

Análise Genética em Populações de *Trithrinax brasiliensis* Mart. Utilizando Marcadores Moleculares RAPD

Ana Yamaguishi Ciampi¹, Patrícia Sanae Sujii² e Manuela Raquel de Mello e Alegria³

Introdução

Trithrinax brasiliensis Mart. (Arecaceae) espécie endêmica da Região Sul do Brasil, ocorre de maneira descontínua, em áreas restritas e isoladas [1]. A espécie é caracterizada por indivíduos com até 10 metros de altura, com folhas palminérvias, com um tufo de pelos no ápice do estirpe, apresentando inflorescências amarelas e frutos carnosos de sabor dulcíssimo. Também conhecido como Palmeira de Buriti é utilizado principalmente para ornamentação e fabricação de chapéus. De acordo com o Conselho Estadual do Meio Ambiente *T. brasiliensis* encontra-se em risco de extinção [2]. A avaliação da variabilidade genética da espécie é um importante parâmetro para a definição de programas de manejo e conservação de espécies, principalmente para aquelas sob forte pressão antrópica. Um dos métodos de análise genética muito utilizado em estudos populacionais consiste na utilização de marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) [3]. Esta tecnologia utiliza um único iniciador ao invés de um par, e esse iniciador único tem seqüência arbitrária de modo que a seqüência alvo é desconhecida e irrelevante. Os marcadores RAPD se baseiam na amplificação de fragmentos de DNA e é vantajosa pela simplicidade e rapidez a baixos custos. Assim, grande quantidade de polimorfismo e segmentos de DNA são obtidos em curto espaço de tempo. Para que haja a amplificação de um fragmento RAPD duas seqüências de DNA complementares ao iniciador devem estar adjacentes (<4000 pares de base) e em orientação oposta, para permitir a amplificação pela DNA polimerase. A característica importante e desvantajosa, deste tipo de marcador é o seu comportamento como marcador genético dominante [4]. A dominância neste caso não se refere à interação genética entre alelos de um mesmo loco e sim à interpretação relativa entre fenótipo e genótipo.

O objetivo desse trabalho consistiu em uma análise de variabilidade genética com uso de marcadores moleculares em duas populações de *T. brasiliensis* ocorrentes na área de Aproveitamento Hidroelétrico (AHE) de Barra Grande, SC/RS, com vistas à conservação.

Material e métodos

A. Material vegetal. Foram coletadas amostras de folhas expandidas adultas e sadias de 50 indivíduos procedentes de 2 populações remanescentes de *T. brasiliensis* da área de Aproveitamento Hidroelétrico (AHE) de Barra Grande, SC/RS separadas por cinco quilômetros. As duas populações analisadas são caracterizadas por ambientes

distintos. Em uma delas os indivíduos de *T. brasiliensis* se desenvolvem diretamente expostos ao sol, enquanto que na outra à sombra. Amostras de cada população foram coletadas e depositadas no herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN).

B. Extração e Quantificação do DNA. A extração foi realizada de acordo com o protocolo de Doyle & Dolye [5], adaptado com o auxílio da máquina Fastprep – BIO 101 SAVANT na trituração das amostras. Após a suspensão do DNA em TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM), alíquotas de 2µl de cada amostra de DNA foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose 1,0 % em TBE 1x (Tris Borato), usando quantidades conhecidas de DNA de fago λ: 50, 100, 200 e 400 ng, para estimar a quantidade de DNA de cada indivíduo. A corrente usada foi de 72 V, 38 mA por 1 hora. O DNA foi fotografado para a quantificação e diluição (1 ng/µl) de cada amostra foram preparadas a partir do estoque de cada indivíduo.

C. Seleção de primers e amplificação RAPD. A seleção de iniciadores foi realizado usando duas amostras de cada população testando 176 iniciadores da Operon Technology escolhidos ao acaso. Foram selecionados aqueles que apresentaram bandas polimórficas e de melhor intensidade e nitidez quando visualizados em géis de agarose (1,5%) com detecção com brometo de etídio e luz ultra violeta, após a eletroforese a 120 V, por 4 - 5 horas.

