

GENÉTICA DA CASTANHEIRA (*Bertholletia excelsa*, Lecythidacea): ESTUDO DA VARIABILIDADE DO GENOMA DO CLOROPLASTO.Laura Graciliana Bernardes¹, Maristerra R. Lemes¹ & Rogério Gribel¹.¹Laboratório de Genética e Biologia Reprodutiva de Plantas/ INPA.

A castanha-do-brasil (*B. excelsa*) é um dos recursos naturais da região amazônica que mais contribuem para a renda das populações extrativistas, porém pouco se sabe sobre a variabilidade genética dessa espécie. Apesar da grande importância sócio-econômica da castanha, o conhecimento atual sobre a variabilidade genética dessa espécie é muito escasso, existindo apenas dois estudos (Buckley *et al.*, 1988; Kanashiro *et al.*, 1987) ambos usando marcadores do genoma nuclear (isoenzimas e RAPD, respectivamente) com a espécie. Estes estudos sugerem a ocorrência de grande variabilidade genética dentro das populações. No entanto, nada se sabe sobre a variabilidade do genoma não-nuclear, como por exemplo, a do cloroplasto (cpDNA). O genoma do cloroplasto caracteriza-se por ser um genoma de herança materna na maioria das angiospermas e, portanto, serve como indicador de fluxo gênico por meio de sementes. Neste trabalho, objetivamos caracterizar a variabilidade genética de quatro populações de *B. excelsa* usando marcadores moleculares de cpDNA.

Foram analisadas quatro populações da região amazônica distanciadas 500-1700 km entre si, sendo genotipados de 10 a 22 indivíduos por população. Foi extraído o DNA total seguindo-se o protocolo otimizado por Ferreira & Grattapaglia (1998). Foram testados 17 pares de iniciadores universais que amplificam regiões não-codificadoras do DNA de cloroplasto de angiospermas. As condições de PCR foram otimizadas para nove desses pares de primers, dos quais os Taberlet CD, Taberlet EF (Taberlet *et al.*, 1991) e Cp5 (Demesure *et al.*, 1995), foram escolhidos para análises genéticas de três regiões do cpDNA. Dois fragmentos amplificados correspondentes ao intron *trnL* (UAA) e à região entre o exon *trnL* (UAA)3' e *trnF* (GAA) foram seqüenciados utilizando-se seqüenciador automático de DNA ABI Prism 377. As seqüências foram analisadas no programa Sequencing Analysis 3.4.1 (ABI) e para o alinhamento utilizou-se o programa CLUSTAL X. Outra região não codificadora (entre *psbC* e *trnS*) foi analisada utilizando-se a técnica CAPS que consiste na digestão dos fragmentos amplificados com endonucleases de restrição. Foram testadas 14 endonucleases sendo que as cinco (*AfaI*, *AluI*, *DdeI*, *HinfI* e *PstI*) que apresentaram maior número de produtos digeridos foram escolhidas para a análise de polimorfismo. Os produtos da digestão foram separados sob eletroforese em gel de agarose 3% e analisados em luz UV.

Os primers utilizados resultaram na obtenção de fragmentos visualizados em gel de agarose e sequências de boa qualidade. O alinhamento das sequências obtidas apresentou total similaridade entre os indivíduos das quatro populações para as duas regiões sequenciadas (Figura 1A). Da mesma forma, não foram detectados polimorfismo para os produtos digeridos pela ação das cinco endonucleases. A ação da enzima Alu I pode ser observada na figura figura 1B, onde todas as amostras apresentam os mesmos fragmentos de restrição, ou seja, são do mesmo haplotipo. A ausência de polimorfismos nas regiões analisadas do DNA do cloroplasto de *B. excelsa* sugere uma provável influência antrópica recente na dispersão dos propágulos dessa espécie, a partir de uma população original pequena e restrita geograficamente.



Fig. 1. A: Alinhamento de uma parte do fragmento de DNA amplificado com o par de primers Taberlet CD, utilizando o programa Crustal X. **B:** Visualização do fragmento amplificado com o par de primers Cp5 digeridos com a endonuclease Alu I, em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio.

Bibliografia:

- 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) *Theoretical and Applied Genetics* 76:923-928.
- Demesure, D.; Sodji, N. & Petit, R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4:129-131.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. 3ª Edição. Brasília (Embrapa-Cenargen). 222p.
- Kanashiro, M.; Harris, S.A. & Simons, A (1997). Rapp diversity n Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). *Silvae Genetica* 46(4): 219-223.
- Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G.; Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17: 1105-1109.