DIVERGÊNCIA GENÉTICA NO AÇAIZEIRO COM BASE EM MARCADORES RAPD[1]

Maria Rosa COSTA[2]
Maria do Socorro Padilha de OLIVEIRA[2]
Miriã Mutsumi Minato OHAZE[3]

RESUMO: A divergência genética de acessos de açaizeiro, com variação para coloração de frutos, foi avaliada através de marcadores RAPD. A extração de DNA foi feita a partir do protocolo de Nelson (1993), modificado, e para as amplificações utilizou-se o protocolo de Williams et al. (1990), modificado. Utilizaram-se 12 *primers* que geraram 161 bandas polimórficas. A análise de divergência genética foi realizada a partir do programa NTSYS-pc 2.02, utilizando o coeficiente de Jaccard. Na análise do dendograma, foram observados dois grupos principais. A divergência genética gerada com estes marcadores mostrou variabilidade potencial para o programa de melhoramento genético, embora não tenha havido correlação direta entre a coloração de frutos e a distância genética obtida.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Euterpe oleraceae*, Marcadores Moleculares, RAPD, Divergência Genética.

GENETIC DIVERGENCE IN EUTERP PALM BASED ON RAPD MARKERS

ABSTRACT: The genetic divergence of access of euterp palm (*Euterpe oleraceae* Mart.) with variation for coloration of fruits was evaluated using RAPD markers. The DNA extraction was made according to modified protocol of Nelson (1993) and the PCR analysis was made following modified protocol of Williams et al. (1990). The twelve RAPD primer utilized produced one hundred sixty one polimorphic bands. Genetic divergence analysis was carried out, by NTSYS–pc, 2.02, and get Jaccard coefficient. As result, the dendogram was divided in two groups. The genetic divergence obtained with these markers showed genetic diversity that can be used in breeding programs ,however, were not related with fruits coloration.

INDEX TERMS: *Euterpe oleraceae*, molecular markers, RAPD, genetic divergence.

---

[1] Aprovado para publicação em 16.06.2004

[2] Engenheira Agrônoma, M.Sc. Genética e Melhoramento de Plantas. Embrapa Amazônia Oriental. Cx. Postal 48. CEP 66.017-970-Belém (PA).

[3] Aluna do curso de Agronomia da UFRA.

1 INTRODUÇÃO

O açaizeiro, espécie nativa da Amazônia, destaca-se como uma das palmeiras mais produtivas dessa região, através da exploração de frutos e palmito (ROGEZ, 2000). A produção de frutos é destinada, especialmente para o mercado local e regional, para o processamento da bebida denominada açaí a qual, devido à composição química e valor nutricional, vem conquistando o mercado de outras regiões brasileiras. Apesar da importância econômica dessa palmeira, não existem variedades e nem cultivares devidamente avaliadas e caracterizadas (OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO, 2000). Contudo, há registros de grandes variações nas populações naturais, nos cultivos subespontâneos e nos cultivos em escala comercial que estão surgindo dessa espécie.

Para o mercado de frutos, uma das principais variações está relacionada com a coloração dos frutos quando maduros, sendo consideradas erroneamente de duas variedades: Roxa ou violácea e Verde, as quais dão origem a dois tipos de bebida: açaí e açaí branco, respectivamente, sendo a primeira a de maior ocorrência e de maior volume comercializado (OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO, 2000). Até o momento nada foi evidenciado sobre essa variação. Oliveira e Muller (1998), avaliando morfologicamente os acessos de açaizeiro da coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, encontraram variações para coloração de frutos maduros em plantas do mesmo acesso coletado como sendo do tipo violáceo. Assim sendo, pode-se considerar a caracterização genética como uma alternativa viável para auxiliar na caracterização desses acessos.

O uso de marcadores moleculares RAPD constitui-se em uma poderosa ferramenta na caracterização de germoplasma (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1996). Tais marcadores poderão ser empregados para identificar e auxiliar a seleção de genótipos promissores (STUBER, 1992) e auxiliar na escolha do material para a constituição dos bancos de germoplasma e na preservação racional da espécie em estudo.

