

Seleção de *primer* microsatélites para caracterização de goiabeira (*Psidium guava*) e araçazeiro (*Psidium* spp.)

Microsatellite primer selection for characterization of guava (*Psidium guava*) and araçazeiro (*Psidium* spp.)

***Maria Maiany de Oliveira*¹; *Carlos Antônio Fernandes Santos*²; *Marciene Amorim Rodrigues*³; *Jucilene S. Araújo*¹; *Tuany Priscila P. Costa*¹; *Hugo Leonardo C. Ribeiro*³**

Resumo

Marcadores microsatélites (SSR) são ideais para diversos estudos genéticos, pois, sendo co-dominantes, possibilitam a correta identificação de indivíduos mono e heterozigotos e estimativas precisas de parâmetros genéticos. Esse trabalho teve como objetivo selecionar *primers* publicados de marcadores microsatélites para caracterização de acessos de germoplasma de goiabeira e araçazeiro do banco de germoplasma de *Psidium* da EMBRAPA Semi-Árido, Petrolina-PE para auxiliar no manejo de recursos genética das espécies. Foram testados 16 pares de *primers* SSRs de goiabeira em quatro indivíduos de goiabeira e um de araçazeiro, em duas temperaturas de anelamento (48°C e 52°C) e duas concentrações de Cloreto de Magnésio (1,5 mM e 2,0 mM) no protocolo PCR ("Polymerase Chain Reaction"). Na concentração de 1,5 mM

¹Estudante de Ciências Biológicas da UPE, Bolsista da Embrapa Semi-Árido/ CNPq, C. P. 23, CEP 56302-970; Petrolina-PE. ²Pesquisador da Embrapa Semi-Árido; ³Estudante de Ciências Biológicas da UPE, Estagiário da Embrapa Semi-Árido. casantos@cpatsa.embrapa.br

MgCl₂ e temperatura de anelamento de 52°C não foram observadas amplificações com o uso dos 16 *primers*, enquanto na concentração de 2,0 mM MgCl₂ e temperatura de anelamento de 52°C observou-se a amplificação de 10 *primers* para os indivíduos de goiabeira e de cinco *primers* para o indivíduo de araçazeiro. O número de *primers* obtidos neste trabalho é suficiente para estudos de diversidade em goiabeira, enquanto para araçazeiros novos *primers* devem ser testados, pois, de modo geral, são necessários 10 *primers* microsátélites para estudos de diversidade.

Palavras-chave: SSR, caracterização de germoplasma, PCR.

Introdução

A cultura da goiaba (*Psidium guajava* L.) apresenta grande importância econômica e social no semi-árido brasileiro. O fruto, principalmente de polpa vermelha, oferece amplas formas de aproveitamento, seja pelo consumo *in natura* ou através da industrialização em forma de suco, purê, polpa, compota, sorvetes, entre outras. Seu consumo é hábito difundido em todas as camadas sociais brasileiras, contribuindo eficazmente para a nutrição humana (Pereira, 2003). Possui baixo teor calórico e é o fruto que apresenta um dos mais elevados teores das vitaminas C e E, além de consideráveis teores das vitaminas A, B₁, B₂, B₆ e dos minerais zinco, fósforo, selênio, cobre, magnésio e cálcio.

Na região do semi-árido brasileiro essa cultura foi introduzida nos últimos 15 anos em áreas irrigadas dos Estados da Bahia e Pernambuco, como uma opção de diversificação com grande potencial para atender ao consumo nacional e com forte perspectiva para exportação, devido principalmente à possibilidade da produção de frutos de alta qualidade.

São escassas as informações de caracterização com marcadores de DNA para goiabeira e inexistentes para araçazeiros. Rodriguez et al. (2004) caracterizaram acessos cubanos de goiabeira com marcador AFLP e SSRs, sendo pioneiros na aplicação de marcadores de DNA na goiabeira. A caracterização de germoplasma é importante para avaliar a diversidade genética de coleções de germoplasma, fornecendo subsídios para manejo de recursos genéticos e programas de melhoramento.

