

# DESENVOLVIMENTO DE BIBLIOTECAS ENRIQUECIDAS COM LOCOS SSR E CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DE MACAÚBA (*ACROCOMIA ACULEATA*)

THIAGO L. DA MATA<sup>1</sup>; STELLA M. NUCCI<sup>2</sup>; MARIA I. ZUCCHI<sup>3</sup>; RICARDO M. COELHO<sup>4</sup>;  
REGINA H. G. PRIOLLI<sup>5</sup>; JOAQUIM ADELINO DE AZEVEDO FILHO<sup>6</sup>; CARLOS A.  
COLOMBO<sup>7</sup>.

Nº 0700029

## Resumo

*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart. é uma palmeira arborescente, monocaule, perenifolia, heliófita, pertencente à família Arecaceae e de ampla distribuição na América, sobretudo no Brasil. Ela possui elevada produção de óleo vegetal, retirado a partir de seus frutos, com grande interesse para a produção de biodiesel. Assim, o presente estudo foi desenvolvido com o propósito de analisar a variabilidade genética de nove populações da espécie por meio de marcadores microsatélites, tendo em vista fornecer informações para o seu melhoramento genético bem como para a conservação do seu germoplasma. Nesse sentido, foi construída uma biblioteca genômica enriquecida com locos SSR sendo que, dentre os insertos seqüenciados, 88,78% apresentaram pelo menos um loco microsatélite e 36 pares de *primers* foram sintetizados. Destes, oito apresentaram-se altamente informativos e com bom perfil de amplificação, tendo sido adotados para o estudo. Foram obtidos, em média, 5 alelos por loco, e uma heterozigotidade esperada de 0,54. Valores elevados de endogamia foram encontrados na região formada pelas populações de Dourado (SP), Barbosa (SP) e Vicentinópolis (SP), bem como de São Pedro do Turvo (SP) e de Ibituruna (MG). Em contrapartida, valores mais baixos de endogamia foram encontrados nas populações de Campinas e Jaguariúna, Serra Negra, Lindóia e Amparo, Mococa e Casa Branca, todas do estado de SP. A taxa estimada de fecundação cruzada aparente foi de 0,471 e considerada intermediária. Portanto, embora preliminares, os resultados apontam para uma grande variabilidade genética das populações estudadas, bem como sugere um comportamento misto de reprodução.

1. Bolsista CNPq: aluno de iniciação científica do CP&D de Recursos Genéticos Vegetais do IAC, Campinas, SP, CEP 13020-902. E-mail: [thiago\\_biologo@yahoo.com.br](mailto:thiago_biologo@yahoo.com.br)

2. Colaborador: aluna de Mestrado do IAC, vinculada ao CP&D de Recursos Genéticos Vegetais do IAC, Campinas, SP, CEP 13020-902. E-mail:

3. Colaborador: Pesquisador do CP&D de Recursos Genéticos Vegetais do IAC, Campinas, SP, CEP 13020-902. E-mail: [mizucchi@iac.sp.gov.br](mailto:mizucchi@iac.sp.gov.br)

4. Colaborador: Pesquisador do Centro de Solos do IAC, Campinas, SP, CEP 13020-902. E-mail: [rmcoelho@iac.sp.gov.br](mailto:rmcoelho@iac.sp.gov.br)

5. Colaborador: Pós-doutoranda do Departamento de Genética da ESALQ, Piracicaba, SP, CEP 13418-900 E-mail: [rpriolli@esalq.usp.br](mailto:rpriolli@esalq.usp.br)

6. Colaborador: Pesquisador do Centro Apta de Monte Alegre do Sul. E-mail: [joaquimadelino@aptaregional.sp.gov.br](mailto:joaquimadelino@aptaregional.sp.gov.br)

7. Orientador: Pesquisador do CP&D de Recursos Genéticos Vegetais do IAC, Campinas, SP, CEP 13020-902. E-mail: [ccolombo@iac.sp.gov.br](mailto:ccolombo@iac.sp.gov.br)

