

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



18º Seminário de
Iniciação Científica e
2º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2014

12 a 14 de agosto

Embrapa
Belém, PA
2014



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

Andréa Cristina Rodrigues Fortes¹, Maria do Socorro Padilha de Oliveira², Natália Padilha de Oliveira³, Ilenilce Castro da Silva⁴

¹ Mestranda do Programa de Biotecnologia aplicada à Agropecuária UFRA/ Embrapa Amazônia Oriental.

andreafortes@rocketmail.com

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

³ Doutoranda Universidade Federal de Lavras (UFLA). Natybiologia2006@gmail.com

⁴ Mestranda do Programa de Biotecnologia aplicada à Agropecuária UFRA/ Embrapa Amazônia Oriental. ilenilcecastrolamarck@gmail.com

Resumo: Este trabalho foi realizado com o objetivo de testar a transferibilidade de locos SSR de *Astrocaryum aculeatum* para a espécie *Astrocaryum murumuru*. Para isso, foram aplicados dez locos desenvolvidos para *A. aculeatum* em cinco amostras de DNA obtidas de matrizes de *A. murumuru* de diferentes procedências. As reações de amplificação foram conduzidas de acordo com o protocolo desenvolvido por Ramos et al. (2012), com pequenas adaptações para testar diferentes temperaturas de anelamento, com a finalidade de determinar a temperatura ótima de amplificação em *A. murumuru*. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e submetidos à eletroforese horizontal por 1h 30 min. 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. Todos os locos testados apresentaram amplificação satisfatória (visualização do produto), perfazendo uma taxa de transferibilidade de 100%, sugerindo que as espécies possuam alto grau de parentesco e sendo, portanto, úteis para acessar o genoma de *A. murumuru*.

Palavras-chave: amplificação, microssatélites, palmeira

Introdução

Astrocaryum murumuru Mart. é uma espécie nativa de grande importância sócio-econômica na Amazônia (FERREIRA, 2011), bem como uma das palmeiras mais abundantes da várzea estuarina (FREITAS et al., 2011). É bastante utilizada para construção de casas a partir das folhas e estipes e na alimentação, através do consumo do palmito e óleos comestíveis, além de ter os frutos usados industrialmente para formulação de sabonetes (JARDIM; STEWART, 1994 citado por FREITAS et al., 2011).



Dada a importância da espécie, a realização de estudos moleculares se faz necessária para subsidiar a formação e incremento de bancos de germoplasma e fornecer informações úteis para programas de melhoramento e conservação desta palmeira.

Dentre as diversas classes de marcadores moleculares úteis na realização de estudos moleculares, encontram-se os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat), que são pequenas sequências de DNA repetidas *in tandem*. Os microssatélites são considerados ideais para estudos de genética de populações e diversidade genética (NASS, 2007).

Apesar de sua utilidade, a caracterização por estes marcadores requer seu desenvolvimento prévio para a espécie em questão, sendo este um processo demorado e oneroso. Entretanto, uma saída para o uso destes marcadores em espécies onde ainda não há relatos do seu desenvolvimento, é o uso de primers heterólogos, já que a conservação dos sítios que flanqueiam os microssatélites entre espécies relacionadas permite a transferência destes marcadores entre espécies ou mesmo gêneros diferentes (PINTO, 2007).

Desta forma, a transferibilidade entre os locos desenvolvidos para o tucumã-do-Amazonas (*A. aculeatum*) ao murumuru (*A. murumuru*) foi o objetivo deste trabalho.

Material e Métodos

Foram coletados folíolos de plantas de murumuzeiro de diferentes regiões para a extração de DNA). A concentração do DNA foi estimada em gel de agarose a 1%, 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/ul de DNA e armazenadas a -20 °C.

Para a realização das reações PCR foram escolhidas aleatoriamente, cinco amostras de murumuzeiro. As reações foram feitas para dez locos de acordo com o protocolo desenvolvido para *A. aculeatum* por Ramos et al. (2012), com adaptações em um volume final de aproximadamente 9 ul (8,68 ul), contendo volumes de 3,48 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 duas etapas, conforme Ramos et al. (2012). Foram testadas diferentes temperaturas de anelamento para cada loco, considerando a temperatura ótima citada por Ramos et al. (2012) (Tabela 1).



