

Brasília, DF
Dezembro, 2003

Autores

**Vânia Cristina Rennó
Azevedo**

Bióloga, bolsista, Embrapa
Recursos Genéticos e
Biotecnologia, FUNTEC/
IBAMA/DFID

Christina Cleó Vinson

Bióloga, mestranda, UFPA,
Embrapa Recursos Genéticos
e Biotecnologia.

Valci Pereira da Silva

Bolsista, Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia,
FUNTEC/IBAMA/DFID.

**Ana Yamaguichi
Ciampi.**

Bióloga, PhD, Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia –
aciampi@cenargen.embrapa.br

Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores Microssatélites em Maçaranduba (*Manilkara huberi*).

Introdução

A Floresta Amazônica abriga uma enorme riqueza de essências florestais, além de suas propriedades madeiras. *Manilkara huberi* (Ducke) Stand. (Sapotaceae), popularmente conhecida como maçaranduba é uma espécie amazônica madeira intensamente explorada, cujas árvores podem atingir até 50m de altura. Ocorre na Amazônia Brasileira, do Pará ao Amazonas, nas matas de terra firme e de várzeas pouco inundáveis; é a maior, mais procurada e de mais ampla dispersão das maçarandubas amazônicas, fornecendo quase a totalidade da madeira exportada por Belém. Devido a essa exploração, estudos de análise genômica têm sido realizados, gerando informações sobre a diversidade genética existente, sendo de fundamental importância na definição de estratégias adequadas para o manejo e a conservação de espécies nativas como a maçaranduba.

Para análises nesse nível os marcadores microssatélites, também denominados SSR ("Simple Sequence Repeats"), são uma ferramenta importante. Esses marcadores são formados por seqüências de uma a seis bases de comprimento repetidas em "tandem" (Jacob *et al.*, 1991), têm herança codominante, são multialélicos, são encontrados em alta frequência e com ampla distribuição nos genomas de eucariotos (Tóth *et al.*, 2000), apresentando o maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares (Goldstein, 2001).

Uma bateria de marcadores microssatélites para *Manilkara huberi* foi desenvolvida para o estudo da diversidade genética, do fluxo gênico e do sistema de cruzamento, de uma população mantida em um programa de manejo de corte florestal seletivo como parte do Projeto Dendrogene.

Materiais e Métodos

O DNA total foi extraído segundo o protocolo de CTAB 2% (Ferreira & Grattapaglia, 1995) a partir de material caulinar coletado em Santarém, Pará.

A Enzima TSP 509 I foi a que gerou o perfil mais adequado de fragmentos para a construção da biblioteca enriquecida. O processo de enriquecimento da biblioteca para elementos AG/TC foi verificada com alta eficiência na presença de um número alto de clones positivos com as seqüências com dinucleotídeos repetidos nos fragmentos

Os primers foram desenhados utilizando o software Primer 3. No processo de otimização, os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 3,5% corado com brometo de etídio e visualizados em UV. A análise de polimorfismo foi realizada em gel desnaturante de poliácridamida 4%, corado com nitrato de prata.

Para as análises foram utilizados 12 indivíduos adultos provenientes da região amazônica, local de estudo para manejo (FLONA - Floresta Nacional do Tapajós). As médias de alelos/loco (Na), heterozigosidades esperada (He) e obtida (Ho) foram calculadas para os locos selecionados utilizando o programa GDA - Genetic Data Analysis version 1.0 (Lewis & Zaykin, 1997) (tabela1).

Resultados e discussão

Foram obtidos 271 clones positivos no processo de hibridização dos quais 251 foram seqüenciados. Foram obtidos microsatélites e seqüências flanqueadoras apropriados para o desenho de "primers" em 29 clones. Desses, sete não amplificaram e 22 amplificaram em temperaturas que variaram desde 52°C a 62°C. Verificou-se polimorfismo satisfatório em 14 "primers", cinco apresentaram monomorfismo, e três não amplificaram fragmentos nítidos. Os 12 locos mais polimórficos (Tabela 1) foram selecionados para os estudos populacionais.

Entre os 12 locos selecionados, nove apresentaram heterozigosidade esperada maior que 80%. Esses resultados mostram que esses locos são ideais para estudos de diversidade genética, fluxo gênico, sistemas de cruzamento e testes de paternidade. Por isso, esses locos SSRs, estão sendo utilizados nos estudos genéticos de uma população de *Manilkara huberi*, para avaliar os impactos da exploração madeireira, em 500 hectares sob monitoramento em Santarém-PA, como também para propor estratégias adequadas para o manejo desta espécie.

Os marcadores desenvolvidos neste trabalho abrem nova perspectiva para o aprofundamento de estudos genéticos na espécie *M. huberi* e representam uma ferramenta poderosa para a geração de dados genéticos populacionais fundamentais e indispensáveis às atividades de coleta, conservação *in situ* e *ex situ*.

Tabela 1. Dados sobre os 12 locos microsatélites (SSR) de *Manilkara huberi* selecionados para os estudos populacionais. Temperatura de anelamento (T_a), número de indivíduos analisados (N), número total de alelos (A), heterozigosidade esperada (H_e); e heterozigosidade observada (H_o).

Locos	No de repetições	Fragmento pb verificado	T_a (°C)	N	A	H_e	H_o
Mh 03	(CT) ¹⁷	176-204	56	12	7	0,859	1,000
Mh 04	(CT) ¹²	189-209	52	12	5	0,768	0,583
Mh 06	(GA) ¹⁴	162-188	56	12	7	0,754	0,417
Mh 07	(CT) ²³	153-187	56	12	4	0,746	0,750
Mh 08	(CT) ¹¹	172-202	56	12	7	0,862	0,917
Mh 12	(CT) ⁹ (AC) ⁶	187-211	56	12	7	0,859	0,667
Mh 17	(CT) ¹³	240-274	56	12	6	0,721	0,750
Mh 19	(CT) ²¹	146-164	56	12	7	0,862	0,750
Mh 20	(GA) ¹³	134-166	56	12	8	0,848	0,833
Mh 22	(CT) ¹⁵	180-206	56	12	7	0,841	0,833
Mh 24	(CT) ¹⁷	181-209	60	12	7	0,815	0,167
Mh 26	(CT) ¹⁴	224-250	58	12	6	0,819	0,583
Média					6,43	0,813	0,688

Referências bibliográficas

- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 1995 2 ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN. 220pp.
- GOLDSTEIN, B.D. & SCHLOTTERER, C. Microsatellites : Evolution and Applications. Oxford University Press, pp 352. 2001.
- JACOB, H.J., Lindpaintner, K., Lincoln, S.E., Kusumi, K., Bunker, R.K., Mao, Y.P., Ganten, D., Dzau, V.J., Lander, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell** 67: 213-24, 1991
- TOTH, G., Gáspari, Z., Jurka, J. (Microsatélites in different eukaryotic genomes survey and analysis .Genome Res.10:967-81 , 2000.

**Circular
Técnica , 25**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2003): 150 unidades

**Comitê de
publicações**

Presidente: *José Manuel Cabral de Sousa Dias*
Secretário-Executivo: *Maria José de Oliveira Duarte*
Membros: *Maurício Machaim Franco*

Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Luciano Lourenço Nass

Expediente

Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria José de Oliveira Duarte*
Normalização Bibliográfica: *Maria Alice Bianchi*
Editoração eletrônica: *Giscard Matos de Queiroz*