A amplificação do DNA foi feita por RAPD uma técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que utiliza um único primer de cerca de 10 pb. Foram utilizados 3 µl de DNA a 1 ng/µl e 10 µl de um coquetel de reagentes (1,3 µl Tampão 10x + 15 mM MgCl₂; 1,04µl dNTP 2,5 mM; 1,04µl BSA 2,5 mg/ml; 3,0 µl Iniciador 10 ng/µl; 0,2µl Taq DNA polimerase 5 U/µl e 3,42µl de H₂O Milli Q estéril) e sobre a reação foram adicionados 50µl de óleo mineral puro, que impede que a reação evapore quando exposta a altas temperaturas no termociclador. O programa utilizado para essa PCR, consistiu de 41 ciclos (Desnaturação a 92°C por 1 min, anelamento a 35°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min e um passo final de extensão de 7 min a 72°C).

As reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, onde os produtos da amplificação foram separados sob uma voltagem constante de 120 Volts durante 4 horas e 30 minutos. O DNA padrão, com fragmentos de tamanhos conhecidos utilizado foi Ladder 1kb.

A visualização das amplificações de fragmentos de DNA foi realizada com detecção em luz ultravioleta e os resultados foram fotografados por uma câmera acoplada

a um sistema computadorizado denominado de *Eagle Eye II – Stratagene*.

D. Análise dos dados. Em cada reação foram identificadas as bandas polimórficas e anotadas como presença (1) ou ausência (0) do fragmento para cada indivíduo, gerando uma planilha de dados com valores binários, 0 e 1. Esses dados foram utilizados na geração de uma matriz de valores binários. O coeficiente de DICE foi utilizado para estimar similaridade genética de buriú, sendo obtido o dendrograma pelo método da média aritmética não ponderada para agrupamento aos pares (*UPGMA-Unweighted Pair Group Arithmetic Average*), utilizando-se o programa *NTSYS 2.0 – Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Systems* [6].

Resultados e Discussão

Da seleção de 176 iniciadores RAPDs, foram escolhidos 24 com maior número de fragmentos polimórficos, como citado por Anzizar *et al.* [7] na análise de 28 genótipos de diversas espécies da família *Arecaceae*. Foram gerados 58 marcadores RAPD polimórficos (Fig. 1a, Fig. 1b) bastante confiáveis pela nitidez e reprodutibilidade. A tecnologia RAPD tem sido utilizada em várias espécies nativas tropicais, pouco conhecidas geneticamente [8,9], no sentido dar suporte aos programas de conservação e coleta de germoplasma vegetal.

Análise de aglomeração hierárquica (Fig. 2) utilizando coeficiente DICE e o método de UPGMA de 47 indivíduos de *Trithrinax brasiliensis* obtido pelo programa *NTSYS* evidenciou similaridade aproximada de 60%, não havendo formação de grupos diferenciando as duas populações. Embora os ambientes entre as populações evidenciem diferenças, a similaridade genética entre indivíduos (10 e 48) de diferentes ambientes mostrou alta similaridade (85%), bem como entre indivíduos (8 e 9) do mesmo ambiente (83%). Devido à proximidade entre as duas populações (cinco quilômetros), o fluxo gênico entre os indivíduos desta área deve ocorrer, indicando ser na verdade uma única população remanescente.

Conclusões

Uma rápida análise genética permitiu evidenciar a ocorrência da variabilidade genética de 40% da espécie *T. brasiliensis* da AHE de Barra Grande, SC/RS e sugere uma estratégia de conservação incluindo o máximo de indivíduos, no sentido de salvaguardar maior número de alelos da espécie. No entanto, para o desenvolvimento de estratégias de conservação de alto nível, recomenda-se a realização de estudos utilizando outras técnicas de análise molecular, que possam analisar tal variabilidade, considerando outras seqüências de DNA que não essas aleatórias utilizadas por RAPD, como é o que ocorre com marcadores moleculares microssatélites, com muita informação genética. Essas análises permitiriam estimar a variabilidade genética, analisando fluxo gênico, heterozigiosidade, frequências alélicas e taxas de endogamia, o que forneceria outros resultados para o

desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo sustentável da espécie *T. brasiliensis*.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos coordenadores do projeto Dra. Taciana Barbosa Cavalcanti e Dr. Marcelo Brillhante Medeiros e a equipe de coleta da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em especial ao Glocimar Pereira da Silva. À Zilneide P.S. Amaral, Elisabete Pereira Nunes e Aécio A. dos Santos pelo auxílio durante as atividades de laboratório e coleta de material no campo. À FUNARBE e BAESA pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] GUBERT, F.A.F. 1987. Descrição de duas áreas de ocorrência natural da Palmácea *Trithrinax brasiliensis* no estado do Paraná In: Boletim FBCN/Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza. Rio de Janeiro: FBCN, 1966. p. 79-88.
- [2] Lista Final das Espécies da Flora Ameaçadas-RS Decreto Estadual n 42.099, publicado em 1/01/2003. Homepage: http://www.fzb.rs.gov.br/downloads/flora_ameacada.pdf
- [3] WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *Nucl. Acids. Res.* 1990 18: 6531-6535.
- [4] FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN. 220p.
- [5] DOYLE JJ & DOYLE JL. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- [6] ADAMS D, KIM J, JENSEN R, MARCUS L, SLICE DE & WALKER J. 2002. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, versão 2.10z © by Applied Biostatistics, Inc
- [7] ANZIZAR, I.; HERRERA, M.; ROHDE, W.; SANTOS, A.; DOWE, J.L.; GOIKOETXEA, P. & RITTER, E. 1998. *Journal of the International Association for Plant Taxonomy*. v.47(3): 635-645.
- [8] CIAMPI, A.Y. & MAGALHÃES, M.T.Q. 2001. Análise da variabilidade genética de três espécies arbóreas utilizando marcador molecular RAPD. Comunicado técnico, Embrapa Cenargen, Brasília DF, 60: 1-8.
- [9] CIAMPI, A.Y.; AZEVEDO, V.C.R. & SILVA, V.P. 2003. Análise genética populacional de *Tabebuia impetiginosa* utilizando marcadores moleculares RAPD. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 18p. Boletim de Pesquisa e desenvolvimento, 55.

