

# DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DE CAJU (*Anacardium occidentale*)

Natalia da Silva e Lamas<sup>1</sup>, Marco Antonio Ferreira<sup>2</sup>, Leandro Moraes de Souza<sup>3</sup>, José Jaime Vasconcelos Cavalcanti<sup>4</sup> e Gláucia Salles Cortopassi Buso<sup>5</sup>

## Resumo

O cajueiro apresenta grande importância econômica em estados do nordeste brasileiro. O uso da biotecnologia pode ser importante, mas, até o momento, poucas são as informações a esse respeito neste gênero. Este trabalho visa desenvolver marcadores microssatélites para *A. occidentale* a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas. Após a extração de DNA, cerca de 50µg de DNA foram digeridos com a enzima de restrição *Mse* I. Os fragmentos entre 200 e 800pb foram recuperados e purificados do gel e ligados aos adaptadores da enzima. Foi feito o enriquecimento, e com os fragmentos recuperados foi feita uma reação de PCR. Os fragmentos foram ligados ao plasmídeo e transformados em *E. coli*. Os clones positivos foram seqüenciados e analisados para presença de microssatélites. As seqüências contendo SSRs foram analisadas para o desenho de primers pelo programa Primer 3. Sessenta primers já foram sintetizados, e serão otimizados e utilizados no mapeamento de população segregante de caju.

## Introdução

A importância do agronegócio caju (*Anacardium occidentale*) para a Região Nordeste, onde ocupa 700 mil hectares, pode ser medida pela geração de 157 milhões de dólares anuais em exportações de amêndoas e milhares de empregos, em todas as atividades dos segmentos produção, industrialização e comercialização da cadeia (PAIVA & BARROS, 2004). Há, no entanto, necessidade de aumentar a rentabilidade do setor produtivo, pois as baixas produtividades vêm repercutindo em toda a cadeia produtiva. O melhoramento genético tem sido até o momento, responsável pelo aumento do potencial produtivo dos cultivares de cajueiro. Entretanto, para atender de forma rápida e precisa às necessidades de aumento da produtividade, qualidade da castanha e do pedúnculo, resistência a doenças e pragas, e redução da altura da planta, necessita-se aprimorar ainda mais o processo de seleção. Uma alternativa viável é a utilização de ferramentas moleculares que possibilitem a identificação das regiões genômicas que controlam as características desejadas. Apesar da importância dessa espécie, poucas são as informações a respeito de marcadores moleculares, genes e regiões cromossômicas que controlam caracteres de importância econômica neste gênero. Os marcadores microssatélites (SSR) constituem uma classe de marcadores moleculares ideais para este tipo de estudo, pois detectam polimorfismo em regiões hipervariáveis do DNA, são baseados em PCR, têm herança codominante, alto conteúdo de informação, são multialélicos e podem ser semi-automatizados em ensaios multiplex (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Este trabalho teve como objetivo desenvolver microssatélites para *A. occidentale* visando a realização de estudos de caracterização e geração de mapa genético para a espécie.

## Material e Métodos

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda pela Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF. E-mail: nslamas@gmail.com

<sup>2</sup> Químico, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil - 70770-900 Email: mantonio@cenargen.embrapa.br

<sup>3</sup> Engenheiro agrônomo, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF.

<sup>4</sup> PhD em biologia molecular, Pesquisador da Embrapa CNPAT, CEP 60511-110 - Fortaleza - CE. Email: jaime@cpnat.embrapa.br

<sup>5</sup> Engenheira agrônoma, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil - 70770-900. Email: buso@cenargen.embrapa.br

Apoio financeiro: CAPES.

**Extração de DNA:** feita a partir de folhas frescas de *A. occidentale*, de indivíduos que apresentam o fenótipo do tipo anão precoce, pelo protocolo CTAB 2% para obtenção de 50 µg de DNA genômico.

**Construção de Biblioteca Genômica Enriquecida:**

- Seleção da enzima a ser utilizada para digestão do DNA (Figura 1);
- Digestão de 50 µg de DNA com a enzima *Mse I* (Figura 2);
- Recuperação dos Fragmentos (200 – 800pb) Kit QIAGEN QIAquick Gel Extraction;
- Ligação do DNA aos adaptadores (BRONDANI *et al*, 2007);
- Ligação das contas magnéticas a bio-oligos (BRONDANI *et al*, 2007);
- PCR do DNA ligado às contas magnéticas (BRONDANI *et al*, 2007);
- Purificação da PCR;
- Ligação do DNA ao Plasmídeo pGEM-TEasy (Promega, Vetor System 1, EUA);
- Transformação com células competentes - *E. coli*, cepa XL1-Blue;
- Identificação de 5472 clones positivos em meio NZY-ampicilina, contendo X-Gal e IPTG;
- Preparo do *template* a partir dos clones positivos e PCR dos insertos.

