

Introdução

A Mata Atlântica abriga uma das maiores biodiversidades do mundo, sendo um dos ecossistemas mais ameaçados, com sua cobertura vegetal atual estimada em 5% da área original. Diante disso, a preservação de espécies e seus habitats tornam-se cada vez mais importante. Atualmente, com os avanços na área de biologia molecular e as diferentes técnicas que permitem a detecção da variabilidade existente ao nível do DNA, uma série de novos métodos para estudos genéticos e de evolução de plantas vem sendo utilizados. Muitos desses métodos fornecem excelentes meios para aquisição de informações genéticas relevantes a serem empregadas em programas de conservação genética.

O gênero *Drimys* (Winteraceae) (Fig. 1A e 1B), possui duas espécies endêmicas no Brasil: *Drimys angustifolia* e *D. brasiliensis*, as quais são conhecidas como cataia e casca d'anta. Apresentam grande importância ecológica, pois fazem parte de uma família basal de angiospermas. Possuem compostos fitoterápicos que são utilizados na indústria farmacêutica, por isso tem sido alvo do extrativismo desmedido, não havendo registros atuais do real impacto da pressão antrópica sobre a diversidade genética destas espécies.

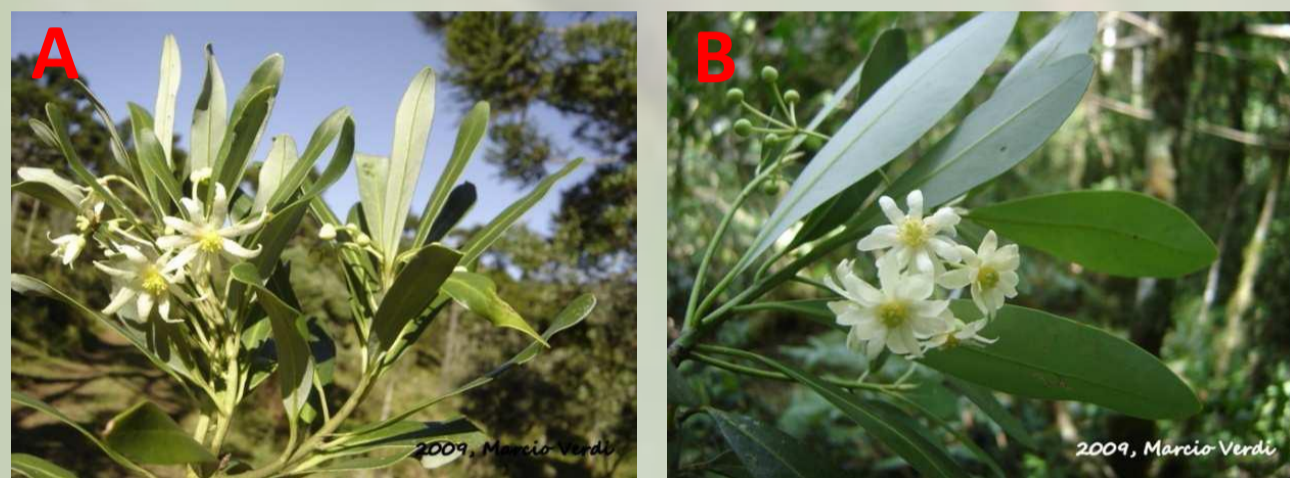


Figura 1. Detalhes das folhas e inflorescências em (A) *D. angustifolia* e (B) *D. brasiliensis*. (Fotos: <http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars>).

Objetivo

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de marcadores microssatélites (SSRs) para *Drimys angustifolia* e *D. brasiliensis* e acessar a diversidade genética em populações dessas espécies no Rio Grande do Sul (RS) em associação ao uso de marcadores plastidiais.

Material e Métodos

Coleta de amostras e extração de DNA

Amostras de folhas de *Drimys* foram coletadas de 92 indivíduos em 5 populações (Fig. 2) e o DNA foi extraído com o protocolo baseado no detergente CTAB (Doyle & Doyle, 1990).

