

Christina Cleo Vinson

Isolamento de Microssatélites de Espécies Madeireiras no Contexto da Sustentabilidade Genética no Manejo Florestal

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Campus do Guamá, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Profa. Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio

Co-orientador: Dra. Ana Yamaguishi Ciampi

Belém

2004

Christina Cleo Vinson

Isolamento de Microssatélites de Espécies Madeireiras no Contexto da Sustentabilidade Genética no Manejo Florestal

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Campus do Guamá, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de Concentração : Genética e Biologia Molecular.

Aprovada em 10 de maio de 2004

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio (Orientadora)
Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança

Dra. Ana Yamaguishi Ciampi
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF)

Dr. Milton Kanashiro
Embrapa Amazônia Oriental (Belém, PA)

Dr. Horacio Schneider
Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança

Belém
Maio, 2004

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CONSERVAÇÃO E MANEJO DE RECURSOS MADEIREIROS DA FLORESTA AMAZÔNICA.....	7
1.2 BAGASSA GUIANENSIS.....	10
1.3 DIPTERYX ODORATA.....	12
1.4 JACARANDA COPAIA.....	15
1.5 RECURSOS GENÉTICOS NOS PLANOS DE MANEJO.....	18
1.6 MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	21
1.7 ISOLAMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	25
1.8 OBJETIVOS.....	27
1.8.1 <i>Objetivo Geral</i>	27
1.8.2 <i>Objetivos Específicos</i>	27
2. METODOLOGIA.....	28
2.1 EXTRAÇÃO DE DNA.....	28
2.2 ENRIQUECIMENTO DA BIBLIOTECA GENÔMICA.....	28
2.2.1 <i>Digestão do DNA Genômico</i>	28
2.2.2 <i>Ligação do DNA aos Adaptadores</i>	30
2.2.3 <i>Ligação da Biotina aos Oligonucleotídeos</i>	30
2.2.4 <i>Preparo das contas magnéticas para a hibridização</i>	31
2.2.5 <i>Hibridização do DNA+adaptor ao complexo oligo-contas magnéticas</i>	31
2.2.6 <i>PCR para controle do enriquecimento da Biblioteca</i>	32
2.2.7 <i>Southern Transfer</i>	33
2.2.8 <i>Hibridização da Membrana com a Sonda AG/TC</i>	34
2.2.9 <i>Amplificação do DNA da Biblioteca Enriquecida</i>	35
2.3 CLONAGEM DO INSERTO COM SSR.....	35
2.3.1 <i>Ligação do DNA ao Vetor PGMET</i>	35
2.3.2 <i>Transformação do Vetor+DNA com a Bactéria</i>	36
2.3.3 <i>Seleção de Clones Positivos</i>	37
2.4 PCR DOS CLONES POSITIVOS.....	39
2.5 SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES POSITIVOS E DESENHO DOS	

INICIADORES	40
2.6 OTIMIZAÇÃO DOS SSRS.....	41
2.7 ANÁLISE DE POLIMORFISMO.....	43
2.8 ANÁLISE DOS DADOS	44
3. RESULTADOS	45
3.1 BIBLIOTECA GENÔMICA ENRIQUECIDA	45
3.2 TRIAGEM DE PARES DE INICIADORES	46
4. DISCUSSÃO	53
4.1 METODOLOGIA UTILIZADA	53
4.2 A UTILIZAÇÃO DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES NOS PLANOS DE MANEJO	55
5. CONCLUSÕES.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fruto globoso da tatejuba (Fonte SAPECA-DENDROGENE)	11
Figura 2 - Corte mostrando o cerne amarelado com grande quantidade de latex da tatejuba (Fonte SAPECA-DENDROGENE).....	11
Figura 3 - Árvore do cumaru (Fonte SAPECA-DENDROGENE)	14
Figura 4 - Flor de cumaru (Fonte SAPECA-DENDROGENE).....	14
Figura 5 - Árvore de parapará (Fonte SAPECA-DENDROGENE).....	17
Figura 6 - Inflorescência de parapará (Fonte SAPECA-DENDROGENE).....	17
Figura 7 - Análise eletroforética em gel de agarose de fragmentos de diferentes DNAs produzidos com enzimas de restrição. O DNA digerido com a enzima TSP 509 I apresentou maior uniformidade de fragmentos.	29
Figura 8 - Análise eletroforética em gel de agarose 2 % de produtos da PCR das lavagens, do DNA diluído e do DNA enriquecido.	33
Figura 9 - Placa de Meio LB contendo clones recombinantes e clones não recombinantes através da seleção direta usando o gene da β-galactosidase (Fonte Projeto Genoma Guaran).	37
Figura 10 - Seleção por hibridação de colônia. Imagem autoradiogrfica obtida de um experimento de hibridação com oligonucleotídeos AG/TC com coloração por CSPD. Os clones escuros são os positivos.	39
Figura 11 - Análise eletroforética em gel de agarose 2 % de produtos da PCR dos clones positivos.....	40
Figura 12 - Seqüência parcial de um fragmento de DNA contendo microssatélite dinucleotdico de GT e GA.	41
Figura 13 - Análise eletroforética em gel de agarose de produtos da PCR do loco Do39 mostrando a diferença na disposição das bandas em relação ao Ladder Kb.....	42
Figura 14 - Gel de poliacrilamida com coloração de nitrato de prata mostrando a disposição das bandas do produto da PCR dos locos Do31 e Do39 em relação a 10 pb Ladder, onde os produtos variaram de 180pb a 220pb.	44

1. INTRODUÇÃO

A floresta tropical úmida ocorre em uma faixa entre 30 graus de latitude Norte e Sul em todos os continentes apresentando uma pluviosidade de 1500 mm por ano e uma alta transpiração, caracterizando um clima úmido (Ribeiro, *et al.*, 1999).

A diversidade das florestas tropicais úmidas é a maior do planeta, em média com 300 espécies vegetais ou arbóreas com mais de 10 cm de DAP (diâmetro na altura do peito) por hectare (Ribeiro *et al.*, 1999). Schultes & Raffauf (1990), estimaram 80,000 espécies amazônicas, porém, em uma visão mais conservadora, Gentry (1982) estimou 21.320 espécies.

A Amazônia brasileira possui 8 milhões de Km² de floresta densa tropical úmida, formada por 23 ecorregiões delimitadas com base nos grandes rios, variação latitudinal, tipos de solo, inundação de rios ou marés e a sazonalidade na precipitação (Ribeiro *et al.*, 1999). Segundo dados do projeto RADAM (IBGE, 1997) dentro destas ecorregiões existem 392 diferentes unidades de paisagem (combinação única do tipo fisionômico de vegetação com um tipo de solo). A composição, o endemismo e a diversidade têm uma clara correlação com a geografia dentro da Amazônia, onde cada unidade de paisagem possui uma diversidade diferente.

Esta vegetação amazônica abriga uma inestimável riqueza de produtos florestais tais como: látex, castanhas, fibras, corantes, frutas, medicamentos, óleos e madeiras, os quais estão sendo retirados de forma indiscriminada. A conservação e o manejo destes recursos são fundamentais para a sua sustentabilidade.

1.1 CONSERVAÇÃO E MANEJO DE RECURSOS MADEIREIROS DA FLORESTA AMAZÔNICA

A exploração comercial da madeira começou há três séculos, mas até o final da década de 60 o volume extraído era pequeno. Entretanto, em menos de três décadas, a Amazônia assumiu a liderança na produção de madeira no país. No início dos anos 90, cerca de 75% da madeira consumida no Brasil provinha da Floresta Amazônica (Veríssimo, 1996).

O crescimento significativo da atividade madeireira na Amazônia resultou, em parte, da exaustão das florestas do Sul e Sudeste do Brasil e do esgotamento progressivo das florestas tropicais da Ásia, responsáveis por 70% do comércio internacional de madeiras (Veríssimo, *et al.*, 1996). Portanto, segundo Veríssimo *et al.* (1996) é provável que estejamos apenas no início de uma grande era de exploração madeireira na Amazônia.

Nas áreas destinadas à atividade florestal, a exploração madeireira deve ser feita de forma planejada. A adoção do manejo possibilita a manutenção da estrutura e composição de espécies da floresta enquanto gera benefícios sociais e econômicos (Silva, 2001).

De acordo com Ahrens (1997), o manejo florestal trata do estudo do desenvolvimento e aplicação de técnicas de análise quantitativa nas decisões acerca da localização, estrutura e composição de um recurso florestal de modo a possibilitar a produção de produtos, serviços e benefícios, diretos e/ou indiretos, na quantidade e na qualidade requeridas por uma organização florestal ou por toda uma sociedade.

O decreto que regulamentou a exploração das florestas da Bacia Amazônica (Decreto nº. 1.282, de 19.10.95) definiu manejo florestal sustentável

como a administração de uma floresta para a obtenção de benefícios econômicos e sociais, respeitando-se os mecanismos de sustentação do ecossistema (Silva, 2001).

No entanto, o que se observa é que no uso e conservação das florestas tropicais na Amazônia, o manejo florestal que tem sido promovido é arbitrário com relação às espécies, como se todas fossem iguais e afetadas da mesma maneira pela exploração seletiva. Um amplo conhecimento das características demográficas, da dinâmica populacional (Matos *et al.*, 1999) e da genética da espécie (Reis *et al.*, *apud* Gaiotto, 1999) são fundamentais para a conservação e um manejo sustentável.

Segundo Reis *et al. apud* Gaiotto (1999), a base para a sustentabilidade da floresta é a manutenção de seus componentes genéticos e ecológicos. O manejo florestal deve ser realizado sob uma perspectiva conservacionista, onde a dinâmica populacional, a estrutura genética das populações naturais, bem como suas interações com as outras espécies do ambiente sejam preservadas.

Cientes da carência de informações biológicas nos planos de manejo florestal, e da preocupação com a manutenção da diversidade genética interespecífica e intraespecífica, iniciativas estão sendo tomadas no sentido de integrar informações biológicas, para garantir a sustentabilidade produtiva da floresta a longo prazo.

Uma dessas iniciativas é o projeto Dendrogene (Embrapa Amazônia Oriental/ DFID - *Department for International Development*), que busca a conservação genética em florestas manejadas na Amazônia, por meio da avaliação dos impactos da exploração madeireira na diversidade genética,

visando o uso sustentável da floresta através da manutenção do seu processo evolutivo. **Sua estratégia é usar um modelo de simulação que represente os processos ecológicos e genéticos para que se possam fazer análises de cenários de diferentes sistemas ou intensidades de manejo. Estas análises, a identificação correta das espécies e a utilização de modelos de simulação genética e de crescimento informações genéticas e ecológicas possam ser incorporadas no software de planejamento das atividades de exploração de madeira (trema).**

O projeto monitora uma área de 500 hectares de floresta primária de terra firme (Parcela de Estudo Intensivo, ISP, ou *Intensive Study Plot*) em parceria com o IBAMA (Instituto brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) / ITTO (*International Tropical Timber Organization*), na Floresta Nacional do Tapajós. O DNA genômico das árvores adultas (DAP > 20 cm), e das progênes de trinta famílias por espécie serão analisados por marcadores moleculares antes e após o corte seletivo das árvores. Assim pode-se estimar a diversidade genética da população e os efeitos das atividades de extração madeireira ao analisar antes e depois da exploração. Esses dados, analisados em conjunto com as informações de organização espacial e da fenologia dos indivíduos reprodutivos, contribuirão para o melhor entendimento das variáveis na manutenção da variabilidade genética intra-específica nos planos de manejo (Kanashiro *et al.* 2001, 2002).

Das sete espécies selecionadas pelo projeto, três são objeto do presente trabalho: tatajuba (*Bagassa guianensis* Aubl.), cumaru (*Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.) e parapará (*Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don).

1.2 BAGASSA GUIANENSIS

Posição taxonômica do *Bagassa guianensis* Aubl de acordo com à hierarquia da classificação segundo Judd *et al.*, (1999):

Classe: Angiospermopsida

Ordem: Urticales

Família: Moraceae

Gênero: *Bagassa*

Espécie: *Bagassa guianensis*

A família Moraceae possui cerca de 1050 espécies em 37 gêneros predominantemente tropicais, é muito abundante na região Ásia-Australásica. Nos neotrópicos possui cerca de 45 espécies herbáceas, 125 espécies hemiepífitas e cerca de 100 taxa arbóreas (Ribeiro *et al.*, 1999).

A espécie *Bagassa guianensis*, conhecida como tatajuba, é pioneira, atinge até 30 metros e ocorre de forma descontínua e irregular na floresta de platô, se distribuindo da América Central até a Floresta Amazônica (Loureiro & Silva, 1968).

A espécie é diplóide e dióica, ou seja, possui uma árvore com flor masculina e outra árvore com flor feminina, apresentando fruto globoso (Figura 1) (Silva, M. B. *et al.*, 2003). A polinização é feita pelos *thrips* ou lacerdinhas, insetos da ordem Thysanoptera, cuja eficiência depende de um fator natural: o vento (Marivana Silva, comunicação pessoal). A maior ocorrência de floração é entre julho a setembro, e de disseminação entre novembro a janeiro, com poucos indivíduos florindo/disseminando fora desse período, geralmente, com um evento de floração por indivíduo ao ano (Silva, M. B. *et al.*, 2003).

A tatajuba possui cerne amarelado logo após o corte e, muitas vezes, com faixas mais escuras distinto do alburno amarelo-pálido a branco-amarelado, apresentando grande quantidade de látex (Figura 2). A madeira tem densidade média de 0,70 a 0,80 g/cm³, sendo utilizada nas construções civil e naval, carpintaria, marcenaria, para a fabricação de cabos de ferramentas, móveis, portas, assoalhos, laminados decorativos e outros (Loureiro & Silva, 1968).



Figura 1 - Fruto globoso da tatajuba (Fonte SAPECA-DENDROGENE)



Figura 2 - Corte mostrando o cerne amarelado com grande quantidade de látex da tatajuba (Fonte SAPECA-DENDROGENE)

1.3 DIPTERYX ODORATA

Posição taxonômica do *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.) de acordo com a hierarquia da classificação segundo Judd *et al.* (1999):

Classe: Angiospermopsida

Subclasse: Rosidae

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae

Gênero: *Dipteryx*

Espécie: *Dipteryx odorata*

O gênero *Dipteryx* possui cerca de 26 espécies, predominantemente arbóreas, das quais 11 foram identificadas no Brasil, em regiões do cerrado e na floresta Amazônica (Loureiro & Silva, 1968). Possui um conjunto hapóide de oito cromossomos, onde existem espécies tetraplóides (Goldblatt, 1977) e diplóides (Torres, 2000).

A espécie *Dipteryx odorata*, conhecida como cumaru ou “tonka bean” (em inglês), ocorre desde a América Central até o norte da América do Sul, e está amplamente distribuída desde Honduras até a floresta Amazônica (Loureiro & Silva, 1968). Ocorre em florestas primária e secundária, principalmente na floresta de platô (Ribeiro *et al.*, 1999). Possui uma baixa densidade na Flona (Floresta Nacional) do Tapajós (0,17 N/ha) (Marivana Silva, comunicação pessoal).

