



DESENVOLVIMENTO DE LOCOS MICROSSATÉLITES DE CAQUI-DO-CERRADO (*DIOSPYROS HISPIDA* ALPH. D.C.) PARA A CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA ESPÉCIE.

Bruna Ibanes¹, Evandro Vagner Tambarussi¹, Maria Andreia Moreno¹, Aluana Gonçalves de Abreu², Maria Imaculada Zucchi³, Roberto Tarazi⁴, Elza Martins Ferraz¹, Paulo Yoshio Kageyama¹. ¹ Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 9, Piracicaba, SP, 13418-900, Brasil. e-mail: brunaibanes@yahoo.com.br; ² Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO 462, km 12, Caixa Postal 179, Santo Antônio de Goiás, GO, 75375-000, Brasil; ³ Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Rodovia SP 127, km 30, Caixa Postal 28, Piracicaba, SP, 13400-970, Brasil; ⁴ Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, km 16, Ilhéus, BA, 45662-900, Brasil . ;

INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando cerca de 24% do território nacional (MMA, 2006). O Bioma se distribui de forma muito ampla por todo país (IBAMA, 2008), participa das três maiores bacias hidrográficas Sul-americanas, sendo elas: Tocantins-Araguaia, São Francisco e Paraná, por conter zonas de planalto no bioma ele possui diversas nascentes de rios, sendo assim o Cerrado é uma importante área de recarga hídrica (LIMA; SILVA, 2005). A biodiversidade total do Cerrado foi estimada em 160.000 espécies de plantas, animais e fungos (KLINK; MACHADO, 2005). A flora vascular nativa é de aproximadamente 11.627 espécies, é a mais rica dentre todas as savanas (MENDONÇA *et al.*, 2008), sendo 44% da flora endêmica (RATTER *et al.*, 2003). O desmatamento no Cerrado chega a 3 milhões de hectares/ano (MACHADO *et al.*, 2004), mais da metade da sua área total foi transformada em monoculturas e pastos de gramíneas exóticas nos últimos 35 anos. Dessa forma, torna-se imprescindível gerar informações relacionadas aos efeitos do desmatamento e da fragmentação ambiental, pois esses efeitos reduzem a variabilidade genética das espécies por deriva genética, restringem o fluxo gênico e consequentemente aumentam a endogamia, expondo alelos recessivos deletérios, reduzindo o vigor reprodutivo e a adaptabilidade das espécies às mudanças, principalmente as climáticas (FRANKHAM *et al.*, 2008). Por isso estudou-se *Diospyros hispida*, uma das espécies arbóreas características do Cerrado, conhecida popularmente como caqui-do-cerrado, pertencente à família Ebenaceae (DURIGAN *et al.*, 2004). *D. hispida* é uma espécie dioica, possui antese noturna, suas flores são verdes, sésseis e polinizadas por pequenos lepidópteros noturnos (WALLNÖFER, 2001). Seu fruto é uma baga sésil, globosa, verde e pilosa, contendo de seis a oito sementes, são comestíveis e muito apreciados pela fauna silvestre, sendo assim pode ser extremamente útil nos plantios de restauração de áreas degradadas (DURIGAN *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi desenvolver marcadores microssatélites para *D. hispida*, auxiliando na execução de trabalhos de diversidade genética, estrutura genética espacial e análise de paternidade da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a caracterização da diversidade genética na espécie foi construída uma biblioteca de microssatélites. O protocolo utilizado foi descrito por Billotte *et al.* (1999), com modificações e otimizado por Angie-Marie Risterruci

do CIRAD/França. A construção da biblioteca foi realizada no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP). Foi extraído o DNA total de um único indivíduo de *D. hispida* localizado na Estação Ecológica de Itirapina – Itirapina, SP, de acordo com o protocolo CTAB (DOYLE, DOYLE, 1987) e digerido com a enzima de restrição RsaI. Os fragmentos foram então ligados a adaptadores Rsa21 (5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3') e Rsa25 (5'AGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACAA3'). Fragmentos contendo CTn/ GTn repetidos foram selecionados por hibridação com oligonucleotídeos complementares à sequência repetitiva, e foram recuperados por “beads” magnéticas ligadas a estreptavidina. Posteriormente foi clonado no vetor do plasmídeo pGEM-T (Promega) e transformado em células de *Escherichia coli* quimicamente competentes. As células transformadas foram cultivadas em placas de ágar contendo 100g ml.1-1 de ampicilina e 50g de ml.1-1 X-galactosidase e isopropílico b-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Colônias brancas (com o inserto) individuais foram selecionadas e armazenadas a -80° C.

