

095-Desenvolvimento de uma biblioteca enriquecida em microssatélites de *Parkinsonia praecox* subsp. *praecox* (verde-oliva)

*Development of a microsatellite-enriched library of *Parkinsonia praecox* subsp. *praecox* (Verde-Oliva)*

ALVES, Fábio de Matos. UNICAMP, matos_fabio@yahoo.com.br; SOUZA, Anete Pereira. UNICAMP, anetepsouza@gmail.com; CERQUEIRA-SILVA, Carlos B. Moreno. UNICAMP, cerqueirasilva1@yahoo.com.br; SARTORI, Ângela Lúcia Bagnatori. UFMS, albsartori@gmail.com.

Resumo

Parkinsonia praecox, característica de formações chaquenhas, e tem recebido fortes pressões antrópicas. O presente trabalho objetivou o desenvolvimento e a caracterização de uma biblioteca genômica enriquecida em microssatélites. Para tanto, foi coletado material foliar de um indivíduo de *P. praecox*, localizado na fazenda Retiro Conceição, Porto Murtinho, Mato Grosso do Sul, Brasil. Foram gerados 95 clones que foram sequenciados, originando 101 sequências entre singlets e contigs. Foram totalizados 70 motivos dinucleotídeos; quatro motivos trinucleotídeos e 21 motivos compostos; refletindo em 95 sequências com motivos de microssatélites. Destas 95 seqüências, foram possíveis desenhar 27 primers que passarão pelo processo de caracterização dos marcadores microssatélites obtidos, e à análise da variabilidade genética dessa espécie na região chaquenha.

Palavras-chave: Caesalpinioideae, *Cercidium praecox*, Chaco, Savana Estépica, SSR.

Abstract

Parkinsonia praecox is characteristic specie of chaquenian flora, lately, it has receiving strong anthropogenic pressures. The main goal of this study was creating and the characterization of a microsatellite-enriched genomic library. We collected samples of leaves from one specimen of *P. praecox*, located in Retiro Conceição's Farm, Porto Murtinho, Mato Grosso do Sul, Brazil. We generated 95 clones that were sequenced, resulting in 101 sequences of singlets and contigs. From all theses sequences we got 70 dinucleotide motifs, four trinucleotídeos motifs and finally 21 compounds motifs, reflecting on 95 sequences with microsatellites' motifs. From these 95 sequences, 27 were possible to draw primers, wich, these sequences will pass through the characterization of markers obtained and analysis of genetic variability of this specie for this chaquenian's place.

Keywords: Caesalpinioideae, *Cercidium praecox*, Chaco, Stepic Savannah, SSR.

Introdução

Leguminosae é a família botânica mais representativa em diversas formações vegetacionais brasileiras; sua importância, tanto econômica, quanto ecológica, tem sido amplamente discutida em diversos trabalhos. *Parkinsonia praecox* (Ruiz & Pav.) J. A. Hawkins subsp. *praecox* (Verde-Oliva) é uma leguminosa pertencente à subfamília Caesalpinioideae, característica de formações chaquenhas, embora não seja endêmica. Os estudos para esta espécie são mais comuns para os táxons norte-americanos, contudo os dados da espécie sul-americana ainda são pouco frequentes.

Marcadores moleculares são definidos como o fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou um segmento de específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A importância dos marcadores moleculares de DNA é evidenciada em programas de

melhoramento, mapeamento genético, estudos taxonômicos, bem como estudos relacionados à conservação.

Os marcadores Microssatélites (Sequências Simples Repetidas - SSR) têm sido vastamente utilizados por apresentarem características tais como: altamente polimórficos, multialélicos, estáveis, co-dominantes, distribuído pelo genoma dos procariontes e eucariontes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), entre outras características, que tornam este marcador desejável para diversas finalidades. Contudo, estes marcadores requerem a construção de uma biblioteca genômica enriquecida com microssatélites, sequenciamento dos clones e desenho dos primers (BRAMMER, 2000).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma biblioteca genômica enriquecida em microssatélites para *P. praecox* subsp. *praecox*.