**Sequenciamento dos produtos de PCR dos insertos e desenho de primers:**

- Amplificação de 304 insertos utilizando o Primer M13 *Forward* e purificação Exosap;
- Sequenciamento, utilizando *Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, versão 3.1 (Applied Biosystems, CA, EUA) em sequenciador automático ABI3700;
- As seqüências obtidas foram processadas e analisadas utilizando-se a ferramenta Staden Package (Staden *et al.*, 2003);
- A ferramenta “Pregap4” foi utilizada para o pré-processamento das amostras, conversão de formatos, estimativa de qualidade de cada base e análise de microssatélites utilizando TROLL como descrito por Martins *et. al.*, 2006.

**Resultados e Discussão**

Das 5472 colônias positivas, ou seja, que continham o inserto, 540 foram utilizadas, até o momento, para sequenciamento. Desde total, foram encontrados 117 microssatélites com mais de seis repetições, mostrando um rendimento de 20%, sendo que 60 seqüências evidenciaram regiões para desenho de pares de *primers*. As seqüências restantes evidenciaram apenas um dos lados das regiões flanqueadoras com boa qualidade, sendo necessário o sequenciamento da fita anti-senso para o desenho dos pares de *primers*.

Foram encontrados dois tipos de microssatélites: os perfeitos e os imperfeitos e compostos, sendo que os primeiros representam 86% do total. Dentre os perfeitos, aproximadamente 60% representa repetições de AG.

**Conclusões**

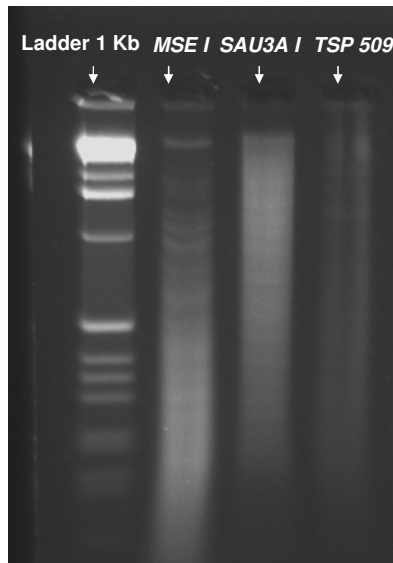
A utilização da biblioteca genômica enriquecida é um método importante na identificação de microssatélites para várias espécies, inclusive o caju, mostrando-se como uma metodologia eficiente, uma vez que apenas 11 *primers* microssatélites para caju foram sintetizados até hoje. Os *primers* vêm sendo sintetizados para posterior otimização e caracterização em 20 acessos da espécie. Esses SSRs abrem uma nova perspectiva para estudos genéticos e melhoramento do caju, favorecendo sua cadeia produtiva.

**Referências**

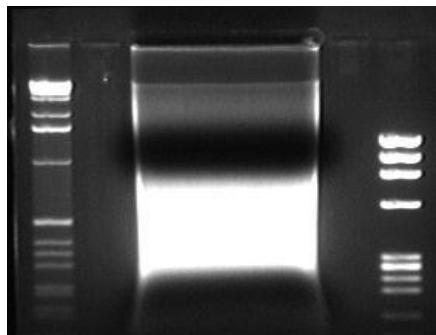
BRONDANI, R.P.V; BRONDANI, C; GRATTAPAGLIA D; Manual prático para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF. 2007. 111p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3º Ed. Brasília: EMBRAPA-CERNAGEM, 220p.,1998.

PAIVA, J.R.; BARROS, L.M. Clones de cajueiro: obtenção, características e perspectivas - Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos 82, 26p., 2004.



**Figura 1.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, evidenciando a digestão do DNA com as enzimas *MseI* (pista 2), *Sau3A I* (pista 3) e *Tsp509 I* (pista 4). Na coluna 1 o marcador DNA 1 Kb Ladder.



**Figura 2.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, evidenciando a digestão do DNA com as enzimas *MseI* (pista 2), *Sau3A I* (pista 3) e *Tsp509 I* (pista 4). Na coluna 1 o marcador DNA 1 Kb Ladder.

