

70 Congresso
Brasileiro de
Melhoramento
de Plantas

05 a 08 de agosto de 2013
Center Convention - UBERLÂNDIA - MG

Variedade Melhorada:
A força da nossa agricultura



ANAIS

Transferibilidade de Locus Microssatélites de *Bactris gasipaes* para *Astrocaryum vulgare*¹

Eliciany de Nazaré Miranda Sanches¹, Maria do Socorro Padilha de Oliveira²

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a transferibilidade de locos microssatélites desenvolvidos para *Bactris gasipaes* em *Astrocaryum vulgare*. Para tanto foram selecionados 30 genótipos de *A. vulgare* conservados no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA. Após a quantificação, as 30 amostras de DNA foram submetidas à reação PCR utilizando oito locos microssatélites de *B. gasipaes*, com pequenas adaptações e sob duas temperaturas de anelamentos. Os produtos da amplificação foram analisados em géis de poliacrilamida 6% corados com prata. A transferibilidade dos locos foi avaliada com base na produção ou não de produto amplificado nas amostras de DNA. Sete locos (mBg17, mBg55, mBg58, mBg62, mBg66, mBg77 e mBg91) foram amplificados, com boa resolução e sem a presença de produtos secundários, conferindo uma transferibilidade de 87,5% desses locos para *A. vulgare*. Esses resultados sugerem que as espécies possuam algum grau de parentesco, sendo possível a aplicação dos locos transferíveis de *Bactris gasipaes* para *Astrocaryum vulgare* e, portanto sua viabilidade de uso em estudos de genéticos dessa espécie.

Introdução

Astrocaryum vulgare Mart., denominada comumente por tucumanzeiro, tucumã e tucumã-do-pará, é uma palmeira de ampla distribuição geográfica e, no Brasil, ocorre em vários estados do Norte, Nordeste e Centro-Oeste, como no Pará, Amapá, Roraima, Maranhão, Piauí, Ceará, cujo seu plantio vem sendo indicado para a recuperação de áreas degradadas, uma vez que é usado de forma integral pela população dessas áreas (Brasil 2002; Lorenzi et al. 2006). Seus frutos e derivados são muito apreciados por apresentarem grande valor nutritivo, tendo três vezes mais vitamina A que a cenoura e superando vários frutos, além conter óleo rico em ácidos graxos saturados e glicerídeos trissaturados, com potencial para a indústria de cosméticos, medicamentos (Lorenzi et al. 2006) e de ter sido indicado como alternativa para o mercado de biodiesel. Apesar do potencial energético e fármaco-coméstico apresentado por essa palmeira, poucos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de obter informações que contribuam para a sua domesticação e melhoramento.

Uma maneira rápida, barata e simples de identificar e caracterizar geneticamente um grande número de genótipos é através da tecnologia dos marcadores moleculares. Estes podem ser definidos como características de DNA, herdadas geneticamente e que servem como base para diferenciar um ou mais indivíduos, permitindo o estudo da genética de populações, mapeamento, análises de similaridade, e distância genética (Ramos et al., 2011). Marcadores microssatélites, também conhecidos por SSR (*Simple Sequence Repeats*) consistem de pequenas sequências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem, atualmente vem sendo os mais indicados para estudos dessa natureza (Grattapaglia, 2007). No entanto, a grande limitação do uso em larga escala de marcadores SSR, está no desenvolvimento de *primers* específicos, um processo trabalhoso e caro. Muitos estudos têm sido publicados mostrando a possibilidade de usar pares de *primers* desenvolvidos para uma espécie em outras espécies próximas do ponto de vista evolutivo. Nesse foco tem-se os trabalhos de Ramos et al (2011), que obtiveram sucesso ao trabalhar com oito locos microssatélites desenvolvidos para pupunha (*Bactris gasipaes*) por Martínez et al. (2002) e Billote et al. (2004) em tucumã-do-amazonas (*A. aculeatum*).