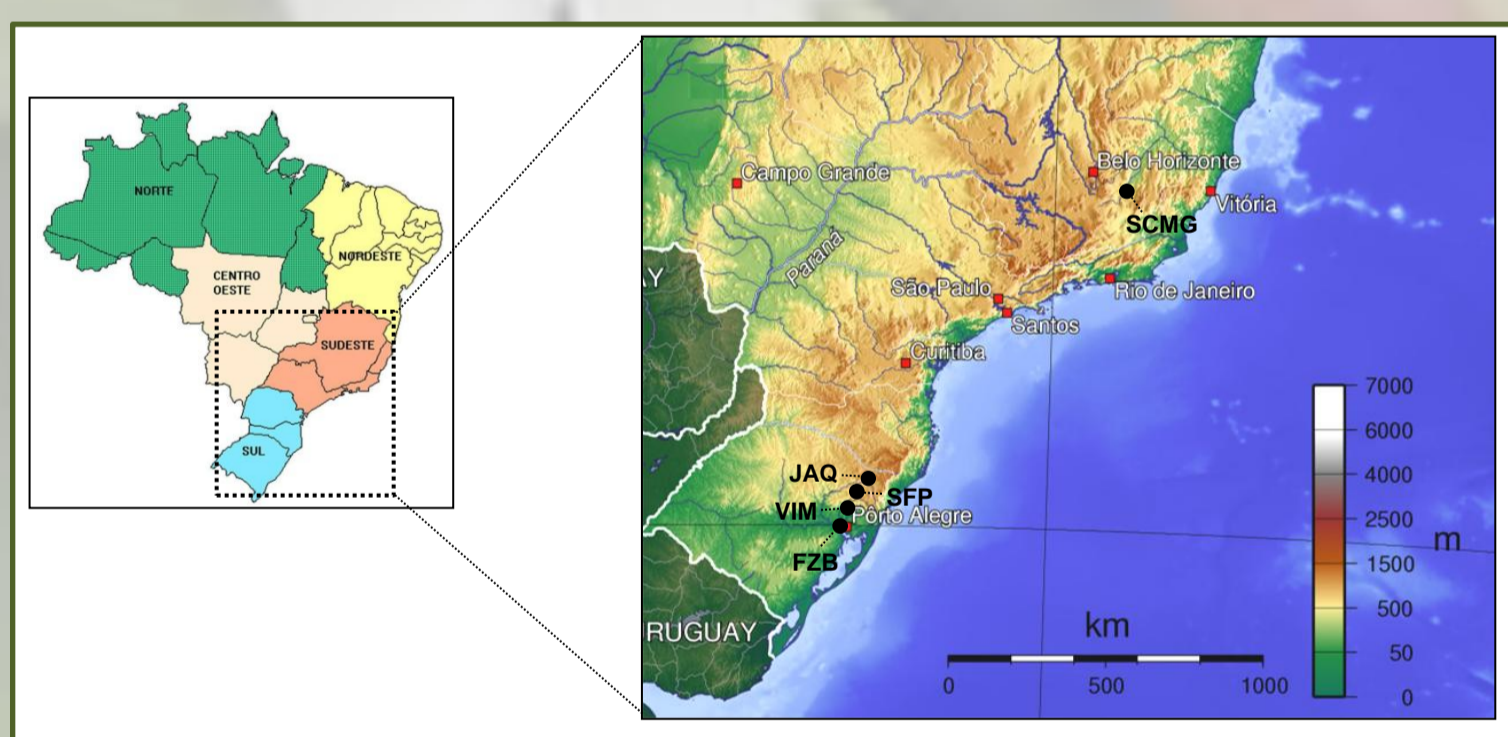


Figura 2. Mapa mostrando as populações de *Drimys* coletadas (círculos em preto).

Caracterização e análise de SSRs

Desenvolvimento dos SSR para *Drimys*: realizado pelo professor Giovanni G. Vendramin, na Itália (colaboração.)