## Abstract

*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart. Is a burshing, monostalk, everlasting and sunny lieves palm that belongs to family *Arecaceae* and it has a wide layout in América, specially in Brazil. It produces vegetal oil, that is extracted from the fruit, and it becomes important for the biodiesel's synthesis. By this way, this study has been carried out so that we can analise the genetical variability of nine populations from the specie. This process was made throw microsatellites markers, aiming to give information for the genetical improvement (breeding) and also the germoplasm's preserving. A genomic library had been constructed and it has gotten rich with SSR locus. Between the sequence's insets, 88,78% have, at least, one microsatellite locus and 36 primers' pairs have been produced. Eight of all contained lots of information and had such a great amplifying profile, which were chosen for this study. Five aleles per locus, in average, have been obtained and such a 0,54 heterozigosity rate was expected. High endogamy's values have been found in places like Dourado (SP), Barbosa (SP), Vicentópoilis (SP), São Pedro do Turvo (SP) and Ibituruna (MG). However, low endogamy's values can be seen in populations between Campinas and Jaguariúna, Serra Negra, Lindóia and Amparo, Mococa and Casa Branca, all in São Paulo. The aparent cross fertilization's rate is 0,471 and it was classified as intermediate. Therefore, although preliminaries, the results show a great genetical variability for all the studied populations, as a mix reproduction's behavior suggests.

## Introdução

A espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart. é uma palmeira arborescente, monocaule, perenífolia, heliófita, pertencente à família *Arecaceae*. Possui estipe ereto, recoberto pelos restos das folhas velhas e, assim como suas folhas, apresentam muitos espinhos em sua superfície. Suas flores são pequenas, unissexuais e ambos os sexos estão presentes numa mesma inflorescência, agrupadas em cachos, com frutos globosos, lisos e contendo uma amêndoa oleaginosa. Macaubais apresentam ampla distribuição, ocorrendo desde o sul do México ao Paraguai, Argentina e sul do Brasil (MORCOTE-RIOS & BERNAL, 2001). No Brasil, é abundantemente encontrada nos estados do Ceará, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SCARIOT *et al.*, 1991, 1995), ocorrendo principalmente em floresta latifoliada semidecídua (LORENZI, 1992) e, segundo MOTTA, OLIVEIRA-FILHO & GOMES (2002), (acompanhando áreas de solos com maior fertilidade natural e vegetação primitiva de fisionomia florestal).

As palmeiras, como as do gênero *Acrocomia*, destacam-se do ponto de vista natural, econômico e ecológico (LIMA *et al.*, 2003). A capacidade de transformar óleos vegetais em óleo

combustível, em substituição ao óleo diesel, vem despertando grande interesse. A utilização de biodiesel como combustível tem apresentado um potencial promissor no mundo inteiro (COSTA NETO *et al.*, 2000), trazendo uma série de vantagens ambientais, econômicas e sociais. Neste contexto, a macaúba é citada como uma das principais fontes de óleo vegetal no Brasil, com expressivo potencial para produção de biodiesel, com estimativas de produção de até 4 mil litros de óleo por hectare/ano.

Dada a distribuição generalizada da macaúba no Brasil e o interesse pela sua exploração comercial, alguns estudos se fazem necessários tendo em vista a sua conservação, melhoramento genético ou manejo sustentável, ou seja, é de fundamental importância o conhecimento da sua variabilidade genética. Para este objetivo, importantes ferramentas denominadas marcadores moleculares vindo sendo eficazmente utilizados. Portanto, o objetivo do presente trabalho é analisar a variabilidade genética de macaúbas por meio de locos SSR especialmente construídos para esta finalidade.

