

2.02.03 - Genética / Genética Vegetal

Utilização de marcadores microssatélites heterólogos de açaí solteiro

Lídia do Nascimento Cavalcante^{1 *}, Hellen Sandra Freires da Silva Azêvedo², Tatiana de Campos³

1. Graduanda da Universidade Federal do Acre
2. Doutoranda do programa em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte
3. Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa – Acre)

Resumo:

O açaizeiro é uma espécie amazônica de grande importância econômica devido à produção de palmito e da extração da polpa dos frutos. A grande maioria do açaí é nativo, extraído da floresta. Nesse contexto, estudos de variabilidade genética são fundamentais para estimar o impacto da extração na diversidade. Porém, não existem marcadores específicos para o açaí solteiro (*Euterpe precatoria*). O objetivo do estudo foi avaliar a transferibilidade de marcadores microssatélites em *E. precatoria* e analisar a diversidade genética de uma população natural. O estudo foi realizado com 50 indivíduos e nove locos desenvolvidos para *E. edulis*. A diversidade genética foi estimada pelos parâmetros: Heterozigosidade Observada (H_o), Esperada (H_e), Número de Alelos (N) e o conteúdo de Polimorfismo (PIC). Os valores de (H_e) variaram de 0,18 (EE59) a 0,69 (EE54), e os de (H_o) variaram de 0,08 (EE32) a 0,58 (EE54). O número de alelos variou de 2 a 6 alelos/loco. Conclui-se que todos os locos microssatélites desenvolvidos para *E. edulis* foram polimórficos e mostraram-se eficientes para acessar informações genéticas em genomas de *E. precatoria*.

Autorização legal: ICMBio registro: 50570

Palavras-chave: *Euterpe precatoria*; Transferibilidade; Diversidade

Apoio financeiro: Embrapa; FAPAC, CNPq

Introdução:

A floresta amazônica possui uma grande diversidade de espécies vegetais frutíferas, se destacando entre elas o açaizeiro *Euterpe precatoria* Mart. conhecida popularmente como açaí-solteiro. Apesar de sua importância econômica, e utilização como alimento, pouco se conhece sobre a variabilidade genética da espécie. O açaí solteiro apresenta potencial agrônomo, tecnológico, econômico e foi destacada pela comercialização de sua polpa sob a forma de "suco de açaí", que apresenta várias qualidades nutricionais (YUYAMA et al. 2011; YAMAGUCHI et al. 2015).

Tendo em vista, a escassez de dados moleculares e o aumento do destaque da espécie no mercado nacional e internacional é notável a necessidade de estudos para a conservação da espécie já que sua extração de frutos retira grande parte das sementes da floresta e por isso, o uso comercial pode causar perda da diversidade da espécie, podendo resultar em efeitos negativos sobre a estrutura genética das populações.

Para a caracterização da diversidade, há vários marcadores moleculares disponíveis, sendo os mais utilizados os que usam a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). O marcador microssatélite (*Single Sequence Repeat* – SSR) vem sendo utilizado com sucesso na caracterização da diversidade de plantas com grande interesse econômico (OLIVEIRA et al. 2010). Devido às suas características genéticas são marcadores ideais para estudar a variabilidade genética em populações de plantas naturais, porque eles são altamente polimórficos, alélica e codominantes (KALIA et al. 2011; FORTES et al. 2016).

Para o gênero *Euterpe*, os microssatélites foram usados para avaliar a diversidade genética, o sistema reprodutivo e o fluxo gênico em populações naturais de *E. edulis* (Gaiotto et al. 2003; Seoane et al. 2005), e em populações naturais e em coleção de germoplasma de *E. oleracea* (Souza 2002; Oliveira 2005; Oliveira et al. 2010). Para *E. precatoria*, existem registro de Azêvedo et al. (2017), de transferibilidade de locos de microssatélites de *E. edulis* para *E. precatoria*.

Portanto, o uso deste marcador em população natural de açaí-solteiro, a fim de conhecer a variabilidade genética da espécie é de fundamental importância para gerar estratégias para a conservação e manejo da espécie. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar a transferibilidade de marcadores microssatélites em *E. precatoria* e analisar a diversidade genética de uma população natural.

Metodologia:

O estudo foi realizado em população de açaí-solteiro da Terra Indígena Kaxinawá de Nova Olinda, no município de Feijó, estado do Acre. Foram coletados folíolos maduros para a extração de DNA, os quais foram armazenados em microtubos contendo 1,0 mL de tampão de transporte (30% de tampão de extração CTAB a 2%: 70% Etanol) e encaminhados para o Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LabMol) da Embrapa Acre.

