



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

A ESPÉCIE SYAGRUS OLERACEA: DIVERSIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA, ANÁLISE DE BIOMETRIA DE SEMENTES E POTENCIAL PARA DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS COSMÉTICOS

Autores: GABRIELLA PEREIRA ROCHA, DARIO ALVES DE OLIVEIRA, AFRÂNIO FARIAS DE MELO JÚNIOR, MURILO MALVEIRA BRANDÃO, VANESSA DE ANDRADE ROYO, ELYTANIA VEIGA MENEZES

Introdução

As plantas popularmente conhecidas como palmeiras apresentam grande variedade morfológica e compreendem a família Arecaceae, que abrange atualmente 200 gêneros e aproximadamente 2800 espécies. A família tem distribuição pantropical, e no Brasil são representados 35 gêneros e 380 espécies, distribuídas em todos os ecossistemas terrestres [1].

Syagrus oleracea é uma espécie nativa muito importante no contexto de desenvolvimento regional, apresentando grande potencial para cultivo extensivo em todo Brasil pelos vários produtos que pode fornecer, além do palmito amargo que é o mais conhecido, pode gerar óleo com potencial para utilização na indústria de cosméticos e até biodiesel. Trata-se de uma espécie incipientemente domesticada [2] e, por isso, informações sobre a caracterização morfológica de acessos que possam ser utilizados em programas de melhoramento, são escassas. Além disso, a ação antrópica na região de semiárido onde se encontra pode ocasionar destruição de seu habitat e conseqüentemente, a perda da biodiversidade, o que gera a perda da variação genética. Por isso torna-se importante o desenvolvimento de atividades científicas referentes à caracterização genética da espécie, para utilização dos resultados na definição de estratégias de conservação.

A genética molecular tem se tornado uma importante ferramenta para o estudo da biologia de populações, especialmente para aquelas cujas informações são difíceis de ser obtidas por meio de observações diretas [3]. Nesse contexto, os marcadores microssatélites, ou SSR (Simple Sequence Repeat) são muito utilizados como ferramentas moleculares em estudos de variabilidade genética de animais e plantas, pois permite conhecer a distribuição da variabilidade entre e dentro de populações naturais, o que é de grande importância para se adotar estratégias eficientes para a conservação [4].

Entre muitas espécies, esses marcadores se encontram bem relacionados, tornando possível a transferência de uma espécie para outra, possibilitando visualizar o grau de semelhança entre estas [5]. A transferibilidade de marcadores SSR entre espécies tem sido empregada e comprovada em altas taxas, sendo esta metodologia utilizada como estratégia mais econômica, uma vez que desenvolver marcadores SSR é trabalhoso e tem elevado custo.

Diante disso, este trabalho tem o objetivo de testar e verificar a transferibilidade de primers SSR desenhados para as espécies *Acrocomia aculeata* e *Cocos nucifera* na espécie *Syagrus oleracea*. Possibilitando assim, o estudo da diversidade genética da espécie *Syagrus oleracea* em populações nativas do Norte de Minas Gerais.

Material e métodos

1. Área de Estudo e Amostragem

As coletas foram realizadas nos municípios de Rio Pardo de Minas, Novo Horizonte, São João da Ponte e Varzelândia, localizados no norte do estado de Minas Gerais. Cada um desses municípios recebeu o nome de população e foram indicados com números de um a quatro, respectivamente.



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

Em cada população foram selecionados dez indivíduos de *Syagrus oleracea*, dos quais foram coletadas folhas de brotações mais novas. As amostras foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo até a chegada no laboratório. Em seguida estas foram lavadas em água corrente, congeladas em nitrogênio líquido por alguns segundos e armazenadas em freezer a - 80°C até o momento das análises bioquímicas.

2. Extração e Amplificação do DNA

Para a extração do DNA das folhas de cada indivíduo amostrado foi utilizada a metodologia CTAB (“cetyltrimethylammoniumbromide”) proposta por Doyle e Doyle [6], com algumas modificações. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose a 1%, comparando visualmente a intensidade das bandas do DNA dos genótipos extraídos com bandas de peso molecular conhecido de 100pb. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água ultrapura para serem utilizadas em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Cada amostra de DNA genômico total foi amplificada com seis pares de primers SSR desenvolvidos para *Acrocomia aculeata* e *Cocos nucifera*, os quais foram otimizados para então serem testados nesses genótipos. Para cada reação de PCR foi utilizado um mix contendo: 14,5 uL de água ultrapura; 1,5 µL de tampão 10X; 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM; 1,5 µL de dNTPs 25 mM cada; 1,5 µL de cada primer a 1µM; 1 µL de Taq DNA polimerase e mais 2 µL de DNA genômico. O volume final para cada reação foi de 25µL. A amplificação foi realizada em termociclador, sendo que a temperatura de anelamento de cada primer variou de 47°C a 52°C. Para a visualização dos resultados das reações de PCR foi utilizado gel de agarose a 1% de concentração, por Fotodocumentador Gel Logic e os resultados avaliados.

Resultados e Discussão

A transferibilidade de marcadores microssatélites entre espécies estreitamente relacionadas, reduz o custo de desenvolvimento do primer, e abre novas perspectivas para o estudo de genética de populações.

Do total de 6 primers SSRs testados, apenas para o primer Aacu 32 não se obteve sucesso na transferência, uma vez que não foi possível realizar a amplificação durante os testes de padronização. Os resultados seguintes demonstraram que, 3/5, ou seja, 60% dos primers testados e padronizados apresentaram polimorfismo (Tabela 1). A porcentagem de polimorfismo por loci tem sido usada como medida de diversidade genética em estudos com populações naturais com a utilização de marcadores moleculares co-dominante. [7].

