



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



DIVERSIDADE GENÉTICA DE JAMBU (*Acmella oleracea*) (L) R.K. Jansen

Bolsista: Thiago Santos dos Reis, Voluntário

UFAM

Manaus-AM

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO PARCIAL

PIB-A/0125/2014

DIVERSIDADE GENÉTICA DE JAMBU (*Acmella oleracea*) (L) R.K. Jansen

Bolsista: Thiago Santos dos Reis, Voluntário
Orientador: Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

Manaus-AM
2015

Todos os direitos deste Relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana da Faculdade de Ciências Agrárias e aos seus autores. Parte deste Relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, está sendo desenvolvido pelo Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana da Faculdade de Ciências Agrárias.

RESUMO

O jambu (*Acmella oleracea*) é uma Asteraceae nativa da região Amazônica, hortaliça herbácea perene, semiereta e de ramos decumbentes. O consumo da espécie na região Norte é bastante difundido, compondo diversos pratos, como pato no tucupi e tacacá, sendo também muito utilizada em saladas. Também apresenta importância medicinal por possuir vários princípios ativos. Essa hortaliça apresenta-se como importante fonte de renda para pequenos produtores dos municípios do Amazonas, uma vez que é planta de múltiplo uso (condimentar, medicinal e ornamental). A caracterização da diversidade genética de populações é uma das etapas iniciais dos programas de melhoramento. O conhecimento da distribuição da variabilidade genética de jambu subsidiará a implementação de planos de uso e conservação dos recursos genéticos da espécie. Muitas são as técnicas para estudo de diversidade genética envolvendo marcadores moleculares, entre elas destaca-se a técnica AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), pois esta detecta um maior número de locos, comparativamente às demais técnicas que revelam marcadores moleculares, possibilita ampla cobertura do genoma e apresenta um baixo custo por informação (loco). O objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade genética do jambu em populações do Amazonas. Foram analisados 12 indivíduos de Manaus, dez de Manacapuru, cinco de Parintins e seis de Itacoatiara. A extração do DNA foi realizada a partir de folhas dessa hortaliça utilizando CTAB 2%, quantificado e diluído para 20 ng/μL. O DNA genômico foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e MseI. Foram utilizadas as combinações E+A/M+C para a pré-seleção. Para a seleção, foram testadas sete combinações de primers, sendo a variabilidade acessada com as combinações E+AA/M+CTC, E+ATC/M+CAT e E+ATC/M+CTC, perfazendo um total de 129 bandas amplificadas. O dendrograma gerado apresentou dois grupos distintos. No grupo I foi representado por it4 e pa5, de Itacoatiara e Parintins. Os outros 31 indivíduos ficaram agrupados em subgrupos do grupo II. Os indivíduos que apresentaram maior variabilidade foram os da cidade de Itacoatiara. Como os dados não ficaram com índices que suportassem a árvore gerada no dendrograma, apesar

do índice cofenético ter sido de 88%, novas análises se fazem necessárias para ratificar a variabilidade observada.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Geral	3
2.2	Específicos	3
3	METODOLOGIA	4
3.1	COLETA DO MATERIAL	4
3.2	EXTRAÇÃO DO DNA	4
3.3	QUANTIFICAÇÃO DO DNA	4
3.4	ANÁLISE DE AFLP	5
3.5	ELETROFOROSE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	6
4	RESULTADOS	8
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11

1 INTRODUÇÃO

O jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen) é uma Asteraceae nativa da região Amazônica, hortaliça herbácea perene, semiereta e de ramos decumbentes. As inflorescências são pequenas e amareladas, dispostas em capítulos. O consumo da espécie na região Norte é bastante difundido, compondo diversos pratos, como pato no tucupi e tacacá, sendo também muito utilizada em saladas. É também conhecido por agrião do Pará, agrião do Brasil, agrião do Norte, jabuaçú, erva maluca, jaburama, botão de ouro, entre outros (COUTINHO et al., 2006).