A árvore emergente chega a atingir até 30 metros de altura, possuindo folhas alternas com cinco ou mais folíolos, raquis alada e lâmina assimétrica. Suas principais características para identificar a espécie são: tronco apresentando algumas protuberâncias (Figura 3), possuindo um ritidoma pardo-

amarelado, folhas glabras e coriáceas (Ribeiro *et al.*,1999).

O cumaru é uma árvore hermafrodita, com inflorescências tipo panículas eretas terminulosais, com dois a oito ramos / inflorescência, apresentando uma média de 78,5 botões e flores / inflorescência (Souza, 2003). Suas flores são papilionáceas de coloração branca a rosada, apresentando uma pétala estandarte, duas pétalas do tipo asas, e duas pétalas do tipo carenas (Figura 4) (Souza & Maués, 2003). O cálice apresenta duas sépalas ferrugíneas; o androceu possui 10 estames diadelfos; as anteras são dorsifixas, distecas, com deiscência longitudinal; o gineceu é unicarpelar e uniloculado; e o estigma é papiloso (Souza & Maués, 2003).

As flores, além do néctar, são muito aromáticas, o que atrai pelo menos 25 espécies incluindo mariposas, vespas, besouros, beija-flores e abelhas de várias famílias, entre as quais, abelhas do gênero *Epicharis*, que visitam as flores e podem carregar o seu pólen (Maués, comunicação pessoal, 2003).

Apresenta madeira muito pesada com 0,95 a 1,0 g/cm³, e o cerne castanho amarelo escuro, sendo seu aspecto fibroso de grande utilidade na construção de navios, carroceria, construção civil, vigas, dormentes e postes (Loureiro & Silva, 1968). A substância cumarina é usada para essência de perfumes e óleos, na indústria cosmética e como sabor para tabacos (Loureiro & Silva, 1968).



Figura 3 - Árvore do cumaru (Fonte SAPECA-DENDROGENE)



Figura 4 - Flor de cumaru (Fonte SAPECA-DENDROGENE)

1.4 JACARANDA COPAIA

Posição taxonômica do *Jacaranda copaia* (Aubl.)D.Don) de acordo com a hierarquia da classificação segundo Judd *et al.* (1999):

Classe: Angiospermopsida

Subclasse: Asteridae

Ordem: Scrophulariales

Família: Bignoniaceae

Gênero: *Jacaranda*

Espécie: *Jacaranda copaia*

A família Bignoniaceae possui cerca de 850 espécies e 120 gêneros, sendo predominantemente tropical e abundante nos neotrópicos. Abriga o maior número de lianas na região Amazônica (Ribeiro *et al.*,1999).

A espécie *Jacaranda copaia*, conhecida como parapará, se distribui da América Central até a Floresta Amazônica, comum em toda a floresta amazônica brasileira, incluindo o estado de Mato Grosso (Loureiro & Silva, 1968). Apresenta cariótipo diplóide (Jones & Hubbell, 2003).

Esta espécie é abundante em florestas primárias e secundárias em florestas de platô, baixio, vertente e capoeira (Ribeiro *et al.*,1999). É árvore de dossel ou sub-dossel (Figura 5), que cresce de maneira esguia acima do dossel, podendo atingir até 30 metros, com características de planta pioneira (Loureiro & Silva, 1968).

O parapará possui folhas compostas e opostas, bipinadas, folíolos com margens inteiras, freqüentemente serrados quando jovens (Ribeiro *et al.*,1999). Apresenta inflorescência em panícula larga, terminais, com pedúnculo e

pedicelos curtos com flores azul-violáceas, cálice tubuloso e corola tubulosa e afunilada (Figura 6) (Ribeiro *et al.*,1999). Estas apresentam antese diurna, ocorrendo entre as 7:00 e 8:00h, tendo duração de dois dias, perdendo suas pétalas após cerca de 24 horas (Silva, I. V. D. *et al.*, 2003). As inflorescências têm em média 1,9 flores / inflorescência, com abertura de 92,9 flores / dia.

A floração ocorre com maior intensidade nos meses de agosto a outubro. A polinização é realizada por um grupo de abelhas, porém, o papel de polinizador - vilão, que destrói as flores, cabe a uma espécie de mamangaba corpulenta, uma abelha de até 5 cm de comprimento, a *Xylocopa frontalis* (Márcia Maués, comunicação pessoal). Com a polinização natural, obtêm-se, em média, 21 frutos / inflorescência, com média de 247 sementes (Silva, I. V. D. *et al.*, 2003b) e com sementes aladas e fruto plano, oval e achatado, com 4 cm de comprimento e 2,5 cm de largura (Ribeiro *et al.*,1999).

A madeira é muito leve (0,38 a 0,40 g/cm³), com cerne e alborno de cor branca levemente rosada, apresentando listras vasculares mais escuras, usada em caixas, brinquedos, compensados e papel (Ribeiro *et al.*,1999).



Figura 5 - Árvore de parapará (Fonte SAPECA-DENDROGENE)



Figura 6 - Inflorescência de parapará (Fonte SAPECA-DENDROGENE)

1.5 RECURSOS GENÉTICOS NOS PLANOS DE MANEJO

O conhecimento da reprodução e genética de espécies florestais e suas interações dentro de uma floresta, tanto em unidades de manejo, quanto no nível de ecossistema, contém muitas lacunas, que prejudica as tentativas de apresentar conclusões sobre como promover a sustentabilidade genética no manejo dessas espécies.

A importância da conservação genética nos planos de manejo deve-se ao fato de que a capacidade adaptativa das espécies está relacionada à variação genética e a manutenção dos processos genéticos “íntactos”, que uma vez respeitados, possam garantir a sustentabilidade no uso dos recursos florestais. Portanto, a principal questão da sustentabilidade no manejo é preservar os processos e não o estado genético-ecológico na dinâmica populacional (Namkoong, 1998).

De acordo com Ciampi (1999), a conservação de uma população natural deve ser realizada de uma maneira eficiente, a fim de preservar a maior percentagem possível de indivíduos que representem geneticamente a espécie em questão.

Segundo Loveless (2002), o que nós medimos e tentamos interpretar é a atual estrutura e dinâmica genética de uma população, que surgiu pela interação no passado de vários fatores evolucionários, tais como: a história biogeográfica, o isolamento reprodutivo, o fluxo gênico, mudanças no tamanho populacional, distribuição no habitat, seleção natural, deriva genética, etc. Entretanto, a magnitude destes efeitos nos padrões de variação genética é dependente da habilidade reprodutiva dos indivíduos da população e seu impacto no fluxo gênico.

Alguns autores, como Corner, Federov, *apud* Loveless 2002 sugeriram que o baixo número de indivíduos por ha (pelo fato de ter maior diversidade de espécies por hectare), que a fragilidade de pequenos insetos polinizadores e que a assincronia na fenologia das espécies florestais tropicais, propiciava o endocruzamento e resultava em pouca variabilidade genética. Atualmente, descobertas de que os polinizadores movem longas distâncias, de que as sementes são largamente dispersas, indicam que as espécies florestais possuem alto fluxo gênico, tornando as populações grandes e conectadas (Loveless, 2002). Com o surgimento dos marcadores moleculares a alta diversidade das espécies florestais tem sido confirmados (Loveless, 2002).

A intervenção do manejo intenso em uma floresta tem sérias implicações, na dinâmica populacional das espécies comerciais e não comerciais, tais como a diminuição da diversidade genética das espécies raras, o aumento da frequência de genes deletérios recessivos devido a seleção disgênica, a diminuição da heterozigosidade devido o efeito gargalo de garrafa em populações pequenas e isoladas, resultantes de cortes, fragmentação florestal e outros impactos das atividades florestais (Putz *et al.*, 2000). No entanto, a alta diversidade genética identificada em espécies tropicais e um aperfeiçoamento dos polinizadores e dispersores de sementes indicam, um sucesso para estas espécies em um plano de manejo. Portanto, uma avaliação sobre o impacto do manejo deverá ser realizado nas populações destas e de espécies florestais para o entendimento da dinâmica da floresta tropical, de modo que as futuras explorações possam ser feitas de maneira sustentável.

A variabilidade genética possui um papel fundamental para a evolução da espécie, uma vez que a seleção natural é realizada com base nas

diferenças existentes entre os indivíduos de uma população, de maneira a permitir, principalmente, o sucesso reprodutivo daqueles mais adaptados ao meio ambiente em que se encontram. Portanto, quanto maior a variabilidade existente na população, maior será a probabilidade de perpetuação da espécie. Desta forma, qualquer estratégia de manejo ou conservação de populações naturais sem informações genéticas a respeito da variabilidade alélica existente entre e dentro destas populações seria ineficiente (Grattapaglia *et al.*, 1997).

As investigações sobre a relação entre dispersão gênica e níveis de diversidade genética dentro e entre populações podem ser feitas através de estudos de sistema de reprodução e mecanismos de dispersão de pólen (Bosheir, *et al.*, 1995) e também através do uso de técnicas moleculares na obtenção de estimativas da diversidade genética, inferindo-se sobre o alcance do fluxo gênico entre as árvores através de estudos de paternidade (Ciampi, 1999, Gaiotto, 1999, Brondani *et al.*, 1998, Colevatti, *et al.*, 1999).

A variabilidade decorrente de diferenças genéticas pode ser detectada através do emprego de marcadores moleculares. Essas técnicas de análise de variabilidade genética em nível do DNA encontram-se classificadas em duas categorias: pós-transcricionais (baseadas na análise de produtos gênicos), como por exemplo, isoenzimas, que inferem indiretamente sobre a existência de diferenças em nível de DNA; ou pré-transcricionais (análise direta da seqüência de DNA), baseadas em digestão e/ou hibridização de ácidos nucleicos (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição - RFLP e minissatélites) e na amplificação enzimática de seqüências de DNA (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso - RAPD, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados - AFLP e microsatélites). (Ferreira, 2001).

1.6 MARCADORES MICROSSATÉLITES

Microsatélites ou marcadores moleculares baseados em SSR (seqüência simples repetida) consistem de unidades de cerca de um a seis nucleotídeos repetidos em seqüência dentro do genoma de vários organismos (Goldstein & Scholterer, 2001).

Os microsatélites podem ser classificados como perfeitos, imperfeitos ou compostos, os perfeitos possuem as repetições sem interferência de outros nucleotídeos na sua seqüência nucleotídica, enquanto que microsatélites imperfeitos possuem um ou mais nucleotídeos interferindo na ordem seqüencial das repetições. Microsatélites compostos são seqüências com dois ou mais conjuntos de seqüências repetidas sistematicamente (Weber & May, 1989).

A existência de repetições di-nucleotídicas poli (CA) – poli (GT) foi primeiro documentado por Hamada *et al.*, (1982). Posteriormente, estudos feitos por Tautz & Renz (1984) confirmaram a abundância e a ubiquidade dos microsatélites nos eucariotos.

Estudos em bancos de dados mostram que a freqüência e distribuição dos microsatélites diferem em plantas e animais. O genoma de plantas contém, em média, dez vezes menos microsatélites dinucleotídicos do que o genoma humano (Powell *et al.*, 1996). Em mamíferos, há 20 pb de seqüências repetidas a cada 6 Kb, ao passo que em plantas são encontradas em média a cada 33 Kb (Powell *et al.*, 1996). A freqüência de microsatélites em genomas de cloroplastos de arroz, tabaco e trigo mostrou que o DNA de organelas possui uma baixa freqüência de SSRs (1 por 317 Kb) comparada ao

DNA genômico (Wang *et al.*, 1994).

As repetições dinucleotídicas mais freqüentes em plantas são (AT)_n, seguida de (GA)_n e (AC)_n. Entre as repetições trinucleotídicas (AAT)_n e (AAC)_n são as mais freqüentes, entre as tetranucleotídicas encontra-se (AATT)_n e (AAAT)_n (Wang *et al.*, 1994; Gupta & Varshney, 2000).

A estimativa para a taxa de mutação para os microsatélites é entre 10⁴ e 10⁵ mutações por gameta (Goldstein & Scholterer, 2001). Entretanto os mecanismos de mutações para os microsatélites são pouco conhecidos. Os dois principais mecanismos são: “escorregões” na replicação do DNA e recombinação desigual ou alinhamento incorreto das fitas de DNA principalmente de eucariotos (Goldstein & Scholterer, 2001).

Segundo Powell *et al* (1996) os microsatélites se aproximam do marcador ideal, pois apresentam numerosas vantagens quando comparados a outros tipos de marcadores, tais como:

- São abundantes em genomas eucariotos e estão bem dispersos no genoma, em regiões codificadoras e não codificadoras;
- A herança é codominante, o que permite a discriminação entre homozigotos e heterozigotos;
- São multialélicos, altamente polimórficos e informativos, apresentando o maior conteúdo informativo por loco entre todas as classes de marcadores moleculares;
- São baseados em PCR. Esta técnica utiliza-se um par de iniciadores na reação de PCR para detectar variações em locos de seqüências repetidas (Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989).
- São altamente reproduzíveis;

- Não requerem radioatividade;
- Os locos são freqüentemente conservados entre espécies relacionadas, podendo ser transferidos dentro de espécies do mesmo gênero ou de gênero similares filogeneticamente;
- Uma vez desenvolvidos, podem ser compartilhados entre diferentes laboratórios;
- São automatizáveis em sistema multiplex, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locos em pouco tempo;
- O conteúdo informativo de um loco de SSR é bastante alto, justamente por se tratar de seqüências de alta taxa evolutiva. Mesmo em comparações de germoplasma de estreita base genética, geralmente detecta-se um alto número de alelos em um loco SSR.

A utilização destes marcadores altamente informativos é ampla. Originalmente eles foram utilizados para mapeamento genético e tem sido usado intensamente para análises de ligação e a associação com genes ligados a doenças. Contudo, eles também são fundamentais na estimativa de relações de parentesco, probabilidade de identidade entre dois indivíduos (Ciampi, 1999) e ao nível populacional. Variação de microssatélites tem sido utilizada para estimar a quantidade de hibridização entre espécies próximamente relacionadas (Gupta & Varshney, 2000, Samadi *et al.*, 1998, Farias *et al.*, 2002), assim como, comparação entre os níveis de variação entre populações e espécies (Gaiotto, *et al.*, 2000, Ciampi, 1999). Estimativas de tamanho populacional efetivo (Gaiotto, 1999, Ciampi, 1999) e nível de subestruturas populacionais incluindo a migração entre as subpopulações (Lemes *et al.*, 2002, Gaiotto, 1999) e relações

filogenéticas entre várias subpopulações (Samadi *et al.*, 1998, Farias *et al.*, 2002).

O estudo genético das populações com microssatélites, nos permite inferir no manejo o nível de impactos causado pelos cortes seletivos de espécies madeireiras. Espera assim desenvolver critérios genéticos e ecológicos que possam ser incorporados no planejamento de exploração para assegurar conservação das espécies, através da manutenção da sua variabilidade genética.

Ferreira (2001) sumariza a utilidade das técnicas moleculares de análise genômica, incluindo os microssatélites, em dois principais pontos:

- Permitem identificar variabilidade nas seqüências de DNA dos indivíduos analisados em nível de resolução várias vezes superior ao polimorfismo passível de detecção ao nível morfológico;
- Reduzem a enorme complexidade do genoma estudado à base de análise Mendeliana dos segmentos de DNA detectados. Assim, os dados moleculares obtidos permitem estimar parâmetros genéticos úteis para um amplo espectro de estudos desde testes de identidade genética e construção de mapas genéticos até análises filogenéticas e evolucionárias.

