

UTILIZAÇÃO DE BANCOS DE DADOS ESTS PARA DESENVOLVIMENTO DE PRIMERS FLANQUEADORES SSR EM

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

Atualmente constata-se um acentuado crescimento dos plantios de *Eucalyptus* no Brasil, visando comercialização de seus produtos. Os mapeamentos genéticos destas espécies têm sido obtidos através de diferentes métodos, incluindo RAPD, RFLP, AFLP, isoenzimas e microssatélites. Isto tem permitido a localização de importantes QTLs nos mapas genéticos, os quais geralmente determinam características de interesses econômicos como: capacidade de propagação vegetativa; tolerância a geada; crescimento e qualidade da madeira etc. (RABELLO et al. 2005).

Microssatélites, também conhecidos como SSR, são marcadores moleculares valiosos em “fingerpriting”, identificação de paternidade, controle de qualidade e de cruzamento, estimação de taxa de autocruzamento, avaliação de diferenciação genética e estimativa de fluxo genético. Em contraste com estas importantes aplicações, esses marcadores têm sido menos utilizados para reconstrução filogenética, principalmente devido à assimetria no processo de mutação e de degradação de repetições todo o tempo. (GOLDESTINE e POLLOCK, 1997, citado por MARQUES et al. 2002).

A principal desvantagem dos microssatélites é seu alto custo de desenvolvimento em função de dificuldades em se isolar regiões repetidas com alta abundância no genoma de plantas. Os métodos padrões para o desenvolvimento destes marcadores envolvem muito tempo e trabalho intenso, pois requerem a construção de bibliotecas com pequenos insertos, hibridização com sondas e seqüenciamento dos clones candidatos. Dessa forma, o desenvolvimento destes marcadores pode ser realizado de diferentes formas: via bibliotecas genômicas, bibliotecas genômicas enriquecidas, bibliotecas BAC/YAC e via bibliotecas de cDNA (SCOTT et al., 2000).

Embora seja inquestionável a eficiência da aplicação dos marcadores SSR nos estudos genéticos e nos programas de melhoramento de espécies florestais, o custo de desenvolvimento destes é muito alto. Entretanto, o método de desenvolvimento de baseado em seqüências EST apresenta vantagens sobre os métodos tradicionais, pois implica na utilização de seqüências EST depositadas em bancos de dados, minimizando, portanto os custos de geração de dados (KANTETY et al. 2004).

Outra alternativa de barateamento e de ampliação do emprego dos marcadores gerados é a possibilidade de transferibilidade dos mesmos, entre espécies relacionadas. Sob essa ótica, é importante verificar a ocorrência de sintenia, ou seja, de conservação na ordem de genes entre espécies relacionadas (CIB, 2005). A transferibilidade de microssatélites é uma consequência da homologia da seqüência de DNA das regiões que flanqueiam os microssatélites (ZUCCHI, 2003), e o sucesso de amplificação de DNA heterólogo, é inversamente proporcional à distância evolutiva entre as espécies envolvidas (ZUCCHI et al. 2002).

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver dois pares de primers microssatélites para *Eucalyptus* através de metodologia que propiciasse uma minimização dos custos e do tempo necessário, quando comparados com as metodologias tradicionalmente empregadas nestas abordagens.

A escolha dos locos foi realizada pelo programa Sattelyptus (CERESINI et al. 2005) a partir de uma amostra de seqüências ESTs geradas pelo Consórcio FORESTs [<http://esalq.usp.br/ciagri> (acesso restrito com senha)] Para o desenho dos *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*.

Conforme apresentado por Ceresini et al. (2005), as seqüências consenso empregadas no desenho dos *primers* foram caracterizadas de acordo com a função gênica, considerando informações geradas pela ferramenta bioinformática BLASTX de comparação de homologia as comparou com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>).

Para extração de DNA empregou-se o método proposto por Saghai-Maroofof 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), 1uM primer *foward*, 1uM 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.