A extração de DNA foi realizada em 50 indivíduos, o DNA genômico total foi extraído usando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987) com modificações. O DNA extraído foi quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose (1%).

As regiões de microssatélites foram amplificadas por PCR, utilizando nove locos SSR (EE2; EE8; EE32; EE41; EE45; EE47; EE52; EE54 e EE59) desenvolvidos para *E. edulis* por Gaiotto et al. (2001) e otimizados por Azêvedo et al. (2017). A reação de amplificação foi composta de fragmentos de DNA contendo 5 ng de DNA genômico; tampão 1x; 0,25 mM de cada dNTP; 0,25 mg/mL de BSA (Albumina Sérica Bovina); 2,0 mM MgCl₂; 0,2 µM de cada iniciador e 1 U de Taq polimerase. Totalizando um volume final de 13 µL. Foram testadas as temperaturas (45,0 °C, 45,8 °C, 46,8 °C, 48,2 °C, 50,2 °C, 52,1 °C, 53,6 °C, 55,4 °C, 57,3 °C, 58,5 °C, 59,4 °C e 60 °C) para verificar a temperatura específica de cada loco. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (3%) por meio da eletroforese.

Após as análises foram definidas as temperaturas específicas para cada loco. Posteriormente, as amostras foram submetidas a PCR que consistiram nas seguintes etapas de amplificação: 94 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento definida para cada iniciador por 1 minuto a 72 °C, e uma fase final de extensão de 72 °C por 5 minutos.

A eletroforese para genotipagem foi realizada em gel de poliácridamida desnaturante (5%). A coloração do gel foi realizada utilizando-se nitrato de prata, segundo o Creste et al. (2001). A interpretação dos fragmentos amplificados foi realizada visualmente por meio de comparação com marcador de peso molecular padrão.

Foram estimados os seguintes parâmetros de diversidade genética: Heterozigosidade Observada (*H_o*), Heterozigosidade Esperada (*H_e*), Número de Alelos (N) por Loco e o Conteúdo de Polimorfismo (PIC) pelo programa TFPGA (MILLER 1997). A análise de agrupamento foi realizada usando o método de Neighbor-Joining (NJ) utilizando o programa Darwin (PERRIER; JACQUEMOUND - COLLET 2006).

Resultados e Discussão:

Foram detectadas diferenças no DNA genômico extraído dos indivíduos da população de açaí-solteiro. Houve variação na concentração obtida entre 10 ng/µl a 350 ng/µl (Figura 1).



Figura 1. Quantificação de DNA de 34 amostras de *Euterpe precatoria* em gel de agarose (1%) com o padrão lambda. L: DNA de fago lambda (L₁:10 ng; L₂: 50 ng e L₃: 100 ng).

Verificaram-se diferentes temperaturas de anelamento para os locos estudados (Tabela 1). As temperaturas variaram de 45,8 (EE41) a 57,3 °C (EE45). As temperaturas utilizadas por Oliveira et al. (2010) foram próximas do presente estudo, os locos EE2; EE8 e EE54 variaram respectivamente nas temperaturas entre 56°, 52° e 50°C. Em relação as temperaturas utilizadas por Gaiotto et al. (2001), a maioria diferiu entre 48° a 62°C, apresentando temperaturas muito maiores do que as utilizadas no presente estudo.

Tabela 1 – Descrição dos microssatélites, temperatura específica de anelamento, número de alelos, conteúdo de polimorfismo (PIC), Heterozigosidade esperada (*H_e*) e Heterozigosidade observada (*H_o*)

Loco	Temp. Específica (C°)	N°de alelos	PIC	<i>H_e</i>	<i>H_o</i>
EE02	55,4	2	0,28	0,28	0,34
EE08	50,2	5	0,56	0,57	0,16
EE32	55,4	3	0,26	0,21	0,08
EE41	45,8	5	0,66	0,66	0,44
EE45	57,3	6	0,60	0,60	0,36
EE47	45,8	3	0,35	0,35	0,40
EE52	53,6	3	0,46	0,46	0,14
EE54	50,2	5	0,68	0,69	0,58
EE59	50,2	5	0,18	0,18	0,20

Dentre os nove locos microssatélites testados todos detectaram polimorfismo e produziram bandas definidas (Tabela 1). O sucesso na amplificação dos nove locos para os indivíduos sugere alto nível de conservação das sequências dos iniciadores entre as espécies, como esperado dentro de gêneros (KALIA et al. 2011).

