

VALIDAÇÃO DE UM PAR DE PRIMERS DESENHADO A PARTIR DE SEQUÊNCIAS GÊNICAS EXPRESSAS EM *Eucalyptus*.

Wagner Narciso de Campos, Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva, Flávia Amoroso Matos, Mario Luiz Teixeira de Moraes - Departamento Fitotecnia, Engenharia de Alimentos e Sócio-Economia – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - Campus de Ilha Solteira.

O gênero florestal *Eucalyptus* é de grande importância na ecologia florestal da Austrália, e na economia mundial, por ser amplamente cultivado visando produção madeireira e de celulose (POKE *et al.* 2005). Atualmente as plantações de *Eucalyptus* ocupam no Brasil, uma área de cerca de três milhões de hectares (MDICE, 2005). Dada a sua importância, este gênero vem sendo estudado na área genômica buscando-se um maior conhecimento de sua diversidade alélica, assim como o desenvolvimento de marcadores moleculares que possibilitem a construção de mapas de ligação associados com caracteres de interesses silviculturais (MARQUES *et al.*, 2004; MORI *et al.*, 2004). O isolamento de genes e determinação da função do gene tem sido outro aspecto prioritário de estudos envolvendo a clonagem e identificação de genes, perfil da expressão do gene, localização de QTLs, associação de polimorfismos com o fenótipo (POKE *et al.*, 2005).

Uma ferramenta extensamente utilizada para a pesquisa genômica em *Eucalyptus* são os SSRs, entretanto seu uso é ainda limitado em função de longos e laboriosos passos para desenvolvê-los (RAKOCZY-TROJANOWSKA e , BOLIBOK; 2004). Pode-se dizer que as duas estratégias gerais para acessar estas regiões e desenvolver marcadores SSR resumem-se ou na construção de bibliotecas genômicas com sondas complementares às sequências de microssatélites ou na pesquisa de sequências expressas contendo microssatélites, disponíveis em bancos de dados (MORGANTE; HANAFER; POWELL, 1993, GUR-ARIE *et al.*, 2000, RAKOCZY-TROJANOWSKA; BOLIBOK, 2004). Destes, o segundo método é mais eficiente do ponto de vista de custos, simplicidade e rapidez; entretanto apresenta algumas limitações. Uma das limitações é que potenciais polimorfismos podem ser perdidos, pois sendo a busca de SSRs realizada em sequências expressas (ESTs), não abrange a maior parte dos SSRs que conhecidamente estão presentes principalmente em regiões não codificadoras do genoma (RAKOCZY-TROJANOWSKA; BOLIBOK, 2004). Atualmente, cerca de 4000 sequências de DNA genômico nuclear de *Eucalyptus* estão depositadas no banco de dados público NCBI GenBank. (POKE *et al.*, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi desenhar um par de *primers* flanqueadores de locos SSR a partir de sequências de genes expressos de *Eucalyptus* gerados pelo Consórcio FORESTS/FAPESP, assim como verificar a sua amplificação em *E. camaldulensis*.

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 impeçam uma boa amplificação do loco SSR, durante a PCR (*polimerase chain reaction*). Empregou-se nesta etapa o software PRIMER 3 (ROZEN; 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 sequência; 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 sequência consenso empregada no desenho do par de *primers* foi submetida à comparação de homologia com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) através do emprego da ferramenta bioinformática BLASTX .

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 (FEIS/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 MgCl₂, 0,2μM dNTP (de cada), 1U Taq DNA polimerase (Phoneutria), 1μM primer *forward*, 1μM primer *reverse*, H₂O_{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.

Inicialmente testou-se a amplificação em doze indivíduos da população de *E. camaldulensis* e verificou-se que o par de primers **Euca63** apresentou potencial de amplificação dos locos SSR (Figura 1). Entretanto observou-se também a ocorrência de alelos nulos, o que 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. A despeito do baixo número amostral inicialmente em emprego, embora suficiente para propósito inicial de testar amplificação dos primers, já foi possível verificar-se a ocorrência de polimorfismo entre alguns indivíduos. Assim, o emprego do primer EUCA63 denotou a ocorrência de indivíduos homozigotos e heterozigotos para aquele locos (Figura 1).