As seqüências recebidas foram analisadas para a identificação dos motivos de SSR (Your Lab Data -yourlabdata.com)

PCR e análise de polimorfismo em sequenciador automático ABI3100

Desenho dos iniciadores utilizando o programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). (Figura 3)

Para a genotipagem em sequenciador foi utilizada a metodologia descrita por Schuelke, 2000, que consiste no uso de um terceiro primer (M13), o qual é marcado com fluorescência.

Sequenciamento de regiões do cloroplasto

Amplificação e sequenciamento de regiões do cloroplasto de amostras de *Drimys* (Tabela 2).

Alinhamento e análise das seqüências ClustalW (Thompson et al. 1994) implementado no software MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007).

Referências Bibliográficas

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**, 3.
Schuelke, M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, **18**, 233-234.
Tamura, K., et al. (2007) Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, **24**, 1596-9.
Thompson, J.D., et al. (1994) Clustal-w - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.

Resultados e Discussão

Microssatélites

Das 96 seqüências analisadas, 67 continham motivos de SSR, sendo a maioria destes com repetições de 2 nucleotídeos. Foram desenhados 22 pares de primers e até o momento 10 deles foram sintetizados (Tabela1). Os primers diretos foram sintetizados com uma extensão M13 (TGTAACGACGGCCAGT) na região 5' de cada primer.

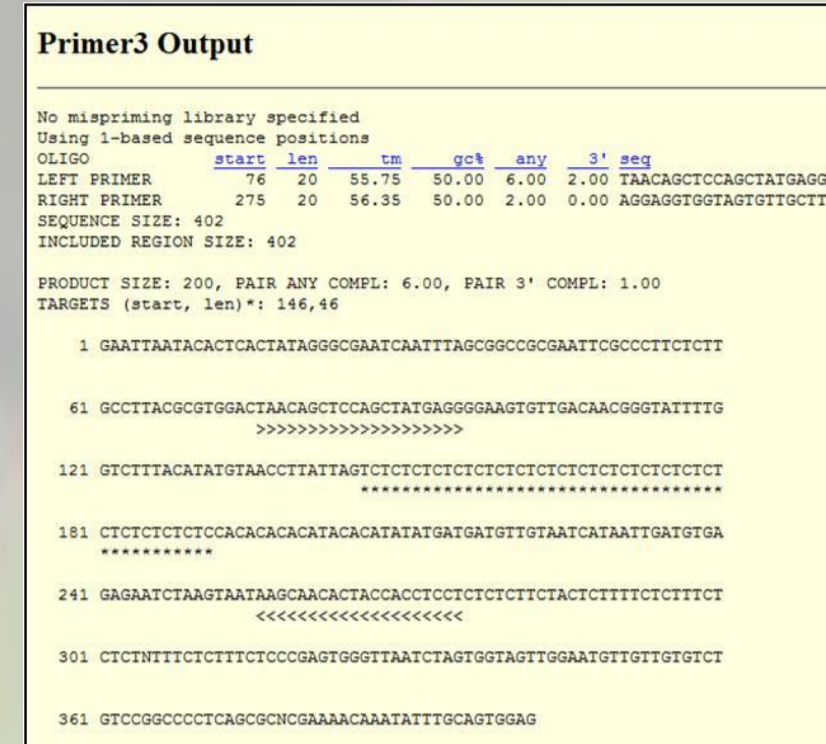


Figura 3. Output do Primer3 mostrando a seqüência dos primers direto e reverso para um locus (Db01). Asteriscos indicam o motivo do locus e os símbolos > e < indicam as seqüências direta (F) e reversa (R), respectivamente.

Os primers foram amplificados com DNA de 8 amostras de *Drimys* de diferentes populações, representando as duas espécies em estudo (*D. brasiliensis* e *D. angustifolia*). A figura 4 mostra o produto de amplificação de quatro primers.