Os estudos de caracterização através de marcadores moleculares em associação com avaliação da divergência genética, nesta espécie, são bastante limitados. Mas, estudos dessa natureza são considerados prioritários, devido à presente necessidade de se quantificar a variabilidade genética dos acessos, verificar a similaridade entre eles, a fim de sanar dúvidas quanto à origem e uso nos cruzamentos, além de auxiliar na escolha de acessos potenciais para o enriquecimento da variabilidade genética no próprio Banco Ativo de Germoplasma de açaizeiro. Apesar da reconhecida variabilidade fenotípica existente nesse banco, o germoplasma dessa palmeira tem sido pouco estudado sob o ponto de vista genético. O uso combinado de marcadores morfológicos e moleculares subsidiará os trabalhos de melhoramento, na busca de

cultivares mais produtivos e com características de qualidade que atendam demandas do setor produtivo, contribuindo, ainda, para o intercâmbio de material e de informações entre instituições de pesquisa.

O objetivo deste trabalho foi examinar o polimorfismo gerado por marcadores RAPD e analisar a diversidade genética para a coloração dos frutos entre acessos de açaizeiro pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DE FOLHAS E EXTRAÇÃO DO DNA

Para a realização desse estudo foram selecionados acessos de açaizeiro que apresentavam variação para coloração de frutos maduros (Quadro 1) provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém (PA), para a coleta de folhas.

De cada planta foi obtida uma amostra de folíolos retirados de folhas novas, colocadas separadamente em embalagem plástica, identificada e transportada para o Laboratório de Genética dessa instituição.

O DNA genômico foi obtido através de folhas em estádio médio de desenvolvimento, recém-coletadas que, após desinfecção, foram maceradas com nitrogênio líquido. Cerca de 200 mg de pó foram transferidos para tubos eppendorf. Adicionaram-se em seguida 700 µL de solução extratora. Os tubos foram vortexados e colocados em banho-maria a 60 °C, durante 60 minutos. O extrato foi misturado com 700 µl de clorofórmio-álcool isoamil (24:1) para formar uma emulsão. Após centrifugar por 10 minutos a 4 °C e 12 000 rpm, a parte superior aquosa foi cuidadosamente isolada e submetida a álcool 95 %, o que ocasionou a precipitação do DNA. O material foi colocado em freezer (-20 °C) por 20 minutos, sendo, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 4 °C e 12 000 rpm, lavado com 1000 µl de etanol 70 % para remover sais e, posteriormente, seco à temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas. O DNA foi ressuspendido com 100 µl RNAse/ TE (10 $ug.mL^{-1}$).

A concentração de DNA foi estimada em gel de agarose 1,0 %, pela comparação do DNA total com três concentrações do DNA lambda. As amostras utilizadas no RAPD, após a quantificação total, partiram de diluições da amostra total em água estéril, de modo a conter 5 ng/µL de DNA. As alíquotas foram armazenadas a -20 °C.

2.2 ANÁLISE RAPD

As reações foram desenvolvidas de acordo com o protocolo de Williams *et al.* (1990) com pequenas modificações, num volume final de 13 µL contendo água destilada autoclavada, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 2,0 mM MgCl2, 200 µM de cada dNTP, BSA purificada (2,5 mg/ml), 1,3 uM *primer* arbitrário, 1U.I Taq DNA polimerase e 15 ng de DNA genômico, cobertas com duas gotas de óleo mineral.

As amplificações foram realizadas em termociclador de DNA Thermolyne Amplitron II modelo DB.80225, sendo realizados 40 ciclos de 1 minuto à 94 °C, 1 minuto à 37 °C e 2 minutos à 72 °C, seguidos de mais 7 minutos a 72 °C para a completa extensão dos produtos amplificados. O método utilizado para a separação dos produtos amplificados foi a eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio 1mg/mL. Utilizou-se 13 µL de cada reação, acrescido de 2 µL de uma solução de azul de bromofenol (40 %) mais sacarose. Foi utilizado TBE (Trizma base 0,1 M; ácido bórico 1M e EDTA 0,5M) como tampão do gel e de corrida.

