

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO NATURAL DE CASTANHEIRA (*Bertholletia excelsa*, LECYTHIDACEAE) DA REGIÃO DO RIO PURUS, AM, UTILIZANDO MARCADORES DE DNA MICROSSATÉLITES

Laisa Cristele Rodrigues SOARES¹; Maristerra Rodrigues LEMES²; Carla Haisler SARDELLI³

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientadora CPEC /INPA; ³Co-Orientadora CPEC /INPA

Órgão financiador: CNPQ

1. INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil ou castanha-da-Amazônia (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl., 1808 Lecythidaceae) é um dos principais recursos do extrativismo amazônico, sendo um caso único de semente exportada em larga escala que dispensa lavouras. O comércio e a indústria de castanha aumentam a renda dos povos extrativistas e podem promover a conservação de grandes extensões da floresta amazônica (Reis *et al.* 2009).

Por outro lado, devido à intensa atividade de exploração de sementes, em algumas áreas a sustentabilidade dos castanhais tem sido ameaçada, pois, não sobram sementes suficientes para germinar e dar origem às novas árvores (Peres *et al.* 2003). Da mesma forma, a superexploração pode reduzir o tamanho efetivo das populações e comprometer a viabilidade das mesmas, devido à perda de diversidade genética.

As indicações de estratégias e ações necessárias ao manejo de espécies nativas fortemente exploradas podem ser realizadas com utilização de marcadores moleculares. Dentre os marcadores disponíveis, o mais recomendado para esse tipo de estudo é o SSR (Simple Sequence Repeats) ou microssatélite. Por gerar alto conteúdo informacional e confiabilidade em seus dados, os locos microssatélites possibilitam análises de fluxo gênico, diversidade genética intra e interpopulacional e também estudos de sistemas de cruzamento das espécies. Com o objetivo de estimar a diversidade genética de *Bertholletia excelsa*, foram desenvolvidos e caracterizados, recentemente, doze locos polimórficos de microssatélites para duas populações uma localizada em Amatura (AM) e outra em Laranjal do Jari (AP) (Reis *et al.* 2009). O objetivo desse trabalho atual é utilizar sete desses doze locos polimórficos desenvolvidos e verificar a diversidade genética de *Bertholletia excelsa* numa população isolada no rio Purus (AM).

2. Material e Métodos

A coleta foi realizada a partir de amostras de folhas de 40 indivíduos de *Bertholletia excelsa* pertencentes a uma população mapeada situada na região do rio Purus, AM. As folhas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel e posteriormente armazenadas em freezer a - 20°C .

A extração do DNA foi utilizado pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1987) modificado por Ferreira & Grattapaglia (1998). Após a extração foi feita eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Em seguida, foi feita a quantificação do DNA extraído por comparação com padrões de massa molecular conhecidos, utilizando-se DNA do bacteriófago Lambda. Após a quantificação do DNA extraído, as amostras foram diluídas em água ultra-pura e padronizadas a uma concentração de 2,5 ng/μl.

Foram amplificados sete dos doze locos microssatélites desenvolvidos para *B. excelsa* (Reis *et al.* 2009). A amplificação foi feita via PCR utilizando-se tampão de PCR 1% (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1,25 mM (NH₄)₂SO₄ e 2,5 mM MgCl₂), 0,19 μM de DNTp, 0,24 μg/μl de BSA, 0,7 unidades de Taq polimerase, 0,3 μM de cada primer e 10ng de DNA. O volume final da reação foi de 10μl. As amostras foram desnaturadas a 94°C e submetidas a 30 repetições do seguinte ciclo: 30 seg. a 94°C, 1 min. a 56°C e 1 min. a 72°C. A temperatura de anelamento foi específica para cada marcador. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 3,0%. A genotipagem foi realizada por meio de sistema multiplex que possibilita a análise de vários locos de uma única vez, utilizando um seqüenciador automático de DNA modelo ABI

3130 XL. (Tabela1). Para tal, um dos *primers* de cada par que amplifica cada loco microssatélite foi marcado com fluorocromo específico (FAM os locos BEX01,BEX03,BEX09 e BEX 32 no foram marcados com HEX BEX02,BEX12 E BEX 33) para detecção dos fragmentos amplificados foram encontrado As análises foram feitas no ARLEQUIN 3.1 e no Fstat 2.9.3.2 (Goudet 2002).