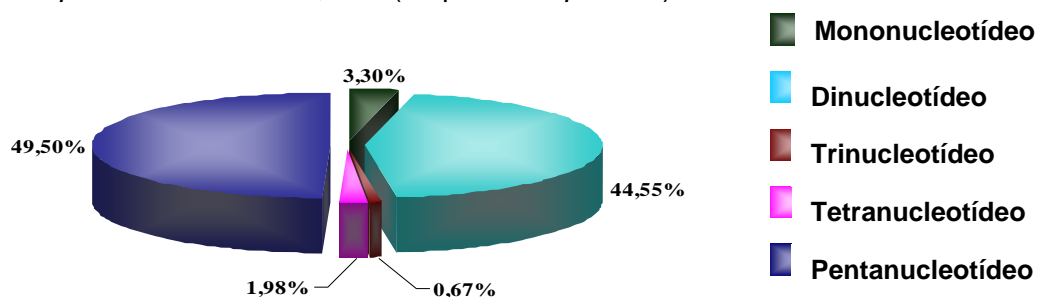
## **Material e Métodos**

A construção da biblioteca foi realizada a partir do protocolo descrito por BILLOTTE, LAGODA, RISTERUCCI & BAURENS (1999), com modificações, que preconiza o enriquecimento de locos SSR por meio da hibridização de oligonucleotídeos marcados com biotinas complementares a seqüências repetitivas GA, GC e AAG e posterior recuperação dos fragmentos amplificados com estreptavidina ligadas a “beads” magnéticas (kit Streptavidine-Magnisphere da Promega). Setenta e sete pares de primers complementares às seqüências que flanqueiam as ilhas de repetição microssatélites, foram desenhados utilizando o programa TROLL. Para cada par de *primers* desenhado foram realizadas séries de amplificações visando alcançar as melhores condições de obtenção dos amplificados e, destes, oito pares foram adotados para estudar a variabilidade genética em 47 genótipos, representando nove populações de macaúba.

## **Resultados e Discussão**

Os motivos mais freqüentes encontrados foram os pentanucleotídeos (49,5%), (Figura 1), e isto se deve aos critérios de busca próprios do programa utilizado, porém não foram usados para síntese de *primers* por se tratarem de locos com apenas duas repetições dificultando a identificação de polimorfismo entre indivíduos. Em segundo lugar vieram os motivos representados por dinucleotídeos (44,5%), seguidos dos motivos mononucleotídeos (3,3%), tetranucleotídeos (1,98%) e trinucleotídeos (0,67%). Entre os insertos seqüenciados, 88,78%

apresentaram pelo menos um loco microssatélite, dos quais 39,29% foram utilizados para desenho dos *primers* e destes 46,75% (36 pares de *primers*) foram sintetizados.



**FIGURA 1** – Porcentagem de motivos microssatélites encontrados nos 174 insertos seqüenciados que apresentaram pelo menos uma região microssatélite.

Estes locos foram selecionados com base no maior número de repetições do motivo SSR para facilitar a detecção de polimorfismo entre os genótipos analisados. Foram adotados oito *primers* para o estudo de variabilidade da espécie, selecionados a partir da otimização da reação de PCR a partir dos 36 *primers* sintetizados.

Em relação à variação genética, como podemos observar na Tabela 1, valores mais altos de endogamia foram encontrados na região formada pelas populações cinco (Dourado), seis (Barbosa e Vicentinópolis), sete (São Pedro do Turvo) e em outra região na população nove (Ibituruna – Lagoa). Nas populações cinco, seis e sete os coeficientes de endogamia (0,410, 0,523 e 0,540, respectivamente) podem ser explicados pela existência de poucas e pequenas populações isoladas de macaúba na região, cercadas por agricultura ou pastagens, contribuindo para a escassez de polinizadores da espécie, além dos indivíduos estarem muito próximos um do outro. Estes fatores favorecem o cruzamento entre indivíduos aparentados e podem gerar uma tendência de estreitamento da variabilidade genética, pela diminuição do fluxo gênico entre as populações. Entretanto, o valor mais alto de endogamia foi encontrado na população nove (0,550). Este valor era esperado pois os indivíduos coletados estavam em volta de uma única planta adulta com cerca de 30 anos e num raio de dois quilômetros não havia outra planta adulta. A endogamia deve ser resultado de auto-fecundação ou fecundação entre plantas irmãs, ou seja, pelo seu alto grau de parentesco.

**TABELA 1.** Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade em nove populações de *Acrocomia aculeata*.

Pop	N	n <sub>A</sub>	Ap	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	F	t <sub>a</sub>
1	7	2,125	2,500	0,270	0,202	0,267	0,578
2	5	2,125	2,500	0,365	0,323	0,132	0,766
3	5	2,286	2,500	0,428	0,343	0,202	0,663
4	5	2,250	2,250	0,555	0,467	0,243	0,609
5	5	2,250	3,000	0,364	0,225	0,410	0,419
6	6	2,50	3,000	0,445	0,221	0,523	0,313
7	4	2,375	2,833	0,458	0,229	0,540	0,460
8	6	1,833	2,250	0,320	0,222	0,279	0,563
9	4	1,875	2,400	0,366	0,177	0,550	0,291
<b>MÉDIA</b>		<b>2,180</b>	<b>2,581</b>	<b>0,397</b>	<b>0,268</b>	<b>0,359</b>	<b>0,471</b>

N: número de indivíduos amostrados; n<sub>A</sub>: número médio de alelos; Ap: número total de alelos por loco polimórfico; H<sub>o</sub>: heterozigosidade observada; H<sub>e</sub>: heterozigozidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; f: índice de fixação, t<sub>a</sub>: taxa de cruzamento aparente; pop1: Campinas, Jaguariúna; pop2: Serra Negra, Amparo, Lindóia; pop3: Mococa; pop 4: Casa Branca; pop 5: Dourado; pop 6: Barbosa, Vicentinópolis; pop 7: São Pedro do Turvo; pop 8: Ibituruna – Gupiara; pop 9: Ibituruna – Lagoa.

