



70 Congresso
Brasileiro de
Melhoramento
de Plantas

05 a 08 de agosto de 2013
Center Convention - UBERLÂNDIA - MG

Variedade Melhorada:
A força da nossa agricultura



ANAIS

Transferibilidade de Locos SSR de *Phoenix dactylifera* para *Astrocaryum vulgare*¹

Andréa Cristina Rodrigues Fortes², Maria do Socorro Padilha de Oliveira³, Natália Padilha de Oliveira⁴
Ilenilce Castro da Silva⁵

Resumo

Este trabalho foi realizado com o objetivo de testar a transferibilidade de locos SSR de *Phoenix dactylifera* para a espécie *Astrocaryum vulgare*. Para isso, foram aplicados onze locos desenvolvidos para *P. dactylifera* com variação de seis temperaturas de anelamento, em DNA de seis indivíduos adultos de *A. vulgare*. As reações de amplificação foram conduzidas de acordo com o protocolo desenvolvido com pequenas adaptações. Os produtos da amplificação foram aplicados em gel de agarose ultra pura a 3,5%, corado com brometo de etídio e submetido à eletroforese horizontal por duas horas. Em seguida, os géis foram fotodocumentados e as imagens armazenadas digitalmente. A transferibilidade dos locos foi avaliada com base na produção ou não de produto amplificado nas amostras de DNA. Dos onze locos testados, apenas dois apresentaram amplificação satisfatória (visualização do produto), perfazendo uma taxa de transferibilidade de 18%, sugerindo que as espécies possuam baixo grau de parentesco. Nos dois locos amplificados foi detectada também a presença de produtos secundários, o que pode gerar dificuldades na contagem de alelos por loco em gel de poliacrilamida. Esses resultados indicam baixa taxa de transferibilidade de locos de *P. dactylifera* para *A. vulgare* e, portanto, não devam ser indicados para acessar o genoma de *A. vulgare*.

Introdução

Astrocaryum vulgare Mart., conhecida por tucumã, é uma palmeira nativa, pioneira que cresce nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e em países vizinhos como Guiana, Peru e Venezuela (Bora et al. 2001). A espécie possui importância econômica e social na Amazônia, visto que a população local a utiliza frequentemente como fonte de alimentos, já que possui polpa com elevado conteúdo de lipídeos e vitamina E, e fibras. Além disso, seu óleo possui várias características desejáveis pela indústria fármaco-cosmética e, mais recentemente, tem sido indicada como matéria prima para a produção de biodiesel. Há relatos de que na Amazônia Oriental ocorra um importante centro de diversidade do gênero *Astrocaryum* (Lleras et al. 1983; Roncal et al. 2013). Apesar disso, informações genéticas sobre as espécies desse gênero são escassas, necessitando de investigações.

Uma das opções que se tem para se inferir sobre o genoma de agrupamentos (progênies, populações, etc.) de uma espécie é por meio do uso de marcadores moleculares, uma vez que elimina o inconveniente do tempo, fator limitante para caracterização dos recursos genéticos vegetais por métodos mais baratos como os marcadores morfológicos, quando se fala em espécies perenes, como o tucumã. Dentre os diversos marcadores que podem ser utilizados para caracterização, estão os microssatélites que são sequências de DNA repetidas em tandem e ocorrem frequentemente no genoma de organismos eucariotos. Entretanto, a caracterização por meio desses marcadores requer a existência de primers desenvolvidos para cada espécie, o que é um processo elaborado e caro. Porém, como ocorre à conservação de sítios microssatélites entre espécies relacionadas, existe a possibilidade de se realizar a transferência de locos entre espécies do mesmo gênero, ou mesmo de gêneros diferentes utilizando-se primers heterólogos (Fantin, 2008). Na literatura disponível não há relatos de desenvolvimento de locos microssatélites para a espécie em questão, nem para espécies do mesmo gênero. Porém, Billote et al. (2004), desenvolveram dezesseis locos microssatélites

1 Trabalho desenvolvido pela Embrapa Amazônia Oriental com o apoio do projeto PROPALMA.

2 Mestranda da Pós-graduação em Biotecnologia aplicada à Agropecuária. UFRA/Belém. Bolsista CAPES. e-mail: andreafortes@rocketmail.com

3 Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental-CPATU-EMBRAPA/Belém. e-mail: socorro-padilha.oliveira@embrapa.br

4 Doutoranda da Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas- UFLA/Lavras. e-mail: natybiologia2006@gmail.com

5 Mestranda da Pós-graduação em Biotecnologia aplicada à Agropecuária. UFRA/Belém. e-mail: ilenilcecastrolamarck@gmail.com

para *P. dactylifera* e mencionaram que doze deles seriam transferíveis para espécies do gênero *Astrocaryum* (*A. alatum*, *A. chambira*, *A. chonta*, *A. sciophilum*, *A. scopatum*, *A. urostachys*).

