia – Faculdade de Engenharia – Campus de Ilha Solteira.

A expressiva área de florestas plantadas com espécies de *Eucalyptus* no Brasil demonstra a importância socioeconômica desta silvicultura, sendo plantada hoje em mais de 3 milhões de hectares, e tem amplo uso industrial (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2006a). O gênero *Eucalyptus* envolve mais de 600 espécies, que visam a garantia do suprimento de matéria-prima para as indústrias de papel e celulose, siderurgia a carvão vegetal, lenha, serrados, compensados e lâminas, painéis reconstituídos e movelaria (SOARES et al., 2003). Dos plantios florestais podem ser obtidos outros produtos, como resinas, óleos essenciais e medicamentos, além de colaborarem para o sequestro de carbono e contribuírem para a conservação das florestas naturais (SOARES et al., 2003).

O setor industrial de base florestal tem sido marcado por um processo de utilização crescente de madeiras provenientes de reflorestamento, o que coloca o Brasil em sintonia com a ordem mundial, que enfatiza a preservação das florestas naturais e incentiva a implantação de florestas renováveis (CASTRO, 2001). O eucalipto apresenta-se como grande alternativa para produção de madeira nos próximos anos, e a indústria já aposta na sua disponibilidade para os futuros suprimentos de matéria-prima (CASTRO, 2001). O descompasso crescente entre oferta e demanda de madeira nos mercados internos e externo tenderá a favorecer o quadro de substituição das madeiras nativas pela madeira de eucalipto (CASTRO, 2001). No entanto, alguns questionamentos têm surgido a respeito das populações introduzidas no Brasil, quanto à sua origem e ao conhecimento em termos de sua divergência genética, pois estes materiais foram introduzidos a partir de populações de plantios naturais da Austrália e da África do Sul, e aqui pode ou não ter ocorrido um processo de redução desta diversidade em razão de cruzamento entre indivíduos aparentados ou do pequeno número efetivo de indivíduos utilizados nos locais de coleta de sementes (CAIXETA et al., 2003). O Brasil não tinha, até duas décadas atrás, materiais genéticos adequados para programas de melhoramento de eucalipto. A Embrapa promoveu, então, expedição à Austrália para coleta de sementes. Atualmente, esse material duplicou a produtividade média existente das plantações (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2006a). Hoje, apenas a celulose proveniente do eucalipto contribui com mais de um bilhão de dólares anuais em exportações da balança comercial brasileira. O Brasil é o líder mundial em áreas plantadas de eucalipto e em produtividade florestal (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2006a). O país possui a mais alta tecnologia em silvicultura e além disso, também possui tecnologia de ponta na área de genética quantitativa e molecular (GRATTAPAGLIA, 2006).

Marcadores microssatélites (SSR) são utilizados de forma crescente como uma ferramenta útil em programas de melhoramento e produção florestal, além de representar um recurso experimental fundamental para iniciativas genômicas envolvendo mapeamento genético de QTL (“quantitative trait loci”) e ancoragem de mapas genéticos com mapas físicos. Em eucalipto, sua aplicabilidade abrange um espectro desde o direcionamento de cruzamentos entre indivíduos contrastantes até a geração de informações associadas com caracteres de interesse ao melhoramento (GRATTAPAGLIA et al., 2004).

Marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma), permitindo gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética e relacionamentos filogenéticos no germoplasma utilizado pelo melhorista. Loci (SSR- Simple Sequence Repeats) são marcadores baseados na amplificação, que mais tarde passam a ser denominados de “microssatélites” (Litt & Luty, 1989), consistem de pequenos seqüências (sequence motif) com 1 a 4 nucleotídeos de comprimentos, repetidas em tandem, utilizadas de forma crescente como ferramenta extremamente valiosa em programas de melhoramento, produção florestal, em análise de

características qualitativas e quantitativas, sendo empregados para *fingerprinting*, controle de qualidade de cruzamentos direcionados, estimativas de fluxo gênico e de diferenciação genética entre populações. O objetivo do presente trabalho foi desenhar um par de *primers* flanqueadores de locos SSR a partir de seqüências de genes expressos de *Eucalyptus* gerados pelo Consórcio FORESTs / FAPESP, para futuro emprego em estudos de genética e melhoramento.

Para o desenho do par de *primers* flanqueadores das regiões SSRs, evitou-se ao máximo a possibilidade de ocorrência de dímeros, *hairpins* e outras características indesejáveis, que impedem uma boa amplificação do loco SSR, durante a PCR (*polimerase chain reaction*). Empregou-se nesta etapa o software PRIMER 3 (Rozen e Skaletsky, 2000) (http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html), obedecendo-se os seguintes critérios: posições de início e fim dos SSRs a pelo menos 50 bases distantes das extremidades 5' e 3', respectivamente, da seqüência; comprimento médio dos *primers* de 20 bases; comprimento esperado do produto da PCR entre 125 e 300 pb; porcentagem de bases CG dos *primers* entre 40 a 70%, temperatura para pareamento dos *primers* com o DNA molde (T_m) igual ou próxima a 60°C., diferença máxima de 3 °C entre as T_m do par de primers, mínima possibilidade de auto-pareamento dos primers, ausência de *hairpins*. O par de primers, foi desenhado a partir do contig EGUTST2032E04.g contendo um motif mononucleotídico (T) com 18 repetições.

A seqüência consenso do contig EGUTST2050E02 contendo um motif trinucleotídico (GGC) com 8 repetições foi empregada no desenho do par de *primers*. Visando a comparação de homologia desta seqüência consenso com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>), emprego-se a ferramenta bioinformática BLASTXm.