RESULTADOS

Foram obtidos 23 clones positivos e os mesmos foram sequenciados em sequenciador ABI 3500 (Life Technologies). Dos clones sequenciados, 13 apresentaram regiões de microssatélites passíveis de síntese de primers pelo software Primer 3. Os primers foram testados em 12 diferentes temperaturas de anelamento: 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 63, 64, 65, 66 e 67°C e visualizados em géis de agarose a 1% corados com brometo de etídeo. Do total, sete pares amplificaram em temperaturas de anelamento que variaram desde 60°C à 67°C e seis deles apresentaram polimorfismo analisado quanto ao número de alelos polimórficos/loco em gel desnaturante de poli(acrilamida) 4%, corado com nitrato de prata. Quatro primers apresentaram motivos dinucleotídeos e três primers apresentaram motivos compostos.

DISCUSSÃO

A construção da biblioteca genômica para a síntese de marcadores moleculares microssatélites de *Diospyros hispida* é inédito no país; seu desenvolvimento é trabalhoso e envolve altos custos financeiros, no entanto, podem-se ter resultados mais específicos para a espécie, além de poder ser utilizado para outras espécies do gênero/família por meio de sua transferência.

CONCLUSÃO

Os iniciadores desenvolvidos permitirão a sua utilização em estudos sobre o estado de fragmentação das populações desta espécie, diversidade e estrutura genética espacial. Desse modo, o estudo deverá gerar informações valiosas para se estabelecer estratégias de manejo, contribuindo em programas de melhoramento e conservação genética da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BILLOTTE N; P.J.L.LAGODA; A.M.RISTERUCCI; F.C. BAURENS (1999). Microsatellite-enriched libraries: Applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277– 288.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Rockville, v.12, p.13-15, 1990.
- DURIGAN, G.; BAITELLO, J.B.; FRANCO, G.A.D.C.; SIQUEIRA, M.F. *Plantas do Cerrado Paulista: imagens de uma paisagem ameaçada*. São Paulo: Páginas & Letras, 2004. v. 1. 475 p.
- FRANKHAN, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. *Fundamentos de genética da conservação*. Tradução de M. R. Francisco; I. P. Farias. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 262p.

INSTITUTO BRASILEIRO DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Ecossistemas – Cerrado. Disponível em: . Acesso em: 14 Abr. 2009.

KLINK, C.A.; MACHADO, R. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*, Gainesville, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.

LIMA, J.E.F.W.; SILVA, E.M. da. Estimativa da produção hídrica superficial do Cerrado brasileiro.

In: SCARIOT, A.; SOUZA-SILVA, J. C.; FELFINI, J. M. (Ed.). Cerrado: Ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. v. 1, p. 61-72.

MACHADO, R.B.; RAMOS NETO M.B.; HARRIS M.B.; LOURIVAL, R.; AGUIAR, L.M.S. Análise de lacunas de proteção da biodiversidade no Cerrado.

In: CONGRESSO BRASILEIRO DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO. FUNDAÇÃO O Boticário de Proteção à Natureza, 4., 2004.

Anais... Curitiba, 2004. p. 29-38

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JÚNIOR, M.C.; REZENDE A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E. Flora vascular do cerrado.

In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (Ed.). Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 2008. p.423-442. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE.

Programa Nacional de Conservação e Uso Sustentável do Bioma Cerrado- Programa Cerrado Sustentável. Brasília, 2006. 56p.

RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. *Edinburgh Journal of Botany*, v.60, n.1, p.57-109, 2003.

WALLNÖFER, B. The Biology and Systematics of Ebenaceae: a Review. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, Austria*, p. 485-512, 2001. (Apoio Financeiro: CNPq)

Agradecimento

Agradeço ao Prof. Dr. José Baldin Pinheiro e sua equipe pelo auxílio no desenvolvimento da biblioteca genômica enriquecida com microssatélites no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento (ESALQ/USP).