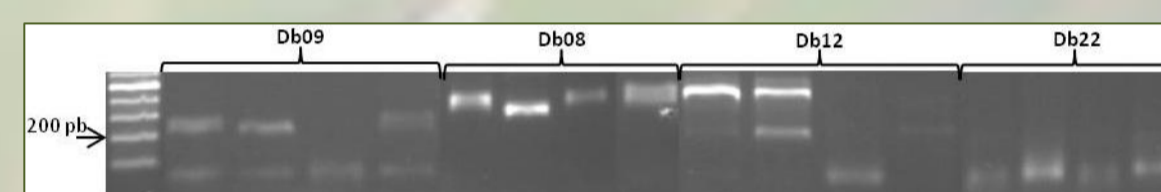


Figura 4. Foto de gel de agarose 1,5%, mostrando o produto de amplificação de quatro primers para SSR de *Drimys*.

Sequenciamento

Dez regiões do cloroplasto e duas nucleares foram amplificadas com DNA de 8 indivíduos de *Drimys* (quatro amostras de *D. angustifolia* e quatro de *D. brasiliensis*) (Tabela 2). Até o momento quatro regiões do cloroplasto foram sequenciadas e duas delas foram polimórficas entre os indivíduos testados. Os polimorfismos encontrados não diferenciam *D. angustifolia* de *D. brasiliensis*.

Tabela 2. Regiões do cloroplasto amplificadas em indivíduos de *D. angustifolia* e *D. brasiliensis*

Marcadores Testados	Seqüência primer 5'-3'	PCR (pb)	Sucesso na amplificação / foto de gel de 4 amostras	Sucesso no Sequenciamento	Polimorfismo
<i>ndhI</i>	F- TTG GGC TTC GAT TAC CAA GG R- TCA ATG AGC ATC TTG TAT TTC	400	SIM	SIM	SIM
<i>rpoB</i>	F- ATG CAA CGT CAA GCA GTT CC R- GAT CCC AGC ATC ACA ATT CC	500	SIM	SIM	NÃO
<i>rpoC1</i>	F- GTG GAT ACA CTT GTT AAT GG R- TGA GAA AAC ATA AGT AAA CGG GC	500	SIM	SIM	SIM
<i>rbclA</i>	F- ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC R- CTT CTG CTA CAA ATA AGA ATC GAT CT	#	NÃO	-	-
<i>rpS16</i>	F- GTG GTA GAA AGC AAC GTG CGA CTT R- TCG GGA TCG AAC ATC AATTGC AAC	800	SIM	**	-
<i>trnG-trnS</i>	F- GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C R- GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC	800	SIM	**	-
<i>trnL-F</i>	F- GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC R- ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	500	SIM	SIM	NÃO
<i>trnL intron</i>	F- CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG R- GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	500	SIM	**	-
<i>ycf5</i>	F- GGA TTA TTA GTC ACT CGT TGG R- CCC AAT ACC ATC ATA CTT AC	#	NÃO	-	-
<i>psbA-trnH</i>	F- ACTGCCTTATGACCTTGGC R- CGAAGCTCCATCACAATGG	400	SIM	**	-
<i>ITSa</i>	F- CCT TAT CAT TTA GAG GAA GGA G R- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	700	SIM	**	-
<i>ITS2</i>	F- ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT R- GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT	400	SIM	**	-
<i>ETS</i>	F- GAG CCA TTG CCA GTT TCA CAG R- CAT GGG CGT GTG AGT GGT GA	#	NÃO	-	-

**Amostras que ainda não foram sequenciadas
Não houve sucesso na amplificação por PCR

Conclusões e perspectivas

Até o momento foram realizadas a identificação de motivos de SSRs e o desenho de iniciadores utilizados na amplificação de regiões do genoma das duas espécies. Os SSRs serão avaliados quanto ao padrão de polimorfismos para essas espécies e utilizados em futura análises de diversidade genética.

O sequenciamento de regiões do cloroplasto permitiu a identificação de duas regiões polimórficas (*rpoC1* e *ndhI*), as quais também serão utilizadas em análises de diversidade.

Com base nos resultados de diversidade genética a serem obtidos, pretende-se disponibilizar informações que possam colaborar e orientar programas de conservação.