Após a eletroforese, os géis foram visualizados e fotografados em equipamento de foto documentação por transiluminação em ultravioleta.

2.3 ANÁLISE DOS DADOS

Os *primers* utilizados foram: OPAR 11,OPAZ 03, OPAZ 11, OPAZ 14, OPAZ 18, OPN 07, OPN 10, OPN 15, OPO 11, OPS 12, OPS 17, e OPS 19.

Foi construída uma matriz para os fragmentos polimórficos amplificados com presença (1) e ausência de banda (0). Somente foram consideradas as bandas que não davam margens a dúvidas. Bandas muito fracas, de difícil resolução, não foram incluídas.

Para análise dos dados, utilizou-se o NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.02. A similaridade entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Jaccard, que gerou a matriz de similaridade. A partir dessa matriz foi gerado o cluster pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average), que foi expresso na forma de um dendograma.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *primers* utilizados geraram 161 bandas polimórficas com tamanhos variando de 300 pb a 2200 pb, com uma média de 13 bandas por *primer* O número de fragmentos polimórficos por *primer* variou de 19 (OPS 19) a 9 (OPN 07; OPN10 e OPN 15). Foram estimados os índices de similaridade para todos os indivíduos analisados (Tabela 1). A similaridade genética média foi de 36,88 %. A maior distância foi obtida comparando-se o acesso 070-1 com o 072-3 (16 %). Isso indica que estes acessos são candidatos potenciais como fonte de variabilidade no programa de hibridização desta espécie, visando o melhoramento genético. Estes dados podem monitorar os cruzamentos com grande potencial de aumento de variabilidade no germoplasma de açaizeiro Por outro lado, a maior similaridade genética foi entre o acesso 071-4 e o 072-2 (66 %).

Na Figura 1, encontra-se o dendograma gerado pelo método UPGMA, através do programa NTSYS-pc, 2.02. Esta análise de distância genética gerou o cluster que mostra a separação dos acessos em dois grupos principais. No primeiro grupo, que se subdividiu em dois subgrupos com coeficiente de similaridade variando de 32 % a 58 %, incluem-se quatro acessos. O segundo grupo, com 11 acessos, dividiu-se em dois subgrupos,

com similaridade genética, variando de 16 % a 66 %. A variabilidade genética média dentro dos acessos foi de 50% Essa grande variabilidade genética também foi encontrada por Ballve (1988) para *E.oleracea* e *E. edulis,* utilizando isoenzimas.

Como o açaizeiro tem sido relatado como uma espécie alógama, é esperada grande variação genética dentro da mesma procedência ou população, principalmente naquelas localizadas no estuário amazônico (OHASHI, 1990), como é o caso dos acessos estudados. Silva *et al.* (2000), ao utilizarem marcadores microssatélites em uma população de *E. oleracea,* detectaram ausência de endocruzamento, o que predispõe a população possuir maior variabilidade genética. Além disso, trata-se de uma espécie que se reproduz sexuadamente, o que também aumenta a variabilidade. Em relação à coloração de frutos, os resultados obtidos com os marcadores RAPD fornecem indícios que esta característica não seja suficientemente discriminatória, pois dentro de um mesmo acesso foi observado, na maioria dos casos, maior proximidade de um indivíduo com frutos verdes e outro com frutos violáceos do que entre indivíduos com frutos da mesma coloração. Acredita-se que, neste caso, haveria uma maior correlação se fosse utilizado um maior número de características morfológicas associadas e um aumento no tamanho da amostra com um maior número de indivíduos por acesso.

Quadro 1 – Identificação dos acessos de açaizeiro pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental com variação para a coloração de frutos. Belém, Pará. 2001.