Em contrapartida, valores mais baixos de endogamia foram encontrados na região em que se encontram as populações um (Campinas e Jaguariúna), dois (Serra Negra, Lindóia e Amparo), três (Mococa), quatro (Casa Branca). Nas populações um, dois, três e quatro os coeficientes de endogamia (0,267, 0,132, 0,202 e 0,243 respectivamente) podem ser explicados pela maior distância geográfica entre os indivíduos das populações, pela maior ocorrência de plantas mais antigas que não sofreram tanta influência da fragmentação do ambiente ou da antropização. A população oito (Ibitutuna-Gupiara) que está na mesma região da população nove, também apresentou um baixo valor de endogamia (0,279), e aqui também há maior ocorrência de plantas mais antigas que não sofreram tanta influência da fragmentação do ambiente, trata-se de uma população maior e a distância entre a primeira e a última planta coletada é de dois quilômetros, e estão distribuídas ao longo da margem do Rio das Mortes, estes fatores podem explicar o predomínio de fecundação cruzada entre indivíduos diferente e ainda, maior ocorrência de polinizadores.

A taxa estimada de fecundação cruzada aparente foi de 0,471 (Tabela 1) e considerada intermediária e está coerente com os dados de SCARIOT *et al.* (1991). Em nosso estudo, confirmamos que em locais onde as populações estão muito fragmentadas e isoladas ocorre maior taxa de endogamia, confirmando que a espécie, embora monóica e autocompatível, realiza autofecundação e ou cruzamentos entre indivíduos aparentados.

Ao contrário, em locais onde as populações estão menos perturbadas e menos isoladas ocorre endogamia, mas prevalece a fecundação cruzada entre indivíduos diferentes, favorecendo o fluxo gênico e aumentando a variabilidade da população.

Portanto, nossos resultados, embora preliminares, permitem concluir que a espécie apresenta comportamento misto de reprodução, apresenta elevada diversidade entre populações, que a menor endogamia observada nas macaúbas das regiões de Campinas, Serra Negra, Mococa e Casa Branca pode ser explicada pela maior ocorrência da espécie nessas regiões que são menos antropizadas em oposição àquelas da região do planalto paulista, cujas populações encontram-se restritas a fragmentos isolados. No entanto, um estudo mais completo deve ser realizado, abrangendo maior número de indivíduos, populações e locos.

## Referências Bibliográficas

- 1 MORCOTE-RIOS, G & BERNAL, R. *Remains of palms (Palmae) at archaeological sites in the New World: a review*. The Botanical Review, 67: 309-350, 2001.
- 2 SCARIOT, A.; LLERAS, E. & HAY, J. D. *Reproductive biology of the palm Acrocomia aculeata in Central Brazil*. Biotropica, 23: 12-22, 1991.
- 3 SCARIOT, A.; LLERAS, E. & HAY, J. D. *Flowering and fruiting phenologies of the palm Acrocomia aculeata: patterns and consequences*. Biotropica, 27: 168-173, 1995.
- 4 LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, SP: Plantarum, 1992.
- 5 MOTTA, P. E. F.; CURI, N.; OLIVEIRA-FILHO, A. T. & GOMES, J. B. V. *Occurrence of macaúba in Minas Gerais, Brazil: relationship with climatic, pedological and vegetation attributes*. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.37, n.7, p.1023-1031, jul. 2002.
- 6 LIMA, E S.; FELFILI, J. M., MARIMON, B. S & SCARIOT, A. *Aldicir. Diversidade, estrutura e distribuição espacial de palmeiras em um cerrado sensu stricto no Brasil Central*. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v.26, n.3, p.361-370, 2003.
- 7 COSTA NETO, P R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F. & RAMOS, L. P. *Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras*. Química Nova, vol.23, n.4, p.531-537, jul./ago. 2000.
- 8 BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M. & BAURENS, F. C. *Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops*. Fruits, v.54, p.277-288, 1999
- 9 TROLL <http://www.bioinformatica.ucb.br/troll.html>