



Variabilidade genética em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.)

Conservação e caracterização de recursos genéticos vegetais na Amazônia Oriental

Maria Rosa Costa

Eng. Agro., M.Sc. em Genética
Embrapa Amazônia Oriental -
Belém - PA
mrc@cpatu.embrapa.br

Maria do Socorro Padilha de Oliveira

Eng. Agro., M.Sc. em Genética
Embrapa Amazônia Oriental -
Belém - PA

Elisa Ferreira Moura

Bolsista PIBICNPq/Embrapa
Embrapa Amazônia - Belém - PA

Fotos cedidas pelas autoras



açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da Amazônia, que se encontra amplamente distribuído da Amazônia até a Bahia (Corrêa, 1926), com maior concentração na parte oriental da Amazônia Legal, mais precisamente do litoral Atlântico até o município de Óbidos-PA, atingindo os arredores do município de Parintins-AM (Ducke, 1946).

A produção de frutos é a sua principal vocação, dos quais, através de maceração, manual ou mecânica, da polpa, se obtém uma

bebida concentrada, nutritiva e de alto valor calórico, conhecida por "açaí", a qual é utilizada desde a época pré-colombiana pela população Amazônica. Vale ressaltar que, até pouco tempo, o consumo dessa bebida estava restrito ao estado do Pará e a outros locais da Amazônia mas que, atualmente, vem conquistando novos mercados em outras regiões brasileiras e até mesmo em outros países. A segunda utilização econômica do açaizeiro é a produção de palmito. Esse mercado é recente, tendo-se iniciado na década de 70 em substituição ao palmiteiro (*E. edulis* Mart.) que já se encontrava sob forte ameaça de extinção. Ao contrário do mercado de frutos, grande parte da produção sempre foi destinada à demanda nacional e internacional. Apresenta-se, ainda, como produtor de celulose (Melo et al., 1974), e tem boa perspectiva como produtor de corante natural (Oliveira et al., 1998).

O Estado do Pará destaca-se como o maior produtor da bebida "açaí" e de palmito, sendo, também, o maior consumidor de "açaí". Essa bebida é o segundo alimento mais consumido pela população local, superado apenas pela farinha de mandioca (Sudam, 1992). Contudo, a maioria da produção provém do extrativismo, pelo qual a estimativa de produtividade para frutos e palmito fica em torno de 12 t/ha/ano e 200 kg/ha/ano, respectivamente (Produtos..., 1998). Tais produtos renderam em impostos ao estado, em 1992, cerca de 200 milhões de dólares, sendo 15% correspondente a extração de palmito. Esses resultados apontam a produção de frutos como a mais rentável, sendo comercializada na forma de "açaí in natura" e "açaí congelado".

Vale ressaltar que, hoje, o açaizeiro (*Euterpe oleracea*) é a maior fonte supridora de matéria-prima para a indústria de palmito, respondendo por mais de 95% da produção nacional, cuja estimativa média é de 11.000 toneladas. Para atender à produção de uma tonelada de palmito enlatado, faz-se necessário o corte de 4.000 plantas, o que, nas populações naturais poderá levar a espécie ao risco de extinção, sendo necessário e urgente envidar



esforços a fins de caracterizar o germoplasma disponível em Bancos e/ou em Coleções de Germoplasma, de modo que se ofereçam subsídios aos programas de melhoramento genético dessa palmeira. Entre 1988 e 1990, foi instalada a coleção de germoplasma de açaí da Embrapa Amazônia Oriental, localizada a 15km da sede, em Belém-PA. Ocupa uma área de dois hectares, em terra firme, com solo do tipo latossolo amarelo, textura média. Os acessos foram plantados em linhas, no espaçamento de 5m x 3m, sem repetição e com um número variável de plantas (1 a 15).

