



TRANSFERIBILIDADE DE LOCOS SSR DE *Astrocaryum aculeatum* MART. PARA *Astrocaryum vulgare* MART.

Andréa Cristina Rodrigues Fortes¹, Maria do Socorro Padilha de Oliveira², Elisa Ferreira Moura²

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia aplicada à Agropecuária UFRA/EMBRAPA Amazônia Oriental, Laboratório de Genética, andreafortes@rocketmail.com

² Pesquisadoras da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética, socorro-padilha.oliveira@embrapa.br

Resumo: Este trabalho foi realizado com o objetivo de testar a transferibilidade de locos SSR de *Astrocaryum aculeatum* para a espécie *Astrocaryum vulgare*. Para isso, foram aplicados doze locos desenvolvidos para *A. aculeatum* em seis amostras de DNA obtidas de matrizes de *A. vulgare* de diferentes procedências. As reações de amplificação foram conduzidas de acordo com o protocolo desenvolvido por Ramos (2012), com pequenas adaptações. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose ultra pura a 1,5%, corado com brometo de etídio e submetido à eletroforese horizontal por 1:30 horas. Os perfis dos géis foram fotodocumentados e as imagens armazenadas digitalmente. A transferibilidade dos locos foi avaliada com base na amplificação de produtos e na sua nitidez. Dos doze locos testados, seis apresentaram amplificação satisfatória (visualização do produto), perfazendo uma taxa de transferibilidade de 50%, sugerindo que as espécies possuam alto grau de parentesco. Em todos os locos amplificados não foi detectada a presença de produtos secundários, sendo, portanto, úteis para acessar o genoma de *A. vulgare*.

Palavras-chave: Amplificação, microssatélites, palmeiras, tucumã-do-Pará.

Introdução

Astrocaryum vulgare Mart. é uma espécie pertencente a família Arecaceae, vulgarmente conhecida como Tucumã-do-Pará, ocorrendo na Amazônia brasileira, em alguns estados do Nordeste e em outros países de abrangência da Amazônia. Possui grande importância econômica e social, em virtude de produzir frutos com elevado teor de óleo e de alto valor nutritivo, os quais são usados pela população local como fonte de alimento, sendo ainda promissores para produção de biodiesel. Além dos frutos, também produz fibras utilizadas para confecção de cestarias, tapetes e etc. Dada sua importância, a espécie necessita de estudos, principalmente relacionados à sua caracterização molecular, os quais são fundamentais para o manejo das populações naturais existentes, afim de evitar perda de variabilidade genética e promover a sua conservação.



Há diversos marcadores moleculares que podem ser úteis na caracterização de espécies vegetais e sua escolha depende de fatores como tecnologia e recursos financeiros disponíveis, objetivo do trabalho, tipo de população a ser trabalhada, dentre outros. Marcadores microssatélites ou SSR são os mais adequados para o estudo e caracterização de populações naturais, pois devido a sua natureza codominante permitem a genotipagem dos indivíduos, o que possibilita a geração de diversos parâmetros úteis para análise em genética de populações. Apesar de sua utilidade, a caracterização por marcadores microssatélites requer o desenvolvimento prévio destes marcadores para a espécie em questão, o que não é um processo simples e corriqueiro, sendo também bastante oneroso. Porém a conservação de sítios que flanqueiam os microssatélites entre espécies relacionadas permite a transferência destes marcadores entre espécies ou mesmo gêneros diferentes utilizando-se *primers* heterólogos (PINTO, 2007).

Desta forma, verificar se há a transferibilidade entre os locos desenvolvidos para o tucumã-do-Amazonas (*A. aculeatum*) ao tucumã-do-Pará (*A. vulgare*), foi o objetivo deste trabalho para acessar o genoma dessa espécie.

Material e Métodos

Foram coletados folíolos de plantas de tucumanzeiro pertencentes a povoamentos florestais de três diferentes mesorregiões do estado do Pará: Baixo Tocantins, Nordeste Paraense e Ilha de Marajó para a extração de DNA. Duas amostras de cada mesorregião foram selecionadas sendo elas: Oeiras do Pará e Irituia (Baixo Tocantins), Cachoeira do Arari e Salvaterra (Ilha de Marajó), Mocajuba e Santa Maria (Nordeste Paraense). A concentração do DNA foi estimada pelo programa Labimage, a partir das quantificações realizadas em gel de agarose á 1,0 %, pela comparação do DNA total com três concentrações do DNA Bacteriófago íntegro lambda. As amostras quantificadas foram diluídas para amostras de trabalho com 10 ng/ μ l de DNA e armazenadas a -20 °C.

