

SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE INDIVÍDUOS DE AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* MART.) DE UMA POPULAÇÃO DE SÃO SEBASTIÃO DA BOA VISTA, PA POR MARCADORES RAPD.

Maria do Socorro Padilha de Oliveira¹, Silvaney Fonseca Ferreira², Natália Padilha de Oliveira³,
Emanuelly Melo de Oliveira⁴

Resumo

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a similaridade genética entre indivíduos de açaizeiro de uma população de São Sebastião da Boa Vista, PA por marcadores RAPD. Foram extraídos DNA's de 25 indivíduos para a aplicação 22 *primers*. Após a eletroforese, os géis foram fotografados. Foi construída a matriz binária com fragmentos amplificados. Foi estimado o número ótimo de bandas polimórficas e gerado o dendrograma pelo método UPGMA utilizando o coeficiente Jaccard. Foram amplificadas 108 bandas polimórficas. O número ideal de bandas pode ser considerado a partir de 90 bandas. A similaridade genética média entre os indivíduos foi de 50% ($S_{gm} = 0,50$), possibilitando a formação de quatro grupos. Quatro indivíduos tiveram alta similaridade (cima de 80%). Os indivíduos da população estudada, mesmo sob a ação antrópica, ainda apresentem consideráveis níveis de variação.

Introdução

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa de fundamental importância às comunidades ribeirinhas do estuário amazônico, como fonte de alimento básico e de renda pela extração de frutos e palmito (SOUZA, 2002). No estuário amazônico suas populações são densas e quase homogêneas, principalmente em áreas de várzea e igapó. Contudo, nesse local as populações sofreram forte processo exploração predatória para palmito, o que pode ter restringido a variabilidade genética intrapopulacional.

Entre os marcadores moleculares, a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), desenvolvida por Williams *et al.* (1990), mostra-se como uma ferramenta útil para análises genéticas entre indivíduos de populações naturais (SILVEIRA *et al.*, 2009), especialmente de espécies pouco estudadas, como é o caso do açaizeiro.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo caracterizar a similaridade genética entre indivíduos de açaizeiro de uma população de São Sebastião da Boa Vista, PA por marcadores RAPD.

Material e Métodos

Foi coletada uma amostra de folha nova (folíolo) de 25 indivíduos (progênes de polinização livre) selecionados ao acaso de uma população de São Sebastião da Boa Vista, PA (49° 37'24"WGr e 1° 20'46.59"S), localizada no estuário amazônico, e submetida à ação antrópica (manejo para frutos e palmito). Cada amostra foi identificada, armazenada em saco plástico contendo sílica gel e transportada ao Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental para a extração de DNA genômico total.

¹ Primeiro Autor é Pesquisador A da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética Molecular, Travessa Enéas Pinheiro s/n, Belém, PA, CEP 66095-100. E-mail: spadilha@cpatu.embrapa.br

² Segundo Autor é professor da Secretaria de educação e Cultura, Belém, PA, CEP 66000-000. E-mail: silvaney@yahoo.com.br

³ Terceiro Autor é estudante de Licenciatura em Ciências Biológicas da UFPA, bolsista ITI A do CNPq, Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética Molecular, Travessa Enéas Pinheiro s/n, Belém, PA, CEP 66095-100. E-mail: natybiologia2006@gmail.com

⁴ Quarto Autor é agrônomo. E-mail: emanuellymelo@yahoo.com.br

Apoio financeiro: Embrapa e FAPESPA.

O DNA foi extraído de 100 mg de cada amostra, de acordo com o protocolo CTAB estabelecido por Doyle, Doyle (1990), com modificações. A concentração dos DNA's foi avaliada pela comparação com o DNA do fago ϕ (50, 100 e 200 ng. μl^{-1}) aplicados em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e diluídos para a concentração de trabalho de 10 ng. μl^{-1} .

As reações PCR-RAPD foram preparadas em microtubos de 0,2 ml, contendo volume final de 15 μl (35 ng de DNA genômico; 1 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos; 1,3 mM do primer; 10mg. ml^{-1} de BSA; 1 unidade de enzima Taq polimerase da Invitrogen; e tampão de reação contendo MgCl_2 fornecido pelo fabricante) e realizadas em termociclador Amplitherm TX96 da AXIGEN, programado para 40 ciclos, conforme Oliveira (2005). As reações foram efetuadas para 22 marcadores RAPD.

Os produtos obtidos foram aplicados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio, e separados por eletroforese horizontal, realizada com 100 V por uma hora e 30 minutos. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz UV e as imagens capturadas para posterior análise.

Foi montada uma matriz binária com base nos fragmentos amplificados com presença (1) e ausência (0) de banda. Com essa matriz foi determinado o número ótimo de bandas polimórficas gerados pelos 22 marcadores RAPD por meio da análise de *bootstrap*, no software Genes. O cálculo das estimativas de similaridades genéticas (\hat{g}_{ij}) entre o i-ésimo e o j-ésimo indivíduo foi feito utilizando o coeficiente de Jaccard, no software NTSYS-pc 2.02. O dendrograma foi gerado pelo método UPGMA com base matriz de similaridade genética obtida, no aplicativo NTSYS.