Botânica do açaí

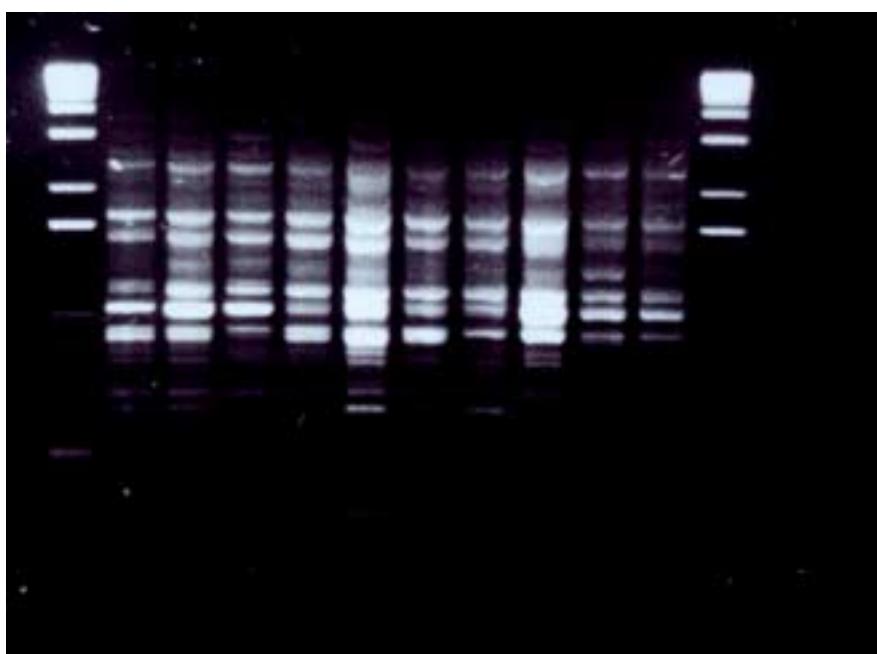
O açaizeiro é representado por uma única espécie, a *Euterpe oleracea* Mart., sendo constituído botanicamente de duas variedades, distintas pela coloração dos frutos (epicarpo) quando maduros, sendo elas: a violácea e a branca, esta última denominada também de verde.

A variedade violácea, como o próprio nome diz, produz frutos violáceos, polpa brilhante e escura, obtendo-se dela uma bebida de coloração arroxeadas, e é a mais comercializada. A variedade branca produz frutos com casca e polpa verde-escuro brilhante, dando uma bebida de cor creme-claro (Cavalcante, 1991). A primeira é rica em antocianina, substância que reduz a taxa de colesterol, enquanto a segunda tem menor teor de óleo na polpa.

Pode ser considerado como uma planta hermafrodita, que possui, no mesmo indivíduo e na mesma inflorescência, flores unissexuais com as femininas perfeitas e as masculinas apresentando pistilódio. Em suas inflorescências, existe sempre um maior número de flores masculinas, estando as femininas ladeadas por duas masculinas, formando as tríades.

O ramo florífero do açaizeiro é intrafoliar, envolvido por duas brácteas (espata) que, no momento da maturação da segunda espata, expõe a inflorescência androgína. Apesar de existirem flores unissexuais distribuídas ao longo de todas as ráquidas, as ânteses dessas flores têm separação temporal, com a maturação sexu-

Figura 1. Eletroforese do RAPD em açaizeiro gerado pelo primer OPN 6 da Operon Technologies. A primeira e a última colunas correspondem ao marcador Ladder e as demais, aos genótipos analisados



al dos dois gametas ocorrendo em épocas distintas, iniciando-se pelas masculinas.

Análise da variabilidade genética

Um dos maiores problemas dos recursos genéticos é a escassez de informações, principalmente daquelas relacionadas com a documentação e a caracterização genética, e culmina com a carência de estudos sobre o conhecimento da diversidade genética das espécies com potencial econômico para a região. Nesse sentido, a caracterização de germoplasma é necessária, com vistas a assegurar informações sobre essas fontes de genes para utilização futura, que, além de prevenir a perda desses recursos, são fundamentais para o sucesso da sua produção agrícola.

Gracias ao avanço na área de marcadores moleculares de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia), hoje é possível estudar melhor o comportamento de organismos de interesse econômico. Trata-se de um processo cíclico, no qual a enzima DNA polimerase faz cópias de um DNA, para o qual iniciadores (*primers* – oligonucleotídeos) específicos são fornecidos, sendo que, em cada ciclo, o

número de cópias é duplicado, produzindo um aumento exponencial do mesmo. O processo envolve as fases de desnaturação das fitas de DNA; anelamento dos oligonucleotídeos; extensão e polimerização pela enzima DNA polimerase (Góes, 1999).