No entanto, Hedrick (1999) (apud Gaiotto, 1999) fez algumas considerações sobre o uso de marcadores microssatélites em estudos de evolução, conservação e genética de populações, em relação ao uso destes na estimativa de distâncias genéticas e significância estatística. Segundo o autor, estes marcadores apresentam resultados surpreendentes para questões evolutivas e conservacionistas, por serem altamente multialélicos. Desta forma, a interpretação da significância de tais resultados deve ser vista com certa cautela, pois as estimativas de distância e diferenciação genética são influenciáveis pelo nível de heterozigosidade apresentada pelos marcadores, que não corresponde à

verdade biológica, já que são hipervariáveis.

A grande limitação do uso de marcadores SSR é a obtenção dos iniciadores usados na reação PCR para amplificar alelos em cada loco. Trata-se ainda de uma técnica de elevado custo e domínio do conhecimento da biologia molecular, demandando mão de obra altamente especializada.

1.7 ISOLAMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

No Brasil, laboratórios têm desenvolvido marcadores SSR para várias espécies vegetais utilizando bibliotecas enriquecidas. Já foram desenvolvidos iniciadores para eucalipto (Brondani, *et al.*, 1998), pequi (Collevatti *et al.*, 1999), pimentas e pimentões (Buso *et al.*, 2000), feijão (Buso *et al.*, 2001), copaíba (Ciampi, *et al.*, 2000), palmito (Gaiotto *et al.*, 2000), mogno (Lemes *et al.*, 2002), arroz (Brondani, *et al.*, 2001), e côco (Moretzsohn, *et al.*, 2001).

Microsatélites de dinucleotídeos são mais abundantes que tri e tetra-nucleotídeos, e por isso existe uma grande quantidade de trabalhos apresentando iniciadores que amplificam estas regiões. Os dinucleotídeos apresentam um taxa de mutação mais alta sendo marcador mais informativo para estudo de populações. Entretanto, não se encontram trabalhos para o isolamento de microsatélites para dinucleotídeos AT devido a auto complementaridade das sondas utilizadas durante o isolamento dos marcadores com este tipo de repetição (Rafalski *et al.*, 1996).

Há varios métodos para isolar SSR: buscando em banco de dados públicos, aplicação de espécies correlacionadas e construindo uma biblioteca genômica (Maguire, 1999). A busca em banco de dados tem sido utilizada para algumas espécies, mas não se encontram marcadores suficientes para

mapeamento, mas isto tende a mudar uma vez que com os EST (*expressed sequence tags*) permite que mais SSR sejam encontrados (Maguire, 1999).

A transferibilidade de microssatélites em gêneros correlatos depende do grau de conservação da região da seqüência do iniciador, da distância taxonômica das espécies de interesse e da amplificação correta do fragmento e do polimorfismo do fragmento. Geralmente as condições de reação precisam ser otimizadas. A transferibilidade nem sempre é possível, havendo a necessidade de se isolar microssatélites para as espécies de interesse (Maguire, 1999).

O isolamento de microssatélites pode ser por métodos tradicionais ou por enriquecimento, os métodos tradicionais consistem de: digestão de fragmento, clonagem e seqüenciamento (Zane *et al.*, 2002, Maguire, 1999).

A construção de uma biblioteca pode ser realizada através de vários protocolos de enriquecimento, podendo-se aplicar mais de um protocolo na mesma biblioteca. Estes são os principais de acordo com Zane *et al.*,(2002) & Maguire (2001):

- Enriquecimento da colônia, conhecido como hibridização de placa através de probes complementares as repetições com marcação quimioluminescente ou radioativa;
- Enriquecimento por extensão do iniciador utilizando iniciadores complementares ou com iniciadores degenerados;
- Enriquecimento por hibridização utilizando espetadivina magnética, onde os fragmentos com microssatélites se hibridizam com oligos ligados a contas magnéticas, são atraídas por um imã;
- Enriquecimento por hibridização em membranas de Nylon;
- Enriquecimento utilizando a técnica de RAPD.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar uma bateria de marcadores microssatélites para espécies arbóreas da Floresta Amazônica: *Jacaranda copaia*, *Bagassa guianensis* e *Dipteryx odorata*. Estes estudos vem sendo realizados como parte do projeto Dendrogene, e as análises genéticas populacionais posteriores fornecerão subsídios para conservação e manejo sustentável destas espécies.

1.8.2 Objetivos Específicos

- Adaptar protocolos para o isolamento de microssatélites para espécies madeiras da floresta amazônica.
- Isolar uma bateria de iniciadores de microssatélites di-nucleotídeos CT/AG para as espécies *Jacaranda copaia*, *Bagassa guianensis* e *Dipteryx odorata*.
- Otimizar no mínimo de oito locos SSRs polimorficos para as espécies *Jacaranda copaia*, *Bagassa guianensis* e *Dipteryx odorata*.
- Caracterizar os locos SSRs para cada espécie.
- Descrever a importância da aplicabilidade dos SSRs em futuros estudos com planos de manejos destas espécies na Amazônia.

2. METODOLOGIA

2.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído de folhas de indivíduos adultos das espécies de *Bagassa guianensis*, *Dipteryx odorata*, e *Jacaranda copaia* de acordo com o protocolo CTAB 2% de Ferreira & Grattapaglia (1995). Para o isolamento de microssatélites é necessária uma quantidade mínima de 50 µg de DNA.

2.2 ENRIQUECIMENTO DA BIBLIOTECA GENÔMICA

2.2.1 Digestão do DNA Genômico

O protocolo de isolamento de microssatélites foi utilizado e otimizado pela DuPont (Rafalski *et al.*, 1996) e foi adaptado para outras espécies (Brondani *et al.*, 1998).

A digestão do DNA genômico foi testada com três enzimas de restrição, Sau 3A I (*Pharmacia*), Mse I e Tsp 509 I (*Biolabs New England*), para as quais já se tem adaptador com a seqüência de corte (Anexo 1), em reações de 10µl. O produto da reação foi submetida a corrida eletroforetica em gel de agarose 2% corado com brometo de etidio. Através da análise eletroforética de fragmentos de DNAs de diferentes tamanhos produzidos com as enzimas Sau 3A I, Mse I ou Tsp 509 I, foi selecionada a enzima que obteve melhor digestão na região de 200 a 880 pb (Figura 7).

Após a seleção da enzima Tsp 509 I, procedeu-se a reação de digestão em um volume final de 200 µL a qual consistiu de 130 µL de DNA (400 ng / µL), 20 µL de Tampão Ne I , 50 µL da Enzima Tsp 509 I (5 U / µL) (Bio Labs New England). A reação foi incubada por 12 h a 65 °C.

Em gel de agarose a 2 %, corado com brometo de etídio, aplicou-se os 200 μ L do produto da reação com 80 μ L de tampão de Ficol 15% e utilizou-se o Φ 174 como marcador. Para uma boa separação dos fragmentos, a eletroforese foi mantida por 2 horas a 100 V. O pedaço do gel que continha os fragmentos de 200 a 800 pb foi retirado e os fragmentos de DNA foram purificados com o *kit Qiaquick Gel Extraction*, da QIAGEN .

Os fragmentos recuperados foram quantificados e visualizados em luz UV através da eletroforese em gel de agarose a 2 %, utilizando o DNA lambda (λ) de 100 ng como marcador.



Figura 7 - Análise eletroforética em gel de agarose de fragmentos de diferentes DNAs produzidos com enzimas de restrição. O DNA digerido com a enzima TSP 509 I apresentou maior uniformidade de fragmentos.

2.2.2 Ligação do DNA aos Adaptadores

Para o preparo dos adaptadores de 200 μ M colocou-se em um tubo de 1,5 mL 80 μ L do adaptador menor (*Short Adaptor*, 500 μ M), 80 μ L do adaptador maior (*Long adaptor*, 500 μ M), e 40 μ L de tampão TE + 0,1 NaCl. Incubou-se por 15 minutos a 65 $^{\circ}$ C, e em seguida deixou-se por 2 h a temperatura ambiente. Armazenou-se a 4 $^{\circ}$ C.

A ligação dos fragmentos aos adaptadores com extremidades coesivas geradas pela enzima consistiu da seguinte reação: 4 μ L de adaptadores (200 μ M), 50 μ L de DNA (5 μ g), 12 μ L de Tampão 10 x T₄ DNA ligase USB, 6 μ L de T4 DNA ligase USB (400 U / μ L) e 48 μ L de água MiliQ. Incubou-se a reação por 12 h a 12 $^{\circ}$ C.

Os adaptadores ligados aos fragmentos de DNA foram utilizados como molde do iniciador para as reações de PCR (Reação em cadeia da polimerase) e para a ligação com o plasmídeo.

2.2.3 Ligação da Biotina aos Oligonucleotídeos

A ligação de oligonucleotídeos à biotina consistiu da seguinte reação: : 2 μ L de (TC)₁₃ (100 pmoles / μ L), 4 μ L de tampão 10X da terminal transferase, 2 μ L de Biotina 16 ddUTP (25 nmol), 5,3 μ L de Terminal Transferase (15 U / μ L) e 26,7 μ L de água miliq. Incubou-se a reação por 30 minutos a 37 $^{\circ}$ C.

Para inibir a ação da enzima, adicionou-se 2 M de EDTA, em seguida precipitou-se com 2,5 volumes de etanol 100 % por 12 h, centrifugou-se a 12.000 rpm por 30 minutos, lavou-se com 250 μ L de etanol 70%. Após o *pellet* estar seco, ressuspendeu-se em 30 μ L de água MiliQ.

2.2.4 Preparo das contas magnéticas para a hibridização

Para o preparo das contas magnéticas (*Dynabeads* – Estreptavidina, Boehringer Mannheim) procedeu-se como descrito abaixo:

- Adicionar 100 μL de contas (10 μg / μL) em um tubo de 2mL.
- Lavar duas vezes com 400 μL de tampão PBS (Anexo 2) + 1 % BSA. Para remover a solução aquosa (sobrenadante), coloca-se o tubo no separador de contas (estante magnetizada), retirando-se o sobrenadante com micropipeta, evitando retirar as contas magnéticas.
- Lavar uma vez com 400 μL BEW 1X (Anexo 2);
- Adicionar 200 μL de BEW 2X (Anexo 2) e 170 μL de água;
- Adicionar 30 μL de biotina ligada ao oligo TC₁₃;
- Deixar sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente;
- Lavar duas vezes com 400 μL de BEW 1X;
- Lavar uma vez com 400 μL de SSC 5X com SDS 0,1 %;
- Resuspender em 150 μL de SSC 10X com SDS 0,2 % pré-aquecido a 65 °C;
- Incubar por 15 min a 65°C;
- Armazenar a 4°C.

2.2.5 Hibridização do DNA+adaptador ao complexo oligo-contas magnéticas

Nesta etapa foram utilizados 6 microtubos e consistiu das seguintes etapas:

- Adicionar 30 μL de água miliq ao DNA + adaptador;
- Desnaturar o DNA + adaptador a 95 °C por 15 minutos e colocar imediatamente no gelo;
- No primeiro tubo faz-se uma diluição 1:1000 do DNA + adaptador;
- Colocar todo o volume de DNA + Adaptador (150 μL) para o tubo contendo o complexo oligo - contas magnéticas e incuba-se a 65 °C por 90 minutos agitando a cada 10 minutos;
- Retirar a solução com o auxílio do separador de contas magnéticas e transfere-se para o segundo tubo;
- Lavar duas vezes por 5 minutos com 400 μL de SSC 2 X + SDS 0,1 % (Anexo

- 2) Colocar as soluções no terceiro e quarto tubo respectivamente;
- Lavar uma vez com 400 μL de SSC 2 X + SDS 0,1 % (Anexo 2) por 15 minutos a 65 $^{\circ}\text{C}$. Colocar a solução no quinto tubo;
 - Lavar 400 μL de SSC 2 X (Anexo 2) e colocar a solução no sexto tubo;
 - Resuspender as contas ligadas a biblioteca genômica enriquecida em 200 μL de água MiliQ.

2.2.6 PCR para controle do enriquecimento da Biblioteca

Uma PCR foi realizada para o controle do enriquecimento da biblioteca utilizando iniciadores complementares aos adaptadores (Anexo 1). Utilizou-se como material genético as soluções dos seis tubos e o DNA enriquecido. Cada reação consistiu de um volume final de 25,0 μL : 2 μL de DNA, 2,5 μL de Tampão 10X (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2), 2,5 μL de iniciador Adaptador TSP 509 I (10 μM), 2,5 μL de dNTP (2,5mM), 0,2 μL de Taq (5U / μL) e 15,3 μL de água Miliq. O programa da PCR consistiu de 95 $^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos, 20 ciclos de 94 $^{\circ}\text{C}$ por 45 seg, 56 $^{\circ}\text{C}$ por 45 seg e 72 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos, e extensão final de 72 $^{\circ}\text{C}$ por 7 minutos.

A PCR purificada foi quantificada e visualizada em luz UV após a eletroforese em gel de agarose a 2%, comparando-se com o marcador $\Phi 174$. O produto da reação com DNA diluído e com DNA enriquecido foram positivas, e os produtos das lavagens foram negativos (Figura 8).

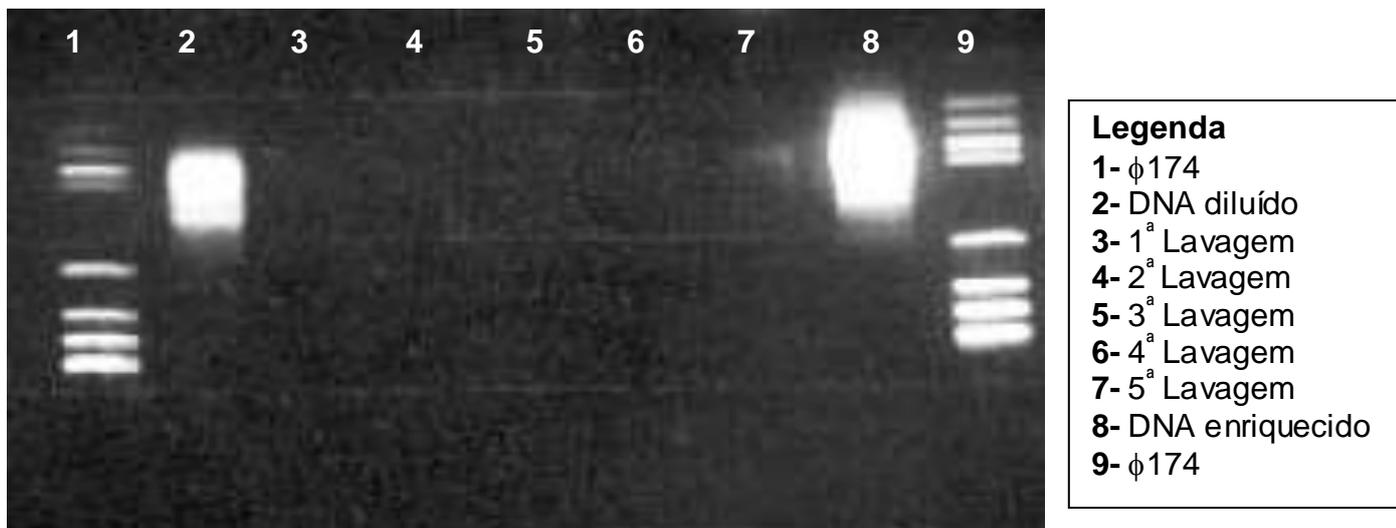


Figura 8 - Análise eletroforética em gel de agarose 2 % de produtos da PCR das lavagens, do DNA diluído e do DNA enriquecido.