Desta forma, investigou-se a transferibilidade de locos microssatélites desenvolvidos para *Phoenix dactylifera* que possam ser úteis em estudos genéticos de *Astrocaryum vulgare*.

Material e Métodos

Foram coletados folíolos de 90 matrizes de tucumazeiro pertencentes a povoamentos florestais de três diferentes mesorregiões do Estado do Pará: Baixo Tocantins, Nordeste Paraense e Ilha de Marajó, cada uma representada por dois municípios, totalizando seis, sendo eles: Oeiras do Pará e Irituia (Baixo Tocantins), Cachoeira do Arari e Salvaterra (Ilha de Marajó), Mocajuba e Santa Maria (Nordeste Paraense) para a extração do DNA genômico.

A extração de DNA seguiu o protocolo proposto por Doyle & Doyle (1990) com pequenas adaptações (Costa and Oliveira 2002). A quantificação das 90 amostras de DNA foi realizada em gel de agarose a 1,0 %, pela comparação com três concentrações do DNA Bacteriófago íntegro lambda, sendo a leitura feita com o auxílio do programa Labimage. Após a quantificação as amostras foram diluídas em água estéril, de modo a conter 10 ng/ul de DNA, sendo em seguida armazenadas a -20 °C.

Para a realização das reações de PCR com vista a transferibilidade foram utilizadas seis amostras, as quais foram escolhidas ao acaso, de modo que uma amostra de cada município fosse testada. Onze dos doze locos desenvolvido para *Phoenix dactylifera* por Billote et al. (2004) foram aplicadas nas amostras de DNA de *A. vulgare* em seis temperaturas de anelamento diferentes (Tabela 1), correspondendo a intervalos acima e abaixo das temperaturas utilizadas no desenvolvimento dos locos (Billote et al., 2004).

As reações de amplificação foram realizadas de acordo com o protocolo desenvolvido por Billote et al. (2004) com adaptações, em um volume final de 10 ul, contendo volumes de 3,8 µl de H₂O mili-Q; 1,0 µl do buffer Tampão 10X; 1,0 µl de mix dNTP (100 µl de cada dNTP mais 600 µl H₂O mili-Q); 1,0 µl de MgCl₂ (2,5 mM/µl); 0,5 µl de *primer reverse* (2,5 mM/µl); 0,5 µl de *primer forward* (2,5 mM/µl); 0,2 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl); e 1,0 µl de DNA genômico (10 ng/µl). As amplificações foram feitas em termociclador Veriti (Applied Biosystems) com programação feita em dois passos, conforme descrito por Ramos et al. (2011).

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese horizontal por duas horas, em gel de agarose ultrapura a 3,5 %, corado com brometo de etídio, sendo colocados em cada poço 12 ul de cada reação, acrescido de 5 ul de azul de bromofenol. O tampão do gel e de corrida foi o TBE (Trizma base 0,1 M; ácido bórico 1M e EDTA 0,5M). Após a eletroforese, os géis foram fotodocumentados em equipamento que utiliza luz ultravioleta e armazenados digitalmente para a interpretação.

A transferibilidade dos locos foi avaliada visualmente com base na produção ou não de produto amplificado nas amostras de DNA. No caso da amplificação, observamos se houve a presença de produtos secundários.

