

EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE AÇAÍ-SOLTEIRO

Lídia do Nascimento Cavalcante¹, Fernanda Dantas Benvindo¹, Hellen Sandra Freires da Silva Azêvedo²; Susana Maria Mello Silva²; Lucielio Manoel da Silva³ e Tatiana de Campos⁴

1. Graduanda da Universidade Federal do Acre (UFAC)
2. Doutoranda do programa em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte
3. Analista de pesquisa da Embrapa - Acre e doutorando do programa em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte
4. Pesquisadora da Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária (Embrapa – Acre)

Resumo:

Euterpe precatoria é uma espécie de grande importância econômica e muito utilizada como alimento pelos povos da região Amazônica. O objetivo do estudo foi avaliar extração e amplificação de DNA e a diversidade genética de *E. precatoria*. O estudo foi realizado em 25 indivíduos. O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose 1% e realizado teste de temperaturas de anelamento para amplificação em oito locos. A diversidade genética foi estimada pelos parâmetros: Heterozigosidade Observada (H_o), Esperada (H_e), Número de Alelos (N) e o conteúdo de Polimorfismo (PIC). As distâncias genéticas de Rogers foram calculadas e usadas na construção do dendrograma. As quantidades de DNA variaram de 20ng/μl a 300ng/μl. Os valores de (H_e) variaram de 0,129 a 0,682 e os de (H_o) variaram de 0,00 a 0,533. O número de alelos variou de 2 a 4 alelos/loco. Conclui-se, que o protocolo usado na extração funcionou e a diversidade genética na população de *E. precatoria* estudada com apenas três locos é baixa.

Autorização legal: ICMBio registro: 50570

Palavras-chave: açaizeiro; variabilidade genética; marcadores moleculares

Apoio financeiro: Embrapa Acre; Fapac/CNPq

Introdução:

A palmeira (*Euterpe precatoria* Mart.) conhecida popularmente como açaí-solteiro é uma espécie de grande importância econômica e apresenta importante papel social. Faz parte da tradição e identidade dos povos ribeirinhos e indígenas da região amazônica.

Atualmente, o consumo do mesocarpo dos seus frutos “suco de açaí” vem se destacando no mercado nacional e internacional, devido ao seu alto valor nutricional (YAMAGUCHI et al., 2015).

Apesar de sua importância econômica, e utilização como alimento, pouco se conhece sobre a variabilidade genética da espécie *E. precatoria*. Na literatura, são encontradas pesquisas na área de genética apenas para *E. oleracea* e *E. edulis* (CONTE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2010).

Para a caracterização da diversidade, há vários marcadores moleculares disponíveis, sendo os que usam a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como os microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeat*).

Esses marcadores SSR são sequências curtas, que contêm de 1 a 6 pares de bases repetidas lado a lado no genoma, são codominantes, múltialélicos, com análise de polimorfismos relativamente simples, necessitam de pequenas quantidades de DNA nas reações de PCR, além de serem plenamente transferíveis entre espécies taxonômicas e até mesmo de gêneros distintos (GAIOTTO et al., 2001; GRATTAPAGLIA, 2007).

O marcador SSR vem sendo utilizados com sucesso na caracterização da diversidade de plantas com grande interesse econômico (OLIVEIRA et al., 2010).

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 extração e amplificação do DNA e diversidade genética de açaizeiro (*Euterpe precatoria*).

Metodologia:

O estudo foi realizado em população de açaí-solteiro da Terra Indígena Kaxinawá de Nova Olinda, no município de Feijó, estado do Acre.

A extração de DNA foi realizada em 25 indivíduos. 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.

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 %). A reação de amplificação dos microssatélites foi testada a partir da literatura disponível (GAIOTTO et al., 2001).

Para a amplificação do DNA foi testada usando duas concentrações de Taq polimerase em oito locos microssatélites em 15 amostras. As reações de amplificação dos fragmentos de DNA foram feitas 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, sendo o volume final de 13 μl. No segundo teste foi alterada somente a quantidade de Taq polimerase que foi de 2,5 U. Também foram testadas as temperaturas (45,0; 45,8; 46,8; 48,2; 50,2; 52,1; 53,6; 55,4; 57,3; 58,5; 59,4; e 60 °C) para verificar a temperatura específica de cada loco.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (3%).

Após as análises foram definidas as temperaturas específicas para cada loco. Posteriormente, as amostras foram submetidas às 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 poliacrilamida 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). As distâncias genéticas foram calculadas utilizando-se a distância modificada de Rogers e foi usada na construção do dendrograma pelo critério de agrupamento UPGMA.

Resultados e Discussão:

Foram detectadas diferenças na quantidade do DNA genômico extraído dos indivíduos da população de açai-solteiro. As quantidades variaram de 20 ng/μl a 300 ng/μl (Figura 1). Resultados similares foram observados por Costa et al. (2002) ao extraírem DNA da espécie *E. oleracea*, os autores obtiveram quantidades de DNA variando de 40 ng/μl a 313 ng/μl.

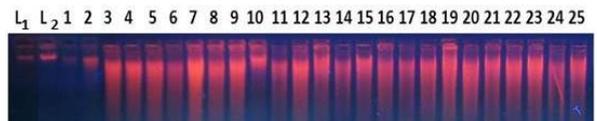


Figura 1. Quantificação de DNA de 25 amostras de *Euterpe precatoria* em gel de agarose (1%) com o padrão lambda. L: DNA de fago lambda (L₁-40 ng e L₂ -100 ng).

Em relação à concentração de Taq polimerase, a concentração de (2,5 U) foram que funcionaram nas PCRs.