2.2.7 Southern Transfer

Foi realizado um *Southern Transfer* dos produtos das PCRs contidos no gel para uma membrana (*Hybond-N*, *Amershan Pharmacia*), com as seguintes etapas:

- Adicionar o gel em 200 mL de solução desnaturante (Anexo 2) por 30 minutos a temperatura ambiente;
- Lavar o gel em água destilada;
- Colocar o gel em 200 mL de solução neutralizante (Anexo 2) por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente.

A montagem do material para *Southern transfer* se realizou da seguinte forma:

- Colocar 500 mL de SSC 10 X (Anexo 2) em uma bandeja, com uma placa de vidro atravessando transversalmente;
- Cobrir a placa de vidro com papel de filtro *Whatman* 3 mm e as extremidades do papel em contato com a solução SSC 10 X (Anexo 2);
- Colocar o gel sobre o papel, e sobre o gel uma membrana (*Hybond – N*, *Amershan Pharmacia*) do mesmo tamanho deste (molde). A membrana deve ter uma identificação da posição das amostras;
- Sobre a membrana colocar os moldes de papel de filtro *Whatman* 3 mm e

papel filtro, respectivamente;

- Colocar outra placa de vidro em cima dos moldes de papel e um peso de 500 g;
- Deixar por 12 h.
- Colocar a membrana em 200 mL de solução SSC 2 X (Anexo 2) por 10 minutos sob agitação.
- Secar a membrana por 2 horas
- Fixar o DNA as membranas através de luz Ultra Violeta (*crosslinker*);

2.2.8 Hibridização da Membrana com a Sonda AG/TC

Após a lavagem da membrana ocorreu a hibridização do DNA contido na membrana aos oligos e a marcação com CSPD (*Boehring Mannheim*) seguindo as etapas:

O protocolo consiste das seguintes etapas:

- Colocar a membrana com o DNA voltado para a porção interior no frasco de hibridização, contendo 50 mL de solução de pré-hibridização (Anexo 2) por 3 horas a 65⁰C;
- Retirar a solução de pré-hibridização e coloca-se 50 mL da solução de hibridização (Anexo 2) por 12 horas a 65⁰C;
- Lavar duas vezes por 5 minutos com 25 mL SSC 2X + SDS 0,1 % (Anexo 2) sob agitação a temperatura ambiente;
- Lavar duas vezes por 15 minutos em 25 mL SSC 0,1 + SDS 0,1 % (Anexo 2) pré-aquecida a 65 °C e incubar a 65 °C sob agitação;
- Lavar por 5 minutos com 25 mL tampão de lavagem (Anexo 2) sob agitação a temperatura ambiente;
- Incubar por 30 minutos em 25 mL do tampão bloqueador (Anexo 2) sob agitação a temperatura ambiente;
- Incubar a membrana por 30 minutos em 25 mL de solução anticorpo (Anexo 2) sob agitação a temperatura ambiente;
- Lavar a membrana duas vezes por 15 minutos em 25 mL de tampão de lavagem (Anexo 2) sob agitação a temperatura ambiente;

- Colocar 25 mL de tampão detector (Anexo 2) por 5 minutos sob agitação a temperatura ambiente;
- Colocar 1 mL da solução de CSPD (Anexo 2) em cima da membrana e com o auxílio de uma pipeta distribuir a solução uniformemente sobre a membrana;
- Colocar um plástico dos dois lados da membrana como uma forma, evitar as bolhas, incubar a membrana por 5 minutos a 37 °C;
- Em uma câmara escura colocar a membrana com um filme no seu formato em uma caixa de auto - radiografia de raio X por 4 h a 37 °C;
- Em uma câmara escura, retirar apenas o filme e colocar na solução reveladora Kodak por 1 minutos ou até aparecer a banda;
- Enxaguar com água;
- Colocar na solução fixadora *Kodak* por 1 minutos;
- Enxaguar com água;
- Deixar secar.

O objetivo desta fase foi a verificação do produto enriquecido.

2.2.9 Amplificação do DNA da Biblioteca Enriquecida

Para a amplificação do DNA através da PCR utilizou como material genético o DNA enriquecido, do qual foram realizadas 32 reações. A reação de PCR e o programa foram os mesmos descritos no item 2.2.6. A purificação do DNA amplificado foi realizada com *Qiaquick PCR Kit* da *QIAGEN* de acordo com as instruções do fabricante. A PCR purificada foi quantificada e visualizada em luz UV após uma eletroforese com um gel de agarose 2 % corado com brometo de etídio comparando-se com DNA já enriquecido de 100 ng / μ L.

2.3 CLONAGEM DO INSERTO

2.3.1 Ligação do DNA ao Vetor PGMET

A reação de ligação do DNA enriquecido ao vetor pGMET (*Promega*

pGMET Vector Easy System I) consistiu de volume final de 10 μL : 2 μL de DNA (200 ng / μL), 5 μL de Tampão 2X T₄DNA ligase, 1 μL de T₄DNA ligase (3U/ μL), 1 μL de Vetor pGEMT (50 ng / μL). Incubou-se por 12 h a 4^oC.

2.3.2 Transformação do Vetor + DNA com a Bactéria

A transformação foi realizada pelo método de eletroporação que consistiu das seguintes etapas: em um microtubo colocou-se 2 μL da ligação e 2 μL de água MiliQ, adicionou-se 50 μL de células competentes (células de *E. coli* XL1-Blue armazenadas a -80^oC). Em uma cuveta (0,1cm) do eletroporador colocou-se os 54 μL da reação e eletroporou-se a 1,8 V e logo em seguida adicionou-se 950 μL do meio SOC (Anexo 2), transferiu-se as células eletroporadas para um microtubo e incubou-se por 1,5 horas a 37^oC sob agitação e armazenou-se a 4^oC.

150 μL da cultura de células transformadas foram inoculados em placas de 50 ml de meio LB com ampicilina com XGAL(1600 mg) e IPTG (8 M) e incubado a 37^oC por 12 h.

A seleção direta usando o gene da β -galactosidase diferenciou os clones. Os clones não recombinantes possuem este gene e produzem uma enzima que cliva o x-gal produzindo azul de índigo, os recombinantes não possuem o gene, portanto, permanecem de cor bege (Figura 9).

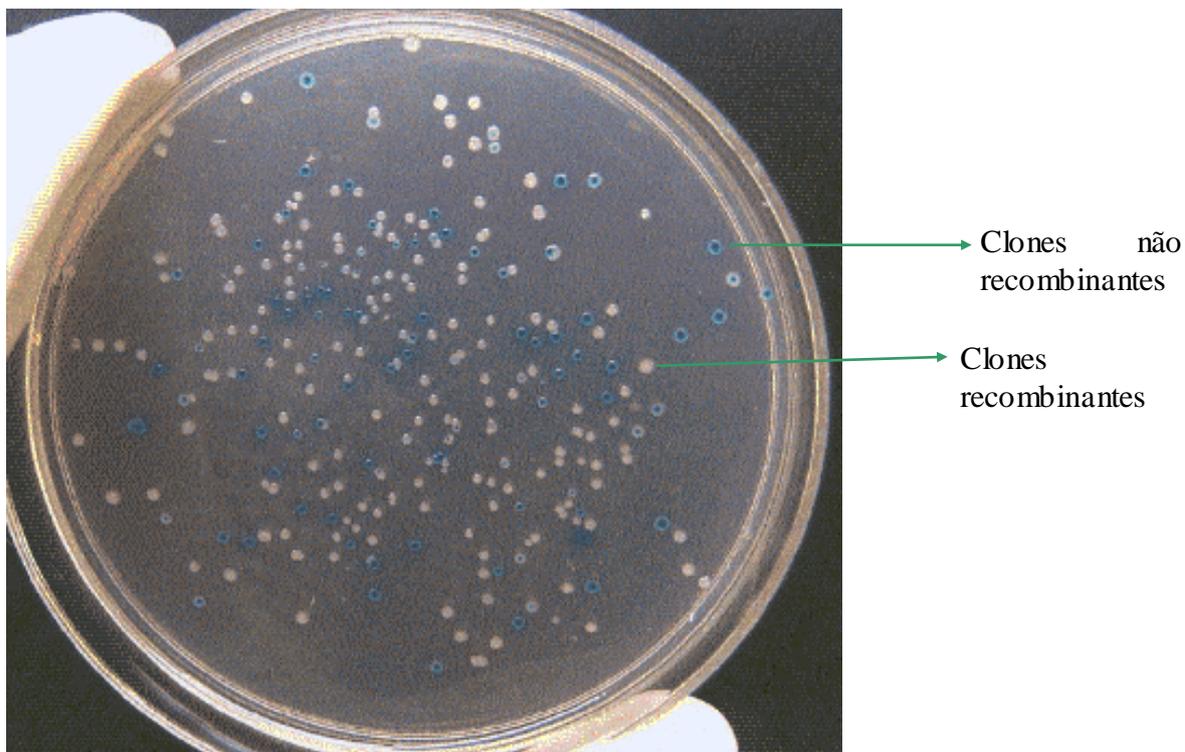


Figura 9 - Placa de Meio LB contendo clones recombinantes e clones não recombinantes através da seleção direta usando o gene da β -galactosidase (Fonte Projeto Genoma Guaraná).

2.3.3 Seleção de Clones Positivos

Nesta etapa utilizou-se 2 placas com meio LB com ampicilina (100 μ g / ml). Uma com um molde de papel contendo 120 quadrados foi colado pelo lado de fora da placa, e a outra placa continha uma membrana de nitrocelulose (igual ao molde) (*Hybond – N, Amershan Pharmacia*) sobre o meio.

Para cada colônia repicou-se no mesmo quadrado para cada placa com palitos de dente autoclavados. Inoculou-se as placas a 37 °C por 12 h.

As membranas (*Hybond – N, Amershan Pharmacia*) foram submetidas a seguintes etapas:

- Colocar a membrana em 25 mL de solução desnaturante (Anexo 2) por 5 minutos sob agitação;

- Colocar a membrana em 25 mL de solução neutralizante (Anexo 2) por 5 minutos sob agitação;
- Colocar a membrana em 25 mL de solução SSC 2X (Anexo 2) por 5 minutos sob agitação;
- Secar a membrana sobre o papel *whatman 3M* por 30 minutos;
- Adicionar o controle positivo (1 μ L do PCR com SSR) no canto esquerdo da membrana
- Fixar o DNA as membranas através de luz Ultra Violeta (*crosslinker*);
- Colocar a membrana em 25 mL de solução de lavagem (Anexo 2) por 30 minutos sob agitação;
- Com luvas novas, passar o dedo sobre as colonias na membrana retirando o excesso;
- Colocar a membrana em 25 mL de solução de lavagem (Anexo 2) por 10 minutos sob agitação;
- Deixar a membrana secar sobre o papel *whatman 3M*.

A membrana foi exposta à hibridização e coloração CSPD (*Boehringer Mannheim*) de acordo com os protocolos de Pre-Hibridização, Hibridização, Lavagem e Revelação da membrana descritas no item 2.2.8. No filme da Kodak com a membrana revelada foram identificados visualmente os clones positivos (escuros), que continham repetições AG/TC e os clones negativos (sem coloração) que não hibridizaram com a sonda AG/TC (Figura 9).

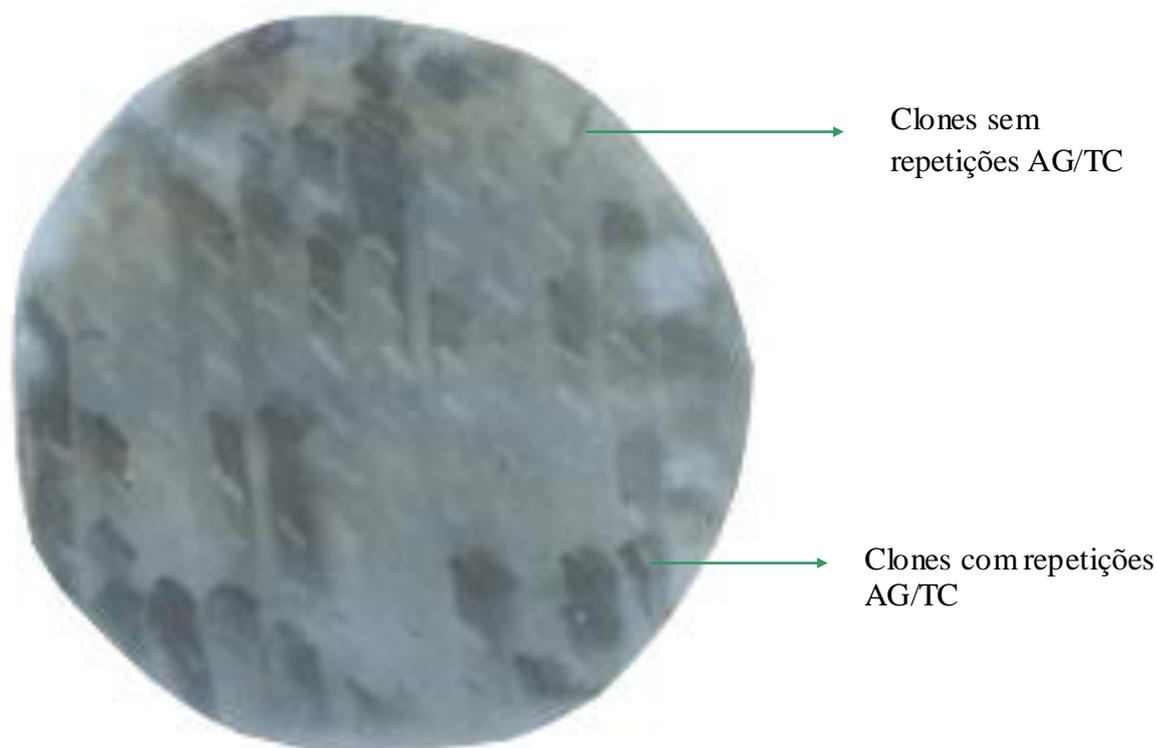


Figura 10 - Seleção por hibridação de colônia. Imagem autorradiográfica obtida de um experimento de hibridização com oligonucleotídeos AG/TC com coloração por CSPD. Os clones escuros são os positivos.

2.4 PCR DOS CLONES POSITIVOS

Os clones positivos identificados pela hibridização foram pescados com ponteiros e diluídos em 100 μ L de água em microtubos de 1,5 mL. Esta diluição foi utilizada como amostra na reação de PCR utilizando um par de iniciadores M13, complementares às seqüências dos vetores.