Verificou-se variação no nível de polimorfismo entre os locos. Os valores de PIC variaram de 0,18 (EE59) a 0,69 (EE54) com média de 0,51. De acordo com a classificação definida por Botstein et al. (1980), os marcadores com valores PIC maiores que 0,5 são considerados altamente informativos. Em outros trabalhos realizados com espécies da mesma família (Arecaceae) foram encontrados valores semelhantes de PIC: *Elaeis quineensis*: PIC = 0,53 (SINGH et al. 2008).

O número de alelos variou de dois (EE02) a seis (EE45) alelos por loco (Tabela 1). É importante ter

conhecimento sobre a dinâmica dos alelos em populações naturais pois, isso contribui para saber como os alelos poderão ser combinados na próxima geração permitindo o estabelecimento de estratégias de seleção genótipos superiores e a manutenção da variabilidade genética para uso futuro em programas de melhoramento para definição de estratégias de manejo e conservação (RODRIGUES 2007).

Os valores de (H_e) variaram de 0,18 (EE59) a 0,69 (EE54) com média de 0,44. Esse valor foi inferior aos descritos para *E. edulis* em outras regiões ($H_e = 0,781$, CONTE et al. 2008; $H_e = 0,86$ GAIOTTO et al. 2003) e semelhante ou superior aos detectados em estudos realizados com espécies da mesma família: *Chanaerops himilus* L.: $H_e = 0,01$ a 0,39 (GIOVINO et al. 2014), *Phoenix carariensis*: $H_e = 0,27$ a 0,62 (SARO et al. 2015). Tais resultados mostram que os SSR utilizados neste trabalho estão dentro do padrão encontrado para Arecaceae (Tabela 1).

Em relação aos valores de heterozigosidade observada, houve variação de 0,08 (EE32) a 0,58 (EE54), com média de 0,30. A diferença entre as médias H_e e H_o foi baixa (0,14) indicando presença de heterozigotos mostrando que existe variabilidade genética razoável. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Conte et al. (2006), onde o valor médio de H_o também foi menor que o de H_e ($H_o = 0,378$; $H_e = 0,403$) para *E. edulis*.

A análise de agrupamento realizada pelo método de Neighbor-Joining constatou a formação de dois grupos, em que o primeiro obteve indivíduos mais distantes entre si, e o segundo grupo teve indivíduos mais próximos (Figura 2).

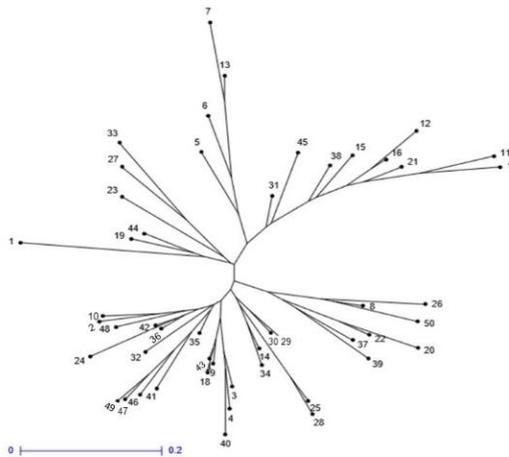


Figura 2. Análise de agrupamento realizada pelo método de Neighbor-Joining em 50 indivíduos de *Euterpe precatória*, com nove locos microssatélites.

A diferenciação genética é a distribuição da variabilidade na população, onde os alelos e os genótipos ocorrem de maneira heterogênea sendo resultado da ação de forças evolutivas que atuam dentro do contexto de cada espécie (HAMRICK 1993). Tendo isso em vista, o conhecimento da diversidade genética de populações e suas flutuações ao longo das gerações é importante para estabelecimento de estratégias de coleta, conservação e manejo mais eficientes. Os níveis de diversidade genética entre e dentro das populações podem ser influenciados pelo sistema de reprodução e os mecanismos de dispersão do pólen e sementes (HAMRICK et al. 1993).

O conhecimento da variabilidade genética dentro de populações naturais de açaí-solteiro desempenha um importante papel na dinâmica da floresta, principalmente por ser fonte de alimento para animais, ter a capacidade de crescer em florestas de terra firme e baixo, e pela ampla distribuição e importância econômica, tornam-se fundamental para orientar a prospecção dos seus frutos, o manejo e o melhoramento genético da espécie.

