

**BOT-007**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES GENÉTICOS RAPD PARA ALGUMAS ESPÉCIES DE ÁRVORES NEOTROPICAIS.**

Laerte Nogueira da Silva<sup>(1)</sup>; Rogério Gribel<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Bolsista/PIBIC; <sup>(2)</sup> Pesquisador Coord. de Pesquisas em Botânica/INPA

O uso de marcadores moleculares em estudos sobre os padrões de distribuição da variabilidade genética e do sistema de cruzamento de espécies florestais é de grande importância para embasar a exploração sustentada e a implantação de práticas de manejo e de conservação dessas espécies. Este projeto tem como objetivo principal o desenvolvimento de marcadores genéticos RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*, WILLIAMS *et al.* (1990); WELSH & MCCLEILLAND (1990)) para as espécies *Pachira aquatica* e *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), *Swietenia macrophylla* (Meliaceae), *Salvertia covaliodora* (Vockysiaceae) e *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae), visando sua utilização em futuros estudos sobre a biologia reprodutiva, estimativas da taxa de fecundação cruzada e estrutura genética de populações destas espécies.

**1) Coleta e procedência do material**

Tabela 01. Locais de coleta de sementes das espécies estudadas

ESPECIE	LOCALIDADE
<i>Ceiba pentandra</i>	Km 29, estrada AM 010 (Amazonas)
<i>Pachira aquatica</i>	Area urbana de Brasília
<i>Swietenia macrophylla</i>	Municípios de Pimenta Bueno (RO) e Redenção (PA)
<i>Salvertia covaliodora</i>	Município de Carolina (MA)
<i>Pouteria ramiflora</i>	Município de Carolina (MA)

**2) Germinação de sementes e cultivo de mudas**

Sementes coletadas de cada espécie foram postas em placas de Petri com papel filtro umedecido com H<sub>2</sub>O destilada, a temperatura ambiente, até a germinação. Após germinação as plântulas foram transferidas para sementeiras e mantidas em casa de vegetação por 2-4 semanas, após o que as folhas frescas foram retiradas das mudas para análises genéticas.

**3) Extração e quantificação do DNA:**

O protocolo utilizado para extração baseia-se no método de minipreparação para extração de DNA de uma amostra de planta desenvolvido por DOYLE & DOYLE (1987). A quantificação das amostras de DNA foi feita através da comparação do DNA a ser quantificado com amostras de DNA de concentrações já definidas. Para tal utilizou-se duas concentrações (25 e 50 ng) de DNA do bacteriófago lambda. A quantificação foi feita em gel de agarose 0.8 % corado com brometo de etídio. O protocolo utilizado baseia-se no método utilizado por FERREIRA & GRATTAPAGLIA(1995). Foram utilizados 100 ml de gel de agarose 0.8%, que teve como base de preparação o protocolo desenvolvido por WILLIAMS *et al.*(1990).

**4) Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) :**

Este método baseado em PCR é usado para amplificar ao acaso fragmentos de DNA de um genoma inteiro. Ele consiste no aquecimento e esfriamento do DNA em 3 diferentes

temperaturas: 92°C, 35°C e 72°C que multiplicam os fragmentos do DNA a partir de oligonucleotídeos (“primers”) aleatórios.

Foi feita inicialmente uma seleção de primers, visando a escolha daqueles que apresentassem maior grau de polimorfismo. Utilizou-se para tal, doze primers do kit B da Operon Technologies Inc., USA. (Sequencia dos primers vide Anexo II)

### 1.Extração e Quantificação do DNA :

A concentração de DNA nas soluções originadas no processo de extração foram estimadas através da quantificação comparativa com soluções-padrão de DNA de fago- $\lambda$ , de concentração previamente conhecida, em gel corado com brometo de etídio. Os protocolos utilizados na extração do DNA e na quantificação do DNA extraído em gel corado com brometo de etídio parecem ser adequados para as espécies estudadas. No entanto, devido a grande variação na quantidade de DNA extraído entre espécies, o protocolo poderá ser adaptado para cada uma delas, variando-se a quantidade de tecido utilizado na extração.

**Tabela 02** - Estimativa da quantidade de DNA (ng de DNA/10 $\mu$ l da solução de DNA extraído) para as amostras das espécies estudadas.

<u>Linha/orifício</u>	<u>Espécie</u>	<u>Quantificação</u>
01	<i>Salvertia covaliodora</i>	60ng
02	<i>Salvertia covaliodora</i>	80ng
03	<i>Salvertia covaliodora</i>	80ng
04	<i>Pouteria ramiflora</i>	75ng
05	<i>Pouteria ramiflora</i>	100ng
06	<i>Puoteria ramiflora</i>	100ng
07	$\lambda$ DNA	25ng
08	<i>Ceiba pentandra</i>	>200ng
09	<i>Ceiba pentandra</i>	>200ng
10	<i>Ceiba pentandra</i>	>200ng
11	<i>Ceiba pentandra</i>	>200ng
12	<i>Ceiba pentandra</i>	>200ng
13	<i>Ceiba pentandra</i>	>200ng
14	<i>Pachira aquatica</i>	>200ng
15	<i>Pachira aquatica</i>	>200ng
16	$\lambda$ DNA	50ng

### 2.Seleção de primers :

Os dados de seleção de primers, utilizando a técnica de RAPD, referem-se à espécie *Swietenia macrophylla* (mogno). Cada primer foi utilizado em quatro indivíduos de diferentes populações (uma em Rondônia e três do Pará). Dos doze primers utilizados neste experimento, cinco (OPB04, OPB06, OPB07, OPB08 e OPB10) produziram bandas nítidas, indicando que houve amplificação do DNA, muito embora o polimorfismo tenha sido baixo (Fig. 2). Os demais primers testados não apresentaram bandas. Os resultados são preliminares e o teste de novos

primers deverá ser efetuado no futuro. Cinco dos doze primers testados resultaram em ampliações de fragmentos de DNA visíveis no ensaio RAPD. No entanto, não houve amplificação de fragmentos de DNA quando utilizados sete primers. O excesso de DNA nas amostras pode ser uma possível causa desta ausência de bandas visíveis. Futuramente estes primers deverão ser testados novamente utilizando-se diferentes concentrações de DNA na reação de PCR..

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

FERREIRA, M.E., & GRATTAPAGLIA, D.(1995). Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA - CENARGEN. Brasília-DF.

WELSH, J. & MCCLEILLAND, M. (1990)) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18: 7213-7218.

WILLIAMS *et al.* (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids. Res.18:6531-6535.