Os resultados são muito promissores, pois indicam que o par de *primers* denominado **Euca 63** foi eficiente em detectar a existência de polimorfismo, o que é desejado em estudos de avaliação de diversidade genética. Em uma pequena amostra de doze indivíduos cerca de 5 diferentes alelos puderam ser identificados para o locus em estudo. Verificou-se também que nem sempre os produtos obtidos apresentaram o tamanho esperado quando se desenhou o par de primers. Este fato pode ser decorrente do fato dos *primers* terem sido desenhados sobre seqüências expressas, quando provavelmente já havia ocorrido o processamento de mRNA, e portanto excisão de íntrons. Isto faz com que o tamanho da seqüência EST seja diferente do gene que lhe originou. Entretanto ainda há que se trabalhar para melhorar as condições de amplificação visando melhor eficiência na geração de produtos de PCR, antes que o par de primers seja definitivamente indicado como marcador em estudos genéticos. Para tanto os testes devem prosseguir empregando-se um maior número amostral, diferentes condições de amplificação e também de eletroforese, ou seja uma matriz que permita uma melhor resolução de bandas, como a policrilamida. Nossa equipe encontra-se empenhada nesta nova etapa de estudo.

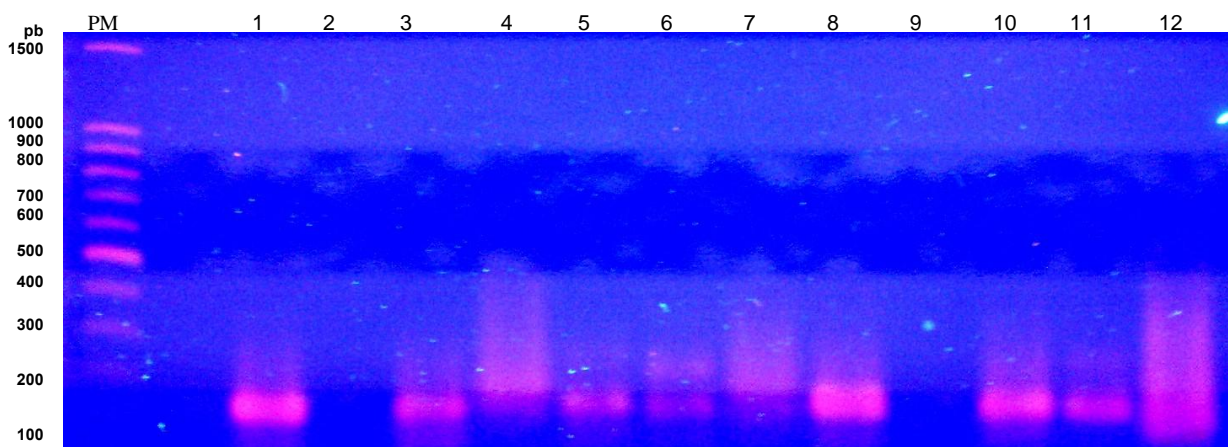


Figura 1- Amplificação de locos SSR a partir de DNA genômico de *Eucalyptus camaldulensis* (canaletas 1 a 12). com os primer **Euca63**. PM- padrão de tamanho molecular.

Apoio financeiro: Prodoc CAPES

Referências Bibliográficas

GUR-ARIE, R. et al. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Genome Research**, p. 62-71. jan. 2000. Disponível em: <<http://www.genome.org/cgi/content/abstract/10/1/62>>. Acesso em: 27 set. 2006.

MARQUES, C. et al. Conservation and synteny of SSR loci and QTLs for vegetative propagation in four *Eucalyptus* species. **Theoretical And Applied Genetics**, p. 474-478. 19 fev. 2004. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/km2m9w5fxd0thu0v/>>. Acesso em: 27 set. 2006.

MDICE - MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMERCIO EXTERIOR Setor de Madeira e Móveis. Disponível em: <http://sistemasweb.desenvolvimento.gov.br/investimento_web/interna.asp?htm=conteudo/21.htm>. Acesso em: 28 mai 2005.

MORGANTE, M.; HANAFER, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nat. Genet.**, p. 194-200.1993.

MORI, E.s. et al. Researching eucalypt expressed sequence tags of FORESTs database for plant growth hormone genes. In: PLANT & ANIMAL GENOMES, 7., 2004, San Diego. **Researching eucalypt expressed sequence tags of FORESTs database for plant growth hormone genes**. San Diego: Plant & Animal Genomes, 2004. p. 10 - 14.

POKE, F.S. et al. Genomic research in *Eucalyptus*. **Genetica**, Tasmania, p. 79-101. 21 set. 2005. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/k101x01707054324/>>. Acesso em: 27 set. 2006.

RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Warszawa, p. 221-238. 09 mar. 2004. Disponível em: <http://www.cmbi.org.pl/pdf/Vol9_p221.pdf>. Acesso em: 27 set. 2006.

ROZEN, S., SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology** (eds Krawetz S, Misener S), p.365–386. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2000.

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.