Conclusões:

Conclui-se que todos os locos microssatélites transferidos foram polimórficos e mostraram-se viáveis para acessar informações genéticas de *E. precatória*.

Referências bibliográficas

AZÊVEDO, H.S.F.S.; BENVINDO, F.D.; CAVALCANTE, L.N., HAVERROTH, M.; WADT, L.H.O.; CAMPOS, T. Transferability of heterologous microsatellite loci between species of *Euterpe* genus, São Francisco, and Parana River valleys of Brazil. **Genet. Mol. Res.** 16: 1-7. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039825>

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage in man using restriction fragment length polymorphism. **The American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 5314-331, 1980.

CONTE, R.; REIS, M.S.; VENCOVSKY, R. Effects of management on the genetic structure of *Euterpe edulis* Mart. populations based on microsatellites. **Scientia Forestalis**, v. 72, p. 81-88, 2006.

- CONTE, R.; REIS, M. S.; MANTOVANI, A.; VENCOVSKY, R. Genetic Structure and Mating System of *Euterpe edulis* Mart. Populations: A Comparative Analysis Using Microsatellite and Allozyme Markers. **Journal of Heredity**, v. 5, p. 476–482, 2008.
- CRESTE, S.; TUMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology**, v.19, p. 299-306, 2001.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue (1990). **Focus**, v. 12, p. 13–15.
- FORTES; A.C.R, OLIVEIRA; M.D.S.P, OLIVEIRA; N.P, SANCHES; E.D.N.M, et al. (2016). Transferibilidade de locos microssatélites desenvolvidos em outras espécies de palmeiras para *Astrocaryum vulgare* Mart. **Rev. Ciênc. Agrária**. 59: 80-86.
- GAIOTTO, F.A.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Palmae). **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 86-88, 2001.
- GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, v. 5, p. 399–406, 2003
- GIOVINO, A.; SCIBETTA, S.; SAIA, S.; GUARINO, C. Genetic and morphologic diversity of European fan palm (*Chamaerops humilis* L.) populations from different environments from Sicily. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.176, p. 66–81, 2014
- HAMRICK, J.L.; MURAWSHI, D.A.; NASON, J.D. 1993. The influence of seed dispersal mechanism on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetatio**, p.281-29
- KALIA, R.K; RAI, M.K; KALIA, S.; SINGH, R.; et al. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**. 177: 309-334.
- PERRIER, X.; JACQUEMOUND-COLLET, J. P. 2006. **DARwin software**. Available from. <<http://www.darwin.cirad.fr/darwin>>. Acesso em: 15 janeiro de 2018.
- RODRIGUES, D. P. 2007. Diversidade Genética e Sistema de Reprodução em Progênieis Elites de Pupunheira Inerme (*bactris gasipaes* kunth) com marcadores Microssatélites: Implicações para o Melhoramento do Palmito. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 105 p.
- SARO, I.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M. A.; GARCÍA-VERDUGO C.; SOSA, P. Patterns of genetic diversity in Phoenix canariensis, a widespread oceanic palm (species) endemic from the Canarian archipelago. **Tree Genetics & Genomes**, p.11-815 2015.
- SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; RIBEIRO, M.; REIS, M. S.; BAWA, A, M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Revista do Instituto Florestal**, v. 17, n. 1, p. 25-43, 2005
- SINGH, V.; KUMA, V. An optimised method of DNA isolation from highly mucilage rich okra (*Abelmoschus esculentus* L.) for PCR analysis. **Pelagia Res Library**, v. 3, p. 1809–181, 2010.
- SOUZA, P.C.A; 2002. **Aspectos ecológicos e genéticos de uma população natural de *Euterpe oleracea* Mart. no estuário amazônico**. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura —Luiz de Queirozll, Piracicaba. 60 p.
- OLIVEIRA, M.S.P. (2005). **Caracterização molecular e morfo-agronômica de germoplasma de açaizeiro**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 183 p.
- OLIVEIRA, M.S.P.; SANTOS, J.B.; AMORIM, E.P.; FERREIRA, D.F.; Genetic variability among accessions of assai palm based on microsatellite markers. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1253-1260, 2010.
- YAMAGUCHI, K.K.L.; PEREIRA, L.F.R.; LAMARÃO, C.V.; and LIMA, E.S. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, 2015
- YUYAMA, L.K.O; AGUIAR, J.P.L; SILVA, D.F, YUYAMA K. (2011). Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amaz.** 41: 545-552.