Os pares de *primers* gerados apresentaram as seguintes características: -primer Euca 30, proveniente do contig EGUTRT3110E03, flanqueia o motif GAG (8), similaridade (*e-value* 1,00e-114) com uma proteína putativa de transporte de Fe(II) presente em *Arabidopsis thaliana*, e primer Euca 39: proveniente do contig EGUTRT3344D11, flanqueia o motif TC(12)GAG(6), e apresenta similaridade (*e-value* 3,00e-47) com a proteína RAD23 cuja função é o reparo e excisão de nucleotídeos. Ainda são raros os relatos sobre as funções dos microssatélites localizados próximos ou dentro das regiões codificantes dos genes das plantas (LIEWLAKSANEYANAWIN et al. 2004). Entretanto é conhecido que em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) repetições de motifs mono, di e tetranucleotídicos são localizados principalmente em posições intergênicas, enquanto os trinucleotídeos encontram-se em ORFs (*open read frames*) envolvidas com a regulação celular (RICHARD e DUJON, 1966, YOUNG et al. 2000).

Inicialmente testou-se a amplificação em quatro indivíduos da população de *E. camaldulensis* e verificou-se potencial de amplificação dos locos SSR (Figuras 1 e 2). Observou-se também a presença 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. Entretanto, como os resultados ainda são preliminares, é possível que outros testes com diferentes condições de amplificação permitam elucidar esta questão.

A despeito do baixo número amostral inicialmente em emprego, embora suficiente para propósito inicial de testar-se a amplificação dos *primers*, já foi possível verificar-se a ocorrência de polimorfismo entre alguns indivíduos. Assim, o emprego do primer EUCA30 denotou a ocorrência de indivíduos homozigotos e indivíduos heterozigotos para aquele loco (Figura 1), com alelos de cerca 500pb e de 150pb.

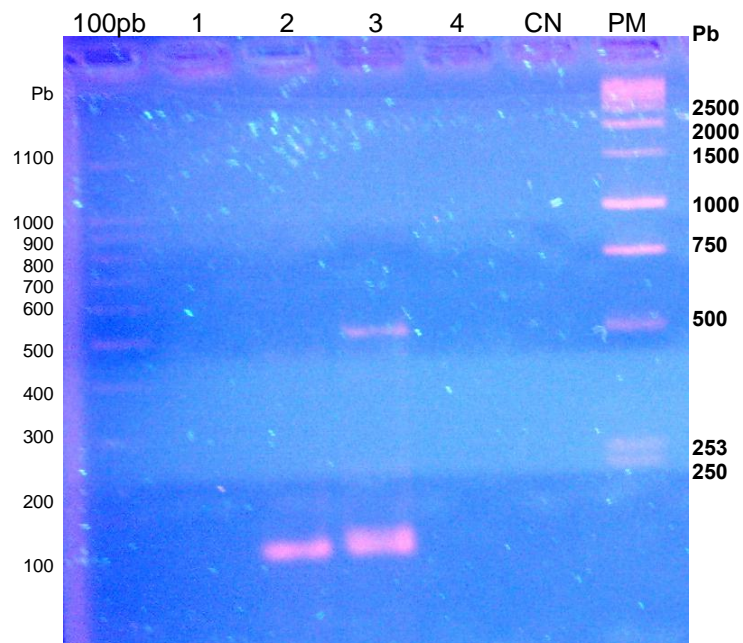


Figura 1- Teste de amplificação com o primer EUCA30 (canaletas 1 a 4 – amostras *Eucalyptus camaldulensis*). CN- controle negativo. PM- padrão de tamanho molecular (100 pb e 1kb)

