

Otimização das condições de amplificação de marcadores de DNA do genoma nuclear e do cloroplasto para o mogno (*Swietenia macrophylla*) e outras espécies da família Meliaceae.

Izabela de Lima FEITOSA^{1,2}; Maristerra Rodrigues LEMES^{2,3}

¹Bolsista PIBIC INPA/CNPq; ²Laboratório de Genética e Biologia Reprodutiva de Plantas (LabGen)/INPA; ³Orientadora INPA/CPEC.

O mogno (*Swietenia macrophylla*) é a espécie tropical lenhosa mais importante economicamente nos Neotrópicos (Veríssimo *et al.*, 1995). A espécie encontra-se ameaçada ao longo de sua distribuição, devido à exploração predatória seguida da conversão da floresta em áreas agrícolas. O mesmo acontece com *Swietenia humilis* que se apresentam na lista das espécies ameaçadas de extinção e *Khaya senegalensis* também pertencentes à família Meliaceae. Estudos anteriores mostram que os marcadores microssatélites são informativos para análise de estrutura genética de populações de *S. macrophylla* e *S. humilis* (Lemes *et al.*, 2003; White *et al.*, 2002). Uma análise filogeográfica, mais refinada, envolvendo seqüências de genes nucleares e de cloroplasto possibilitaria correlacionar a genealogia dos haplótipos e sua distribuição geográfica. O objetivo do presente estudo foi otimizar as condições de amplificação de marcadores de DNA dos genomas do núcleo e cloroplasto de *S. macrophylla*, *S. humilis* e *K. senegalensis*, visando disponibilizar um banco de marcadores informativos para estudos sobre a genética de populações e filogeografia dessas espécies. As análises genéticas foram realizadas a partir de folhas de indivíduos das três espécies, sendo oito populações de *S. macrophylla* na Amazônia brasileira, quatro populações de *S. humilis* na América Central e doze populações de *K. senegalensis* oriundas de Beni, África. A extração do DNA dos indivíduos de *K. senegalensis* foi realizada utilizando o método CTAB (Doyle & Doyle, 1987), otimizado por Ferreira e Grattapaglia (1998), enquanto dos indivíduos de *S. macrophylla* e *S. humilis* foi realizada utilizando o método CTAB com proteinase *k*, modificado por Porebski *et al.*, (1997). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em um termociclador. Para *S. macrophylla* foram testados, quatro pares de *primers* universais: *trnS-trnG*, *trnH-psbA*, *psbB-psbF* (Hamilton, 1999) e *rps16* (Oxelman, 1997), que amplificam regiões não-codificadoras do genoma do cloroplasto e um *primer* que amplifica uma região não-codificadora do genoma nuclear (*PepC*). Para *S. humilis* foram testados dez pares de *primers* universais que amplificam locos microssatélites do cpDNA de várias espécies de angiospermas (Weising & Gardner, 1998). Foram testados ainda oito *primers* previamente desenvolvidos para *S. macrophylla* (Lemes *et al.*, 2002), visando a amplificação dos locos microssatélites do genoma nuclear de *K. senegalensis*. A análise dos produtos amplificados tanto de regiões do genoma do cloroplasto quanto nuclear foi feita em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio, sob luz ultra-violeta. A análise preliminar de polimorfismos dos locos microssatélites do genoma do cloroplasto de *Swietenia humilis* foi realizada em um seqüenciador automático de DNA ABI Prism 377, utilizando-se o programa GENESCAN (ABI, Inc). Os pares de *primers* testados, que amplificam regiões não-codificadoras do genoma do cloroplasto de *S. macrophylla* tiveram as temperaturas de anelamento (T_A) e condições da PCR otimizadas. A Figura 1 mostra os produtos amplificados obtidos a partir da análise dos espaçadores intergênicos *trnH-psbA* e *trnS-trnG*, do intron *rps16* do genoma do cloroplasto, bem como do quarto intron do gene nuclear *PepC*. Dos dez *primers* testados para *S. humilis*, que amplificam os locos microssatélites do genoma do cloroplasto, seis tiveram as temperaturas de anelamento e condições de PCR otimizadas (*ccmp2*, *ccmp3*, *ccmp4*, *ccmp5*, *ccmp10* com $T_A=56^\circ\text{C}$ e o *ccmp7*, $T_A = 51^\circ\text{C}$). Uma análise preliminar, com base na genotipagem de indivíduos das populações de *S. humilis* da América Central, evidenciou a presença de um único haplótipo com base na análise de cinco locos de DNA microssatélites do genoma do cloroplasto. Na figura 2 são apresentados os eletroferogramas, mostrando os alelos obtidos para cada um dos locos analisados para *S. humilis*. Dos oito locos microssatélites desenvolvidos para *S. macrophylla* e testados em *Khaya senegalensis* foi possível otimizar as temperaturas de anelamento e condições de PCR de todos eles (*sm01*, *sm32*, *sm40*, *sm46*, *sm47* e *sm51*; $T_A=56^\circ\text{C}$; *sm22*, $T_A=62^\circ\text{C}$ e *sm31*, $T_A = 52^\circ\text{C}$). Na Figura 3 são apresentados os fragmentos amplificados, em gel de agarose, para os oito locos SSR otimizados para *K. senegalensis*. Uma análise preliminar de quatro desses locos em seqüenciador automático de DNA evidenciou a presença de polimorfismos em dois deles, a partir da análise de 12 indivíduos de *K. senegalensis* provenientes de 12 populações colatadas em Beni na África. Os resultados alcançados até o presente evidenciam a potencialidade dos marcadores testados para estudos de genética de populações (microssatélites do genoma nuclear e cloroplasto) e filogeografia (regiões não-codificadoras do cpDNA e genoma nuclear) das espécies de Meliaceae investigadas.