Verificaram-se diferentes temperaturas de anelamento para os locos estudados. As temperaturas variaram de 46,8 (EE5) a 62, 0 °C (EE9). Alguns locos apresentaram a mesma temperatura de anelamento, o loco EE9 foi o único que houve a necessidade de ajuste de temperatura (62, 0 °C) superior das testadas.

Os resultados corroboram com os encontrados por Gaiotto et al. (2001), que observaram que a temperatura 62 °C amplificou de forma satisfatória na transferibilidade de *E. edulis* para *E. oleracea*. Oliveira et al. (2010) também precisaram otimizar seus procedimentos ao transferirem locos de *E. edulis* para *E. oleracea*. As temperaturas utilizadas por Oliveira et al. (2010) foram próximas ao do presente estudo, os locos EE2, EE8, EE23 variaram respectivamente nas temperaturas entre 56°, 52° e 56 °C.

Dentre os oito microssatélites testados, três locos (EE2; EE8 e EE23) detectaram polimorfismo e produziram bandas definidas. Os demais locos foram monomórficos ou inespecíficos (EE03, EE05, EE09, EE15, EE25).

Verificou-se variação no nível de polimorfismo entre os locos polimórficos. Os valores de PIC variaram de 0,129 (EE 23) a 0,660 (EE 08). Esse resultado se difere com os de Oliveira et al. (2010), que encontraram na maioria dos locos, um conteúdo informacional de polimorfismo (PIC) elevado, variando de 0,60 a 0,86. Entretanto, nota-se que no loco EE8 que possui o maior número de alelos o seu PIC também é maior, dando ênfase na observação de que quanto maior no número de alelos, maior será o valor do PIC. O número de alelos variou

de 02 (EE 02) a 4 (EE08) alelos/loco.

Os valores de heteroziguidade esperada (H_e) variaram de 0,129 (EE23) a 0,682 (EE08) e os valores de heteroziguidade observada de 0,00 (EE23) a 0,533 (EE08). No trabalho de Oliveira et al. (2010) constatou-se para as heteroziguidades esperadas variações de 0,60 a 0,85. No caso das observadas os valores variaram de 0,51 a 0,99.

Observa-se, que locos que exibem menor valor H_o , possuem menor número de alelos, sendo observado no loco EE23 valor de 0,00 por apresentar apenas dois tipos de alelos. De acordo com Weir (1996), espera-se que o valor do PIC seja similar ao da estimativa da heteroziguidade esperada (H_e), sendo ambos sinônimos de diversidade genética.

Com base na distância Modificada de Rogers os indivíduos foram agrupados pelo método UPGMA (Figura 2). Verificou-se que os indivíduos (11, 14 e 03), (9, 15 e 07), (05, 10 e 02) e (04 e 06) apresentaram zero de distância genética e os indivíduos (11 e 12, 14 e 12) foram os que apresentaram as maiores distâncias (0,817).

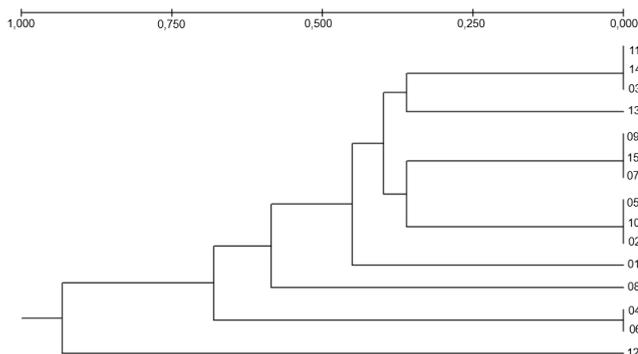


Figura 2. Agrupamento UPGMA de 15 indivíduos de *Euterpe precatoria* com três microssatélites, de acordo com as distâncias de Rogers modificado.

O valor encontrado em Oliveira et al. (2010) na matriz de distâncias genéticas formada pelos 116 acessos foram altamente variáveis, indo desde totalmente similares (0,00) a quase dissimilares (0,96), apresentando um resultado similar com o presente estudo. Segundo os autores, essa similaridade pode estar associada ao fato dos acessos terem a mesma procedência e ambiente de coleta.

Utilizando o agrupamento construído pelo dendrograma é possível observar que existe variabilidade genética entre os indivíduos analisados de açaí-solteiro, entretanto pelo fato de ter sido utilizado apenas três locos microssatélites polimórficos gera-se pouca distância genética, apresentando assim muitos indivíduos com o mesmo perfil alélico.

Conclusões:

O protocolo para extração de DNA testado foi adequado para açaí-solteiro. A concentração de Taq polimerase para PCR é de 2,5 U e cada loco tem temperatura específica para anelamento na PCR. A população de *E. precatoria* apresenta baixa variabilidade genética, porém vale ressaltar que foi analisada com base em três locos. Porém, estudos estão sendo realizados com mais locos microssatélites para ser ter a real variabilidade da espécie.

Referências bibliográficas

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

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.

COSTA, M.R.; OLIVEIRA, M.S.P. Extração de DNA de Açaizeiro a Partir de folhas. Embrapa Amazônia Oriental. Documentos. Belém: 2002. 22p.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue (1990). **Focus**, v. 12, p. 13-15.

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.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. (Ed.). Biotecnologia florestal. Viçosa, MG: UFV, 2007.p.175-200.

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.

WEIR, B.S. Genetic data analysis: methods for discretion population genetic data. Sunderland:

Sinauer Associates, 1996. 377p.