

OTIMIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM CASTANHEIRA (*Bertholletia excelsa* Bonpl.)

Vanessa Santos Silva¹, Karina Martins², Vânia Cristina Rennó Azevedo³,
Lúcia Helena de Oliveira Wadt⁴.

1-Bolsista PIBIC / CNPq / Embrapa-AC

2-Professora, UFSCar, campus Sorocaba, SP

3- Pesquisadora, Lab. Genética Vegetal Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

4- Pesquisadora, Embrapa Acre, Rio Branco, AC - orientadora do projeto Pibic

INTRODUÇÃO: A Floresta Amazônica abriga numerosas plantas de valor econômico, dentre elas está a castanheira (*Bertholletia excelsa*, Lecytidaceae). As sementes dessa árvore são citadas como um dos produtos florestais não madeireiros mais importantes das reservas extrativistas da região. Essa espécie é valiosa tanto como alimento quanto como renda para as famílias que trabalham com o extrativismo. Para que o uso dessa planta seja uma atividade economicamente e biologicamente sustentável é preciso que se identifique, caracterize e conheça a distribuição e a dinâmica populacional da espécie. O presente estudo teve como objetivo otimizar marcadores microssatélites (SSR) desenvolvidos pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia visando estudos sobre a diversidade genética entre populações naturais de castanheiras.

MATERIAIS E MÉTODOS: Foram coletadas, no período de 2006 a 2007, amostras de câmbio em 50 árvores em cada uma das seguintes populações: duas no Seringal Cachoeira (Xapuri), uma no Seringal Filipinas (Brasiléia), uma na Reserva Florestal da Embrapa-Acre (Rio Branco), uma na Colônia Petrolina (Senador Guiomard) e uma na fazenda Nova Jerusalém (Acrelândia). As amostras foram armazenadas em tampão de transporte de câmbio (30% CTAB: 70% Etanol) em gelo e levadas para o Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular, da Embrapa Acre. Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo CTAB 2% segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) usando como macerador o equipamento Tissue lyser (Quiagen). O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose a 1% corado com Sybr Green ou brometo de etídeo, utilizando o método de comparação de bandas com quantidades conhecidas de DNA padrão lambda (λ). A otimização foi feita para 12 pares de primers SSR desenvolvidos pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, utilizando reação de PCR com 13 μ l de volume final, sendo 4,01 μ l de água miliq, 1,30 μ l de tampão 10X, 1,30 μ l de DNTP (25mM), 1,30 de BSA(2,5 mg/ml), 2,89 μ l de Primer (0,9 μ M), 0,20 μ l de Taq polimerase e 2,0 μ l de DNA(2,5 ng/ μ l). Para cada primer foi ajustada a melhor temperatura de anelamento e também foi feito teste de concentração de cloreto de magnésio (15 mM e 30mM).

RESULTADOS: Obteve-se um DNA viscoso, cujas concentrações iniciais variaram de 10 a 200 ng/ μ l. Dos 12 primers testados, apenas 8 possibilitaram a definição de temperaturas de anelamento que apresentassem bandas nítidas. Quando esses primers foram utilizados para avaliar 50 indivíduos de cada população 4 foram monomórficos e por isso considerados impróprios para o estudo de diversidade genética da espécie. Apenas 4 primers apresentaram

polimorfismo e mesmo assim o número de alelos (máximo de 4) foi muito inferior ao encontrado para outras espécies tropicais (em média: 20 alelos para *Manilkara sp*, 183 para *Hymenea coubaril* e 32 para *Bagassa guianensis*). O tamanho dos alelos amplificados variou de 140 a 260 pares de bases.

CONCLUSÃO: Dos 12 primers SSR de *Bertholletia excelsa* desenvolvidos, apenas 4 se mostraram potenciais para estudos de diversidade genética. Faz-se necessário o desenvolvimento de mais primers, procurando identificar marcadores com maior número de alelos e que possibilitem acessar um maior grau de polimorfismo.

PALAVRAS CHAVES: Diversidade Genética, Castanheira, Marcadores Microsatélites.

FINANCIADORA: PIBIC/CNPq/PPG-7/Natura/Embrapa-Projeto Silvigen.