O objetivo desse trabalho foi analisar a transferibilidade entre os locos desenvolvidos para *Bactris gasipaes* em *Astrocaryum vulgare* com vista a subsidiar estudos de caracterização molecular.

Material e Métodos

Para a realização desse trabalho, foram escolhidas 30 amostras de DNA genômico de uma população

¹ Trabalho desenvolvido pela Embrapa Amazônia Oriental com o apoio financeiro parcial da FINEP

² Aluna de graduação da Universidade federal rural da amazônia(UFRA) e bolsista de projeto da Embrapa. e-mail: any.mirandasanches@gmail.com

³ Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental-CPATU-EMBRAPA/Belém. e-mail: socorro-padilha.oliveira@embrapa.br

de *A. vulgare*, as quais se encontram conservadas sob baixa temperatura (- 80°C) no banco de DNA da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA.

As amostras foram descongeladas e quantificadas em gel de agarose a 1%, pela comparação do DNA total com três concentrações do DNA Bacteriófago íntegro lambda. As amostras de DNA, após a quantificação foram diluídas em água estéril para uma concentração de trabalho de 10 ng/ul de DNA. As alíquotas foram armazenadas a -20 °C.

Primeiramente, as reações de amplificação com o uso dos oito locos (Tabela 1), sendo dois (Bg17 e Bg55) desenvolvidos por Martínez et al. (2002) e os demais por Billote et al. (2004) foram aplicadas em cinco amostras de DNA escolhidas ao acaso, sendo desenvolvidas de acordo com o protocolo desenvolvido por Billote et al. (2004) com adaptações, para volume final de 10 ul, contendo volumes de 3,8 µl de H₂O mili-Q; 1,0 µl do buffer Tampão 10X; 1,0 µl de mix dNTP (100 µl de cada dNTP mais 600 µl H₂O mili-Q); 1,0 µl de MgCl₂ (2,5 mM/µl); 0,5 µl de *primer reverse* (2,5 mM/µl); 0,5 µl de *primer forward* (2,5 mM/µl); 0,2 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl); e 1,0 µl de DNA genômico (10 ng/µl).

As amplificações foram realizadas em dois passos, conforme descrito por Rodrigues *et al.*, (2004) e adaptado por Ramos (2011). A primeira etapa consistiu na desnaturação a 94°C por 2 min, seguida de 25 ciclos a 94°C por 10s, temperatura de anelamento (Ta) do *primer* (Tabela 1) por 20s e 72°C por 30s. A segunda etapa consistiu em um ciclo de 72°C durante 10 min, seguido de 20 ciclos a 94°C por 10s, depois 50°C por 20 segundos, 72°C por 30segundos, finalizando com uma extensão a 72°C durante 30 min. Todos os locos SSR foram testados inicialmente com temperatura de anelamento (Ta) entre 52°C e 59°C. Depois, na Ta de melhor amplificação nas 30 amostras de DNA.

Os produtos da amplificação das cinco amostras foram observados em gel de agarose ultrapura a 3% corado com brometo de etídio, para observar se houve amplificação ou não dos locos (Figura 1). Os que amplificaram foram aplicados em 30 amostras e revelados em gel de poliacrilamida 6% corados com prata para verificação dos alelos.

Tabela 1 Identificação dos oito locos microssatélites de *B. gasipaes* testados em *A. Vulgare*.

