

53

Circular
Técnica

Isolamento e caracterização de marcadores microsatélites para *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae)

Resumo

A *Araucaria angustifolia* é a única espécie do gênero com ocorrência natural no Brasil. Devido à intensa exploração madeireira, restam aproximadamente 2% dos remanescentes desta espécie. Os marcadores moleculares baseados em SSR – “Simple Sequence Repeats” ou microsatélites, são utilizados para estudos de populações naturais por revelarem alto nível de polimorfismo e por serem de herança co-dominante e multialélicos. O objetivo deste estudo foi desenvolver um conjunto de marcadores microsatélites específicos de *Araucaria angustifolia* e estimar a diversidade e estrutura genética de duas populações naturais da espécie. A biblioteca enriquecida para microsatélites foi construída inicialmente digerindo DNA genômico com enzima de restrição (*Mse* I). Os fragmentos entre 200 e 800 pb foram isolados, purificados, ligados a adaptadores e hibridizados a oligonucleotídeos (AG)₁₃ and (TC)₁₃ biotinilados. Os fragmentos enriquecidos para estes dois microsatélites foram isolados com contas magnéticas, clonados e sequenciados. Níveis de polimorfismos foram avaliados em 29 locos microsatélites usando um total de 16 árvores adultas de populações naturais da espécie. Média de 8,1 alelos por loco foram detectados, e heterozigidade esperada e observada de 0,72 e 0,63.

Brasília, DF
Dezembro, 2007

Palavras chave: *Araucaria angustifolia*, microsatellite, diversidade genética, conservação.

Autores

Schmidt, A. B.

Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, Brasília-DF,
Brasil,

Ciampi, A. Y.

Embrapa Recursos Genéticos
e Biotecnologia, Brasília-DF,
Brasil,

Guerra, M. P.

Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, Brasília-DF,
Brasil,

Rubens Onofre Nodari

Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, Brasília-DF,
Brasil.

1. INTRODUÇÃO

Araucaria Angustifolia (Bert.) O. Kuntze é uma espécie nativa, dióica da Floresta Atlântica Tropical. Populações naturais ou plantadas ocorrem nos três Estados do Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) onde é chamado de “pinheiro-do Paraná”, “araucária” ou “pinheiro brasileiro”. Esta espécie também ocorre como manchas esparsas em outros estados como São Paulo e Minas Gerais e na Argentina, particularmente na província de Misiones (KLEIN, 1960).

A araucaria teve relevante função ecológica, econômica e social, sendo considerada uma das espécies arbóreas de maior importância nas regiões de ocorrência natural. Populações de indivíduos adultos criam ambiente para o desenvolvimento e o crescimento de várias outras espécies de plantas. Suas sementes servem de alimento para a fauna, incluindo pássaros e roedores, que são dispersores de sementes de araucária. Humanos também usam as sementes para a alimentação e renda adicional (AULER et al., 2002). A madeira de alta qualidade, que torna-se de elevado valor econômico, pode ser usada para diversos fins (REITZ et al., 1978). No entanto, os remanescentes de araucárias que representam 1 a 3% do total original (GUERRA et al., 2002), ainda estão sofrendo pressão na exploração pela indústria madeireira. Locos microsatélites ou seqüências repetitivas simples (SSR) exibem elevados níveis de polimorfismo pelos diferentes números de unidades repetitivas. A elevada diversidade alélica e abundância de microsatélites em genomas eucariotos tornaram esse marcador molecular codominante, popular em estudos detalhados de análises de diversidade genética e estrutura genética (CHASE et al., 1996).

2. MÉTODOS

DNA genômico total foi extraído de acículas de indivíduos de *Araucaria angustifolia*. Marcadores microssatélites foram desenvolvidos a partir de biblioteca genômica enriquecida para poly(TC)₁₃ construída com DNA digerido com MseI. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 2%, e selecionados os fragmentos de 200 a 800 pb, que foram eluídos, ligados a adaptadores e usados na construção de biblioteca genômica enriquecida, de acordo com protocolos previamente descritos por (BRONDANI et al., 1998; COLLEVATTI et al., 1999). Os fragmentos selecionados foram ligados em pGEM-T Easy Vector (Promega) e os vetores foram usados para transformar células competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue, que foram crescidas em 1X Luria-Bertani (LB) ágar contendo ampicilina, Xgal e IPTG. Um total de 400 colônias foram transformadas para repetições (TC)_n e amplificadas com iniciador M13 "forward" (Figura 1). O DNA plasmidial foi seqüenciado usando-se dye-terminator fluorescent chemistry, os produtos foram detectados em sequenciador automatizado ABI PRISM (Applied Biosystems) (Figura 2).