Essa técnica, desenvolvida por WILLIAMS et al. (1990), distingue-se das demais técnicas de PCR pelo fato de se utilizar um “único” *primer*, composto por 10 pares de bases de seqüências nucleotídicas arbitrárias, tendo, portanto, sua seqüência alvo desconhecida (Ferreira & Gratapaglia, 1996), ao contrário das outras que requerem informações a respeito da seqüência do DNA alvo para o desenho de *primers* específicos (Williams et al., 1990), o que permite a realização de estudos de análise genética em diversas espécies.

Mediante a utilização dessa técnica, detectam-se vários polimorfismos entre diferentes populações e/ou indivíduos (presença x ausência dos produtos de amplificação), visto que as seqüências internas dos segmentos amplificados pertencem a todas as classes de abundância de DNA no genoma, desde sequências de cópia única até as altamente repetitivas. Parte-se da premissa de que os sítios de hibridização do *primer* estão dis-

Tabela 1. Identificação dos indivíduos analisados pertencentes à coleção de germoplasma de açaizeiro. Belém, Pará. 2001

Indivíduo	Origem	Procedência
001=1	Brasil	Benfica-Pará (Povoado de Santa Maria)
006=3	Brasil	Mosqueiro-Pará (Sítio Santa Lúcia)
042=3	Brasil	Muaná-Pará (Fazenda Espírito Santo)
067=1	Brasil	Breves-Pará (Furo dos Macacos, área de influência do rio Amazonas)
050=9	Brasil	Breves-Pará (Furo Jaburu, área de influência do rio Amazonas)
064=1	Brasil	Breves-Pará (Furo dos Macacos, área de influência do rio Amazonas)
072=2	Brasil	Breves-Pará (Furo do Tajapuru, área de influência do rio Pará)
090=8	Brasil	Oiapoque-AP (localidade Açaizal, rio Curipi)
127=1	Brasil	Guimarães-MA (localidade Jandiritina)
135=6	Brasil	São João do Araguaia-Pará (Estrada da Transamazônica, ramal Apinagés)

tribuídos ao acaso pelo genoma e que as diferenças nesses sítios resultam na amplificação de fragmentos distintos (de tamanhos variáveis), que podem ser utilizados como marcadores moleculares (Bardakci & Skibinski, 1994). Sendo, portanto, o polimorfismo detectado pela presença de um fragmento específico amplificado em um indivíduo comparado com a ausência dele em outro indivíduo (Williams et al., 1990; Fairbanks et al., 1991).

O polimorfismo gerado pode ser devido a uma troca única de base, a qual previne uma associação estável com o *primer ou* por mudanças que alterem o tamanho (pequenas inserções ou deleções) ou previnam a amplificação dos fragmentos (inserções que separam os sítios em mais de 3.000 bp, inversões, deleções); (Waugh & Powell, 1992). O poder de detecção do polimorfismo, na técnica RAPD (polimorfismos de DNA amplificados ao acaso), a olho nu, diretamente em gel de eletroforese ou através de corantes específicos para DNA (brometo de etídio e outros) é, na grande maioria dos casos, uma vantagem significativa para a detecção da variabilidade genética.

Muito embora a técnica de RAPD resulte em uma série de vantagens, visto que apresenta uma notável simplicidade e rapidez, ela é bastante sensível, e pequenas modificações na concentração dos componentes da reação são capazes de produzir alterações no padrão dos marcadores obtidos. Em decorrência disso, é recomendável uma otimização cuidadosa das condições experimentais

para que se possam obter amplificações reproduzíveis e confiáveis (Timmerman & Mccallum, 1993).

O objetivo deste estudo foi examinar o polimorfismo gerado por marcadores RAPD e analisar a diversidade genética entre acessos de açaizeiro, de diferentes procedências.