A reação de PCR consistiu de 50 μ L dos seguintes componentes: 8,0 μ L de DNA, 5 μ L de Tampão 10X (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$), 1,75 μ L de iniciador M13 (10 μ M), 7 μ L de dNTP (2,5 mM), 0,26 μ L de Taq (5 U / μ L), 26,85 μ L de H_2O . O programa da PCR consistiu de 95 $^{\circ}C$ por 5 minutos, 20 ciclos de 94 $^{\circ}C$ por 1 minuto, 58 $^{\circ}C$ por 1 minuto e 72 $^{\circ}C$ por 1 minuto, seguido da extensão final de 72 $^{\circ}C$ por 7 minutos. O produto da amplificação foi purificado

através do protocolo de acetato de amônia e etanol que consistiu das etapas:

- Em um tubo colocar 90 μL da PCR e acrescentar 9 μL (10%) de NaOAc 3M pH 4.8 e 200 μL de Etanol 100%.
- Deixar 30 minutos a -20°C e centrifugar por 30 minutos a 10,000 rpm.
- Descartar o sobrenadante e acrescentar 250 μL de Etanol 70%.
- Descartar o sobrenadante e deixar secar.
- Ressuspender em 10 μL de H_2O MiliQ.

As PCRs purificadas foram quantificadas e visualizadas em luz UV após uma eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio comparando-se com o marcador α Hind III (100 ng / μL) (Figura 11).

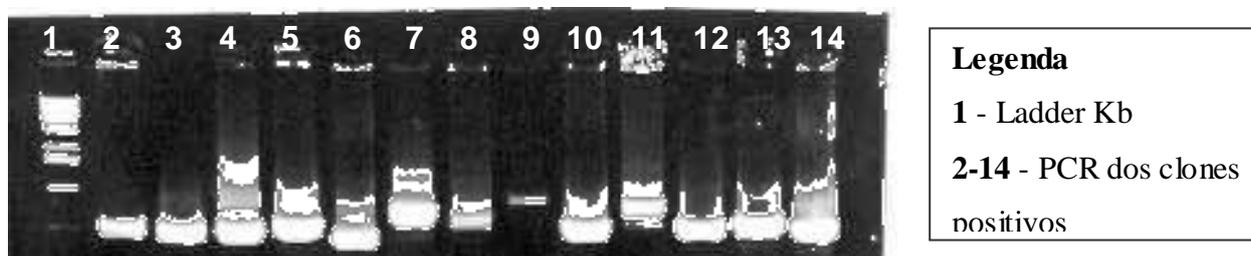


Figura 11 - Análise eletroforética em gel de agarose 2 % de produtos da PCR dos clones positivos.

2.5 SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES POSITIVOS E DESENHO DOS INICIADORES

O produto da amplificação do fragmento do plasmídio foi seqüenciado com a amplificação do fragmento M13. A reação de sequenciamento e a precipitação com acetato e etanol foi realizado conforme instruções do fabricante, com marcação fluorescente com “dye-terminador” (*Amersham*), e

94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, temperatura de hibridização por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e 72 °C por 7 minutos. A primeira reação de amplificação com cada iniciador foi com a temperatura de hibridização de 56 °C, e para as amplificações que se apresentaram inespecíficas foram realizadas novas PCRs com temperatura de hibridização aumentada a fim de melhorar a especificidade do iniciador. Por outro lado, os iniciadores que não produziram amplificação ou resultaram em bandas fracas a 56 °C, tiveram esta temperatura diminuída até a obtenção de bandas com boa resolução.

Os SSRs foram otimizados, adequando-se as temperaturas de hibridização das reações de PCR para cada loco, os amplificados foram observados em gel de agarose 3,5 %, corados com brometo de etídio e visualizados em luz UV (Figura 13).

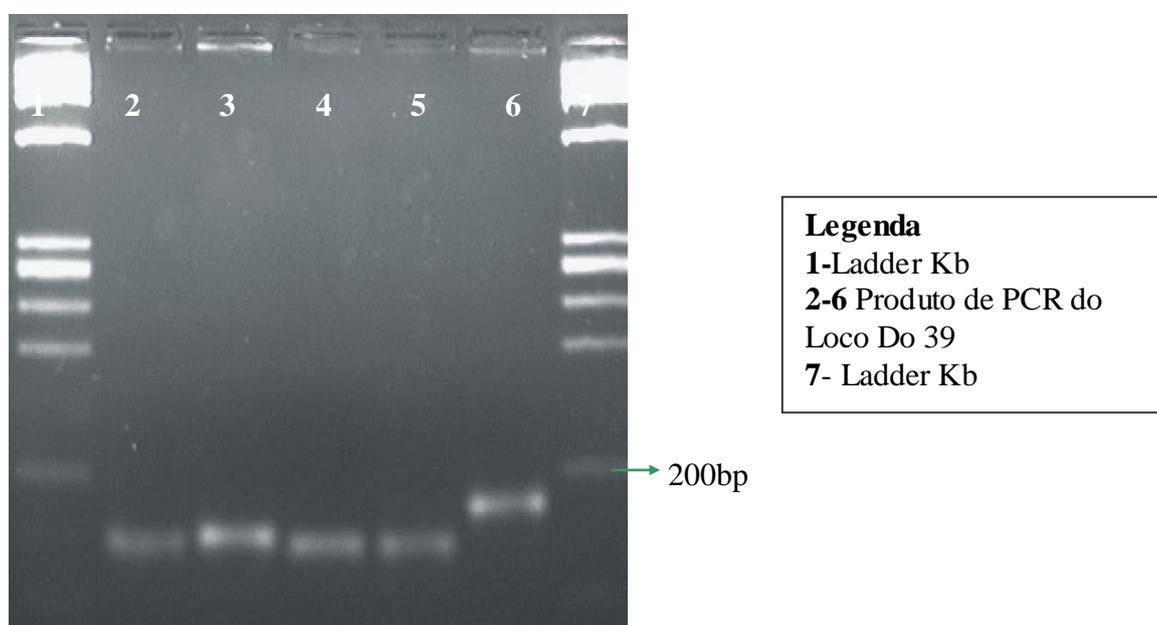


Figura 13 - Análise eletroforética em gel de agarose de produtos da PCR do loco Do39 mostrando a diferença na disposição das bandas em relação ao Ladder Kb.

2.7 ANÁLISE DE POLIMORFISMO

Após a otimização dos microssatélites, o polimorfismo dos locos SSRs positivos foi analisado utilizando-se 12 indivíduos. A reação da PCR e o programa foram os mesmos descritos no item 2.6.

A eletroforese foi realizada em gel desnaturante de poli-acrilamida de alta resolução corados com nitrato de prata de acordo com Bassam *et al.* (1999). Durante a montagem das placas de vidro são colocados 1 mL de *Bind Silane* (placa pequena) e 1 mL de *Repel* (placa grande) e retira-se o excesso com papel. No preparo do gel utiliza-se 40 mL de acrilamida 4 % + 267 µL de APS 10%. O gel polimeriza em duas horas.

Foram aplicados 5 µL de PCR e tampão formamida em cada poço, e a cada 24 amostras aplicou-se 4 µL do marcador 10 pb *Ladder*. A eletroforese durou 30 minutos a 45 W, 2000 V e 100 mA.

O procedimento de coloração consistiu das seguintes etapas:

- Colocar a placa grande por 10 minutos na solução de fixação na capela sob agitação;
- Lavar em 1000 mL de água deionizada por 1 minutos sob agitação;
- Colocar em 1000 mL solução de oxidação (Anexo 10) por 3 minutos sob agitação;
- Colocar na solução de nitrato de prata (Anexo 10) no escuro por 20 minutos;
- Lavar em 1000 mL de água deionizada por 30 seg sob agitação;
- Lavar em 1000 mL de água deionizada por 30 seg sob agitação;
- Colocar em 250 mL de solução de revelação (Anexo 10) sob agitação até a solução escurecer;
- Colocar em 750 mL de solução de revelação (Anexo 10) sob agitação por 4 a 7 minutos até a visualização das bandas;
- Colocar em 1000 mL de solução de ácido acético 5 % 10⁰C por 5 minutos;
- Lavar em 1000 mL de água deionizada por 1 minuto sob agitação;
- Deixar secar em temperatura ambiente.

A placa foi escaneada e em seguida foi realizada a identificação do

polimorfismo dos alelos com base na disposição dos fragmentos em relação a um marcador (*ladder* 10pb) (Figura 14).

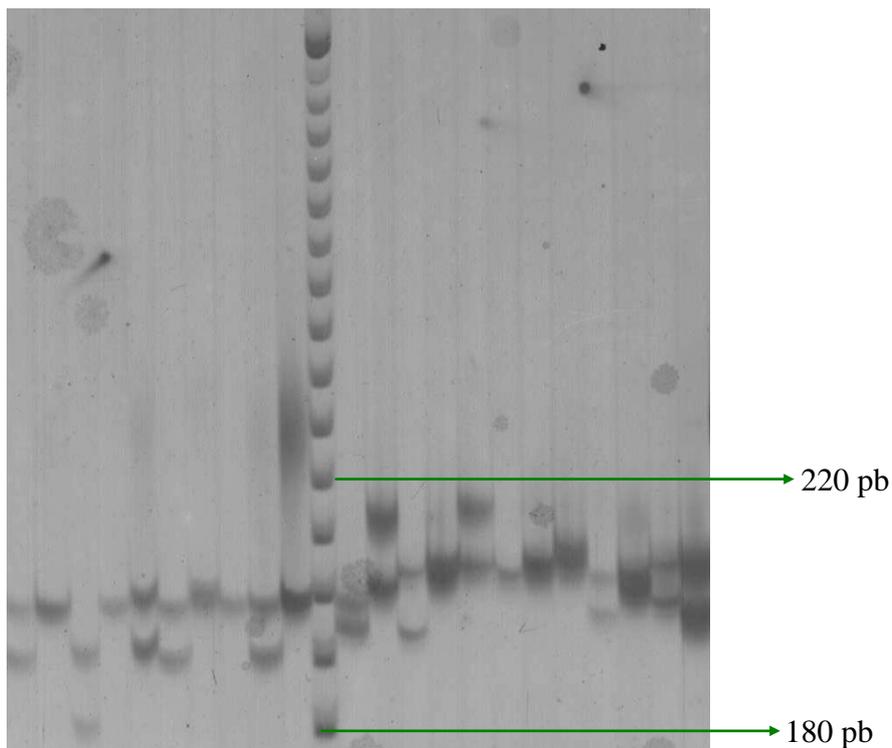


Figura 14 - Gel de poliacrilamida com coloração de nitrato de prata mostrando a disposição das bandas do produto da PCR dos locos Do31 e Do39 em relação a 10 pb Ladder, onde os produtos variaram de 180pb a 220pb.

2.8 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados dos fragmentos em pares de base (pb) foram “escoreados”. As estimativas de frequências alélicas para cada loco foram obtidas diretamente dos genótipos observados para cada indivíduo. A Heterozigosidade Esperada (H_e), a Heterozigosidade Observada (H_o), o índice de Fixação (F) foram estimados utilizando o programa GDA – *Genetic Data Analysis* versão 1.0 (Lewis & Zaykin, 1997) e o desequilíbrio de ligação utilizando o programa GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset, 1995).

3. RESULTADOS

3.1 BIBLIOTECA GENÔMICA ENRIQUECIDA

A digestão do DNA com diferentes enzimas de restrição revelou que Tsp 509 I foi a enzima que gerou o perfil mais adequado de fragmentos para as espécies *B. guianensis*, *D. odorata* e *J. copaia*, permitindo isolar os fragmentos com tamanhos entre 200-800 pb.

Na Tabela 1 encontra-se a percentagem média de clones positivos verificada em placas contendo 120 clones cada uma, o número total de clones positivos obtidos em todas as placas e o número de clones seqüenciados a partir dos clones positivos.

A eficiência do processo de enriquecimento da biblioteca para poli AG/TC foi verificada na hibridização dos clones com a sonda AG / TC, onde a percentagem de clones positivos contendo microssatélites foi de 19,8 % a 43,2 % (Tabela 1).

Tabela 1: Eficiência do enriquecimento na hibridização dos clones

Espécie	% Clones positivos por placa	Número total de clones positivos	Clones seqüenciados
<i>B.guianensis</i>	43,2	389	266
<i>D.odorata</i>	29,76	476	243
<i>J.copaia</i>	19,8	239	198

As características dos clones seqüenciados encontram-se na tabela 02. A maioria continha seqüências repetitivas, predominantemente AG e CT (a qual foi realizada a biblioteca). Os clones seqüenciados que não apresentavam microssatélites incluíram seqüências que não apresentavam nenhuma repetição

ou que apresentaram baixa qualidade de definição visual da repetição.

Entre as seqüências que continham microssatélites, 14 %, 18 % e 14 % para *B. guianensis*, *D. odorata* e *J.copaia* respectivamente obtiveram desenhos de iniciadores flanqueadores através do programa *Primer 3* (Tabela 2). As seqüências remanescentes não atenderam as condições necessárias para o desenho dos iniciadores, por apresentarem uma ou mais das características seguintes: redundância; ausência de seqüência ao lado das repetições por conter a seqüência do adaptador próxima a repetição ou pela baixa qualidade da seqüência depois da repetição; seqüências com repetições imperfeitas e/ou curtas; percentagem de GC abaixo de 40 % nas regiões flanqueadoras; ausência de região conservativa na região flanqueadora.

Tabela 2: Características dos Clones seqüenciados para cada espécie.

Espécie	Nº. de Clones Sequenciados			Nº. de iniciadores desenhados
	Com presença de SSR	Com ausência de SSR	Total	
<i>B.guianensis</i>	218	48	266	39
<i>D.odorata</i>	205	38	243	42
<i>J.copaia</i>	140	58	198	28

3.2 TRIAGEM DE PARES DE INICIADORES

Dentre os pares de iniciadores testados, cerca de 87 %, 62 % e 86 % para *B.guianensis*, *D.odorata* e *J.copaia*, respectivamente, geraram produtos de PCR visualizados em gel de agarose 3,5 % corado com brometo de etídio (Tabela 3).

A análise do polimorfismo de cada loco em géis desnaturantes de poli-acrilamida e detecção com nitrato de prata proporcionou a caracterização dos locos polimórficos amplificados pelos iniciadores, a percentagem da eficiência foi

calculada sobre o número de locos amplificados (Tabela 3).

Tabela 3: Características dos iniciadores sintetizados

Espécie	Iniciadores sintetizados	Locos amplificados e visualizados em gel de agarose 3,5%.	Locos polimórficos em gel desnaturante corado com prata
<i>B.guianensis</i>	39	34 (87,1 %)	12 (30 %)
<i>D.odorata</i>	42	26 (61,9 %)	16 (38 %)
<i>J.copaia</i>	28	24 (86 %)	14 (50 %)

As seqüências de fragmentos polimórficos de *B. guianensis* amplificados pelos iniciadores foram caracterizadas como seqüências simples repetitivas AG/TC que variaram de 14 a 24 elementos dinucleotídeos, com exceção dos locos Bg34 e Bg35 que continham seqüências interrompidas. Os locos Bg14 e Bg21 apresentaram microssatélites compostos, com repetições dinucleotídicas e tetranucleotídicas no mesmo fragmento (Tabela 4).

A otimização da temperatura de hibridização ocorreu entre 54 °C para alguns locos que não amplificaram em temperaturas mais altas e 58 °C para locos que amplificavam bandas secundárias (Tabela 4). A otimização permitiu gerar bandas robustas e de clara interpretação.