100ng 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

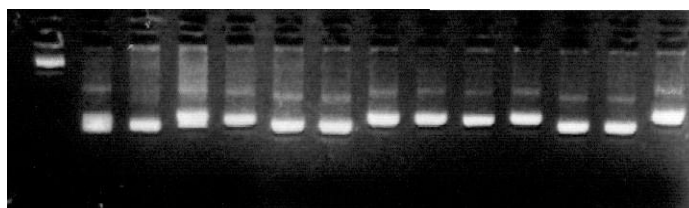


Figura 1 – Produtos amplificados de 13 inseros de DNA de *Araucaria angustifolia* em *E. coli*. Gel de agarose 2%.

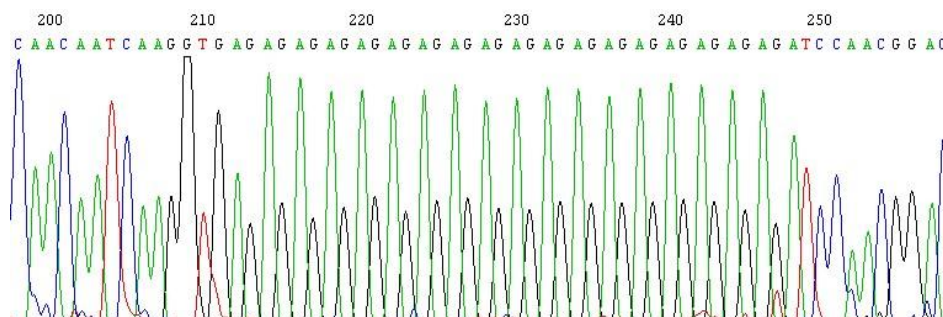


Figura 2 - Região microssatélite identificada no seqüenciamento de inserção de DNA de *Araucaria angustifolia* amplificado por sistema plasmidial em *E. coli* através do programa Chromas (versão 1.45).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicam que 399 colônias continham um microssatélite com tamanho e posição adequado no inserto clonado. Dos 399 clones positivos, 80 (20%) contendo microssatélite e regiões flanqueadoras adequadas para a realização do desenho de seqüência única. Iniciadores complementares para seqüências flanqueadoras de microssatélites foram desenhados usando-se o programa PRIMER3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000). Cinquenta pares de iniciadores foram sintetizados, otimizados e utilizados para estimar o número de alelos, heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada com 16 árvores adultas provenientes de cinco populações naturais de *Araucaria angustifolia*.

Os locos microssatélites foram amplificados usando reação de polimerase em cadeia (PCR) em volume total

de 13µL contendo 3ng de DNA genômico, 0,25mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂, tampão de PCR 1X (10mM Tris-HCl, 50mM KCl), 0,25mg/mL de BSA, 0,25µM de cada iniciador e 1U de TaqDNA polimerase (Gibco). As amplificações foram realizadas em controlador de temperatura MJ Research PTC-100 usando o seguinte protocolo: desnaturação a 94°C por 5 min; 29 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min; temperatura de anelamento (Ta) por 1 min; extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos da reação foram separados em gel de poliacrilamida e visualizado por nitrato de prata. Os alelos foram comparados em relação ao padrão 10pb. O número de alelos por loco, médias das heterozigosidades esperadas e observadas foram

Aang46

TAAGTGAGCATGTGTGAAAGTGTGAGATCAAACCCTCATTATATAGCGGGCTTGAAGGCAAAA
AGAGCAAAA**ACC**CAAGGAGGG**CTGATAC**AATACACTCCAACCTTAGAGGAATTAGGCTTTCTA
TAGAGAAAATACTAAAAAGGTGAAATCATGCCCCATCTAGGTTGATTGCGATCTTTCCTATGCA
AAGTCACGCCTAATCTCAATCAGGTGCAATTTACATAG**GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAA**
GAAATGAGAAAAGGAAGGGGA**AAAGGGTTGGATCTTGCCTT**GGGAAATCCCAAGGGGTATCTA
GGAGGACTCAAGGAAAATTGCCCACTAAAGTGGAACAATTTCCATGTCT

Aang47

TAAGTGGACTTTACCTCACAATACTGAGTTTC**AGGGTTGAACATCCCTTT**TGCATGCACGCACGT
GTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATGTTTATATATTGAAATAAGTATAAGAATACGATACA
GTCAAGGCCACAGCCATGGACTATGAATAGCAGTGAGAGGTCACCTTGTG**AAAGGGTGCGACCT**
AACATGTATAAAGTAATAACAAACAATTG

Todos os marcadores microsatélites foram altamente polimórficos, revelando em média 8,1 alelos por loco e valores médios de heterozigosidade esperada e observada de 0,72 e 0,63, respectivamente. Seis locos (Aang09, Aang12, Aang17, Aang18, Aang35, Aang44) não corresponderam ao esperado por Hardy-Weinberg após correção para múltiplos testes (método de Bonferroni, $P < 0,0017$). Desequilíbrio de ligação significativo foi detectado para quatro locos (Aang02/Aang03, Aang04/Aang09, Aang04/ Aang43 e

Aang03/ Aang44) analisados par a par. Isto mostra que, os desvios de equilíbrio podem ter ocorrido em função da amostragem limitada.