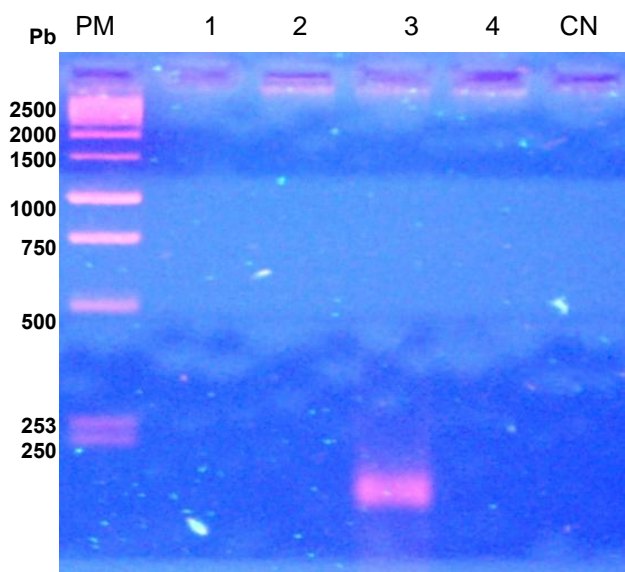


Figura 2- Teste de amplificação com o primer EUCA39 (canaletas 1 a 4 – amostras *Eucalyptus camaldulensis*). CN- controle negativo. PM- padrão de tamanho molecular (1kb)

Os resultados, embora ainda preliminares, são bastante promissores, indicando que esta estratégia pode gerar economia de tempo e trabalho na produção primers a serem utilizados em estudos de genética populacional, de conservação de biodiversidade ou de melhoramento genético. Entretanto antes do efetivo

uso destes primers 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 poliacrilamida. Nossa equipe encontra-se empenhada nesta nova etapa de estudo.

Apoio financeiro: Prodoc CAPES

Referências Bibliográficas

- CERESINI, P.C.; SILVA, C.L.S.P.; MISSIO, R.F.; SOUZA, E.C.; FISCHER, C.N.; GUILHERME, I.R.; GREGÓRIO, I.D.; SILVA, E.H.T.; CICARELLI, R.M.B.; SILVA, M.T.A.; GARCIA, J.F.; AVELAR, G.A.; PORTO NETO, L.R.; MARÇON, A.R.; BACCI JÚNIOR, M.; MARINI, D.C. Satellyptus: analysis and databases of microsatellites from ESTs of *Eucalyptus*. **Genetic and Molecular Biology**, v.28, n.3, suppl, p.589-600, 2005.
- CIB- Conselho de informações sobre biotecnologia. Glossário. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/glossario.php?letra=S>>. Acesso em: 02 jul 2005.
- KANTETY, R.V., M.L. ROTA, D.E. MATHEWS, AND M.E. SORRELLS. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. **Plant. Mol. Biol. Rep.** v. 48, p.501-510, 2002.
- LIEWLAKSANEYANAWIN, C., RITLAND, C.E., EL-KASSABY, Y.A., RITLAND, K. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs, TAG **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, n.2, p. 361-369, 2004.
- MARQUES, C.M.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Conservation and synteny of SSR loci and QTLs for vegetative propagation in four *Eucalyptus* species. **Theor Appl Genetic** , v.105, p.474-478, 2002
- RABELLO, E.; SUZA, A.N.; SAITO, D.; TSAI S.M. In silico characterization of microsatellites in eucalyptus spp.: Abundance, length variation and transposon associations. **Genetics and Molecular biology**, v.28, n.3, p.582-588, 2005.
- RICHARD GF, DUJON B Distribution and variability of trinucleotide repeats in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v.174, p.165–174, 1996.
- 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.

- SCOTT KD, EGGLER P, SEATON G, ROSSETTO M, ABLETT EM, LEE LS, HENRY RJ. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. **Theor Appl Genet**, v.100, p.723–726, 2000.
- YOUNG, E.T., SLOAN, J.S., VAN RIPER, K. Trinucleotide repeats are clustered in regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v.154, p.1053–1068, 2000.
- ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.V.; PINHEIRO, J.B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, Loughborough, v.2, n.4, p.512-514, 2002.
- ZUCCHI, M.I. BRONDANI, R.P.V., PINHEIRO, J.B. *et al.* Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p.449-457, 2003.