Resultados e Discussão

Dos onze locos testados, apenas dois (Tabela 1) apresentaram resultados satisfatórios de amplificação (visualização do produto), perfazendo uma taxa de transferibilidade de 18%, considerada baixa. Billote et al. (2004) aventaram a possibilidade desses locos serem transferíveis para espécies do gênero *Astrocaryum*, principalmente para *A. alatum*, *A. chambira*, *A. chonta*, *A. sciophilum*, *A. scopatum*, *A. urostachys*. Mas, não demonstraram a transferibilidade. Para Gonçalves et al. (2010) a transferibilidade de locos SSR depende do grau de parentesco genético das espécies analisadas. Há relatos também de que o sucesso da transferibilidade diminui com o aumento da distância filogenética entre as espécies envolvidas (Pereira et al. 2009). Tais resultados sugerem que *A. vulgare* possua baixo grau de parentesco com *P. dactylifera*. A Figura 1 consta o padrão de amplificação obtido pelo loco mPd015, em gel de agarose, nas amostras de DNA de *A. vulgare*.

Tabela 1 Locos microssatélites de *P. Dactylifera*¹ testados em *A. vulgare* com as temperaturas de anelamento

e a informação de amplificação.

Locos	Tamanho (bp)	Ta ¹ (°C)	Ta testadas (°C)	Amplificação
mPd 010	180	55,9	53-54-55-56-57-58	Não
mPd 015	253	51,6	49-50-51-52-53-54	Sim
mPd 016	209	51,7	49-50-51-52-53-54	Não
mPd 025	269	49,3	47-48-49-50-51-52	Não
mPd 032	376	51,5	49-50-51-52-53-54	Sim
mPd 035	341	53,9	51-52-53-54-55-56	Não
mPd 044	340	51,7	49-50-51-52-53-54	Não
mPd 048	439	51,4	49-50-51-52-53-54	Não
mPd 050	568	48,5	46-47-48-49-50-51	Não
mPd 063	301	49,8	47-48-49-50-51-52	Não
mPd 070	265	48,7	46-47-48-49-50-51	Não

¹: Desenvolvidos por Billote et al. (2004).

Nos dois locos amplificados, mPd015 e mPd032, foi detectada a presença de produtos secundários em ambos (Figura 1), o que pode gerar dificuldades na contagem de alelos no loco amplificado em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% (Figura 2). Para esses locos as temperaturas ótimas de amplificação foram 52°C e 50°C, respectivamente.

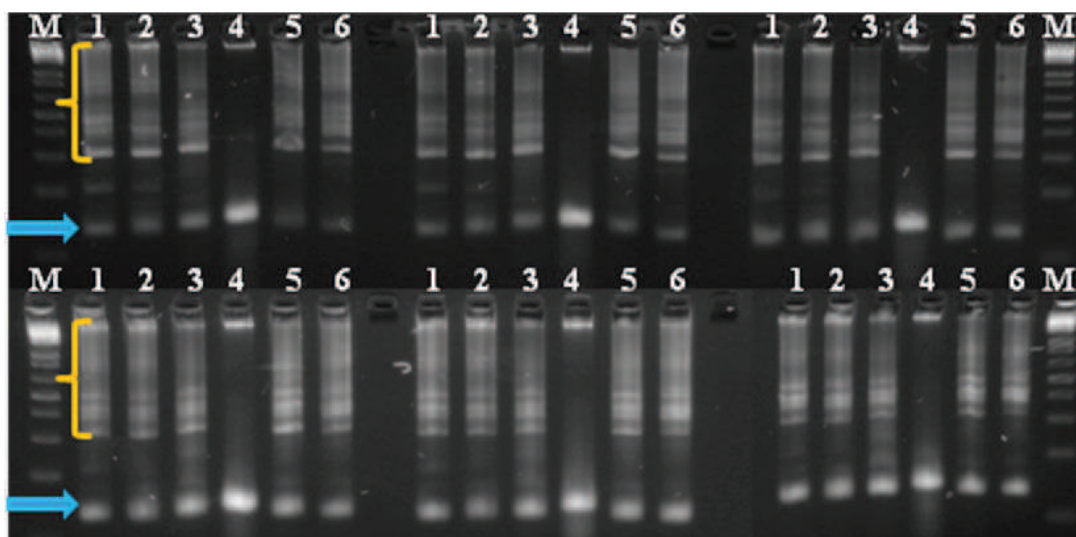


Figura 1 Produtos de amplificação do loco mPd015 desenvolvido para *P. dactylifera*, em gel de agarose, em seis amostras de DNA de *A. vulgare* testadas, em seis temperaturas de anelamento 49°C, 50°C e 51°C (em cima) e 52°C, 53°C e 54°C (em baixo). Detalhe da amplificação do loco e da presença (seta) de produtos secundários (chave).