Código	Localidade/Origem	Coloração do fruto maduro
070-1	Breves (PA) Brasil	Verde
070-2	Breves (PA) Brasil	Violáceo
070-3	Breves (PA) Brasil	Violáceo
071-1	Breves (PA) Brasil	Violáceo
071-2	Breves (PA) Brasil	Violáceo
071-4	Breves (PA) Brasil	Verde
072-2	Breves (PA) Brasil	Violáceo
072-3	Breves (PA) Brasil	Violáceo
072-4	Breves (PA) Brasil	Verde
134-1	Cametá (PA) Brasil	Verde
134-2	Cametá (PA) Brasil	Violáceo
134-4	Cametá (PA) Brasil	Violáceo
135-2	Cametá (PA) Brasil	Violáceo
135-3	Cametá (PA) Brasil	Violáceo
135-4	Cametá (PA) Brasil	Verde

Tabela 1 – Matriz de distância genética estimada pelo coeficiente de Jaccard para os acessos de açaizeiro pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental com variação para coloração dos frutos. Belém, 2001.

	070-1	070-2	070-3	071-1	071-2	071-4	072-2	072-3	072-4	134-1	134-2	134-4	135-2	135-3	135-4
070-1	1.00														
070-2	0.58	1.00													
070-3	0.50	0.58	1.00												
071-1	0.32	0.41	0.57	1.00											
071-2	0.33	0.35	0.35	0.53	1.00										
071-4	0.34	0.28	0.35	0.41	0.58	1.00									
072-2	0.31	0.30	0.32	0.34	0.53	0.66	1.00								
072-3	0.16	0.17	0.23	0.25	0.33	0.46	0.61	1.00							
072-4	0.17	0.18	0.23	0.31	0.32	0.36	0.38	0.36	1.00						
134-1	0.30	0.28	0.33	0.39	0.39	0.42	0.40	0.33	0.47	1.00					
134-2	0.25	0.27	0.28	0.32	0.36	0.37	0.45	0.36	0.46	0.63	1.00				
134-4	0.27	0.26	0.28	0.33	0.38	0.37	0.39	0.31	0.44	0.47	0.63	1.00			
135-2	0.21	0.20	0.22	0.26	0.38	0.39	0.50	0.40	0.43	0.44	0.51	0.52	1.00		
135-3	0.39	0.30	0.30	0.33	0.38	0.41	0.43	0.32	0.40	0.52	0.55	0.44	0.43	1.00	
135-4	0.22	0.18	0.19	0.25	0.34	0.43	0.45	0.36	0.35	0.41	0.48	0.40	0.44	0.45	1.00