<i>Locos</i>	Sequencia 5'-----3'	Amplitude (bp)	Ta¹ (°C)
mBg 17	F: TTGTCTGCTCTAGCTCATTGG R: CGCTCAATCCAGTGCAAG	170-228	58
mBg55	F: TTCTGGGTGCGGTGGTAG R: ATGATGGACTGAAGAGATGGAATAG	281 a 306	58
mBg41	F: TGGAGGTTTCAAGATAGAC R: AGTGTTGGCGATCTGTC	100 a 170	52
mBg58	F: TTTGATACCCAGAGAGA R: AGCGAGAAACACGAATAC	180 a 210	52
mBg62	F: CTACAGGGAGTGCATCTAC R: CCACCATTTCAGCAATATTAG	119 a 240	52
mBg66	F: GCATGTTGCATTGACTA R: GAATCCTGGTTCAGATACT	195 a 230	52
mBg77	F: TTTGCATGTTGGGACAT R: ACTGCTACTGGCACTGTAAG	220 a 270	52
mBg91	F: CAAGAACAGGCTCAGTCTA R: TGCAATCAACCCAAGAT	180 a 210	52

¹: temperaturas de anelamento utilizadas no desenvolvimento dos locos por Martínez et al. (2002) e Billote et al. (2004).

Resultados e Discussão

Dos oito iniciadores avaliados, sete amplificaram produtos e com boa resolução nas temperaturas de anelamento nos quais foram desenvolvidos (Figura 1), o que representa uma taxa de transferibilidade de 87,5%, podendo considerar eficiente. Esse alto valor de transferibilidade pode ser justificado pela maior proximidade evolutiva entre as duas espécies que pertencem à mesma família, Arecaceae, Tribo Cocoeae (Billote et al., 2004) e ocorrência basicamente na mesma região (Roncal et al., 2013). Resultados semelhantes foram alcançados por Costa et al (2012) ao avaliarem a transferibilidade de seis locos microssatélites dos 18 desenvolvidos para *Euterpe edulis*, os quais sete já haviam sido relatados como transferíveis para *E. oleracea* (Gaiotto et al., 2001), e desse total cinco foram transferíveis para *Elaeis guinensis*. Resultados como os apresentados, evidenciam que a transferibilidade é maior em espécies cujo grau de parentesco genético é maior.

O loco mBg41 apesar de ter apresentado amplificação em *A. vulgare*, ao ser aplicado nas 30 amostras em gel de poliacrilamida 6% revelou pouco polimorfismo (apenas um alelo) e de baixa resolução e foi considerado como não transferível. A Figura 2 mostra um exemplo de transferibilidade com o locus mBg77 para as 30 amostras de *A. vulgare*.

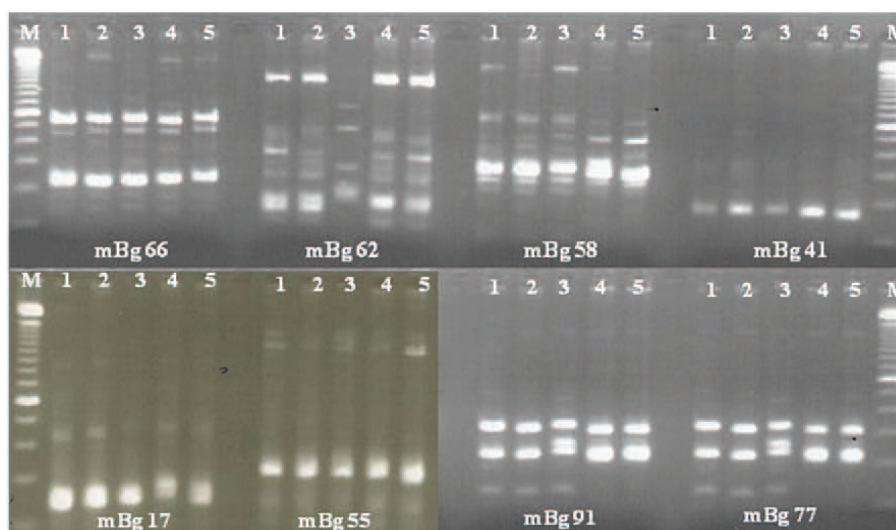


Figura 1 Perfil dos produtos de amplificação de cinco amostras de DNA genômico de *A. vulgare* testados em oito locos microssatélites de *B. gasipaes*, em Ta de 52°C (mBg66, mBg62, mBg41, mBg91 e mBg77) e 58°C (mBg17 e mBg55), em gel de agarose. M = Padrão DNA ladder de 100pb.