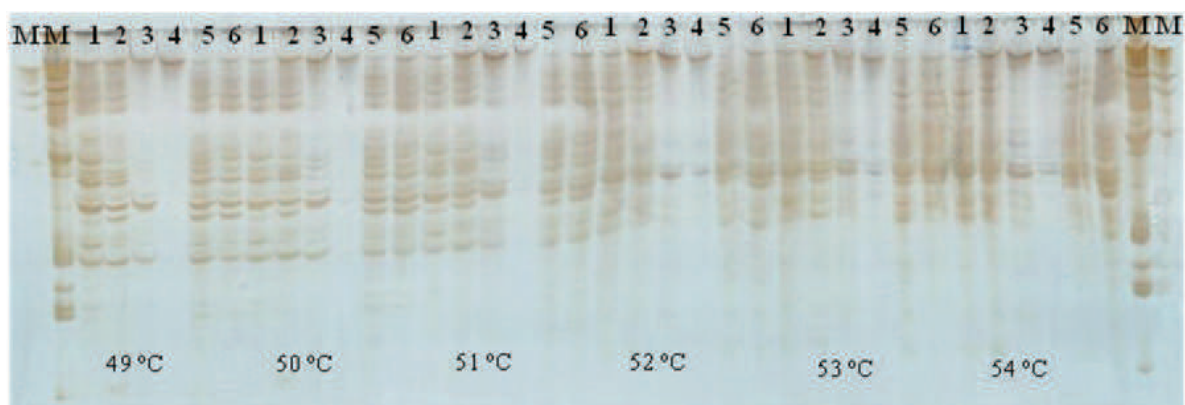


Figura 2 Produtos de amplificação do loco mPd015, em gel de poliacrilamida, obtido em seis amostras de DNA de *A. vulgare* em seis temperaturas de anelamento. Detalhe da amplificação dos alelos no loco e da presença de produtos secundários.

A baixa taxa de transferibilidade de locos de *P. dactylifera* para *A. vulgare* sugere que tais espécies possuam pouca similaridade genética, ou seja, um baixo grau de parentesco, uma vez que a transferibilidade de locos microssatélites depende do grau de parentesco genético das espécies analisadas (Gonçalves et al. 2010). Embora ambas as espécies sejam da mesma família botânica (Arecaceae), elas devem ter origens diferentes e possuem também áreas de ocorrência bastante distintas, o que provavelmente contribui para a baixa taxa de transferibilidade encontrada. Com base no exposto, acredita-se que tais locos não devam ser indicados para acessar o genoma de *A. vulgare*.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FUNARBE e a Embrapa Amazônia Oriental pelo auxílio financeiro na condução do projeto, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de mestrado a primeira autora.

Referências

- Billote N et al. (2004) Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. **Molecular Ecology Notes** 4: 256–258.
- Bora PS (2001) Characterization of the oil and protein fractions of tucuma (*Astrocaryum vulgare* Mart.) fruit pulp and seed kernel. **Ciencia e Tecnologia dos Alimentos** 3 n.2: 111-116, 2001.
- Costa MR and Oliveira MSP do (2002) Extração de DNA de açazeiro a partir de folhas. **Embrapa Amazônia Oriental, Documentos** 127.
- Doyle JJ and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15.
- Gonçalves FK, Fávero TM, Pinto LR (2011) Avaliação de transferibilidade de microssatélites funcionais de sorgo (EST-SSR) visando a construção de mapas de ligação em cana-de-açúcar. **Anais do 5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica-CIIC**.
- Oliveira MSP, Coutourier G, Beserra P (2003) Biologia da polinização da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) em Belém, Pará, Brasil. **Acta botânica brasileira** 17 n.3: 343-353.
- Pereira AA, Clement CR, Rodrigues DP (2009) Transferibilidade de locos microssatélites de pupunha (*Bactris gasipaes*) e côco (*Cocos nucifera*) para buriti (*Mauritia flexuosa*). **61ª Reunião Anual da SBPC**.
- Ramos SLF et al (2011) Determination of the mating system of tucumã palm using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 11: 181-185.
- Roncal J et al. (2013) Cenozoic colonization and diversification patterns of tropical American palms: evidence from *Astrocaryum* (Arecaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 171: 120–139.