



DESENVOLVIMENTO DE LOCOS MICROSSATÉLITES DE GUARANTÃ (*Esenbeckia leiocarpa* ENGL.) VISANDO ESTUDOS GENÉTICOS E ECOLÓGICOS.

Giullia Forti;

Alexandre Magno Sebbenn, Evandro Vagner Tambarussi, Maria Andreia Moreno, Elza Martins Ferraz, Roland Vencovsky, Gustavo Maruyama Mori e Paulo Yoshio Kageyama.

INTRODUÇÃO

Os ecossistemas florestais têm sido submetidos a uma intensa pressão antropogênica. Somente no estado de São Paulo, os levantamentos atualizados indicam que a cobertura vegetal natural remanescente atinge 13,4% da área total, concentrada principalmente na região do litoral sul. Este quadro reflete o quase completo desaparecimento das florestas estacionais semidecíduais Paulistas. Assim, verifica-se a necessidade de informações acerca da biologia, ecologia e genética, bem como taxa de crescimento, dinâmica da vegetação e da idade das árvores. Estudos da diversidade e estrutura genética, sistema de reprodução, estrutura genética espacial e dispersão de pólen e sementes são fundamentais para compreender a dinâmica evolutiva de populações naturais de espécies arbóreas, e assim adotar estratégias adequadas para a sua conservação genética, melhoramento e manejo florestal. Tais estudos podem ser eficientemente realizados utilizando-se marcadores moleculares microssatélites. Por isso, é necessário a realização de estudos de genética de populações, a fim de buscar informações que servirão para o estabelecimento de estratégias de conservação, de manejo e de melhoramento dessas espécies. O Guarantã (*Esenbeckia leiocarpa* Engl.) é uma espécie clímax, com alta densidade de indivíduos por população na forma de reboleiras. Com flores hermafroditas polinizadas por moscas, foi detectado a existência de auto-incompatibilidade (FAEGRI e PIJL, 1971), havendo então fecundação cruzada obrigatória. Como seus polinizadores são de voo curto, deve haver certo grau de endogamia dentro de reboleiras devido ao cruzamento de indivíduos aparentados. A dispersão primária de sementes é por autocoria e é possível que ocorra a dispersão secundária por pássaros (KAGEYAMA *et al.*, 2003). A espécie é utilizada na construção civil, como planta medicinal em estudos de medicina humana (tratamento do Alzheimer) e efeito alelopático, como controle biológico contra pragas de algodão (MAIER, 2010; SOUZA *et al.*, 2010; NAKATSU *et al.*, 1990) além de ornamentação. Como a fecundação é realizada por moscas e a dispersão (autocoria) é pouco eficiente, estudos existentes com marcadores como o RAPD e isoenzimas, apontam que a espécie tem maior diversidade genética entre as populações do que dentro das mesmas (CASTELLEN, 2000; SEOANE e SEBBENN, 2004). A dispersão de sementes a curtas distâncias favorece a formação de estrutura genética espacial intrapopulacional (EGE), ou seja, a espécie possui indivíduos com maior grau de parentesco dentro das populações do que entre elas. Contudo, tais marcadores não permitem realizar estudos de paternidade, calcular área mínima viável pra conservação e tamanho efetivo. Dessa forma, faz-se necessário o estudo com microssatélites que “preenchem essas lacunas”, pois o Guarantã tem importância econômica, medicinal e ecológica.

OBJETIVOS

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver marcadores microssatélites para a espécie *E. leiocarpa*, no sentido de colaborar em trabalhos de diversidade genética e estudo de paternidade.

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 Análise Genética Molecular do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foi extraído o DNA total de um único indivíduo de *E. leiocarpa* do campus da ESALQ/USP, de acordo com o protocolo CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987) e digerido com a enzima de restrição RsaI. Os fragmentos foram 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 de ampicilina e 50g de ml⁻¹ X-galactosidase e isopropílico b-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Colônias brancas (com o inserto) individuais foram selecionadas e de armazenagem a -80° C.

RESULTADOS

Foram obtidos 45 clones positivos e os mesmos foram sequenciados em sequenciador ABI 3500 (Life Technologies). Dos clones sequenciados, 25 apresentaram regiões de microssatélites passíveis de síntese de "primers". Quinze pares de "primers" utilizando o "software" Primer 3 foram desenvolvidos. Do total, 14 pares ampli?caram e um par não amplificou em temperaturas de anelamento que variaram desde 54°C à 64°C. Estes foram analisados quanto ao número de alelos polimór?cos/loco em gel desnaturante de poliacrilamida 4%, corado com nitrato de prata. Destes, 68% foram dinucleotídeos, 16% trinucleotídeos e 16% tetranucleotídeos. Pentanucleotídeos e Hexanucleotídeos não foram encontrados. Todos "os primers" ampli?caram fragmentos nítidos, e até o momento, quatro apresentaram indícios de polimorfismo utilizando apenas 6 indivíduos.

DISCUSSÃO

Sabe-se que o trabalho com marcadores microssatélites em espécies nativas ainda é árduo devido à ausência de locos específicos. No entanto, quando estes são viáveis, 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

Este trabalho prévio desenvolveu 14 pares de iniciadores que permitirão a sua utilização em estudos sobre o estado de fragmentação das populações desta espécie, fluxo de genes e estrutura genética espacial. Este estudo deverá gerar informações valiosas para o manejo das populações fragmentadas da espécie, contribuindo em programas de melhoramento e conservação genética para recuperação ambiental.

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.

CASTELLEN, M.S. Uso de Marcadores RAPD e Isoenzimáticos na quantificação da diversidade genética em populações naturais de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Piracicaba, 2000. 76p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

FAEGRI, K & PIJL, L. The principles of pollination ecology. 2ed., Oxford, Pergamon, 1971, 291 p.

KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, L.A.; GANDARA, F.B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M.B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Florestalis*, n. 64, p. 93-107, 2003.

MAIER, J.A. Efeitos do extrato etanólico e frações purificadas de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) na atividade anticolinesterásica e no comportamento de animais. São Paulo, 2010. 70p. Dissertação (Mestrado)

NAKATSU, T.; JOHNS, T.; KUBO, I.; MILTON, K.; SAKAI, M.; CHATANI, K.; SAITO, K.; YAMAGIWA, Y.; KAMIKAWA, T. Isolation, structure and synthesis of novel 4-quinolinone alkaloids from *Esenbeckia leiocarpa*. *Journal of Natural Products*, v. 53, n. 6, p. 1508-1513, 1990.

SEOANE, C.E.S.; SEBBENN, A.M. herança genética e desequilíbrio de ligação em locos de isoenzimas em *Esenbeckia leiocarpa*. *Revista Instituto Florestal*, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2004.

SOUZA, F.M.; GANDOLFI, S.; PEREZ, S.C.J.C.A.; RODRIGUES, R.R.; Allelopathic potential of bark and leaves of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). *Acta Bot. Bras.* v. 24, n. 1, p.169-174, 2010.

Agradecimento

À Fundação de Amparo a Pesquisa - FAPESP pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudos de Iniciação Científica (Fapesp 2012/20790-3) Ao Laboratório de Análise Genética e Molecular CBMEG – UNICAMP, pela permissão e apoio na construção da biblioteca de microssatélites.