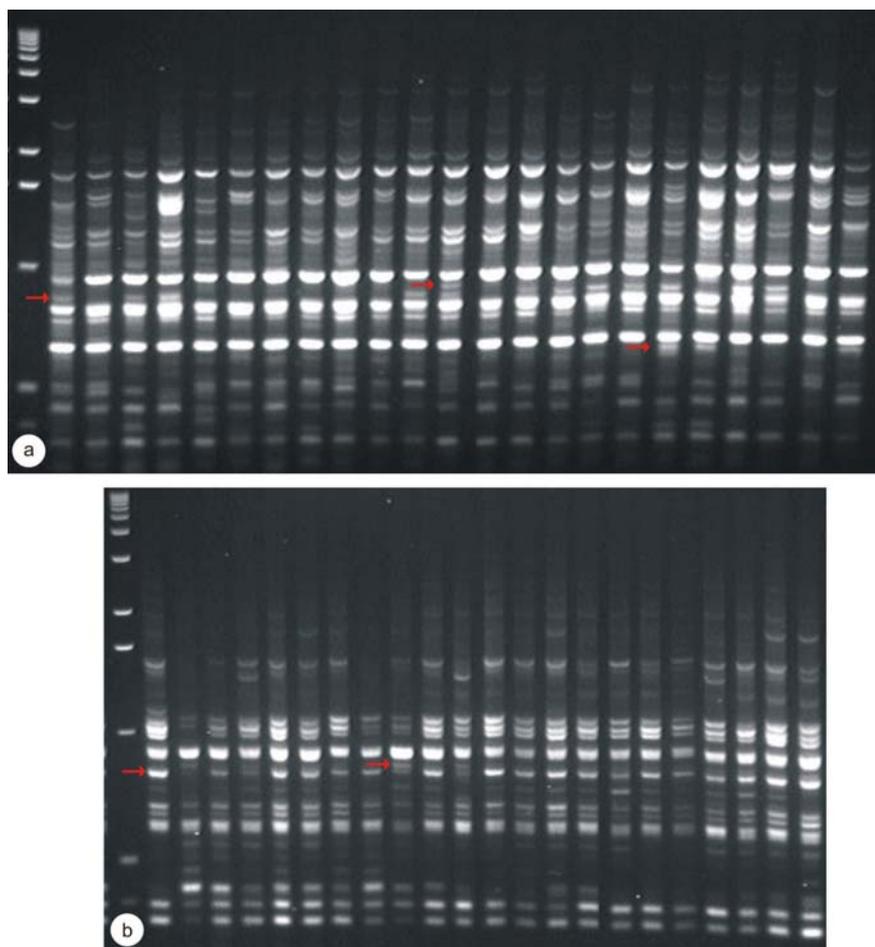


Figura 1. (a) Eletroforese de fragmentos de RAPD (iniciador OPV04) em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. As setas indicam os marcadores RAPD polimórficos usados na análise. Pista 1 *Ladder* 1 Kb. As pistas 2 -24 representam os indivíduos de *T. brasiliensis*. (b) Eletroforese de fragmentos de RAPD (iniciador OPAX03) em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. As setas indicam os marcadores RAPD polimórficos usados na análise. Pista 1 *Ladder* 1 Kb. As pistas 2-22 representam os indivíduos de *T. brasiliensis*.

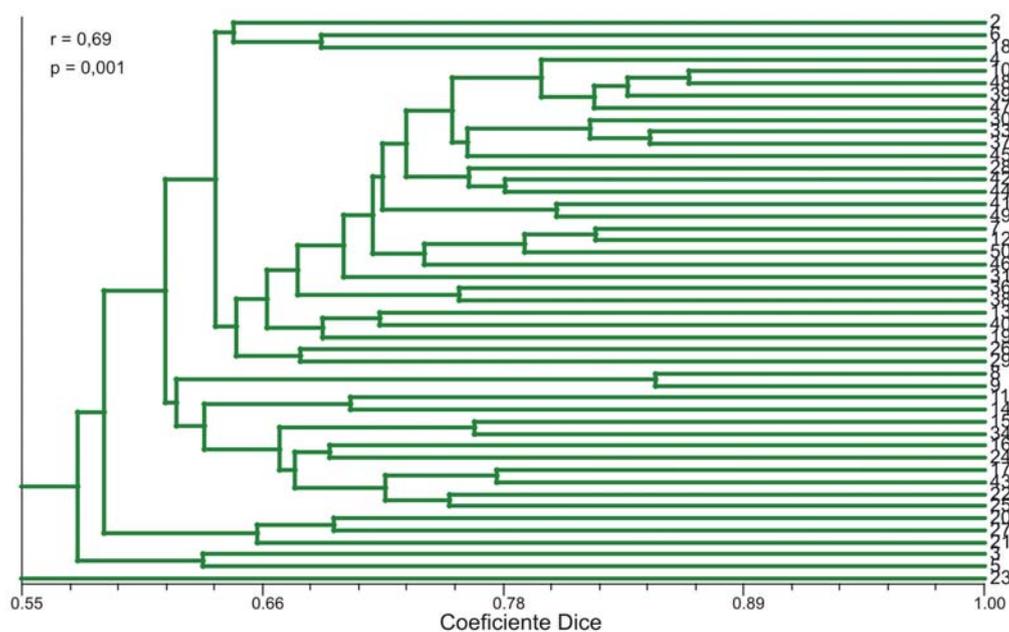


Figura 2. Análise de aglomeração hierárquica utilizando coeficiente DICE e o método de UPGMA de 47 acessos de *Trithrinax brasiliensis* baseada na estimativa de similaridade genética computada pela análise de 58 fragmentos de DNA amplificados ao acaso.