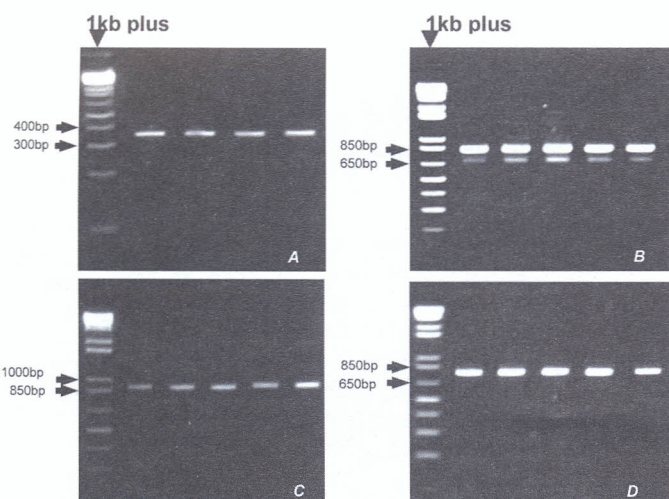


Figura 1 – Produto de PCR de quatro regiões não-codificadoras do genoma do cloroplasto de *Swietenia macrophylla*. A) *psbA-trnH*; B) *psbB-psbF*; C) *rps16* e D) *trnG-trnS*.

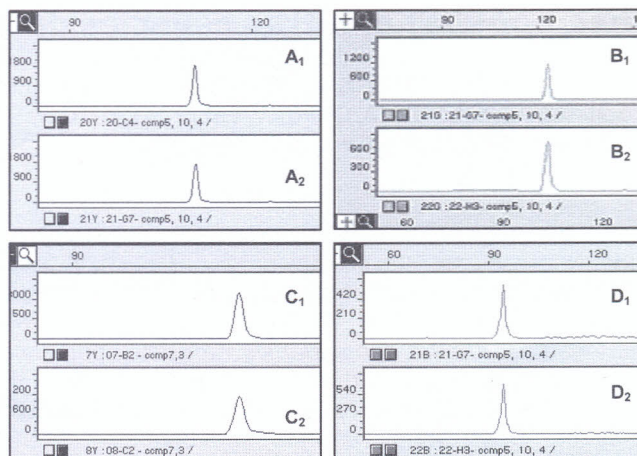


Figura 2 – Eletroferogramas de quatro locos microssatélites do genoma do cloroplasto de *Swietenia humilis* para dois indivíduos. A1 e A2 = *ccmp4*; B1 e B2 = *ccmp3*; C1 e C2 = *ccmp6*; D1 e D2 = *ccmp10*.

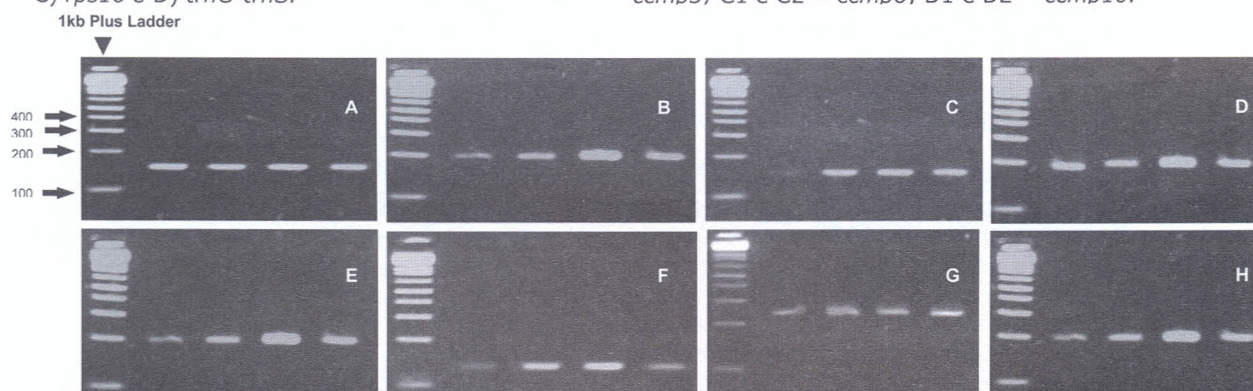


Figura 3 – Amplificação de locos microssatélites do genoma nuclear de *K. senegalensis*. A) *sm01* (56°C); B) *sm32* (56°C); C) *sm40* (56°C); D) *sm46* (56°C); E) *sm51* (56°C); F) *sm22* (62°C); G) *sm31* (52°C); H) *sm47* (56°C).

Palavras-chave: Sequências de DNA; Microssatélites; Transferabilidade.

Apoio Financeiro: CNPq

Bibliografias citadas

- Doyle, J.J., Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Ferreira, M. E., Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ª edição. Brasília (EMBRAPA-CENARGEN). 222p.
- Hamilton, M. B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, 8: 521-523.
- Lemes, M. R., Brondani, R. P. V., Grattapaglia, D. 2002. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. *The Journal of Heredity*, 93(4): 287-291.
- Lemes, M.R.; Gribel, R.; Proctor, J.; Grattapaglia, D. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology*, 12: 2875-2883.
- Oxelman, B., Lidén, M., Berglund, D. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe *Sileneae* (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 206: 393-410.
- Porebski, S.; Bailey, L.G.; Baum, B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15:8-15.
- Veríssimo, A., Barreto, P., Tarifa, R., Uhl, C. 1995. Extration of high-value natural resource in Amazônia: the case of mahogany. *Forest Ecology and Management*, 72 (1): 39-60.
- Weising, K., Gardner, R. C. 1998. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42: 9 - 19.
- White, G. M., Boshier, D. H., Powell, W. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: An example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4): 2038-2042.