O elevado nível de polimorfismo permite que todos os iniciadores podem ser usados para estudos de genética de populações. Estes marcadores foram utilizados para investigar diferenciação genética entre populações naturais e diversidade genética como parte dos estudos para a criação de Unidades de Conservação no sul do Brasil.

Tabela 1. Sequências dos pares de iniciadores de locos microssatélites desenvolvidos para *Araucaria angustifolia* estão listadas com temperaturas de anelamento (Ta), número de alelos por loco (A), heterozigosidade esperada (He), Heterozigosidade observada (Ho), amplitudes alélicas (pb), e os respectivos números de acesso no “GenBank”

Locus	rray	ner Sequence (5' – 3')	Alele size range (bp)	a (°C)	N	A	He	H o	Assession GenBank”
Aang01	(CT)22	F: 5'TGACGGGTTCACTCCTACCT 3' R: 5'TAGGAACCCCATTCATTG 3'	200-260	56	16	8	0.81	0.87	Y865575
Aang02	(GA)27	F: 5'AAGGGCCAGAATGAAAAGGT 3' R: 5'TCACCCCCACATATTGTTGT 3'	250-290	56	16	7	0.63	0.44	Y865576
Aang03	(CT)13	F: 5'CGCCTACCTCAATCACTGGT 3' R: 5'TGGGACAATGTGCTTATCCA 3'	150-170	56	16	7	0.62	0.37	Y865577
Aang04	(GA)12	F: 5'TTGAAACCAACCATGATCCA 3' R: 5'GTTTTCCATTGCGATGTGG 3'	150-170	56	15	4	0.25	0.27	Y865578
Aang07	(GA)24	F: 5'ACCTCACAGGGACACCTCAC 3' R: 5'TTTCATGCATGTTGCTTGC 3'	200-280	54	15	11	0.88	0.80	Y865579
Aang09*	(GA)12	F: 5'TCTTCTACAATAGCTCATCCCTT R: 5'TGAGGAGAGGGAAGAGAAGGT 3'	150-170	54	12	6	0.79	0.25	Y865580
Aang12*	(GA)23	F: 5'AAGGGTTCACAATGCTGAGG 3' R: 5'TGGATTTTATTATGATGGTTGTCC 3'	190-240	56	9	9	0.87	0.55	Y865581
Aang13	(GA)20	F: 5'AAGGGTTCACAATGCTGAGG 3' R: 5'TGGATTTTATTATGATGGTTGTCC 3'	200-230	56	16	5	0.73	0.44	Y865582
Aang14	(GA)27	F: 5'GAGCACGTGCAGATGTTGAT 3' R: 5'CCATCCTCTCCATGACCACT 3'	150-190	56	13	11	0.81	0.61	Y865583
Aang15	(GA)19	F: 5'TGGTCGATCGTAGGGATCAT 3' R: 5'GCTGTGCGAGCCTCCTATCAC 3'	210-290	56	16	13	0.91	0.94	Y865584
Aang17*	(GA)22	F: 5'TAAAAAGGGTGCAAATGTGG 3' R: 5'TTGCATGGTCCGATCTTGT 3'	250-290	56	16	9	0.87	0.50	Y865585
Aang18*	(TC)9	F: 5'ACACGTTAATCAGACGAAGAAG 3' R: 5'ATGCCACCTTTTTCAGCAAC 3'	190-320	54	12	12	0.93	0.50	Y865586
Aang21	(CT)12	F: 5'GGAGACACCTCACCCCTA 3' R: 5'TGATGAGGGAGGATTACAAGC 3'	190-210	56	15	7	0.80	0.67	Y865587
Aang22	(GA)10	F: 5'TCAACTTGCAAGGTCACCTCTA 3' R: 5'ATGGGAGCCCCTTCTAGTGT 3'	220-250	56	14	6	0.53	0.43	Y865588
Aang23	(GA)19	F: 5'TGAGGTATTTGGGCTAGCAA 3' R: 5'CTTCCACGCTCTCACTTTCC 3'	180-200	56	15	5	0.46	0.47	Y865589
Aang24	(CT)19	F: 5'CTCTCCTTCCCCTTGCTCTT 3' R: 5'AGGTGGATCACCCACTGAAG 3'	160-200	56	14	8	0.86	0.64	Y865590
Aang27	(CT)12	F: 5'CATGGTGGCTATTGCTCCTT 3' R: 5'AGAAGCCATCAAAGGAGTGG 3'	160-210	56	16	11	0.87	0.81	Y865591
Aang28	(CT)11	F: 5'TCCATTGCATTAGTTGGGATA 3' R: 5'TTCCAATCATACATTCACCACA 3'	130-170	58	12	10	0.91	0.92	Y865592
Aang30	(CT)21	F: 5'GTGGAGGTCTTGGGCTAATGG 3' R: 5'TAGCTGGGAGCTGATCCAAT 3'	210-230	56	9	5	0.71	0.78	Y865593
Aang35	(GA)10	F: 5'GGTGAAGCTTCGTTTCAAGG 3' R: 5'CCACTGTCTTCAACCA 3'	200-270	56	14	11	0.89	0.93	Y865594
Aang36	(GA)14	F: 5'CACCCCTGTAGGATTCAAA 3' R: 5'ATGGTTGCTGATGACGA 3'	175-215	56	15	9	0.81	0.67	Y865595
Aang37	(GA)18	F: 5'GGGGAGTTTCCATGAGATGA 3' R: 5'TCCACTCACCCTCTGAGGA 3'	250-270	54	15	4	0.25	0.20	Y865596
Aang41	(GA)12	F: 5'TGTCCATGTGAACGAGTCC 3' R: 5'TCTCTCCATTATTCATACATGCTC 3'	170-300	56	16	14	0.91	0.94	Y865597
Aang42	(GA)15	F: 5'TGCACCAATGAACCACTT 3' R: 5'GCCCACTACTACCACCATA 3'	140-160	56	16	6	0.77	0.94	Y865598
Aang43	(GA)24	F: 5'AGGTCACATCAGGCTCACT 3' R: 5'TGGTTTTGGTGGTCAAATCA 3'	160-190	56	16	8	0.53	0.44	Y865599
Aang44*	(CT)15	F: 5'CAGAGGGTGGACACTTGGTT 3' R: 5'CACAAACCCCTTTTGCTTAA 3'	250-280	54	16	6	0.73	0.19	Y865600
Aang45	(CT)15	F: 5'AGGTCACATCAGGCTCACT 3' R: 5'TGGTTTTGGTGGTCAAATCA 3'	190-270	54	16	11	0.83	1.00	Y865601
Aang46	(CT)12	F: 5'TCCACCTACCTCAATCACTGG 3' R: 5'TGGGACAATGTGCTTATCCA 3'	210-230	56	16	5	0.69	0.81	Y865602
Aang47	(GA)15	F: 5'GATATGAAAAGAAGGGTCTATGCT 3' R: 5'TTCTTCCATTCTCCAAGC 3'	155-175	58	16	6	0.72	0.87	Y865603