Material e Métodos

Material vegetal e extração de DNA

O material investigado foi composto de dez acessos de açaizeiro provenientes do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém -PA. O DNA genômico foi obtido através de folhas recém-coletadas que, após desinfecção, foram maceradas com nitrogênio líquido, e cerca de 200mg de pó foi transferido para tubos eppendorf. Adicionaram-se, em seguida, 700 µl de solução extratora. Os tubos foram misturados em vortex e colocados em banho-maria a 60ºC, durante 60 minutos. O extrato foi misturado com 700 µl de clorofórmio-álcool isoamil (24:1) para formar uma emulsão. Após centrifugar por 10 minutos a 4 ºC e 12.000 rpm, a parte superior aquosa foi cuidadosamente isolada e submetida a álcool 95 %, o que ocasionou a precipitação do DNA. O material foi colocado em -20ºC, por 20 minutos, sendo, em seguida, centrifugado por 10 minutos, a 4º C e 12.000 rpm, lavado com 1000 µl de etanol 70%, para remover sais e, posteriormente seco a temperatura ambiente por, aproximadamente, doze horas. O

DNA foi ressuspensido com 100µl RNase/ TE (10ug.ml⁻¹). A concentração de DNA foi estimada em gel de agarose 1,5% pela comparação do DNA total com três concentrações do DNA lambda. As amostras utilizadas no RAPD, após a quantificação total, partiram de diluições da amostra total em água estéril de modo que contivesse 5ng/µl de DNA. As alíquotas foram armazenadas a -20ºC.

Análise RAPD

A seleção de primers foi realizada pela comparação de quatro indivíduos com características morfológicas contrastantes. Selecionou-se aqueles que apresentaram um bom padrão de amplificação e que geraram polimorfismo entre os indivíduos. Foram escrutinados oito kits da Operon Technologies, Alameda, CA, USA, compostos de 20 primers arbitrários, num total de 160.

As reações foram desenvolvidas de acordo com o protocolo de Williams e col., (1990), em um volume final de 13µl contendo água destilada autoclavada, 20mM Tris-HCl (pH 8,0), 50mM KCl, 2,0mM MgCl₂, 200µM de cada dNTP, BSA purificada (2,5 mg/ml), 1,3 uM primer arbitrário, 1U.I Taq DNA polimerase e 15 ng de DNA genômico, cobertas com uma gota de óleo mineral comercial.

As amplificações foram realizadas em termociclador de DNA Thermolyne Amplitron II modelo DB.80225, sendo realizados 40 ciclos de 1', a 94 ºC; 1' a 37 ºC; e 2', a 72 ºC, seguidos de mais 7 minutos a 72 ºC, para a completa extensão dos produtos am-

plificados. O método utilizado para a separação dos produtos amplificados foi a eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio 1mg/ml. Utilizaram-se 13 μ l de cada reação acrescidos de 2 μ l de uma solução de azul de bromofenol (40%) mais sacarose. Foram utilizados TBE (Trizma –base 0,1 M; ácido bórico 1M e EDTA 0,5M) como tampão do gel e de corrida.

Após a eletroforese, os géis foram visualizados e fotografados em equipamento de foto documentação por transiluminação em ultravioleta.

Análise dos dados

Aplicou-se um ladder de 1Kb no início e no final do gel para definir o tamanho aproximado dos fragmentos gerados nas PCRs.

Inicialmente foi construída uma matriz para os fragmentos polimórficos amplificados, com presença (1) e ausência de banda (0). Somente foram consideradas as bandas que não davam margens a dúvidas. Bandas muito fracas, de difícil resolução, não foram incluídas. Para análise dos dados, utilizou-se o NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.02. A similaridade entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de jaccard, que gerou a matriz de similaridade. A partir dessa matriz, foi gerado o cluster, pelo método UPGMA ("Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average"), que foi expresso

na forma de um dendograma.

Resultados e Discussão

Dos 160 primers testados, obteve-se um total de 83 primers polimórficos, que se mostraram viáveis para o estudo pretendido, demonstrando um aproveitamento de 46 %.

Um total de 177 marcadores RAPD, com tamanhos que variavam de 300 a 2.200 pb, foi amplificado pelos 24 primers utilizados, dos quais 75 eram polimórficos, gerando 43% de polymorfismo. O número de marcadores amplificados variou de 12 (OPN-16) a 4 (OPN-3). O número de fragmentos polimórficos por primer variou de 7 (OPAZ-4) a 1 (OPN-9 e OPN-11). Observou-se, dentre os fragmentos amplificados, a ocorrência de bandas específicas aos indivíduos. Na Figura 1, podem ser visualizados exemplos desses marcadores.

Na Tabela 2, encontra-se a matriz de distância genética gerada pelo coeficiente de jaccard para todos os indivíduos que compunham a amostra. As maiores distâncias foram obtidas comparando-se o indivíduo 127=1 com os demais.