Tabela 1 Locos desenvolvidos para *A. aculeatum* testados nas amostras de *A. murumuru*, com suas respectivas temperaturas de anelamento, recomendadas por Ramos et al. (2012) e testadas.

| Loco | Ta recomendada (°C) | Ta testadas (°C) |
|-------------|----------------------------|-------------------------|
| Aac 01 | 60.0 | 58-59-60-61-62-63 |
| Aac 02 | 60.0 | 58-59-60-61-62-63 |
| Aac 03 | 60.0 | 58-59-60-61-62-63 |
| Aac 04 | 60.0 | 58-59-60-61-62-63 |
| Aac 05 | 62.0 | 60-61-62-63-64-65 |
| Aac 06 | 64.0 | 62-63-64-65-66-67 |
| Aac 10 | 60.0 | 58-59-60-61-62-63 |
| Aac 11 | 60.0 | 58-59-60-61-62-63 |
| Aac 12 | 60.0 | 58-59-60-61-62-63 |
| Aac 13 | 60.0 | 58-59-60-61-62-63 |

Ta= temperatura de anelamento

A separação dos produtos amplificados foi feita em eletroforese horizontal por gel de agarose a 1,5 %, corado com brometo de etídio. Ao volume total da reação foram acrescentados 5 ul de azul de bromofenol, aplicando-se essa mistura no gel. 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 com base na amplificação dos locos e na nitidez das bandas produzidas.

Resultados e Discussão

Os dez locos testados apresentaram amplificação, em pelo menos uma temperatura de anelamento, sendo escolhidas as temperaturas ótimas que variaram de 59 a 65°C (Tabela 2).

Tabela 2 Locos desenvolvidos para *A. aculeatum* testados em amostras de *A. murumuru*, com suas respectivas temperaturas ótimas de anelamento.

| Loco | Ta recomendada (°C) | Ta ótima (°C) |
|-------------|----------------------------|----------------------|
| Aac 01 | 60.0 | 59 |
| Aac 02 | 60.0 | 58 |
| Aac 03 | 60.0 | 60 |
| Aac 04 | 60.0 | 60 |
| Aac 05 | 62.0 | 63 |
| Aac 06 | 64.0 | 65 |
| Aac 10 | 60.0 | 60 |
| Aac 11 | 60.0 | 62 |
| Aac 12 | 60.0 | 62 |
| Aac 13 | 60.0 | 62 |

Ta= temperatura de anelamento



Gonçalves et al. (2011) relatam que a transferibilidade dos marcadores depende do grau de parentesco genético das espécies analisadas, assim os resultados sugerem alto grau de parentesco entre *A. aculeatum* e *A. murumuru*.

A alta taxa de transferibilidade encontrada neste trabalho, corrobora com os resultados obtidos por Ramos et al. (2012), que ao desenvolverem quatorze loci nucleares microssatélites para *A. aculeatum*, observaram que doze seriam transferíveis para espécies do gênero *Astrocaryum*, dentre as quais, *A. murumuru*, e para outras espécies da família *Arecaceae*.

Conclusões

Os dez locos microssatélites desenvolvidos para *Astrocaryum aculeatum* mostram-se viáveis para acessar informações genéticas em genomas de *A. murumuru*.

Referências Bibliográficas

- FERREIRA, E. J. L. Caracterização anatômica das pinas foliares de *Astrocaryum murumuru* Mart. (*Arecaceae*). In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 63., 2011, Goiânia. **Cerrado**: água, alimento e energia. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2011. FREITAS, M. A. B.; LOPES, M. A.; FARIAS, L. M. A. Fenologia reprodutiva de *Astrocaryum murumuru* Mart. em um fragmento de floresta de várzea estuarina em Belém, Pará. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 10., 2011, São Lourenço, MG. **Anais...** São Lourenço, MG: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2011.
- GONÇALVES, F. K.; FÁVERO, T. M.; PINTO, L. R. Avaliação de transferibilidade de microssatélites funcionais de sorgo (EST-SSR) visando à construção de mapas de ligação em cana-de-açúcar. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 2011, Campinas. **Anais...** Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2011.
- NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
- 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) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- 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**, v. 99, n. 12, p. e508-e510, 2012.