

NOVOS MICROSSATÉLITES PARA *Eucalyptus* A PARTIR DE CLONES “SHOTGUN”

Batista, Adriana RS^{1,3}, Lourenço, Rodrigo F^{2,3}, Pereira, Gonçalo AG², Grattapaglia, Dario^{1,3}

1 Universidade Católica de Brasília, UCB, Brasília/DF, 2 Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas/SP, 3 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF

dricagen@yahoo.com.br

Palavras-chave: microssatélites, *Eucalyptus*.

No Brasil espécies de *Eucalyptus* são amplamente utilizadas na obtenção de diversos produtos, principalmente papel e celulose. A indústria de matéria-prima e produtos derivados de madeira oferece 2,5 milhões de empregos, diretos e indiretos, é responsável por cerca de 4% do PIB brasileiro e gera receita de US\$13 bilhões. Devido ao intenso melhoramento genético de *Eucalyptus* nas últimas décadas as empresas brasileiras possuem clones superiores que suprem eficientemente a demanda de matéria-prima. Entretanto, há ainda possibilidades de incremento de produção e de qualidade. Neste contexto, o projeto Genolyptus surgiu com o intuito de ampliar ainda mais as possibilidades de melhoramento, integrando ferramentas clássicas e moleculares de genética. Uma ferramenta molecular de ampla aplicabilidade são os marcadores microssatélites que permitem desde análises populacionais até o mapeamento genético detalhado de QTLs. Neste trabalho, utilizamos uma forma alternativa de desenvolvimento de marcadores microssatélites, utilizando sequenciamento randômico de DNA e busca de microssatélites. Seqüências de DNA obtidas por sonicação foram clonadas, seqüenciadas em plataforma ABI3100 e submetidas ao programa TROLL, para identificação de microssatélites. Os parâmetros de busca incluíram repetições de di, tri, tetra e pentanucleotídeos com um número mínimo de repetições igual a nove, seis, cinco e quatro, respectivamente. A partir de 7406 seqüências válidas (phred ≥ 20 em 300 bases), foram encontradas 548 seqüências microssatélites de di, tri, tetra e pentanucleotídeos, e para 160 destes foram desenhados pares de primers. Paralelamente foram também desenvolvidos 20 pares de primers específicos para amplificação de microssatélites em ESTs com o objetivo de comparar o nível de polimorfismo. Foi selecionado um subconjunto de 18 pares de primers derivados de seqüências genômicas e dois de seqüências de ESTs para testes de amplificação e de polimorfismo. Destes 20, 17 apresentaram polimorfismo e robustez e foram imediatamente acrescentados ao conjunto de marcadores para mapeamento genético. Outros 160 pares de primers estão sendo otimizados, a partir dos quais espera-se um aproveitamento equivalente, ou seja, da ordem de 80 a 90%. Esta técnica de obtenção de microssatélites é eficiente e apresenta pelo menos quatro vantagens: (1) fornece marcadores com distribuição aleatória no genoma sem nenhum “bias” derivado da distribuição dos sítios de restrição das enzimas utilizadas no processo de construção de bibliotecas enriquecidas; (2) permite o desenvolvimento de microssatélites baseados em repetições AT; (3) a taxa de novidade de marcadores é muito alta pois a biblioteca genômica é naturalmente normalizada; (4) permite a identificação e desenvolvimento de microssatélites baseados em tri e tetranucleotídeos.

Apoio Financeiro: Projeto Genolyptus-FINEP, CNPq e CAPES.