O número de alelos observado para cada loco variou de dois a cinco com média de 3,9 alelos por loco (Tabela 4). Os valores de heterozigosidade esperada e heterozigosidade observada obtiveram uma média de 0,548 e 0,563, respectivamente. Apesar de não ter valores negativos para o índice de fixação F para todos os locos, o valor médio foi negativo com valor próximo a zero, igual a -0,006, porém, com probabilidade de 0,526 (52,6%) com 500 replicas. Os locos Bg16, Bg22 e Bg32 apresentaram-se geneticamente ligados no teste de desequilíbrio de ligação.

Tabela 4: Características dos fragmentos polimorficos amplificados por iniciadores de *Bagassa guianensis*: nome do loco SSR, seqüência dos iniciadores Direto (F) e Reverso (R), elemento repetido, temperatura de hibridização (Th), número de alelos por loco (A), número de indivíduos amplificados (N), amplitude do produto de PCR em pares de base, Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He) e índice de Fixação (F).

Iniciador	Seqüência	Elemento repetido	Th	A	N	Produto de PCR (pb)	Ho	He	F
Bg 13	F 5'ACACACATgCATgCTCCTTT3' R 5'CggATATTCCCACACTCAC3'	(GA) ₁₄	54 °C	5	12	166-192	1,000	0,747	-0,340
Bg 14	F 5'CCATCgTTTAACgCATTCCCT3' R 5'TgCTgTCgTTggTATTgAgC3'	(CCCT) ₂ (CT) ₁₅	58 °C	4	12	181-145	0,583	0,622	0,061
Bg 16	F 5'CAAgCTCCTCTCAAgtATgTTCg3' R 5'CCAgACCCgATATATATTCATgC3'	(CT) ₁₈	58 °C	5	12	103-119	0,417	0,587	0,290
Bg 21	F 5'CagTgTgTggAAgCTgCTgT3' R 5'CCATCgTTTAACgCATTCCCT3'	(GA) ₂₂ (GGGA) ₂	58 °C	2	12	167-189	0,583	0,497	-0,175
Bg 22	F 5' TCgATCCTTCTggTTCTTCTTC3' R 5'gCgTATCATCgATACCAgCA3'	(CT) ₂₀	58 °C	4	12	129-141	0,417	0,490	0,149
Bg 25	F 5'TCATTTAAACTgCCgggTTg3' R 5'CgATgAAAgTgAAgCCCTAgA3'	(CT) ₁₇	58 °C	4	12	155-179	0,750	0,566	-0,325
Bg 28	F 5'CAAgCgTCAAgAAgAACTgg3' R 5'gACgCgAAAACCTCAgACACA3'	(GA) ₁₅	58 °C	4	12	160-184	0,250	0,358	0,301
Bg 32	F 5'TCgTCCTCTTCTgCTCTTCC3' R 5'CATgCgTATCTTCgTTAACAgC3'	(CT) ₁₄	58 °C	4	12	110-128	0,417	0,490	0,149
Bg 33	F 5'TCTCACgCCAATCCCAAC3' R 5'CATAAATggCgAgTTCTAgAgAgA3'	(CT) ₂₄	56 °C	4	12	151-201	0,250	0,451	0,446
Bg 34	F 5'CgAgCTgTTAACCCATCAAAA3' R 5'ggCCAgACATgACAAACCTT3'	(CT) ₂₁	56 °C	4	12	136-158	0,583	0,691	0,156
Bg 35	F 5'TTgggAAAgCgAAgAAAAG3' R 5'ACgAAgTCTCTgCgAATgCT3'	(GA) ₁₇	56 °C	3	12	160-176	0,917	0,538	-0,703
Bg 39	F 5' gAgCAgAAACCAAgCTCgTA3' R 5'TCTCTATTgTgTgCgTgATg3'	(CT) ₁₆	58 °C	4	12	143-155	0,583	0,538	-0,084
Média				3,9			0,563	0,548	-0,006

Na Tabela 5 encontram-se as características dos fragmentos polimorficos dos iniciadores de *D. odorata*. As seqüências dos locos continham seqüências simples repetitivas AG/TC que variaram de 9 a 18 elementos dinucleotideos repetidos perfeitos com exceção do loco 19 que apresentou um microssatélite interrompido por uma base timina. O loco Do06 apresentou uma repetição composta da repetição dinucleotidica GT seguida da repetição dinucleotidica GA. O loco 17 apresentou 2 regiões de repetições CT no mesmo fragmento.

A otimização da temperatura de hibridização ocorreu entre 54 °C para alguns locos que não amplificaram em temperaturas mais altas e 58 °C para locos que amplificaram bandas secundarias (Tabela 5). A otimização permitiu gerar bandas robusta e de clara interpretação. Para a otimização dos locos Do05, Do08 e Do18 foram submetidos a diferentes condições para a obtenção de locos interpretáveis, no entanto, foi observado que estes locos apresentaram ploidismo desconhecido, conseqüentemente, analisamos apenas as duas bandas mais fortes destes alelos, interpretando-os como diplóides.

O número médio de alelos foi de 6,44 per loco com valores de heterozigosidade observada variando de 0,250 a 1,000, média de 0,736, enquanto os valores de heterozigosidade esperada estavam acima de 60% com exceção de dois locos, com média de 0,686. O valor da média do índice de F apresentou-se positivo (0,068) com probabilidade de 0,938 (93 %) com 500 replicas. Os locos não apresentaram-se geneticamente ligados no teste de desequilíbrio de ligação.

Tabela 5 - Características dos fragmentos polimorficos amplificados por iniciadores de *Dipteryx odorata*: nome do loco SSR, seqüência dos iniciadores Direto (F) e Reverso (R), elemento repetido, temperatura de hibridização (Th), número de alelos por loco (A), número de indivíduos amplificados (N), amplitude do produto de PCR em pares de base, Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He) e Índice de Fixação (F).

Iniciador	Seqüência	Elemento repetido	Th	A	N	Produto PCR (pb)	Ho	He	F
Do 03	F 5'AATTAgCCCAgTCCATAACA3' R 5'TgAgCTTCCAgAgCATgAgA3'	(CT) ₁₃	56 °C	8	11	182-224	0,727	0,752	0,033
Do 05	F 5'AggggAggCCAAgAAgTAAgC3' R 5'AAggTTTgAAgTTgAAgCTTgg3'	(GA) ₁₈	56 °C	7	11	198-232	0,909	0,806	-0,128
Do 06	F 5'AgCggTgAAAAgACCATAgC3' R 5'CCAACgATAAgATTCCTCCA3'	(GT) ₉ (GA) ₁₄	54 °C	5	12	158-204	1,000	0,747	-0,340
Do 08	F 5'AgATCAgCggACAAAgTCT3' R 5'gTAAgTTgTgCCACTCTTg3'	(GA) ₁₄	54 °C	8	11	177-205	0,909	0,822	-0,106
Do 17	F 5'gTTgCTgTCggTTCTCCATA3' R 5'CCAAGgACgCTgTgCTCTAC3'	(GA) ₁₈₋₁₁	56 °C	6	12	165-187	0,250	0,722	0,654
Do 18	F 5'gCTCTCTCCCCCTTTgTCTC3' R 5'gTTggCAGtGAAggTggTg3'	(CT) ₁₂	58 °C	9	11	88-122	0,727	0,855	0,150
Do 19	F 5'gCgTCTCTTCCATTgTTTg3' R 5'TCCgTAGAgCCACACAgAgA3'	(CTiCT) ₁₅	58 °C	9	12	109-141	0,750	0,816	0,081
Do 20	F 5'gCCCACTAAgCgCATTA TT3' R 5'AgTggAAgggTggATTgA Tg3'	(CT) ₁₇	58 °C	7	12	175-207	1,000	0,833	-0,200
Do 22	F 5'ggAgACCAAggggagAgAAgg3' R 5'ACgAgAgACACgTgggTgTT3'	(GA) ₁₄	54 °C	5	12	138-168	0,500	0,472	-0,059
Do 24	F 5'AACgCAggATCTAgCCAAAA3' R 5'CTTCTCgCTgTTgTgCACTC3'	(GA) ₁₄	58 °C	6	10	183-201	0,800	0,745	-0,074
Do 25	F 5'AAATgCAAAACggAAgAggA3' R 5'CCCCTgAAggAgACTTCgAT3'	(GA) ₉	56 °C	6	11	195-223	1,000	0,814	-0,228
Do 26	F 5'ACATTCTgCTgCACCTggTA3' R 5'ggCTgAgATCgAAggCTgTA3'	(GA) ₁₃	56 °C	7	12	126-168	0,583	0,778	0,250
Do 27	F 5'CAAAGgCCACACAgAgAgA3' R 5'CACgCACACCAACTgTAACC3'	(GA) ₁₂	58 °C	6	12	203-237	0,500	0,806	0,379
Do 31	F 5'CAACA TgCgATCCTTCCTTT3' R 5'gAgAgAAAgAgAgggggTTCA3'	(CT) ₁₄	54 °C	3	12	198-218	0,417	0,392	-0,062
Do 35	F 5'CAACCAAAGCAAACAAAgCA3' R 5'gCTgAgAAAggggAA TgCAG3'	(CT) ₁₆	54 °C	5	11	208-230	0,364	0,649	0,439
Do 39	F 5'ggA TgCCTgAA TgAA TggAC3' R 5'ggggCTTAAAgCgAgTTgT3'	(CT) ₁₈	58 °C	6	11	192-218	0,545	0,769	0,290
Média				6,44			0,686	0,736	0,068

Os locos de pares de iniciadores para *Jacaranda copaia* apresentaram repetições perfeitas simples dinucleotídicas de CT ou AG que variaram de 10 a 26, com exceção do loco Jc08 e Jc27 que apresentaram microssatélites compostos, o loco Jc08 com repetição tetranucleotídica de GAGT seguida da repetição dinucleotídica GA, o loco Jc27 com repetição hexanucleotídica de CCCTCT seguida da repetição dinucleotídica CT; e o loco 18 apresentou um microssatélite interrompido por uma base de guanina (Tabela 6).

A otimização da temperatura de hibridização ocorreu entre 58 e 62 °C para os locos que apresentaram grande especificidade no genoma do parará (Tabela 6). A otimização permitiu gerar bandas robusta e de clara interpretação.

O número de alelos observados para cada loco variou de 02 a 13 com média de 7,14 alelos per loco. Os valores de heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada foram altos com uma média de 0,629 e 0,744 (Tabela 6). Os locos Jc04 e Jc28 foram excluídas da análise de índice de fixação devido a ausência de informação para alguns indivíduos, apresentando valor médio de $F = 0,165$ com probabilidade significativa de 1,000 com 500 replicas, apresentando-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os outros locos. Os locos não apresentaram-se geneticamente ligados no teste de desequilíbrio de ligação.

Tabela 6: Características dos fragmentos polimorficos amplificados por iniciadores de *Jacaranda copaia* : nome do loco SSR, seqüência dos iniciadores Direto (F) e Reverso (R), elemento repetido, temperatura de hibridização (Th), número de alelos por loco (A), número de indivíduos amplificados (N) , amplitude do produto de PCR em pares de base, Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He) e índice de Fixação (F).

Iniciador	Seqüência	Elemento repetido	Th	A	N	Produto de PCR (pb)	Ho	He	F
Jc 03	F 5'CCATTTggCAgCAgAgATATgA3' R 5'AgCAgAAAgATgTCCAAGCTg3'	(GA) ₁₁	58 °C	6	12	213-237	0,417	0,743	0,439
Jc 04	F 5'gCTATTgCCgAAAgTgCTTC3' R 5'gTgCATgAAgAAggCAA3'	(CT) ₁₀	58 °C	2	7	170-178	0,286	0,490	0,417
Jc 05	F 5'TTCCCAAAGCTTCCAATCAC3' R 5'CCTCAAAATACAAGCTAgAATAAAATg3'	(CT) ₁₆	58 °C	7	10	230-264	0,600	0,730	
Jc 08	F 5'CATTTggCAgCACAgATATgA3' R 5'AgATgACCAAgCTgAgTCCAA3'	(GAGT) ₇ (GA) ₁₇	58 °C	7	12	210-232	0,417	0,760	0,452
Jc 09	F 5'TTAgAAgACCAAgAAAATgAgCA3' R 5'AAATCCACCATCCgACCAT3'	(GA) ₁₀	58 °C	4	12	179-197	0,500	0,521	0,040
Jc 10	F 5'gAggggTTgACgCAgATTT3' R 5'gTggTgAgATTCTTCAA3'	(GA) ₁₅	60 °C	10	11	240-152	0,636	0,876	0,274
Jc 13	F 5'TCAAgTgTgACTATgAAAATgAgAA3' R 5'CCTTTTTAgCTgCCATgAgg3'	(GA) ₂₄	58 °C	6	12	212-192	0,583	0,580	-0,006
Jc 15	F 5'AgCATgCggACCTAgTCAAC3' R 5'TggTTCCAAGTgggTTCTCT3'	(GA) ₁₉	60 °C	8	12	162-200	0,833	0,844	0,012
Jc 18	F 5'TATggTCCAACgACAAATCg3' R 5'TTTgCAAATgACAgCACACA3'	(CTiCT) ₂₆	58 °C	6	12	215-235	0,583	0,729	0,200
Jc 21	F 5'gCTCAACAAAgACTCgTAggAA3' R 5'gAgAgAgAgAgAgaACAATAgCATTC3'	(CT) ₁₉	60 °C	6	12	140-162	0,667	0,750	0,111
Jc 22	F 5'ACCTTgAggACTCATTTTAATACTTC3' R 5'TggCACATAgggAgTTAgCA3'	(CT) ₂₇	62 °C	7	12	126-204	0,917	0,816	-0,123
Jc 23	F 5'TgCCAgAgACAggACATgg3' R 5'TgggCCCACATATATAgCATT3'	(CT) ₁₉	58 °C	13	12	151-241	0,667	0,892	0,253
Jc 27	F 5'CCTCTggAggACgAgAAgAA3' R 5'ACATACCTCTgTgTgTgTgA3'	(CCCTCT) ₅ (CT) ₁₇	58 °C	8	10	149-191	0,700	0,825	0,152
Jc 28	F 5'AAgCCCCTATTgCATCCAg3' R 5'TgTgTAGTTCTCTCTCTCTCTC3'	(GA) ₂₁	58 °C	10	10	150-206	1,000	0,865	
Média				7,14			0,629	0,744	0,165

4. DISCUSSÃO

4.1 METODOLOGIA UTILIZADA

A eficiência do procedimento utilizado para o isolamento dos iniciadores de marcadores microsatélites para estas espécies, baseado na construção de uma biblioteca enriquecida para repetições AG/TC, pode ser evidenciado na etapa de enriquecimento onde uma média de 43 %, 29 % e 17 % dos clones para *B. guianensis*, *D. odorata* e *J. copaia*, respectivamente, foram tidos como positivos na triagem por hibridização de colônia.

Destes clones, 15%, 17% e 14% para *B. guianensis*, *D. odorata* e *J. copaia*, respectivamente, forneceram seqüências a partir das quais foram desenhados os iniciadores. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos com outras espécies utilizando o mesmo protocolo, como por exemplo *Copaifera Langsdorffii* Desf.(16 %) (Ciampi, *et al.*, 2000) e *Caryocar brasiliensis* (14,4 %) (Collevatti *et al.*, 1999).