Na Figura 2, encontra-se o dendrograma gerado pelo método UPGMA, através do programa NTSYS-pc. Essa análise de distância genética gerou o cluster que mostra a separação dos acessos em cinco grupos, considerando-se a distância genética relativa de 71%. Observa-se que o indivíduo 127-1 exibiu um grau de diferencia-

ção maior, com maior distanciamento genético, fato que pode ser explicado pela sua procedência de outro estado, no caso, o Maranhão, separado geograficamente das áreas de ocorrência do estado do Pará em, aproximadamente, 1.000km, inclusive recebendo denominação característica do estado. "Jussara", quando no Pará, generalizadamente, todos os acessos são denominados de "açaí". Isso indica que esse acesso é um bom candidato como fonte de gene no programa de hibridização dessa espécie, visando ao melhoramento genético, no estado do Pará.

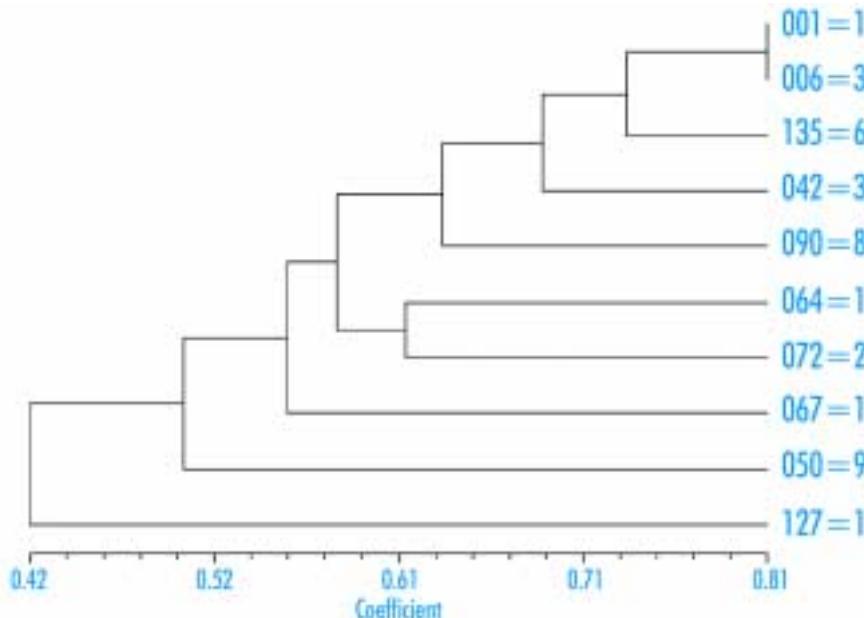
A maior similaridade ocorreu entre os indivíduos 001=1 e o 006=3 (0,81), o que pode ser explicada pela proximidade geográfica da área de ocorrência, ou seja, os municípios de Benfica e Mosqueiro, que distam cerca de 60 km. Assim, observa-se uma correlação positiva entre a distribuição geográfica e a distância genética, desde que não ocorra nenhuma barreira de dispersão de semente.

Em relação ao acesso 090-8, proveniente do Oiapoque - AP, observa-se que existe uma proximidade em relação aos acessos 042-3, 006-3 e 001-1, oriundos de Muaná – Pará, Mosqueiro-PA e Benfica-PA, respectivamente, fato que pode ser explicado pela tendência de que naquela região, a dispersão de sementes do açaizeiro ocorra basicamente pelo rio, o que contribui para a similaridade de alguns materiais desses dois estados.

Tabela 2. Matriz de distância genética estimada pelo coeficiente de Jaccard para todos os indivíduos de açaizeiro estudados. Belém, Pará, 2001

001=1	006=3	042=3	067=1	050=9	064=1	072=2	090=8	127=1	135=6
001=1	1.0000								
006=3	0.8088	1.0000							
042=3	0.6521	0.7042	1.0000						
067=1	0.5937	0.6029	0.5384	1.0000					
050=9	0.5245	0.5151	0.4918	0.4905	1.0000				
064=1	0.6406	0.6470	0.5846	0.5689	0.5471	1.0000			
072=2	0.5384	0.5735	0.5806	0.5357	0.5400	0.6181	1.0000		
090=8	0.6417	0.6714	0.6119	0.5000	0.4500	0.5967	0.5932	1.0000	
127=1	0.3582	0.4626	0.4833	0.3750	0.4166	0.3559	0.4423	0.4655	1.0000
135=6	0.7741	0.6956	0.7142	0.5483	0.4500	0.5714	0.4920	0.6250	0.4166
									1.0000