Para extração de DNA empregou-se o método proposto por SAGHAI-MAROOF *et al.* (1984), o qual foi realizado a partir de folhas jovens de plantas constituintes de uma população base de *Eucalyptus camaldulensis*, originária da região de Katherine River, no estado de Queensland, Austrália e instalada em 26/04/1986, na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Engenharia (FEPE), Campus de Ilha Solteira (FE/UNESP). A quantificação do DNA se deu em espectrofotômetro (SAMBROOK *et al.*, 1989), e a qualidade em gel de agarose (0,8%). Cada reação foi constituída de 6 ng de DNA, tampão PCR (Phoneutria) 1X, 2,0mM $MgCl_2$, 0,2µM dNTP (de cada), 1U Taq DNA polimerase (Phoneutria), 1µM primer *foward*, 1µM primer *reverse*, H_2O_{dest} filtrada q.s.p. 13 µl. Para amplificação, as reações foram submetidas ao seguinte programa de termociclagem *touchdown*: 5 ciclos de 94°C por 30 seg, 64°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, 5 ciclos de 94°C por 30 seg, 62°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, 5 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, 5 ciclos de 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, 5 ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg e 72°C por 30 seg e finalmente 25 ciclos de 94°C por 30 seg, 54°C por 30 seg e 72°C por 30 seg.

Os alelos amplificados foram separados através de eletroforese (90 V - 1h 30 min) em gel de agarose (3%, dissolvida em Tampão TBE 1X - Tris 28 mM, ácido bórico 88 mM, EDTA 7 mM, pH 8,3), corados com brometo de etídio (5 µg/ ml de gel) e fotografados com câmera digital em transluminador ultra-violeta. O primer desenhado recebeu a denominação **Euca 65** e a busca de similaridade deste contig com seqüências depositadas no banco de dados NCBI não gerou hit, indicando que se trata de um gene ainda não identificado. Inicialmente testou-se a amplificação em quatro indivíduos da população de *E. camaldulensis* e verificou-se amplificação do locos SSR (Figuras 1). Entretanto observou-se a ocorrência de alelos nulos. Tal fato pode ser decorrente da existência de mutação no DNA destes indivíduos justamente no sítio de ancoragem dos primers, impedindo assim, a amplificação dos locos. Considerando-se que os resultados ainda são preliminares, é possível também que seja necessário testar novas condições de amplificação de forma a elucidar esta questão.

Os resultados são promissores por indicarem a existência de polimorfismo. Entretanto mais estudos são necessários visando melhor eficiência na geração de produtos de PCR, antes que o par de primers seja definitivamente indicado como marcador em estudos genéticos.

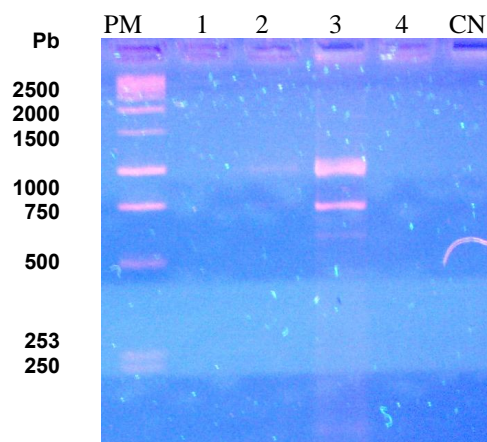


Figura 1- Amplificação de locos SSR a partir de DNA genômico de *Eucalyptus camaldulensis* (canaletas 1 a 4) com o par de primers **Euca 65**. PM- padrão de tamanho molecular.

Referências Bibliográficas

SAGHAI-MAROOF, M. A., SOLIMAN, K., JORGENSEN, R. A., ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacerlength polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. London, v.81, p. 8014-8018, 1984.

SAMBROOK, J., FRITCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor:Press. 1989.

GRATTAPAGLIA, D. Projeto genoma do eucalyptus. Disponível em: <http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2001/agosto/bn.2004-11-25.6686844538/mostra_noticia>. Acesso em: 25 set. 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – Embrapa. Floresta 2004. Disponível em: http://www.embrapa.br/linhas_de_acao/temas_basicos/florestas/index_html/mostra_documento. Acesso em: 25 set. 2006a.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – Embrapa. Florestas - Brasil é referência mundial em eucalipto, 2004. Disponível em: <http://www.embrapa.br/linhas_de_acao/temas_basicos/florestas/florestas_2/mostra_documento>. Acesso em: 25 set. 2006b.

SOARES, T. S., CARVALHO, R. M. M. A., VALE, A. B. **Economic evaluation of *Eucalyptus grandis* stands for multiproduct use**. *Rev. Árvore*, vol.27, n.5, p.689-694, Set 2003. ISSN 0100-6762.

CASTRO, J. **A madeira de eucalipto**, 2001. Disponível em: <<http://www.floresta.ufpr.br/eventos/eucalipto/artigos.htm>>. Acesso em: 25 Setembro 2006.

CAIXETA, R. P., CARVALHO, D., ROSADO, S. C. S. *et al.* **Genetic variations in *Eucalyptus* spp. genotypes detected by means of molecular markers**. *Rev. Árvore*, vol.27, n.3, p.357-363, 2003. ISSN 0100-6762.

GRATTAPAGLIA, D.; BATISTA, A R.S.; LOURENÇO, R. T. et al. **Desenvolvimento e mapeamento de microssatélites de rivados de ESTs em Eucalyptus**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 8p. (Circular técnica, 32).

FERREIRA, M.P, GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa, Brasília, DF 1996. 220p.

Bolsa: Sem Bolsa.