

AVALIAÇÃO DE REGIÕES MICROSSATÉLITES DO GENOMA DE *Cereus peruvianus*

Mayara Destro Passere (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Claudete Aparecida Mangolin (Co-orientador), Maria de Fátima Pires da Silva Machado (Orientador), e-mail: mfpsmachado@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/Maringá, PR.

Área: 2.02.00.00-5 Genética / Subárea: 2.02.03.00-4 Genética Vegetal

Palavras-chave: *Cereus peruvianus*, mandacaru, SSR

Resumo

A proposta no presente estudo foi a padronização das reações de amplificação para dez pares de *primers* de microsatélites, previamente desenhados a partir do genoma de *Cereus peruvianus*, para selecionar os microsatélites polimórficos. Esta espécie de cactos, conhecida como mandacaru em várias regiões brasileiras, tem importância econômica e industrial, e os microsatélites polimórficos poderão ser usados como marcadores moleculares em investimentos para caracterizar a diversidade genética e analisar a estrutura das populações da referida espécie. Dos 10 pares de *primers* testados 60% apresentaram potencial para estudar o genoma de *C. peruvianus*, e representam o primeiro conjunto de marcadores específicos desenvolvido para este genoma..

Introdução

A espécie *Cereus peruvianus* Mill. tem sido alvo de investigações no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV) desde a década de 1990. O interesse é avaliar a diversidade genética desta espécie, considerada como uma espécie de importância econômica e industrial (Barros e Nozaki, 2002; Tanaka et al., 2010). A diversidade genética tem sido examinada usando diferentes marcadores moleculares em plantas regeneradas *in vitro* e em plantas coletadas em jardins públicos e domésticos, e em reservas naturais (Faria-Tavares et al., 2013). Um dos marcadores moleculares mais recomendados para analisar diversidade genética e a estrutura genética das populações, por apresentar herança codominante, são os locos de sequências simples repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeated*), também denominados como microsatélites (Litt e Luty, 1989). As sequências de DNA que flanqueiam as regiões repetidas dos locos SSRs podem ser utilizadas como *primers*. Estes *primers* são utilizados para a amplificação dos microsatélites. Como não há informações sobre as sequências microsatélites do genoma de plantas do gênero *Cereus*, a proposta no presente estudo é identificar os microsatélites polimórficos para

serem utilizados para analisar a diversidade genética e a estrutura das populações da espécie *C. peruvianus*. O objetivo no presente estudo foi a padronização das reações de amplificação para dez pares de *primers* previamente desenhados, e a amplificação do DNA, para selecionar os microssatélites polimórficos.

Materiais e métodos

O DNA de cinco plantas de *C. peruvianus* coletadas de diferentes regiões do Brasil foi extraído utilizando o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999), com modificações referentes à concentração de NaCl, incubação com RNase e etapa adicional de purificação com clorofórmio:isoamílico (24:1). O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X, usando soluções de DNA padrão (Fago λ) com concentrações de 50, 100 e 150 ng. O gel foi corado em solução de brometo de etídio contendo 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 30 minutos, e a imagem foi capturada. Para a padronização da amplificação dos microssatélites foram utilizados 10 dos 34 pares de *primers* obtidos da biblioteca enriquecida para o genoma de *C. peruvianus* (Tabela 01).

Tabela 01 – Identificação dos Clones, denominação do par de *primers*, sequências (*Forward* e *Reverse*), sequência e número de repetições do microssatélite.

Clone	Nome do <i>Primer</i>	<i>Primer</i>	Repetição
Clone 3	mCER01	F: TATGAGACGATACACACCCACC R: GCGTGGACTAACATACATCCCT	(act) ₄
Clone6b	mCER02	F: ACCTGCACTTTCTCCATTTTAC R: AATTGGCCTTTGGAAACCTT	(aaat) ₃
Clone 9	mCER03	F: GGCATACCTCAGACTAAAGAG R: TAGCGGATTTGGCTTCACATA	(gga) ₃
Clone 2	mCER04	F: ATACTCCAAACGCCCTACTTCC R: GTCAAAGCACCCCTAGTTCAGAGA	(tct) ₃
Clone15	mCER05	F:TAAGGAATGTGATCAGCAGAGTG R: GTTCACTAGCACTGTCACCTCAA	(ac) ₁₅
Clone26	mCER06	F: CAACCTGTTTGCTATGCACATCT R:GAGGTGCAGTGAAGAATTTGAGT	(at) ₄
Clone27	mCER07	F: TGGCTTCTTTATCGGAATAGGAC R: GTCTTCGCGTGGAGTATCTCTTA	(ttc) ₃
Clone 5a	mCER08	F: ATCAGCAGAGTGGTCGTATCAAC R: CATTACACCTCATCCCTTGCTTA	(ac) ₁₅
Clone 8	mCER09	F: CCTACAATGCCCAACCACTC R: CGGGCTTCTTAAGACCAACA	(ag) ₃₃ (gat) ₂
Clone 20	mCER10	F: GCTATCACTGCCGGACGTA R: GGTCAGGCTTTGTGAGGGTA	(g) ₆ X(g) ₆

Foram realizadas reações de PCR com 15 e com 20 ng de DNA molde, 1 U Taq DNA polimerase, 2 μL do tampão 10X, foi utilizado 0,5 μM dos *primers* R e F específicos, foram testadas as concentrações de 2,0, 2,5 e 3,0 mM de MgCl_2 , 0,8 μL de dNTP (2,5 mM de cada) e água mili-Q para o volume de 20

μL. As amostras foram inicialmente amplificadas com o programa *TouchDown* PCR, as amostras que não amplificaram foram submetidas ao programa Microcacto variando a temperatura de anelamento em 40, 44, 45, 48, 50, 58 e 60 °C. Aos produtos das ampliações foram separados em gel de agarose 4% (50% de agarose Metaphor e 50% de agarose comum) usando tampão TBE 0,5X. Para estimar o tamanho dos alelos amplificados, foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pb *DNA Ladder* (Invitrogen). Os géis foram expostos a um campo elétrico de 60 Volts por 4 horas e corados em solução de brometo de etídio 0,5 μg/mL. A imagem foi capturada em transiluminador L-PIX HE, Locus biotecnologia.