O uso de marcador tipo AFLP é de fácil aplicação em goiabeira, enquanto que a aplicação de marcadores SSR tornou-se possível com o desenvolvimento e publicação de *primers* por Risterucci et al. (2005). Os marcadores baseados na amplificação de microsátélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) são úteis para localizar características co-dominantes e multialélicas, são os que possuem o maior conteúdo de informação de polimorfismo na terminologia de marcadores moleculares.

Esse trabalho tem como objetivo selecionar *primers* publicados de marcadores microsátélites para caracterização de acessos de germoplasma de goiabeira e araçazeiro do banco de germoplasma de *Psidium* da EMBRAPA Semi-Árido Petrolina-PE para auxiliar no manejo de recursos genéticos das espécies.

Material e Métodos

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens pelo método CTAB 2x. A concentração e integridade do DNA genômico foram observadas em géis 0.8% de agarose comum, comparando-se a DNA lambda de 30, 50 e 100 ng/ μ L. Foram testados 16 pares de *primers* de SSRs publicados por Risterucci et al. (2005), em quatro indivíduos de goiabeira e um de araçazeiro. Os *primers* avaliados foram: mPgCIR01, nPgCIR02, mPgCIR03, mPgCIR04, mPgCIR05, mPgCIR06, mPgCIR07, mPgCIR08, mPgCIR09, mPgCIR10, mPgCIR11, mPgCIR12, mPgCIR13, mPgCIR14, mPgCIR15, mPgCIR16 e mPgCIR17. Para testes no protocolo da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) foram avaliadas duas temperaturas de anelamento, 48°C e 52°C e duas concentrações de MgCl₂, 1,5 e 2,0 mM.

As reações de PCR consistiram de: denaturação a 94°C por 4 min; 30 ciclos a 94°C por 45 s, 52 ou 48°C por 60 s e 72°C por 60 s e uma etapa de extensão final a 72°C, por 8 min. A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 20 μ L, contendo 30 ng de DNA genômico, 1x de Tampão para *Taq* DNA Polimerase, 1,5 ou 2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,2 μ M de cada *primer* e 0,15 Unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase. As reações de PCR foram realizadas em termociclador. Após a amplificação os fragmentos foram visualizados por meio de Eletroforese em gel de Poliacrilamida corado com nitrato de prata, conforme descrito por Creste et al. (2001).

Resultados e Discussão

Na concentração de 1,5 mM MgCl₂ e temperatura de anelamento de 52°C não foram observadas ampliações para os 16 *primers* utilizados para os quatro indivíduos de goiabeira e um de araçazeiro. Na concentração de 2,0 mM MgCl₂ e temperatura de anelamento de 52°C observou-se a amplificação de 10 *primers*: mPgCIR02, mPgCIR08, mPgCIR09, mPgCIR10, mPgCIR11, mPgCIR12, mPgCIR13, mPgCIR14, mPgCIR16 e mPgCIR17 (Fig.1) para os indivíduos de goiabeira. Para o indivíduo de araçazeiro observou-se amplificação de cinco *primers*: mPgCIR02, mPgCIR11, mPgCIR13, mPgCIR16 e mPgCIR17 (Fig.1).