Resultados e Discussão

Os 22 *primers* geraram um total de 108 bandas, todas polimórficas, cujos tamanhos variaram de 400 a 1700pb, sendo detectada, inclusive, a presença de bandas específicas dentre fragmentos amplificados (Figura 1). O número de fragmentos polimórficos variou de dois (OPB-16 e OPBA-05-12) a sete (OPB-09, OPB-11, OPM-04, OPM-11 e OPL-15), gerando média de 4,90 bandas por *primer*. Resultados similares foram encontrados por Nunes *et al.* (2008) e Isensee *et al.* (2007) quando avaliaram indivíduos de população natural de butiazeiro e de populações comerciais e melhoradas geneticamente de pupunheira, respectivamente.

A análise de *bootstrap* consta na Figura 2. A partir de 90 bandas houve um bom ajuste entre os valores da correlação ($r=0,98$), da soma de quadrados dos desvios ($\text{SQd}=0,02$) e do estresse ($E=0,05$), o que garante alta consistência na associação das matrizes e alta confiabilidade (KRUSKAL, 1964). Como neste trabalho foram geradas 108 bandas polimórficas, pode-se sugerir que tais bandas tenham sido suficientes para estimar as similaridades genéticas entre os indivíduos amostrados.

O dendrograma gerado com base na matriz de similaridades genéticas entre os 25 indivíduos representantes da população de São Sebastião da Boa Vista, PA, encontra-se representado na Figura 3. A similaridade média entre os indivíduos foi de 50% ($S_{gm}= 0,50$), o que possibilitou a formação de quatro grupos: os grupos 1 e 2, com apenas um indivíduo, 11 e 5, respectivamente, que apresentaram o menor grau de relação genética entre os demais (cerca de 30% similaridade); o grupo 3 por seis indivíduos; e o último por 17 indivíduos, que variaram entre si quanto a similaridade. As maiores similaridades foram detectadas entre os indivíduos 2 e 3 (85%) e 15 e 16 (83%), quando comparadas as dos demais indivíduos. Souza (2002) avaliando a variabilidade genética de uma população de açazeiro de Melgaço, PA, localizada no estuário amazônico, sem ação antrópica, com base em uma amostra de 98 indivíduos encontrou alta variabilidade ($H_e=0,839$), mas detectou a presença de excesso de homozigotos, com 12,9% de cruzamentos entre indivíduos aparentados. Oliveira, Silva (2008) estudando a diferenciação genética entre procedências de açazeiro com base em marcadores RAPD e SSR, observaram que grande parte da variação ficou retida dentro dos locais, com ampla variabilidade entre os indivíduos da mesma procedência (cerca 75,85%). Resultados condizentes foram obtidos em populações naturais de pupunheiras (RODRIGUES *et al.*, 2004). Como no trabalho em foco, as similaridades genéticas variaram de 0,11 a 0,85 pode-se inferir que os indivíduos da população estudada, mesmo sob a ação antrópica, ainda apresentem consideráveis níveis de variação.

Conclusões

Os 22 marcadores RAPD utilizados nesse estudo são eficientes para detectar polimorfismo entre os indivíduos de açaizeiro da população São Sebastião da Boa Vista, PA.

Mesmo sofrendo pressão antrópica para a extração de palmito e manejo para frutos, os indivíduos dessa população ainda apresentam similaridade genética média de 0,50, estando agrupados em quatro grupos, o que pode representar considerável variação intrapopulacional.

Agradecimentos

Aos assistentes de pesquisa do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia oriental. Ao CNPq pela concessão de bolsa ITI ao terceiro autor e à FAPESPA pelo apoio financeiro.

Referências

ISENSEE, J. M. F.; VIDAL, P. O.; GAIOTTO, F. A. Caracterização genética entre pupunheiras cultivadas no sul da bahia por marcadores RAPD. *Magistra*, v. 19, n. 4, p. 304-310, out./dez., Cruz das Almas-Ba, 2007.

KRUSKAL, J.B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. *Psychometrika*, Williamsburg, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964.

NUNES, A. M.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; CARVALHO, A. Z.; CARDOSO, G. Caracterização Molecular de Butiazeiro por Marcadores RAPD. *Revista Brasileira Fruticultura*. Jaboticabal - SP, v. 30, n. 3, p.702 - 707, 2008.

OLIVEIRA, M.S.P. *Caracterização molecular e morfo-agronômica de germoplasma de açaizeiro*. 2005, 171f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

OLIVEIRA, M. do S. P.; SILVA, K. J. D. Diferenciação Genética entre Procedências de Açaizeiro por marcadores RAPD e SSR. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 2, p. 438-443, Junho 2008.

RODRIGUES, D.; ASTOLFI FILHO, S.; CLEMENT, C.R. Molecular marker-mediated validation of morphologically defined landraces of pejibaye (*Bactris gasipaes*) and their phylogenetic relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Dordrecht, v.51, p. 871-882, 2004.

SOUZA, P.C.A de. *Aspectos ecológicos e genéticos de uma população natural de Euterpe oleracea Mart. no estuário amazônico*. 2002. 60p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais)- Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Piracicaba.