As reações PCR foram feitas para doze locos desenvolvidos para *A. aculeatum* por Ramos et al. (2012) com o protocolo desenvolvido por esses autores, com adaptações em um volume final de aproximadamente 9 μ l (8,68 μ l), contendo volumes de 3,48 μ l de H₂O mili-Q; 1,0 μ l do buffer Tampão 10X; 1,0 μ l de mix dNTP (100 μ l de cada dNTP mais 600 μ l H₂O mili-Q); 1,0 μ l de MgCl₂ (2,5 mM/ μ l); 0,5 μ l de primer reverse (2,5 mM/ μ l); 0,5 μ l de primer forward (2,5 mM/ μ l); 0,2 μ l de Taq DNA polimerase (5 U/ μ l); e 1,0 μ l de DNA genômico (10 ng/ μ l). As amplificações foram realizadas em duas etapas, conforme Ramos et al. (2012).



A separação dos produtos amplificados foi feita em eletroforese horizontal por gel de agarose a 1,5 %, corado com brometo de etídio. Foram utilizados 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.

A avaliação da transferibilidade foi feita pela amplificação dos locos e pela nitidez.

Resultados e Discussão

Dos doze loci testados, seis apresentaram resultados satisfatórios de amplificação. A transferibilidade dos marcadores depende do grau de parentesco genético das espécies analisadas (GONÇALVES et al. 2011), assim o sucesso desse processo diminui com o aumento da distância filogenética entre as espécies em questão (PEREIRA et al. 2009).

Ramos et al. (2012), desenvolveram quatorze loci nucleares microsatélites para *A. aculeatum*, dos quais, de acordo com os autores, doze seriam transferíveis para espécies do gênero *Astrocaryum* (*A. acaule*, *A. jauari*, *A. murumuru* e *A. vulgare*) e para outras espécies da família *Areaceae*. Contudo, para a espécie em foco apenas seis amplificaram, o que representa uma transferibilidade de 50%. Os locos amplificados foram *Aac01*, *Aac03*, *Aac04*, *Aac05*, *Aac09* e *Aac14* (Figura 1)

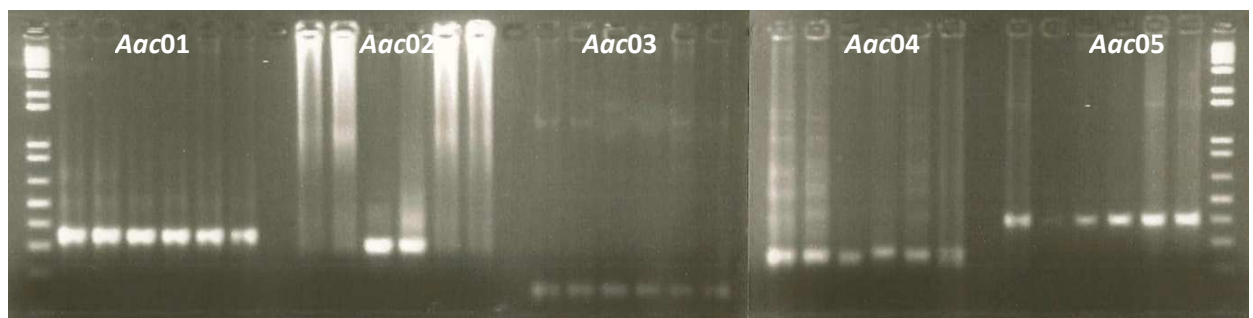


Figura 1. Perfil de gel de agarose contendo a amplificação dos locos *Aac01*, *Aac03*, *Aac04* e *Aac05* em *A. vulgare* Mart.

Conclusão

Os seis locos SSR amplificados mostram-se viáveis para acessar informações genéticas em genomas de *A. vulgare*, perfazendo uma taxa de 50% de transferibilidade e sugere elevado grau de parentesco entre as espécies.



Agradecimentos

À EMBRAPA Amazônia Oriental e à FINEP pelo apoio financeiro na condução do trabalho, à Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pela oportunidade do treinamento e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de mestrado a primeira autora.

Referências Bibliográficas

- COSTA, M.R.; OLIVEIRA, M. DO S.P. Extração de DNA de açaizeiro a partir de folhas. EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, DOCUMENTOS 127.2002.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus 12: 13-15.1990.
- GONÇALVES, F.K.; FÁVERO, T.M.; PINTO, L.R. **Avaliação de transferibilidade de microssatélites funcionais de sorgo (EST-SSR) visando a construção de mapas de ligação em cana-de-açúcar**. Anais do 5^o Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica- CIIC.2011.
- PEREIRA, A.A.; CLEMENT, C.R.; RODRIGUES, D.P. **Transferibilidade de locos microssatélites de pupunha (*Bactris gasipaes*) e côco (*Cocos nucifera*) para buriti (*Mauritia flexuosa*)**. 61^a Reunião Anual da SBPC. 2009.
- PINTO, M. F. F. C. **Caracterização de locos microssatélites em duas espécies de abelhas da região amazônica: *Melipona compressipes* e *Melipona seminigra* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina)**. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais)- Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus. 2007.
- RAMOS, S. L. F.; MACÊDO, J. L. V. DE; LOPES, M. T. G.; BATISTA, J. S.; FORMIGA, K. M.; SILVA, P. P. DA; SAULO-MACHADO, A. C.; VEASEY, E. A. **Microsatellite loci for tucumã of amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other arecaceae**. American Journal of Botany. 2012.