3. Resultados e Discussão

As condições de amplificação dos sete marcadores de DNA microssatélites foram otimizadas. Quatro dos sete marcadores (BEX1, BEX2, BEX12, BEX32) foram amplificados com temperatura de anelamento de 56°C. Dois deles (BEX3 e BEX 33) amplificaram na temperatura de anelamento de 60°C e apenas um (BEX9) na temperatura de 54°C (Tabela 1). O protocolo de amplificação seguiu o mesmo padrão para a maioria dos marcadores (BEX1, BEX2, BEX3, BEX12, BEX32 e BEX33), somente, para BEX9 foi adicionada uma concentração maior de 0,2 de cloreto de magnésio.

O número de alelos variou de 3 a 12 com uma média de 7.29 alelos por loco. A maioria dos locos apresentou alta heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada (Tabela 1) e com exceção dos locos BEX3 e BEX33 a heterozigosidade esperada foi menor que a heterozigosidade observada. Esses mesmos locos apresentaram valores de 0.579 e 0.281 respectivamente para o coeficiente de endocruzamento.

Tabela1- Caracterização dos sete locos microssatélites desenvolvidos para *Bertholletia excelsa*. Seqüência do primers Temperatura de anelamento, TA; Número de alelos, A; Heterozigosidade esperada, HE; Heterozigosidade observada, HO, Coeficiente de endocruzamento, f*.

Locos	N ^o Repetições	Seqüência do primers	N ^o pares de base	TA	A	H _o	H _e	f*
BEX 01	(AG) ₂₂	F:TTCCAGGCATTTTGTTACAG R:CAAGAGCGCAGGAGAAGATT	217-253	56°C	12	0.97222	0.87872	-0.108
BEX 02	(CT) ₈ (CA) ₉ (CT) ₅ (CA) ₂	F:GCCATGTTCTCTACAGTCT R:AGTCGGACATCCTTCGTGCT	109-115	56°C	3	0.63158	0.49509	-0.280
BEX 03	(AG) ₁₃	F:CTACCTACAGGTCCGTGCCA R:CGTATTTTCGTGTCAAACCTCT	87-97	60°C	4	0.25000	0.58881	0.579
BEX 09	(CT) ₃₂	F:TATTCCATGGTCCTCCGT R:AGTCAATCATCTTCAAGAGT	124-140	54°C	8	0.88889	0.79665	-0.118
BEX 12	(GC) ₄ (AC) ₅ A(TG) ₂ CTAT(GA) ₂₀	F:AATTAGCAACAATGCACTGA R:ATTCCGTAACATGCTCTTCT	194-216	56°C	7	0.73333	0.70000	-0.048
BEX 32	(TC) ₂₁	F:CCCTCCCCCATCTTGAGTAG R:CAACCCCTCCTTTTACCATT	125-165	56°C	5	0.78788	0.63310	-0.249
BEX 33	(CT) ₁₉	F:CAAGTCTCTGACTCATCGCCTA R:ACCAGGTTTCAGCAGACGTT	196-134	60°C	12	0.60000	0.83051	0.281

4. Conclusão

A maioria dos locos analisados apresentou estimativas altas de diversidade genética (A e He) Tais marcadores poderão ser utilizados com sucesso para estimar importantes parâmetros genético-populacionais, bem como para analisar e caracterizar o sistema de cruzamento e fluxo gênico em *Bertholletia excelsa*.

5. Referências

- Buckley, D.P.; O'Malley, D.M.; Apsit, V.; Prance, G.T. & Bawa, K.S. 1988. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). 1. Genetic variation in natural populations. *Theor Appl Genet*, 76:923-928.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinform Online*, 1: 47-50.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. (1996). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética, 2ª ed. EMBRAPA, Brasília, 220p.
- GOUDET, J. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): A computer program to calculate F-statistics. *J Heredity* 86, 485-486, 2002.
- Peres, C.A.; Baider, C.; Zuidema, P.A.; Wadt, L.H.O.; Kainer, K.A.; Gomes-Silva, D.A.P.; Salomão, R.P.; Simões, L.L.; Franciosi, E.R.N.; Valverde, F.C.; Gribel, R.; Shepard Jr., G.H.; Kanashiro, M.; Coventry, P.; Yu, D.W.; Watkinson, A.R. & Freckleton, R.P. 2003. Demographic threats to the sustainability of Brazil nut exploitation. *Science*, 302:2112-2114.
- Reis, M. M.; A. C Braga; Lemes M. R.; Gribel R. Collevatti R. G. (2009). Desevelopment and characterization of microsatellite markers for the Brazil nut tree *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Lecythidaceae). 2009. *Molecular Ecology Resources*, 9:920-923