Metodologia

Para construção da biblioteca foram coletadas folhas de um indivíduo de *Parkinsonia praecox* subsp. *praecox* (Verde-Oliva), localizado na fazenda Retiro Conceição (21°41'58.6"S e 57°45'50.1"W), Porto Murtinho, Mato Grosso do Sul. As folhas foram armazenadas em sílica-gel, para a posterior extração de DNA.

O material foliar passou pelos seguintes procedimentos: 1) extração de DNA do material segundo a metodologia de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990); 2) digestão com a enzima Rsa I, a fim de gerar fragmentos de DNA com tamanhos adequados; 3) ligação de adaptadores para que os fragmentos tenham uma terminação comum conhecida; 4) amplificação dos fragmentos; 5) purificação para a seleção de fragmentos de interesse usando o kit "Quiaquick PCR purification kit"; 6) seleção de fragmentos contendo microssatélites; 7) amplificação dos fragmentos selecionados; 8) clonagem em Vetor pGEM-T; 9) transformação em XL1-Blue; 10) manutenção dos clones; 11) amplificação dos insertos clonados; 12) inoculação e extração plasmidial e 13) sequenciamento com o kit Big Dye (vs3.1), purificação, análise das seqüências e construção de oligonucleotídeos. As etapas posteriores foram: a) edição das sequências com auxílio do pacote computacional DNASTar; b) identificação e exclusão das sequências adaptadoras; c) identificação das regiões de microssatélites com auxílio do site Gramene (www.gramene.org); e d) desenho dos primers com auxílio do Primer3PLUS (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Resultados e discussões

Foram gerados 95 clones que foram sequenciados, originando 101 seqüências entre *singlets* e *contigs*, sendo destas, 85 potencialmente úteis para o desenho dos primers (com mais de 100 bp). Após a exclusão das regiões dos adaptadores foram identificados 95 motivos de microssatélites, sendo 74 simples e 21 compostos (Figura 1).

Destas 85 seqüências, foram possíveis desenhar primers em 27 delas, as quais ainda passarão pelo processo de síntese e avaliação (Tabela 1). A construção dos primers será fundamental para a análise genética de outros exemplares da espécie estudada (Verde-Oliva).