Da bateria de pares de iniciadores sintetizados 87 %, 62 %, 86 % para *B. guianensis*, *D. odorata* e *J. copaia*, respectivamente, produziram produtos amplificados. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em estudos utilizando a mesma metodologia como de Buso, *et al.*(2000) (77 %) e Ciampi, *et al.* (2000) (80 %).

Desta forma a eficiência para a obtenção de iniciadores foi calculada com o número positivo de clones, número de iniciadores desenhados e o número de iniciadores amplificados, foi de 5,6 % ($0,43 \times 0,15 \times 0,87 = 0,56$) para *B. guianensis*, 3 % ($0,29 \times 0,17 \times 0,62 = 0,3$) para *D. odorata* e 2 % ($0,198 \times 0,14 \times 0,71 = 0,2$) para *J. copaia*. Estes resultados foram mais baixos que aos obtidos

com outras espécies arbóreas tropicais, onde o mesmo protocolo foi utilizado, *Eucalyptus grandis* (8,8 %), *E. urophylla* (6,3 %) (Brondani, *et al.*, 1998) e *Copaifera Langsdorffii* Desf. (7,5 %) (Ciampi, *et al.*, 2000). A diferença dos resultados deve-se ao fato de que esta análise estimou a eficiência a partir do número de seqüências que permitia o desenho dos iniciadores, enquanto que nossa análise estimou a freqüência a partir das seqüências das quais foram desenhados os iniciadores.

A eficiência gerando iniciadores produzindo locos informativos foi de 1,9 % ($0,43 \times 0,15 \times 0,30 = 0,019$) para *B. guianensis*, 1,8 % ($0,29 \times 0,17 \times 0,38 = 0,018$) para *D. odorata* e 1,3 % ($0,198 \times 0,14 \times 0,5 = 0,013$) para *J. copaia*.

No entanto, estes resultados são significativamente superiores àqueles obtidos sem enriquecimento (0,2 % de clones hibridizaram) e/ ou com método utilizando outros tipos de enriquecimento, como o enriquecimento por colônia ou por enriquecimento por extensão de iniciadores onde Maguire (2000) encontrou baixíssimos níveis de eficiência em clones randômicos.

Os locos de *D. odorata* e *J. copaia* não apresentaram-se ligados geneticamente, produzindo informações estatísticas independentes, porém, os locos Bg16, Bg22 e Bg32 apresentaram-se ligados.

Foram desenvolvidas seqüências de iniciadores para a amplificação de doze locos para *B. guianensis*, dezesseis locos para *D. odorata*, catorze locos para *J. copaia*, informativos para cada espécie. Os locos amplificados por esses iniciadores desenvolvidos apresentaram tamanhos diferenciados, possibilitando a utilização desses iniciadores em sistemas *multiplex* de detecção por análise fluorescente em seqüenciador automático. Estes sistemas foram utilizados em

estudos como de Brandani, *et al.*(1998), Gaiotto (1999), Ciampi, *et al.* (2000) e Collevatti *et al.* (1999), que permitiram a realização rápida de análises genéticas detalhadas em nível populacional, elucidando questões de identificação individual e estudos de parentesco.

4.2 A UTILIZAÇÃO DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES NOS PLANOS DE MANEJO

De acordo com Putz *et al.* (2000) provavelmente o fator genético é o mais sensível de todos os componentes do desmatamento. A exploração madeireira pode afetar os componentes genéticos podendo alterar a estrutura genética devido uma diminuição do tamanho efetivo populacional e conseqüentemente da heterozigosidade, alterando a estrutura funcional da população devido a interferências ou interrupções do fluxo gênico, o que influencia nas taxas de cruzamento das diferentes famílias.

Existem diferentes métodos para se estudar o fluxo de genes entre e dentro de populações. Um método direto de avaliar o fluxo gênico em populações naturais é através de testes de paternidade (Gaiotto, 1999). O conhecimento do parentesco entre indivíduos de populações naturais é considerado um refinamento da análise genética populacional, através dos marcadores microsatélites (Gaiotto, 1999).

O avanço com o conhecimento do parentesco entre indivíduos é obtido no momento da estimativa de áreas de vizinhança entre os indivíduos da população. Nesse caso, torna-se possível conhecer com precisão o fluxo gênico entre e dentro de populações, e dessa forma estabelecer o tamanho da área

populacional e o número de indivíduos a ser conservado por área para que a variabilidade genética seja mantida (Gaiotto, 1999).

Os marcadores desenvolvidos neste trabalho são aptos e indicados para estudos de fluxo gênico e teste de paternidade e abrem novas perspectivas para o aprofundamento de estudos genéticos das espécies *Bagassa guianensis*, *Dipteryx odorata* e *Jacaranda copaia*, assim como para espécies próximas e representa uma ferramenta poderosa para a geração de dados genéticos populacionais fundamentais e indispensáveis na condução de programas de manejo florestal.

Diante disto, estudos mais conclusivos de populações arbóreas da Flona do Tapajós, utilizando-se os iniciadores de microssatélites obtidos neste trabalho, estão sendo desenvolvidos pelo projeto Dendrogene visando a compreensão dos possíveis impactos do manejo na diversidade genética dessas espécies madeireiras, possibilitando uma real avaliação da sustentabilidade das práticas de manejo atualmente empregadas.

Porém, as informações obtidas aqui, dentro dos limites dos objetivos deste estudo, já permitem algumas considerações sobre a diversidade genética das espécies estudadas, mesmo que o número de indivíduos genotipados tenha sido restrito.

As altas taxas de diversidade genética das três espécies estudadas concordam com outros estudos em espécies arbóreas tropicais, como por exemplo de *Euterpe edullis*, com uma média de 10,6 alelos em 18 locos ($H_e = 0,76$ em 66 indivíduos) (Gaiotto *et al.*, 2000); *Copaífera Langsdorffii* Desf., com uma média de alelos de 24,5 em 8 locos ($H_e = 0,89$ em 96 indivíduos) (Ciampi *et*

al., 2000); *Ceiba pentandra* com uma média de 14 alelos em 8 locos ($H_e = 0,80$ em 74 indivíduos) (Brondani *et al.*, 2002); *Caryocar brasiliensis* com uma média de 16 alelos em 10 locos ($H_e = 0,84$ a $0,94$ em 120 indivíduos) (Collevatti *et al.*, 1999); *Dipterocarpus tempehes* com uma média de 10,3 alelos em 10 locos ($H_e = 0,57$ a $0,88$ em 34 indivíduos) (Isagi *et al.*, 2002).

Em comparação com florestas tropicais, espécies de árvores pioneiras nas regiões temperadas possuem um baixo número de alelos e de heterozigosidade, como *Betula phatyphlla*, espécie pioneira no Japão com 2 - 8 alelos em 20 indivíduos e heterozigosidade média esperada de ($0,050 - 0,808$) (Wu, *et al.*, 2002), e *Betula maximowicziana*, espécie pioneira na zona temperada, com 2 - 5 alelos em 44 indivíduos e a heterozigosidade média esperada de $0,412$ (Ogyu, *et al.*, 2003).

De acordo com Goldblatt (1978), o gênero *Dipteryx* apresenta uma origem aloploplóide, onde seus ancestrais eram tetraplóides e seus táxons derivados são diplóides. Estudos citogenéticos de Goldblatt (1978) e Torres *et al.* (2000) registram espécies diplóides e tetraplóides no gênero, no entanto ainda não se conhece o cariótipo de *D. odorata*. O fato de *D. odorata* ter apresentado de 2 a 5 alelos por indivíduo em nossos estudos fazem-se necessários estudos mais extensivos para revelar o cariótipo de *D. odorata*, assim como, outros testes deverão ser realizados para determinar a ploidia da espécie. Uma das opções para elucidar esta questão seria a purificação de todas as bandas apresentadas pelo marcador microssatélite e o seqüenciamento destas para confirmar a presença das repetições, descartando assim a possibilidade de amplificação inespecífica. Outra opção seria um estudo de citogenética, a fim de se determinar

a ploidia desta espécie e de outras espécies do gênero.

Considerações devem ser feitas, também, em relação ao fato de que as espécies *Bagassa guianensis*, *Dipteryx odorata* e *Jacaranda copaia* representam três diferentes grupos ecológicos, devido a diferenças em seus sistemas reprodutivos, seus modos de vida, suas estratégias de regeneração natural, suas interações com os agentes polinizadores e dispersores das sementes, sua demografia, etc.

Bagassa guianensis é uma espécie dióica e de baixa densidade, assim a retirada de uma grande proporção de adultos reprodutivos da espécie pode mudar a frequência alélica. Portanto, a diminuição do tamanho efetivo populacional juntamente com a diminuição de polinizadores e de agentes de dispersão podem resultar na redução do fluxo gênico, principalmente em espécies que possuem muitas árvores maduras e poucas juvenis "pioneiras de vida longa" (Putz *et al*, 2000), como é o caso da tatajuba. Por outro lado, nas espécies dióicas é preciso ocorrer grande redução no seu tamanho efetivo populacional para que sejam modificados no fluxo gênico (Ghazoul *apud* Putz *et al.*, 2000), uma vez que não há endocruzamento.

Nossos resultados indicam que os locos de *B. guianensis* apresentaram menor diversidade alélica (média 3,92 alelos) e menor média de heterozigosidade (0,548 e 0,563) quando comparada com as outras espécies arbóreas deste estudo, porém, estudos futuros com estes locos podem indicar mais sobre sua dinâmica populacional.

Em espécies comerciais de baixa densidade e hermafrodita como é o caso de *Dipteryx*, após a exploração pode ocorrer a diminuição do tamanho efetivo

populacional, promovendo uma possível mudança alélica, uma redução de fluxo gênico e um aumento de endocruzamento nas populações (Putz *et al.*, 2000). Os locos apresentados para esta espécie apresentaram altos números de alelos por loco (média 6,44) e heterozigosidade esperada (média de 0,686), e um índice de fixação próximo de zero (0,068) indicando que estes locos estão em equilíbrio de Hardy – Weinberg com tendência a endogamia, no entanto, uma melhor amostragem populacional mostraria resultados mais significativos.

De acordo com Putz *et al.* (2000) espécies com altas densidades e regeneração avançada, dificilmente irão alterar sua estrutura genética dentro de uma floresta manejada. *J.copaia* apresenta estas características ecológicas e apresentou locos altamente polimórficos (média de 7,14 alelos / loco) e altos níveis de heterozigosidade (0,629 e 0,744) e com índice de fixação indicando um equilíbrio de heterozigotos e homozigotos. Nossos resultados são semelhantes aos de Jones & Hubbell (2003) que analisaram 110 indivíduos de *J. copaia* na Ilha do Barro Colorado, Panamá, em que mostrou altos níveis de heterozigosidade esperada (0,778) e de alelos (média de 13,5 em 10 locos).

Os futuros estudos utilizando estes marcadores para a avaliação do impacto no fluxo gênico juntamente com a análise da habilidade reprodutiva dos indivíduos da população, através do teste de paternidade, serão realizados no programa Ecogene, que irá utilizar os dados em simulações da demanda exploratória das espécies, assim, prevendo os impactos causados pelo corte. Portanto, as informações provenientes dos locos de microssatélites desenvolvidos neste trabalho, juntamente com outras informações da complexidade da floresta tropical, deverão ser respeitados nos programas de manejo. Assim como, estudos

com outras populações destas espécies ajudarão na compreensão da estrutura populacional e demográfica das espécies.

5. CONCLUSÕES

- A técnica de isolamento empregada é adequada e revela a abundância de seqüências simples repetitivas AG/TC no genoma de *Bagassa guianensis*, *Dipteryx odorata* e *Jacaranda copaia*.
- Foram isoladas seqüências de iniciadores para a amplificação de 12 locos para *B. guianensis*, 16 locos para *D. odorata* e 14 locos para *J.copaia* informativos para cada espécie.
- Os locos apresentam um alto polimorfismo, com média de alelos / loco, heterozigosidade esperada e independência de ligação entre os locos (com exceção dos locus Bg16, Bg22 e Bg32) adequados, tornando-se ferramentas úteis para análises ao nível populacional, elucidando questões de identificação individual e estudos de parentesco.
- Os marcadores moleculares desenvolvidos neste trabalho podem ser utilizados nos sistemas de avaliação da sustentabilidade nos planos de manejo, validando estudos de modelagem, tais como os contemplados no âmbito do projeto Dendrogene.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRENS, S. 1997. O manejo de recursos florestais no Brasil: Conceitos, Realidades e Perspectivas. Tópicos em Manejo Floresta Sustentável. Curso de Manejo Florestal Sustentável, Embrapa-CNPQ, Curitiba-PR.
- BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 196, p. 80-83, 1991.
- BOSHIER, C. H.; CHASE, M. R.; BAWA, K. S. 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. Gene flow, neighborhood, and population structure. **American Journal of Botany**, 82 (4):484-490.
- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R. & GATTAPAGLIA, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theor. Appl. Genet.** 97: 816-827.
- BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N. & FERREIRA, M.E. 2001. Development and mapping of *Oryza glumaepatula* - derived microsatellite markers in the interespecific cross *Oryza glumaepatula* X *O. sativa*. **Hereditas** 134: 59-71.
- BRONDANI, R.P.V.; GAIOTTO, F. A.; MISSIAGGIA, A. A.; KIRST.M.; GRIBEL, R. & GATTAPAGLIA, D. 2003. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Molecular Ecology notes**, 3, 177-179.
- BROWN, S.M.; HOPKINS, M.S.; MITCHELL, S.E.; SENIOR, M.L.; WANG, T.Y.;

- DUNCAN, R.R.; GONZALEZ-CANDELAS, F. & KRESOVICH, S. 1996. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Theoretical and Applied Genetics** 93: 190 - 198.
- BUSO, G S C; BRONDANI, R V; AMARAL, Z P de S; REIS, A M M & FERREIRA, M E. 2000. Desenvolvimento de *primers* SSR para análise genética de pimentas e pimentões (*Capsicum spp.*) utilizando biblioteca genômica enriquecida. **Boletim Técnico da EMBRAPA/EPAGI**, Brasília-DF, n.15, p. 01-27.
- BUSO, G. S. C.; AMARAL, Z. P.; BRONDANI, R. V.; MORETZSOHN, M. C.; BRONDANI, C. & FERREIRA, M. E. 2001. Development and characterization of simple repeat markers for *Phaseolus vulgaris*. In: **47 Congresso Nacional de Genética**, 2001, Águas de Lindóia. Sociedade Brasileira de Genética, v. Anais.
- CIAMPI, A.Y. 1999. Desenvolvimento e utilização de Marcadores Microssatélites, AFLP e Sequenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de Copaíba (*Copaifera Langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado. Botucatu, 204 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências/UNESP.
- CIAMPI, A.Y., BRONDANI, R. & GATTAPAGLIA, D. 2000. Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites para *Copaifera Langsdorffii* Desf. (Copaíba)-Leguminosae - Caesalpinioideae e Otimização de Sistemas Fluorescentes de Genotipagem Multiloco. **Boletim de Pesquisa. Embrapa**: n.16, p.1– 40.

- COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; & GATTAPAGLIA, D. 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliensis*. **Heredity** 83: 748-756.
- FARIAS, I. P.; HRBEK, T.; BRINKMANN, H.; SAMPAIO, I. & MEYER, A. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. **Molecular Ecology Notes**. 3: 128-130.
- FERREIRA, M.E. 2001. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: GARAY, I. E. G. & DIAS, B. F. S. **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Editora: Vozes, Petropolis, 2001. 233-267.
- FERREIRA, M.E. & GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 1995. 2 ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN. 220pp
- GAIOTTO, F. A. 1999. Inferências sobre herança quantitativa e estrutura genética em populações naturais de *Euterpe edulis* Mart. utilizando marcadores microsatélites. Piracicaba, 122 p. Tese (Doutorado) – Escola superior de Agricultura, USP.
- GAIOTTO, F.A., GATTAPAGLIA, D. & BRONDANI, R.P.V. 2000. Microsatellite markers for Heart of Palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Palmae). **Molecular Ecology**. 1(1-2), 86-92.
- GENTRY, A.H. 1982. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections

between Central and South America, Pleistocene fluctuations, or an accident of the Andean orogeny. **Ann. Missouri Botanical Garden** 69: 557-593.

GOLDBLATT, P. Cytology and Phylogeny of Leguminosae. 1977. P. 427-463. In: POLHILL, R. M. & RAVEN, P. H. **Advances in Legume Systematics Part 2**. Proceedings of the International Legume Conference, Kew, 24-29 July, 1978. 2^o Volume. Royal Botanic Garden Kew, Missouri Botanical Garden & University of Reading.

GOLDSTEIN, B.D. & SCHLOTTERER, C. 2001. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, pp 352.

GRATTAPAGLIA, C.; CIAMPI, A.Y. & GAIOTTO, F.A. 1997. DNA technologies for forest tree breeding and conservation. In: **Recent advances in biotechnology for tree conservation and management**, Florianópolis, Brazil p. 50-61.

GUPTA, P.K. & VARSHNEY, R.K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, 113: 163-185.

HAMADA, H.; PETRINO, M. G. & KAKUNAGA, T. 1982. A novel repeat element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 79: 6465-6469.

HEDRICK, P.W. 1999. Perspective : Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, 53, (2), 313-318.

IBGE. 1997. **Diagnostico Ambiental da Amazônia Legal. (CD-ROM)**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

- ISAGI, Y.; KENTA, T. & NAKASHIZUKA, T. 2002. Microsatellite loci for a tropical emergent tree, *Dipterocarpus tempehes* V. SI. (Dipterocarpaceae). **Molecular Ecology Notes**. 2: 12-13.
- JONES, F. A.; HUBBELL, S.P.; 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci in the tropical tree *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology notes**. 3: 403-405.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A. & STEVENS, P. F. 1999. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates, Sunderland MA. 464 pp.
- LEMES, M. R.; BRONDANI, R. P. V. & GATTAPAGLIA, D. 2002. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of Mahogany, *Switenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal of Heredity** 93(4): 287-290.
- LEWIS, P. O. & ZAYKIN, D. 1997. **Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data**. Free program distributed by the authors over the Internet from the GDA Home Page at <http://chee.unm.edu/gda>.
- LITT, M. & LUTY, J.A. 1989. A hipervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Human Genet.** .44: 397-101.
- LOUREIRO, A. L. & SILVA, M. F. 1968. **Catálogo das Madeiras da Amazônia**. Belém, 2 Volume, SUDAM.
- LOVELESS, M. D. 2002. Genetic diversity and differentiation in tropical trees, p- 3-30. In: DEGEN, B.; LOVELESS, M. D. & KREMER, A. 2000. **Modeling and experimental research on genetic processes in tropical and temperate**

- forest.** Kouru, French Guiana. Proceedings Embrapa Amazônia Oriental.
- KANASHIRO, M.; THOMPSON, I. S.; YARED, J.A.G. LOVELESS, M.D.; COVENTRY, P.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V; DEGEN, B.; & AMARAL, W. (2001). Improving conservation values of managed forests: The Dendrogene Project in the Brazilian Amazon. *Unasylva* 209.
- KANASHIRO, M. ; THOMPSON, I.S. & DEGEN, B. 2002. Genetic conservation within managed forests in Amazonia: Dendrogene project, p 77-88. In DEGEN, B.; LOVELESS, M. D. & KREMER, A. 2000. **Modeling and experimental research on genetic processes in tropical and temperate forest.** Kouru, French Guiana. Proceedings Embrapa Amazônia Oriental.
- MAGUIRE, T.L.1999. Producing and exploiting enriched microsatellite libraries. In HENRY, R. J. **Plant Genotyping : The DNA fingerprint of plants** . Editora CABI. 193-209.
- MATOS, D.M.S. & WATKINSON, A.R. 1998. The fecundity, seed, seedling ecology of edible palm *Euterpe edulis* in southeastern Brazil. **Biotropica**. 30 (4): 595-603.
- MORETZSOHN, M. C.; COELHO, P. J. A.; AMARAL, Z. P. S.; HERCOS, A. P. & TUPINAMBÁ, E. A. 2001. Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites na análise da variabilidade genética de ecótipos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa**, 16, 25 p.
- OGYU, K.; TSUDA, Y.; SUGAYA, T.; YOSHIMARU, H. & IDE, Y. 2003. Identification and characterization of microsatellite loci in *Betula maximowicziana* Regel. **Molecular Ecology Notes**, 3: 268-269.

- POWELL, W.; MARCNRAY, G.C. & PROVAN, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science**. 1 (7): 215 - 222.
- PUTZ, F.E.; REDFORD, K.H.; ROBINSON, J.G.; FIMBEL, R. & BLATE, G.M. 2000. Biodiversity Conservation in the context of tropical Forest Management. **Biodiversity series- Impact studies. World's Bank's Enviroment Department Papers**. Paper nº. 75.
- RAFALSKI, J.A; MORGANTE, M.; POWELL, W.; VOGEL, J.M. & TINGEY, S.V. 1996. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B. & LAI, E. (eds.) **Analysis of non mammalian genomes - a practical guide**. Academic Press, New York, pp 75-134.
- RAYMOND, M. & ROUSSER, F. 1995. genepop Version 1.2: population genetics software for exacts test and ecumeniccism. **Journal of Heredity**, 86:248-249.
- REIS, M. S.; GUERRA, M. P. & NODARI, R.O 1997. Management of natural populations and maintenance of genetic diversity of *Euterpe edulis*, the heart-of-palm tree. In: **Recent advances in biotechnology for tree conservation and management**, Florianópolis, p. 145-156.
- RIBEIRO, J. E. L. Da S. *et al.* 1999. Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus:INPA.
- ROZEN, S. & SKALESKY, H. J. 2000. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S (eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ, pp: 365-386.

- SAMADI, S.; ARTIGUEBIELLE, E.; ESTOUP, A.; POINTIER, J. P.; SILVAN, J. F.; HELLER, J.; CARIOU, M. L.; JARNE, P. 1998. Density and variability of dinucleotide microsatellites in the parthenogenetic polyploid snail *Melanoides tuberculata*. **Molecular Ecology Notes**. 7: 1233-1236.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2nd edition CSHL, Cold Spring Harbor, NY.
- SCHULTES, R. E & RAFFAUF, R. F. 1990. **The healing forest: medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia**. Portland, EUA: Doisorides Press. 846p.
- SILVA, J. N. M. 2001. **Manejo Florestal**. Embrapa Amazônia Oriental. 3 ed, 49p. Belém, PA.
- SILVA, M. B.; MOITA, A. N.; LOVELESS, M. D.; COVENTRY, P.; THOMPSON, I. & KANASHIRO, M. 2003. Sustentabilidade ecológica na exploração madeireira: A contribuição dos estudos fenológicos na compreensão da dinâmica reprodutiva de tatajuba (*Bagassa guianensis* Aubl., Moraceae). **54 Congresso Nacional de Botânica, 3 Reunião Amazônica de Botânica**, V.Anais.
- SILVA, I. V. DA ; KANASHIRO, M. & MAUÉS, M. M. 2003. Aspectos da Biologia Floral de Parapará (*Jacaranda Copaia* (Aublet) D. Don. – Bignoniaceae): Razão Flor/Fruto e Semente/Fruto. **54 Congresso Nacional De Botânica, 3ª Reunião Amazônica de Botânica**, V.Anais.
- SOUZA, M. S. DE & MAUÉS, M. M. 2003. Morfologia floral de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. Leguminosae – Papilionoideae (Cumaru). **54 Congresso Nacional de Botânica, 3ª Reunião Amazônica de Botânica**, V.Anais.

- TAUTZ, D. & RENZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acid Research** 12, 4127-4138.
- TORRES, G. A.; CARVALHO, C. R. & DAVIDE, L. C. 2000. Caracterização morfológica dos cromossomos mitóticos de *Dipteryx alata* vog. **45º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindoia-SP.
- VERÍSSIMO, A.; UHL, C.; MATTOS, M.; BRANDINO, S. & VIEIRA, I. 1996. Impactos sociais, econômicos e ecológicos da exploração seletiva de madeiras numa região de fronteira na Amazônia oriental: o caso de Tailândia p 09-46. In VERÍSSIMO, A. & BARROS, A. C. **A expansão da atividade madeireira na Amazônia: Impactos e perspectivas para o desenvolvimento do setor florestal no Pará**. IMAZON, Belém-PA. 186p.
- WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G. & TANKSLEY, S.D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theor. Appl. Genet.** 88: 1-6.
- WEBER, Z. & MAY, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Human Genet.** 44: 388-396.
- WEIR, B.S. 1996. Programa : **Genetic Data Analysis II (software)**. Sinauer Associates. Sunderland, MA, 445p.
- WU, B.; LIAN, C. & HOGETSU, T. 2002. Development of microsatellite markers in white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*). **Molecular Ecology Notes.** 2: 413-415.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L. & PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology.** 11: 1-16.

ANEXO**Anexo 1**

Seqüências

Seqüências de corte das enzimas

Sau 3A I ↓GATC

MSE I T↓TAA

Tsp 509 I ↓AATT

Seqüências dos adaptadores:

MSE I: Longa 5'p –TAAACGTGTAGAATTCGCCCA - 3'

Curta 5' - TGGCGAATTCTACACGTT - 3'

Tsp 509 I: Longa 5'p - AATTGGAATTCGACTCGCAGCAGCC-3'

Curta 5' - GGCTGCTGCGAGTCGAATTCC - 3'

Sau 3A I: Longa 5'p - GATCGGTGAATTCGGCTCTAGGCTG - 3'

Curta 5' - CAGCCTAGAGCCGAATTCACC - 3'

Seqüência dos iniciadores dos adaptadores

Tsp 509 I : 5' - GGCTGCTGCGAGTCGAATTCC - 3'

Seqüências dos iniciadores complementares as seqüências dos vetores

pUC/M13 Direto: 5' - CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC - 3'

pUC/M13 Reverso: 5' - TCACACAGGAAACAGCTATGAC - 3'

Anexo 2

Soluções

- Solução desnaturante

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

- Solução neutralizante

0,5 M Tris-HCl pH 8.0

1,5 M NaCl

- SSC 20 X

NaCl 3 M 175,3 g

Citrato de Sódio 0,3 M 88,2 g

Acrescentar água destilada até 1000 mL e autoclavar por 15 minutos.

- SDS 10 %

SDS 100 g

Água destilada 900 mL

Aquecer a 68 °C, ajustar pH para 7,2 com NaOH, completar para 1000 mL e autoclavar por 15 minutos.

- PBS (tampão salino de fosfato)

NaCl 0,8 g

KCl 0,2 g

Na₂HPO₄ 1,44 gKH₂PO₄ 0,24 g

Completar com água destilada para 1000 mL, ajustar o pH para 7,4 com HCl e autoclavar por 15 minutos.

- BEW 2X

Tris HCl pH 7,5 1M 1 mL

EDTA pH 7,6 100 mM	1 mL
NaCl 5M	40 mL
Completar com água destilada para 100 mL	

- Solução de Pré - Hibridização

SSC 5X	125 mL do estoque de 20 X
0,1% N - Laurylsarcosine	0,5 g
0,02% SDS	0,1 g
1% Reagente bloqueador	5 mL do estoque de 10 X
Água destilada para completar 500 mL.	

- Sonda

Sonda: 5 μ L da sonda AG/TC do estoque 100 ng/ μ L em 45 μ L de água MiliQ esterelizada. Desnaturar por 10 minutos a 95⁰C e colocar no gelo.

Colocar a sonda em 50 mL da solução de pré-hibridização e armazenar a -20⁰C.

Antes de utiliza-la, desnaturar por 10 minutos a 95⁰C.

- Tampão de ácido maléico

0,1 M ácido maléico pM 116.1	11,61 g
0,15 M NaCl pM 58,44	8,76 g

Ajustar o Ph para 7.5 com NaOH, armazenar a temperatura ambiente e não autoclavar.

- Tampão de lavagem

Tampão de ácido maléico	250 mL
Tween 20	750 μ L

Armazenar a temperatura ambiente e não autoclavar.

- Tampão bloqueador

Solução Bloqueadora 10 X	5 mL
Tampão I	45 mL

Armazenar a temperatura ambiente e não autoclavar.

- Solução bloqueadora 10 X

Reagente bloqueador (*Blocking reagent, Boehringer Mannheim GmbH 1096176*)

Reagente bloqueador 5 g

Tampão I 50 mL

Misturar o reagente bloqueador com o tampão a 65⁰C e autoclavar por 15 minutos.

- Solução Anti-Corpo

Antidigoxigina conjugado a alcalino fosfato (*Anti DIG-AP Conjugate, Boehringer Mannheim GmbH 1096176*)

Antidigoxigina conjugado a alcalino fosfato 2,5 µL

Tampão de detecção 25 mL

- Tampão de detecção

0,1 M Tris-HCl (pM 121,14) 6,057 g

0,1 M NaCl (pM 58,44) 2,922 g

50 mM MgCl₂ (pM 95,31) 2,382 g

Completar com água destilada para 500 mL, ajustar o pH para 9,5 e não autoclavar.

- Solução CSPD

CSPD (*Boehringer Mannheim GmbH 1096176*)

CSPD 10 µL

Tampão detector 990 mL

- Meio SOC

5 mL de meio LB

100 µL glicose 1 M

- Meio LB sólido

NaCl	10 g
<i>Tryptona</i>	10 g
Extrato de leveduras	5 g
Agar	15 g

Dissolver com água destilada o NaCl, *triptona* e extrato de leveduras. Completar para 1000 mL com água destilada, acrescentar o agar e autoclavar por 15 minutos e esperar esfriar. No fluxo colocar 50 mL em cada placa.

- Revelador

Carbonato de Sódio	30 g
Água destilada	1000 mL

Esta solução deverá ser feita algumas horas antes de ser utilizada e guardar em um vidro escuro. Acrescentar 540 µL de formaldeído antes de utilizar.

- Nitrato de Prata

Nitrato de Prata (169,87 g/mol)	20 g
Água destilada	1000 mL

Armazenar em vidro escuro.

- Solução de Fixação

Etanol 96,6 % (10 %)	100 mL
Acido Acético (1 %)	10 mL
Água destilada	890 mL

Armazenar em vidro escuro.