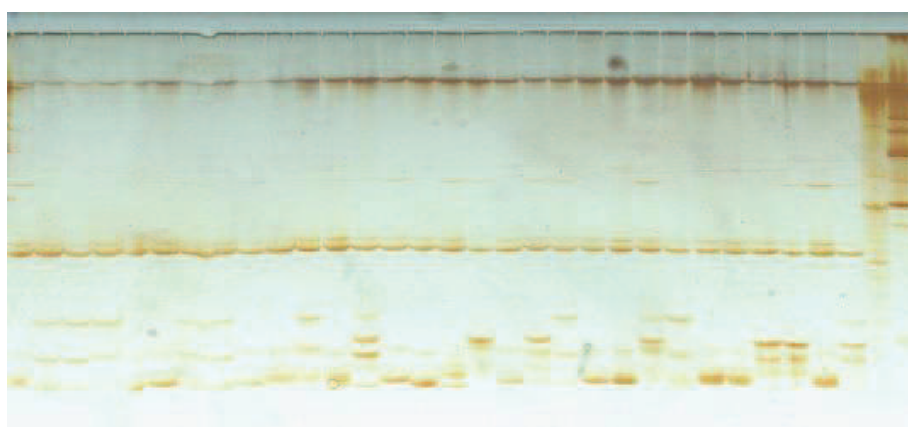


Figura 2 Gel de poliacrilamida contendo produtos de amplificação (alelos) do iniciador mBg77 aplicado em 30 amostras de *A. vulgare*, em temperatura de anelamento de 52°C. Padrão DNA ladder 10 (M₁) e 100 (M₂) pb.

Tais resultados demonstram que houve sucesso na transferibilidade de locos de *Bactris gasipaes* para *A. vulgare*, sendo esta alta. Logo, pode sugerir que os sete locos transferíveis (mBg17, mBg55, mBg58, mBg62, mBg66, mBg77 e mBg91) possam ser utilizados com sucesso em trabalhos que acessem o genoma de *A. vulgare*.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa via projeto componente 09 – BAGEAP, e à FINEP pelo apoio financeiro e, à Embrapa Amazônia Oriental pela concessão de bolsa de projeto à primeira autora.

Referências

- Billote N et al. (2004) A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth); characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae. **Molecular Ecology Notes** 4: 580–582.
- Brazil MH (2002) **Brazilian Regional Foods. Northern Region: Fruit. Brasília, Brasil. 140 p.**
- Costa MR, Oliveira MSP, Nascimento SV, Silva CA (2012) Transferibilidade de iniciadores microssatélites de açaizeiro (*Euterpe oleracea*) para dendezeiro (*Elaeis guinensis*). **Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos**, 2. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. CDrom, 1-4p.
- Gaiotto FA, Brondani RPV, Grattapaglia D (2001) Microsatellite markers for heart of palm *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Palmae). **Molecular Ecology Notes** 1: 86-88.
- Grattapaglia D Aplicações operacionais de marcadores. In: Borém A (ed.) Biotecnologia florestal. Ed UFV, Viçosa, p. 175-200.
- Lorenzi H et al (2006) **Brazilian Fruit and Exotic Cultivated.. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, São Paulo, 640 p.**
- Martínez AK et al (2002) Microsatellite loci in *Bactris gasipaes* (Arecaceae): their isolation and characterization. **Molecular Ecology Notes** 2: 408-410.
- Ramos SLF et al (2011) Determination of the mating system of Tucumã palm using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 11: (2), 181-185.
- Roncal J et al (2013) Cenozoic colonization and diversification patterns of tropical American palms: evidence from *Astrocaryum* (Arecaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 171: 120–139.