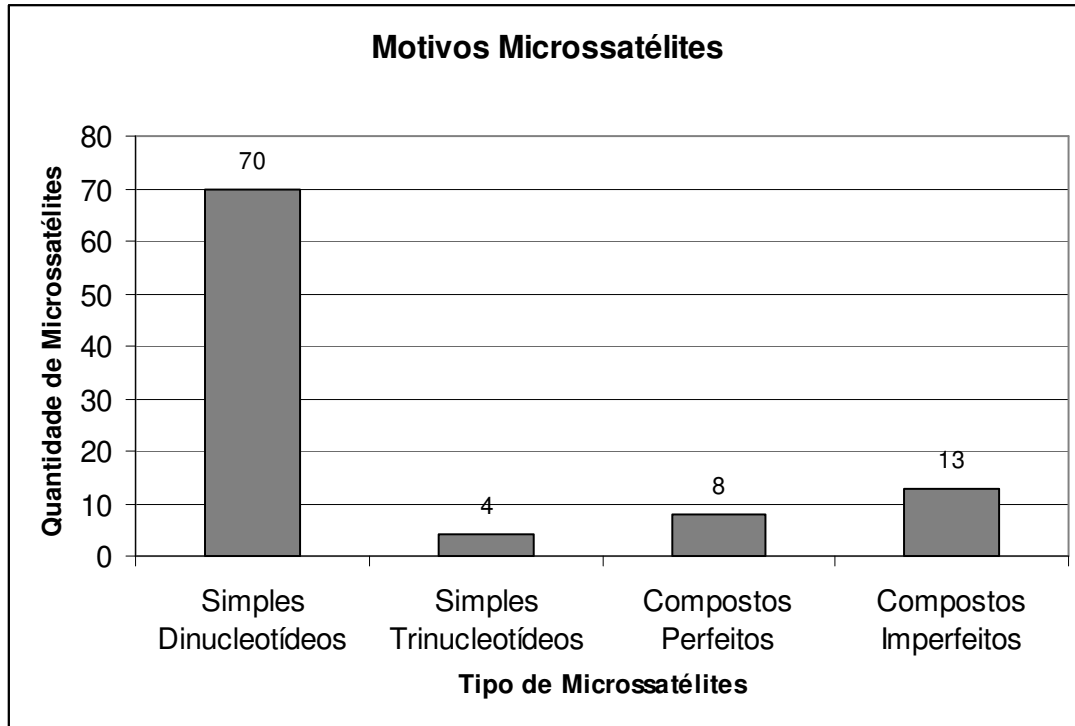


Figura 1. Motivos microsatélites registrados após a exclusão dos marcadores evidenciando a quantidade e os tipos, dos motivos microsatélites obtidos.

Tabela 1. Amostra de dados obtidos pelo desenho dos primers para *P. praecox* subsp. *praecox*, com os motivos, tamanho esperado do primers e a temperatura média.

Contig	Motivo	Tamanho esperado (bp)	Temperatura PCR
002	(AT) ₅	206	51°C
009	(AG) ₁₂	148	59°C
011	(GT) ₆ (TG) ₉ (TA) ₆	254	55°C
015	(AC) ₇	318	51°C
020	(AC) ₂₀	170	60°C
022	(TG) ₈	234	58°C
023	(TG) ₈	286	58°C
025	(GT) ₁₃ (GA) ₄	319	60°C
030	(CA) ₉	306	58°C
031	(TA) ₇ (AC) ₁₀	279	60°C
035	(TG) ₁₄	180	56°C
036	(AC) ₁₃	241	56°C
037	(TC) ₉ (AC) ₇	144	54°C
040	(TG) ₂₃	307	60°C
047	(CAT) ₆	263	60°C
048	(GT) ₁₄	217	58°C
050	(AC) ₆ G(CA) ₆	263	60°C
052	(CT) ₂₀	271	60°C
060	(TG) ₈ (TA) ₆	282	52°C
061	(CT) ₅ TTCTC(TG) ₈	302	60°C
062	(CTT) ₄	277	60°C
067	(CA) ₉	101	56°C
069	(TTC) ₇	118	60°C
041	(TG) ₈	100	58°C
066	(AC) ₅ (AT) ₄	302	58°C
073	(AC) ₁₀	266	54°C
080	(AC) ₁₀	222	55°C

A criação e caracterização de uma biblioteca genômica enriquecida é fundamental para a busca de regiões microssatélites para construção de primers. Os primers desenhados, passarão pelo processo de caracterização dos marcadores microssatélites e serão úteis em estudos envolvendo a árvore Verde-Oliva (*Parkinsonia praecox*). Uma vez que os marcadores em microssatélites em geral apresentam uma boa taxa de transferência, tais marcadores terão potencial a serem utilizados para outras espécies do gênero e possivelmente em outros membros de Caesalpinioideae tanto nativos como jatobá, fedegoso, pau Brasil, copaíba e exóticas como o tamarindo. Tais dados serão úteis em futuros estudos abrangendo tanto a conservação dos recursos genéticos como poderão ser aplicados em programas de melhoramento de plantas nativas e comerciais.

Conclusões

A conservação por meio de cultivo e domesticação de plantas, bem como o melhoramento através da escolha fenotípica, tem sido utilizada pelo homem há muitos anos. Contudo, a escolha dos melhores e mais saudáveis exemplares não implicam necessariamente na obtenção de uma boa carga genética refletido pelas grandes perdas anuais de produtos agrícolas devido as pragas ou condições ambientais, resultado muitas vezes de uma pobre carga genética. Desta forma, o uso de marcadores moleculares são fundamentais, por auxiliarem a detecção e solução de problemas relacionados a produtividade e melhoramento tanto das plantas cultivadas como nativas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES e ao CNPq pelos recursos financeiros disponibilizados.

Referências

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo-RS, Embrapa Trigo, 2000. 7 p. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.htm. Acesso em: 23 ago. 2010.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220 p. (Embrapa Cenargen. Documentos, 20).