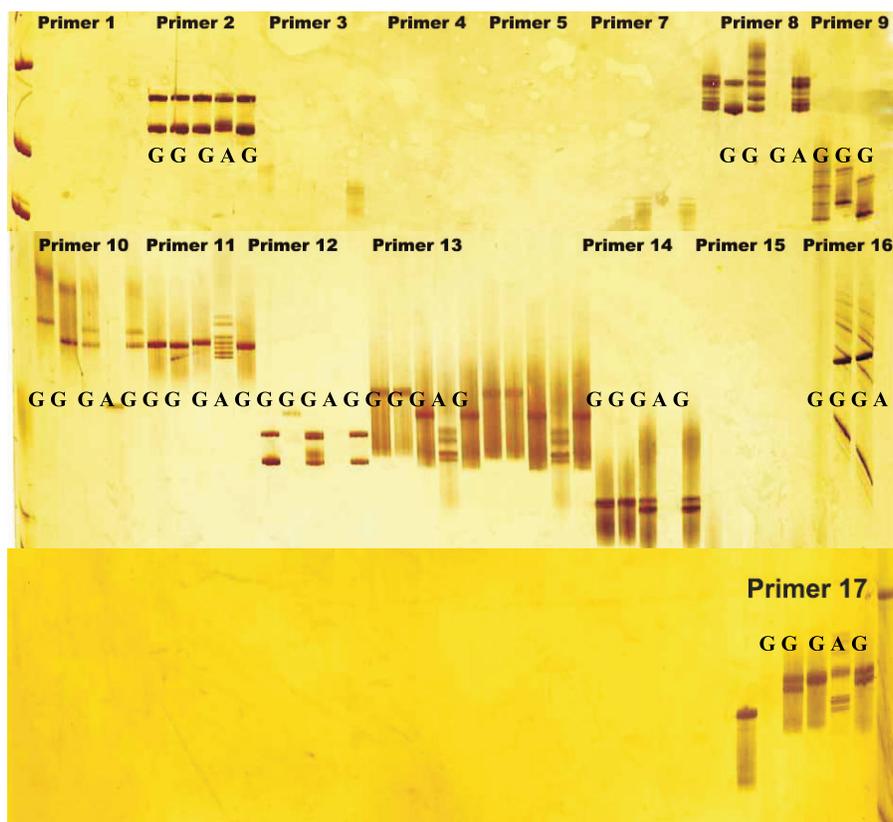


Fig. 1. Géis de poliacrilamida (6%) com *primers* de goiabeira avaliados em quatro indivíduos de goiabeira (G) e um de araçazeiro (A), na 2,0 mM MgCl₂ e temperatura de anelamento de 52°C.

cloreto de magnésio é um importante componente nas reações de PCR, pois é necessário para a atividade da enzima Taq DNA polimerase, que é responsável pela adição dos nucleotídeos na síntese do DNA. O cloreto magnésio além de ser importante para a Taq DNA polimerase também se liga com outros componentes da reação de PCR, como dNTPs e *primer*, o que pode diminuir a quantidade do cloreto de magnésio para a atividade da enzima. A concentração padrão de cloreto de magnésio na reação PCR é de 1,5 mM, sendo que ajustes devem ser efetuados para uma melhor amplificação de bandas, na faixa de 1,5 a 3,0 mM (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Risterucci et al. (2005) reportam que todos os microsátélites desenvolvidos por eles amplificaram em diferentes cultivares de goiabeira, bem como em três outras espécies de *Psidium*, na concentração padrão de cloreto de magnésio, 1,5 mM. Neste trabalho ocorreu um porcentual menor de amplificação de *primers* para goiabeira (69%) e menor ainda para uma espécie de araçazeiro (31%) na concentração de 2,0 mM de cloreto de magnésio. Deve ser destacado que para estudos de diversidade, de modo geral, são necessários 10 *primers* microsátélites para estudos de diversidade. O número de *primers* obtidos neste trabalho é suficiente para goiabeira, enquanto para araçazeiros novos *primers* devem ser testados.

Agradecimentos

Ao CNPq e a Comunidade Européia (GUAVAMAP: FP6-INCO-DEV2-CT 015111) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 9, p. 299-306, 2001.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20)

PEREIRA, F. M. **Cultura da goiabeira**: informações econômicas sobre a goiabeira. 2003. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=1565>. Acesso em: 29 maio 2008.

RODRIGUEZ, N. N.; VALDES-INFANTE, J.; BECKER, D.; VELASQUEZ, B.; COTO, O.; RITTER, E.; ROHDE, W. Morphological, agronomic and molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L.). **Journal of Genetics & Breeding**, Roma, v. 58, p. 79-90, 2004.

RISTERUCCI, A. M.; DUVAL, M. F.; ROHDE, W.; BILLOTTE, N. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 745-748, 2005.