A temperatura de anelamento dos primers foram baseadas no protocolo de seu fabricante. Levou-se em consideração a temperatura de melting (T_m) e foram alteradas visando a amplificação com maior especificidade dos fragmentos desejados. Sendo que, a Temperatura de anelamento testada teve uma variação média de 2,4 °C quando comparada à Temperatura de anelamento descrita (conforme a Tabela 1). Todos os primers testados, com exceção do Aacu32, foram descritos anteriormente por Simplicio et al. 2017 [8], e algumas diferenças foram observadas. O primer CNZ50 teve a maior modificação de temperatura, quando comparada à descrita, porém a amplificação foi eficiente, igualando o tamanho de seus fragmentos aos da literatura. A diferença de temperatura pode estar relacionada a alguns fatores, como mutações na região de anelamento do primer, ou mesmo devido ao equipamento utilizado para fazer a PCR.

Quanto ao tamanho dos fragmentos obtidos e a variação alélica, todos coincidiram com os descritos na literatura, ambos os trabalhos exibiram um número médio de alelos por locus de 9,8. CNZ57 e CNZ50 apresentaram os menores fragmentos, chegando a 120 pares de bases; os maiores fragmentos foram obtidos pelo primer mBgCIRO66, com limite de 257 pares de bases.

O polimorfismo é detectado pela amplificação dos fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, pela reação de PCR. Somente foram consideradas as bandas monomórficas e polimórficas que se apresentaram de forma consistente e reproduzível nos géis de agarose. Os primers CNZ50 e CNZ51 foram os únicos que não apresentaram polimorfismo, sendo que, o baixo polimorfismo pode ser explicado pela maior similaridade genética entre os parentais.

As informações geradas pelos seis primers utilizados nas amplificações de fragmentos de DNA foram consideradas satisfatórias para avaliar a diversidade genética entre os indivíduos amostrados.

Conclusões

A transferibilidade dos marcadores microssatélites para *S. oleracea* foi realizado com sucesso. De acordo com as informações obtidas neste estudo, os marcadores transferidos poderão ser usados como ferramentas robustas para análises genéticas de populações de *S. oleracea*. Devido à alta diversidade de espécies e aos custos de desenvolvimento de marcadores microssatélites específicos, a transferibilidade de primers heterólogos é uma alternativa adequada para estudos de genética populacional em hotspots de biodiversidade [9].

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)

Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa PIBICde Iniciação Científica e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) cujo auxílio permitiu a realização desse trabalho.

Referências

- [1] MEDEIROS-COSTA, J. T. 2002. As espécies de palmeiras (Arecaceae) do Estado de Pernambuco, Brasil. In: Tabarelli, M. & Silva, J. M. C. Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco. 1, SECTMA & Massangana. Recife. p. 229-136.
- [2] CLEMENT, C.R. Melhoramento de espécies nativas {Improvement of native species}. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARESINGLIS, M.C. (Ed.). Recursos genéticos & melhoramento: plantas. , Rondonópolis: Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso, 2001. p. 423-441.
- [3] BRYJA J, Kanuch AP, Fornuskova A, Bartonicka T & Rehak Z. 2009. Low population genetic structuring of two cryptic bat species suggests their migratory behaviour in continental Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 96 (1): 103-114.
- [4] OLIVEIRA et al,2006. Microsatellite Transferability. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Departamento de Genética, Piracicaba, SP, Brasil. Pp. 6.
- [5] FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: Embrapa. 1998.
- [6] DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15, 1990.
- [7] XIA, X., CHEN, H., LI, Z., WANG, P. AND WANG, J. (2007). Significant reduction of surface solar irradiance induced by aerosols in a suburban region in northeastern China. *Journal of Geophysical Research* 112: doi: 10.1029/2006JD007562. issn: 0148-0227
- [8] SIMPLICIO, R. R.; PEREIRA, D. G.; WALDSCHMIDT, A. M. Transferability of microsatellite markers in *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (Arecaceae), an iconic palm tree from the Brazilian semi-arid region. *Genetics and molecular research: GMR*, v. 16, n. 2, 2017.
- [9] BARBARÁ T, PALMA-SILVA C, PAGGI GM, BERED F, et al. (2007). Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol. Ecol.* 16: 3759-3767.

Tabela 1. Primers testados no trabalho, suas sequências, Temperatura de Anelamento (Ta) em °C e Tamanho dos fragmentos (pb: Pares de base).

Primer	Sequência Forward	Sequência Reverse	Ta Testada / Ta Descrita	Tamanho dos fragmentos (pb)	Polimorfismo
mBgCIRO66	GCA TGT TGC ATT GAC TA	GAA TCC TGG TTC AGA TAC T	50°C/48°C	253-257	Polimórfico
CNZ44	CAT CAG TTC CAC TCT CAT TTC	CAA CAA AAG ACA TAG GTG GTC	50°C/51°C	131-168	Polimórfico
CNZ50	TCG ACT AAG TGT TGT CCA TTC	ATC CAT CCA GGA TCC CAA TAT	47°C/52°C	114-120	Monomórfico
CNZ51	CTT TAG GGA AAA AGG ACT GAG	ATC CAT GAG CTG AGC TTG AAC	51°C/53°C	138-150	Monomórfico
CNZ57	AGT GAC AGC TCA AAG CAG TAT	GTG GAG TAC ACA ACC TAT GGA	52°C/54°C	099-105	Polimórfico
		TCT TGC TTA CGC GTG GAC TA			-
Aacu32	AGA AGC CGA TTT CCT AAT TG		-/53°C	-	