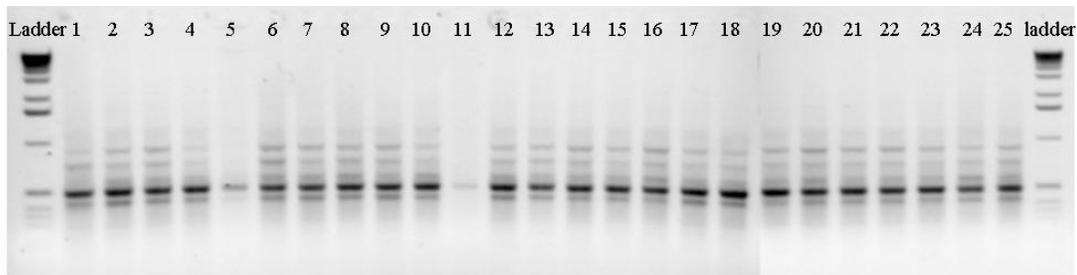


Figura 1. Eletroforese gerada pelo marcador RAPD OPB-09. A primeira e a última coluna correspondem ao DNA ladder e as demais aos 25 indivíduos analisados da população de São Sebastião da Boa Vista.

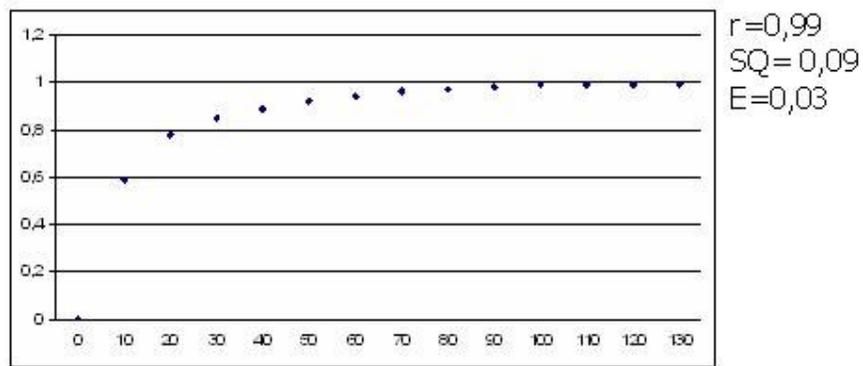


Figura 2. Estimativas das correlações entre as similaridades obtidas pela análise bootstrap para números crescentes de RAPD para 25 progênes de polinização livre.

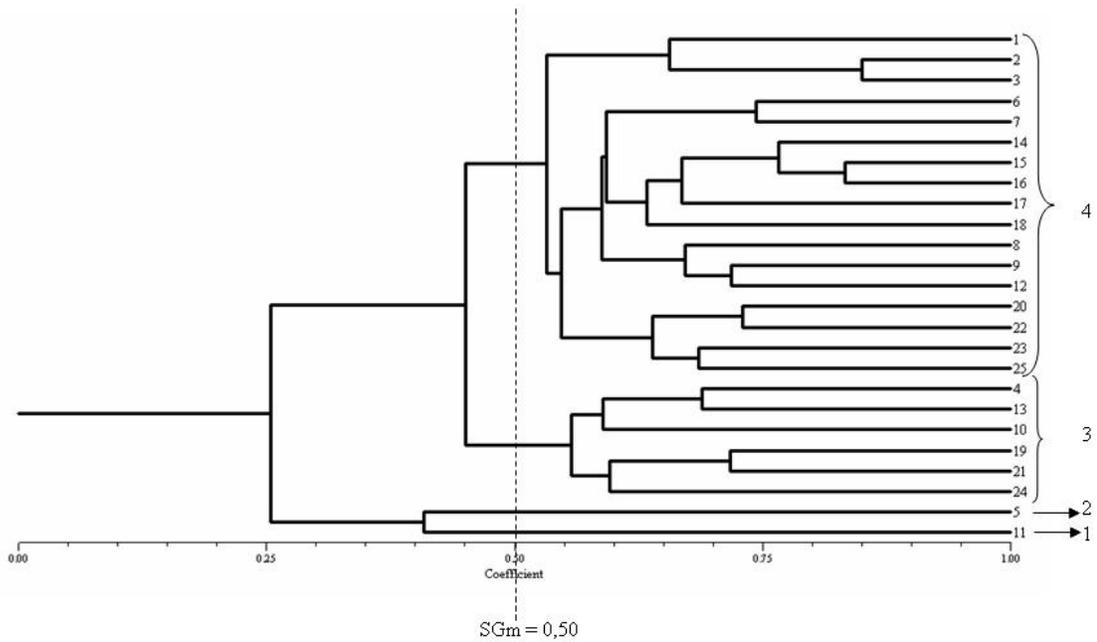


Figura 3. Dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir das estimativas de similaridades genéticas obtidas com base em 108 bandas polimórficas de marcadores RAPD geradas nos 25 indivíduos de açazeiro da população de São Sebastião da Boa Vista, PA. $Sgm=0,50$.