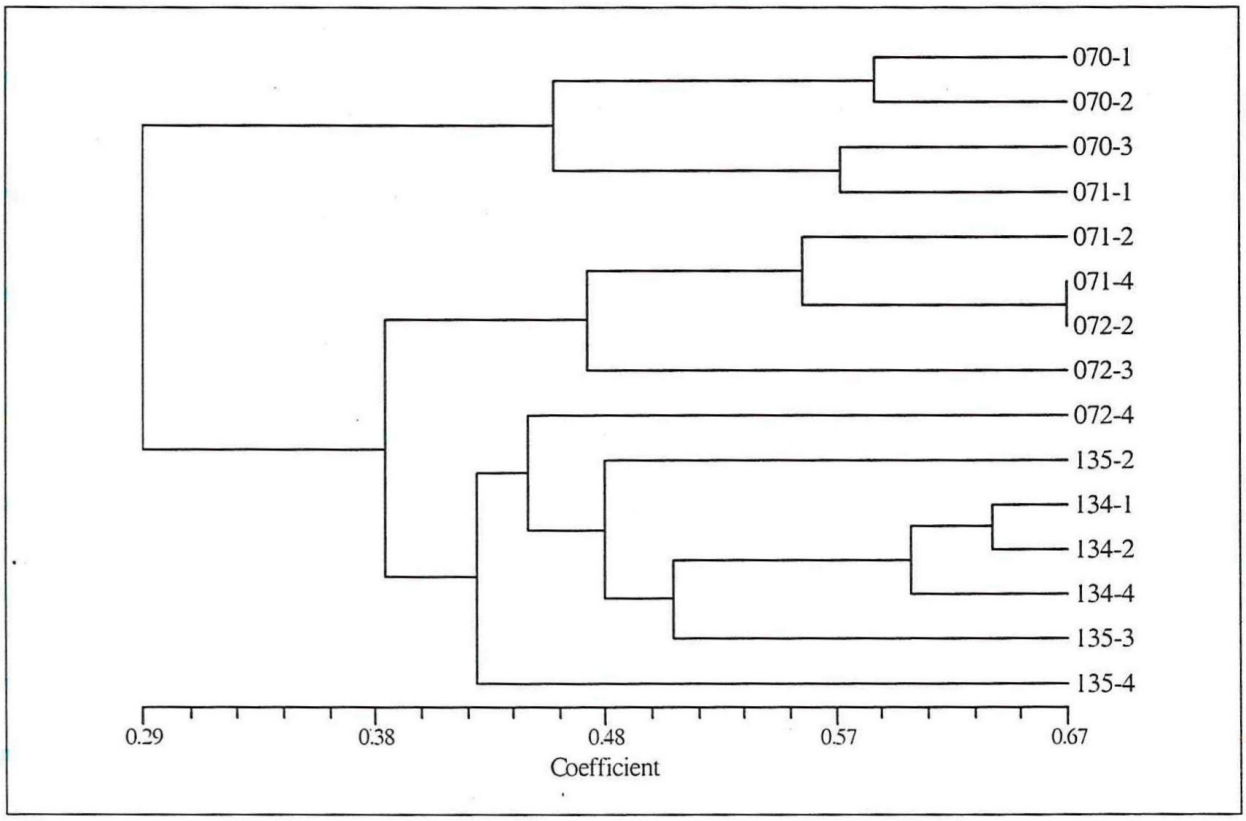

Figura 1 – Dendograma gerado pelo método de análise UPGMA para o coeficiente de Jaccard, a partir das 161 bandas polimórficas geradas pelo RAPD.

4 CONCLUSÃO

O RAPD-PCR é uma ferramenta eficiente para detectar de maneira rápida a variabilidade genética entre acessos de açaizeiro e possibilitou uma distinção mais precisa dentro desses grupos e entre eles.

O arranjo da distribuição dos acessos em função da divergência genética possibilita monitorar os cruzamentos e incrementar o programa de melhoramento genético nesta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALLVE, R.M.L. *Izoenzimas como marcadores genéticos em palmiteiros (Euterpe spp.).* 1988. 95 p. Dissertação (Mestrado) – UNICAMP, Campinas, 1988.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.* Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 1996.

NELSON, J. C. ITMI *Wheat mapping workshop -laboratory manual.* Ithaca: Cornell University, 1993.

OHASHI, S.T. *Variação genética em populações de açaizeiro (Euterpe oleracea Mart.) do estuário amazônico.* 1990. 119 p. Dissertação (Mestrado) – ESALQ, Piracicaba, 1990.

OLIVEIRA, M do S.P de; MÜLLER, A. A. *Caracterização e avaliação de germoplasma de açaí (Euterpe oleracea* Mart.). Belém: EMBRAPA-CPATU, 1998.3 p. (EMBRAPA-CPATU. Pesquisa em Andamento, 167).

OLIVEIRA, M do S.P de; CARVALHO, J.E.U de; NASCIMENTO, W.M.O do. *Açaí (Euterpe oleracea* Mart.). Jaboticabal: Funep, 2000. 52p. (Frutas Nativas, 7).

ROGEZ, H. *Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação.* Belém: EDUFPA, 2000. 313 p.

SILVA, A.G.; GAIOTTO, F.A.;CIAMPI, A.; GRATTAPAGLIA, D. Análise de genética populacional de duas espécies de palmito (*Euterpe edulis* e *Euterpe oleracea*) utilizando microssatélites. *Genetics and Molecular Biology*, v.23, n.3 p. 231, 2000. Supplement.

STUBER, C.W. *Biochemical and molecular markers in plant breeding.* In: DUDLEY, J.W.; HALLAUER, A.R.; RYDER, M. (Ed.). *Plant breeding reviews.* New York: J. Wiley, 1992.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.6531-6535, 1990.