Figura 2. Dendograma gerado pelo método de análise cluster UPGMA para o coeficiente de jaccard, para as 75 bandas polimórficas geradas pelo RAPD



Os quatro acessos procedentes de Breves-PA apresentaram distanciamento genético considerável, sendo que dois deles participaram do mesmo agrupamento (064-1 e 072-2) e diferiram dos demais. Pelo fato de pertencerem à mesma procedência, esperava-se uma maior proximidade genética entre eles. Contudo, como o açaizeiro tem sido relatado como uma espécie alógama, é esperada grande variação genética dentro da mesma procedência, ou população, principalmente naquelas localizadas no estuário amazônico (Ohashi, 1990). Pode-se inferir também que os resultados obtidos possam estar relacionados com o que foi mencionado por Cavalcante (1991), que considerou Breves como o centro de origem dessa espécie, e também por haver sido encontrada alta divergência entre os acessos daquele município, pode-se esperar, que naquele lugar esteja localizado o centro de diversidade da espécie.

Esse estudo de diversidade genética na coleção de açaizeiro através de marcadores RAPD permitiu a obtenção de informações úteis para o seu manejo. Acredita-se que essa abordagem seja válida e a formação de uma “core collection” dependerá de estudos que incluam toda a coleção, sendo interessante, nesse caso, realizar comparações com outras téc-

nicas moleculares, o que forneceria um quadro geral da diversidade na espécie.

Agradecimento:

Agradeço a colaboração prestada pela Dra. Ana Yamagishi Ciampi para a realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**, v.73, p.117-132. 1994.
- CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5^a ed. Belém: CNPq, 1991. p. 25- 28 (Coleção Adolfo Ducke).
- CÔRREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, v.1, p. 229-231, 1926
- DUCKE, A. **Plantas de cultura pré-colombiana na Amazônia Brasileira. Notas sobre as espécies ou formas espontâneas que supostamente lhes teriam dado origem**. Belém: Instituto Agronômico do Norte, 1946. 24p. (Boletim técnico, 8)
- FAIRBANKS, D.J.; ANDERSEN, W.R.; MAUGHAM, P.J. **Analyses for Biological resource characterization: a laboratory manual**. Provo: Brigham Young University, 1991. 27p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.
- GÓES, L.B. **Polimorfismo de DNA em isolados de Trichoderma e antagonismo a Rhizoctonia solani**. Recife: UFPE, 1999. 76p. Dissertação Mestrado.
- MELLO, O.F.M. de; WISWIEWSKI, A.; ALVES, S.M. Possibilidades papeleiras do açaizeiro. Belém, IPEAN, 1974. (IPEAN, **Boletim técnico**, 63) 53p.
- OHASHI, S.T. **Variação genética em populações de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart) do estuário amazônico**. Piracicaba, 1990. Dissertação (Mestrado). 119p.
- OLIVEIRA, M. do S. P.; MARTINS, C. da S.; NAZARÉ, R.F.R. de; RODRIGUES, J.E.L.F. Pesquisas desenvolvidas com plantas produtoras de corantes na Embrapa Amazônia Oriental. In: **WORKSHOP SOBRE BIODIVERSIDADE: recursos genéticos vegetais da Amazônia, de plantas medicinais, aromáticas, inseticidas e corantes com potencial socioeconômico**, Relatório final..., Belém, Pará, 1998. Belém : Embrapa-CPATU, p. 59-62.
- PRODUTOS POTENCIAIS DA AMAZÔNIA – **Açaí**. Brasília, M.M.A./SUFRAMA/SEBRAE/GTA, 1998. 50p.
- SUDAM. **Desenvolvimento sustentável da Amazônia: estratégia de desenvolvimento e alternativas de investimento**. Rio de Janeiro, 1992. 43 p.
- TIMMERMAN, G.M.; MCCALLUM, J.A. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in plant biology. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 17., 1993. **Proceedings...** 1993. P. 1025-1031.
- WAUGH, R.; POWELL, W. Using RAPD markers in crop improvement. **TIBTECH** v.10, p.186-191, 1992.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.