* Disequilibrium Hardy-Weinberg expectations (P<0.005)

Agradecimentos

Este estudo foi desenvolvido como parte da pesquisa para a obtenção de grau de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais

da Universidade Federal de Santa Catarina. A pesquisa foi desenvolvida no Centro Nacional de Pesquisa em Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen/Embrapa) e financiada pelo Ministério do meio Ambiente (MMA).

Referências

- AULER, N. M. F.; REIS, M.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptive variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 329-338, 2002.
- BRONDANI, R. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 817-827, 1998.
- CHASE, M. R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; BAWA, K. S. Distant gene flow in tropical trees. **Nature**, London, v. 383, p. 398-399, 1996.
- COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, London, v. 83, p. 748-756, 1999.
- GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; REIS, M. S.; SCHNEIDER, L. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMOES, L. L.; LINO, C. F. (Ed). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: SENAC, 2002. p. 85-101.
- KLEIN, R. M. Aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, Itajai, SC, v. 12, p. 17-44, 1960.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic data**. Version 1.0 (d16c). 2001. Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. Acesso em: out. 2004.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto Madeira de Santa Catarina. **Sellowia**, Itajai, SC, v. 28, p. 1-320, 1978.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. p. 365-386. Disponível em: <www.primer3_www.cgi v 0.2>. Acesso em: mar. 2004.

Circular Técnica, 53

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372
PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61) 3340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e-mail: sac@cenargen.embrapa.br

Ministério da
Agricultura,
Pecuária
e
Abastecimento

1ª edição
1ª impressão (2007):

Comitê de Publicações

Presidente: Sergio Mauro Folle
Secretário-Executivo: Maria da Graça Simões Pires Negrão

Membros: Arthur da Silva Mariante
Maria da Graça S. P. Negrão
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro

Expediente

Supervisor editorial: Maria da Graça S. P. Negrão
Normalização Bibliográfica: Maria Iara Pereira Machado
Editoração eletrônica: Maria da Graça Simões Pires Negrão

