

PADRONIZAÇÃO DE REAÇÕES PCR PARA EMPREGO DE PRIMERS SSR DESENHADOS A PARTIR DE SEQUÊNCIAS GÊNICAS EXPRESSAS EM *Eucalyptus*.

Hélio Sandoval Junqueira Mendes, Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva, Deise Reis de Paula, Mario Luiz Teixeira de Moraes. Inter-áreas - Agronomia - Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia – Faculdade de Engenharia – Campus de Ilha Solteira.

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento vegetal eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de identificação visual, como nanismo, cor de pétala e deficiência clorofítica. Atualmente sequências simples repetidas (SSR – Simple Sequence Repeats) também denominadas de microssatélites, que consistem de pequenas sequências (“sequence motif”) com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento repetidas em tandem, são ferramentas de grande importância em estudos de variabilidade genética e úteis em programas de melhoramento e produção florestal especialmente em *Eucalyptus* (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1996). Tais marcadores possuem caráter codominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados, além de serem altamente multialélicos e ainda possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) permitindo assim uma adequada identificação dos genótipos dos indivíduos avaliados (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1996).

As análises de identificação de genótipos com emprego de marcadores moleculares são conduzidas na Genética Vegetal com diferentes propósitos, entre eles: geração de *fingerprinting*, controle de qualidade de cruzamentos direcionados, estimativa de fluxo gênico e de diferenciação genética entre populações. Os projetos GENOLYPTUS e FORESTs geraram bancos de dados de ESTs (“expressed sequence tags”) de diferentes espécies e tecidos de *Eucalyptus* com múltiplos objetivos de desenvolvimento em pesquisa genômica e investigação funcional (GRATTAPAGLIA et al., 2004). Estes bancos representam uma fonte extremamente útil e importante para o descobrimento de novos microssatélites, além daqueles já desenvolvidos a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas (BRONDANI et al., 1998; BRONDANI et al., 2002).

Visando futuro emprego em estudos de genética e melhoramento, o objetivo do presente trabalho foi desenhar um par de *primers* flanqueadores de locos SSR a partir de sequências de genes expressos (ESTs) de *Eucalyptus* gerados pelo Consórcio FORESTs / FAPESP, e também verificar as melhores condições de amplificação.

Havia interesse em ESTs que possuísem o motif TCC, e para localização do mesmo utilizou-se o programa Sattelyptus (CEREZINI et al., 2005) a partir de uma amostra de sequências ESTs geradas pelo Consórcio FORESTs [<http://esalq.usp.br/ciagri>] (acesso restrito com senha). Para o desenho dos *primers* flanqueadores da região SSR, 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 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*.

Dessa forma o par de primers foi desenhado a partir do contig EGUTSL7212H07 contendo um motif trinucleotídico TCC com oito repetições em tandem. Buscou-se homologia deste contig com as sequências depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>), entretanto nenhum hit foi obtido, significando portanto que trata-se de um gene provavelmente ainda não determinado, ou seja, sua função até o momento é desconhecida.

O par de primers foi desenhado com auxílio do software PRIMER3, e recebeu a denominação **Euca 57**. 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%). A PCR foi inicialmente conduzida utilizando-se as condições propostas por Brondani et al. (1998) a saber: 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), 1uM primer *forward*, 1uM primer *reverse*, H₂O dest filtrada q.s.p. 13 μl. Posteriormente, visando a maior eficiência de amplificação, diferentes concentrações de cloreto de magnésio (1,0mM, 1,5mM, 2,0mM e 2,5mM) e do par de primers (0,3 uM e 1 uM) foram testadas durante as amplificações, assim como diferentes temperaturas de pareamento (Tabela 1).

Tabela 1- Condições de termociclagem testadas para amplificação de locos SSR, utilizando-se o par de primers Euca 57 com o DNA genômico de *Eucalyptus camaldulensis*.

Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4
1 ciclo de: 96 °C for 2 min 29 ciclos de: 94°C for 1 min 56°C for 1 min 72°C for 1 min 1 ciclo de : 72°C for 7 min	1 ciclo de: 96 °C for 2 min 29 ciclos de: 94°C for 1 min 58°C for 1 min 72°C for 1 min 1 ciclo de : 72°C for 7 min	1 ciclo de: 96 °C for 2 min 29 ciclos de: 94°C for 1 min 60°C for 1 min 72°C for 1 min 1 ciclo de : 72°C for 7 min	Touchdown 5 ciclos iniciais de 94°C for 1 min 64°C for 1 min 72°C for 1 min A cada grupo de cinco ciclos repetia-se as mesmas condições, alterando-se entretanto, a temperatura de pareamento com decréscimo de 2°C, até atingir 54 °C, quando então repetiu-se por 25 vezes

As duas concentrações de primers empregadas diferiram na performance do amplificado, entretanto verificou-se que os melhores resultados foram obtidos com [MgCl₂]= 2mM e termociclagem do tipo *touchdown*. Os resultados são promissores por indicarem a existência de polimorfismo, embora nem sempre os produtos obtidos possuem o tamanho esperado. 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.

Referências Bibliográficas

SAGHAI-MAROOF, M. A., SOLIMAN, K., JORGENSEN, R. A., ALLARD, R. W. Ribossomal DNA spacerlength polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromossomal 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. **Molecualr cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Press. 1989.

GRATTAPAGLIA, D., BATISTA, A R.S., LOURENÇO, R. T. et al. **Desenvolvimento e mapeamento de microssatélites derivados de ESTs em Eucalyptus**. Circular Técnica, Brasília, DF, Dezembro, 2004.

BRONDANI, R.P.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. towards a genus-wide reference linkage map for Eucalyptus based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Molecular Genetics and Genomics**, berlin, v.267, p.338-347, 2002.

BRONDANI, R.P.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in Eucalyptus grandis and E. urophylla. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 816-827, 1998.

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

Bolsa: Sem Bolsa.