Resultados e Discussão

Os 10 pares de *primers* foram testados inicialmente com o programa *Touchdown* PCR e para aqueles não produziram produtos de amplificação com este programa foram realizados novos experimentos, utilizando as temperaturas de anelamento de 60, 55, 50, 48 45, 44 e 40°C (Tabela 02).

Tabela 02 – Identificação dos clones para os quais foram sintetizados os pares de *primers*, as sequências dos *primers* F e R, os motivos e o número das sequências repetidas, temperaturas de anelamento testadas, número e tamanho em pares de bases (pb) para os alelos dos microssatélites.

Nome do Primer	Primer	Temperatura de anelamento	Alelos amplificado	Tamanho dos alelos
mCER01	F: TATGAGACGATACACCCCACC R: GCGTGGACTAACATACATCCCT	60, 55, 50, 48 45, 44 e 40°C e <i>Touchdown</i> PCR	Nenhum	
mCER02	F: ACCTGCACTTTCTCCATTTTAC R: AATTGGCCTTTGGAAACCTT	60, 55, 50, 48 45, 44 e 40°C e <i>Touchdown</i> PCR	Nenhum	
mCER03	F: GGCATACCTCAGACTAAAGAG R: TAGCGGATTTGGCTTCACATA	60, 55, 50, 48°C* e <i>Touchdown</i> PCR	1	60pb
mCER04	F: ATACTCCAAACGCCCTACTTCC R: GTCAAAGCACCCCTAGTTCAGAGA	60, 55, 50, 48 45, 44 e 40°C e <i>Touchdown</i> PCR	Nenhum	
mCER05	F: TAAGGAATGTGATCAGCAGAGTG R: GTTCACTAGCACTGTCACCTCAA	60°C	2	171-186pb
mCER06	F: CAACCTGTTTGCTATGCACATCT R: AGGTGCAGTGAAGAATTTGAGT	60°C	1	225pb
mCER07	F: TGGCTTCTTTATCGGAATAGGAC R: GTCTTCGCGTGGAGTATCTCTT A	60, 55, 50, 48 45, 44 e 40°C e <i>Touchdown</i> PCR	Nenhum	
mCER08	F: ATCAGCAGAGTGGTCGTATCAAC R: CATTACACCTCATCCCTTGCTTA	45 °C e <i>Touchdown</i> PCR	1	600pb

mCER09	F: CCTACAATGCCCAACCACTC R: CGGGCTTCTTAAGACCAACA	45 °C e <i>Touchdown</i> PCR	1	Não definido
mCER10	F: GCTATCACTGCCGGACGTA R: GGTCAGGCTTTGTGAGGGTA	45 °C e <i>Touchdown</i> PCR	1	Não definido

Com o programa *Touchdown* PCR o *primer* mCER08 amplificou um alelo de 600pb. Com a temperatura de anelamento de 60°C foram amplificados dois alelos usando os *primers* mCER05 (171 e 186 pb) e o alelo 225 pb com o *primer* mCER06. O microssatélite evidenciado pelo par de *primer* mCER03 foi amplificado com a temperatura de anelamento a 48°C produzindo o alelo de 60pb. Os pares de *primers* mCER09 e mCER10 amplificaram sequências microssatélites, mas ainda não foram definidos os alelos produzidos. Com os pares de *primers* mCER01, mCER02, mCER04 e mCER07 não se obteve sucesso em qualquer condição testada. Além das diferentes temperaturas de anelamento testadas foi estabelecido que a concentração de 2,0 mM de MgCl₂ e 20 ng de DNA apresentaram melhores resultados para a amplificação de microssatélites em *C. peruvianus*.

Conclusões

Dos 10 pares de *primers* testados, seis (60%) apresentaram potencial para estudar especificamente o genoma de *Cereus peruvianus*. Este resultado é importante, pois representa o primeiro conjunto de marcadores específicos desenvolvido para este genoma.

Agradecimentos

Agradeço a UEM pela oportunidade e ao CNPq/Fundação Araucária pela bolsa concedida.

Referências

- ALJANABI, S.M., FORGET, L. & DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, n. 3, p. 1-8, 1999.
- BARROS, M.J. & NOZAKI, J. Pollutants abatement from effluents of paper and pulp industries by flocculation/coagulation and photochemical degradation. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 736-740, 2002.
- LITT, M. & LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, n. 3, p. 397-401, 1989.
- TANAKA, L.Y.A.; OLIVEIRA, A.J.B.; GONÇALVES, J.E.; CIPRIANI, T.R.; SOUZA, L.M.; MARQUES, M.C.A.; WERNER, M.F.P.; BAGGIO, C.H.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G.L. & JACOMINI, M. An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 714-721, 2010.