O jambu também apresenta importância medicinal, por possuir princípios ativos como óleo essencial, saponinas, espilantinas, afinina, filoesterina, colina, triterpenóides e, principalmente, o espilantol (YASUDA et al., 1980). As inflorescências quando mastigadas provocam sensação de dormência na região bucal. O princípio ativo espilantol apresenta grande atividade inseticida contra os mosquitos *Anopheles culicifacies*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (SARAF e DIXIT, 2002). Essa hortaliça apresenta-se como importante fonte de renda para pequenos produtores dos municípios do Amazonas, uma vez que é planta de múltiplo uso (condimentar, medicinal e ornamental).

A caracterização da diversidade genética de populações é uma das etapas iniciais dos programas de melhoramento. O conhecimento da distribuição da variabilidade genética de jambu subsidiará a implementação de planos de uso e conservação dos recursos genéticos da espécie. Muitas são as técnicas pra estudo de diversidade genética envolvendo marcadores moleculares, entre elas destaca-se a técnica AFLP (*Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados*), pois esta detecta um maior número de locos, comparativamente às demais técnicas que revelam marcadores moleculares, possibilita ampla cobertura do genoma e apresenta um baixo custo por informação (loco) (LOPES et al., 2003).

O uso de marcadores moleculares do tipo AFLP será utilizado no estudo de diversidade genética de plantas de jambu, espécie em domesticação, para qual o conhecimento da organização da variabilidade

genética é fundamental para o estabelecimento de uma coleção para a conservação e o melhoramento da espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a variabilidade genética do jambu em populações do Amazonas.

2.2 ESPECÍFICOS

Identificar populações de jambu no Estado do Amazonas;

Otimizar protocolos de extração de DNA para jambu;

Caracterizar a diversidade genética de indivíduos de jambu utilizando marcadores AFLP.

3 METODOLOGIA

3.1 COLETA DO MATERIAL

Foram estudados 33 genótipos de jambu coletados no Estado do Amazonas, em diferentes municípios de ocorrência da mesma: Manaus, Manacapuru, Itacoatiara e Parintins. Nas expedições foram coletadas amostras de folhas para a extração de DNA.

Amostras das folhas foram coletadas e identificadas e encaminhadas ao Laboratório de Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias, acondicionadas em sacos plásticos com sílica gel para serem submetidas à extração de DNA e análise com marcadores AFLP.

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

Foram testados dois protocolos de extração de DNA. Dentre os protocolos testados em outras espécies o que utiliza o detergente catiônico CTAB 2% (Cationic Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide) (DOYLE e DOYLE, 1987), seguindo-se o protocolo otimizado por Ferreira e Grattapaglia (1998) é o que tem apresentado os melhores resultados.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A técnica de quantificação do DNA utilizada foi uma das mais simples e baratas, a técnica de quantificação comparativa. Esta consiste na utilização de padrões de massa molecular conhecida (marcadores) os quais são empregados para determinação, por comparação, das concentrações das amostras de DNA analisadas. A quantificação comparativa foi feita em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Para tal, foram utilizados como padrões DNA de fago lambda nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/uL. Os géis de agarose foram submetidos a eletroforese em minicubas horizontais contendo tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) por 30 minutos a 80 volts. Em seguida, os géis foram analisados em

transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água ultrapura e padronizadas a uma concentração de 20 ng/uL.

3.4 ANÁLISE DE AFLP

A análise de marcadores AFLP foi realizada de acordo com os procedimentos propostos originalmente por Vos et al. (1995), com modificações de Lopes et al. (2003).

Para digestão do DNA foi utilizada a combinação de enzimas de restrição *EcoRI/MseI*. As reações de digestão foram realizadas utilizando-se 300 ng de DNA genômico, 5,0 uL do tampão *One Phor All 10X* (OPA; Amersham), 0,5 uL de solução BSA (Albumina de Soro Bovino) (10 ug/uL), 0,5 uL da enzima *MseI* (10 U/uL, *New England Biolabs*) e 0,5 uL da enzima *EcoRI* (10 U/uL, Gibco) em volume final de 50 uL. As reações foram realizadas a 37 °C por três horas, em seguida as enzimas foram inativadas a 70 °C por 15 minutos.

Após a digestão foi realizada a ligação de adaptadores, foram utilizados 2,0 uL do tampão T4 DNA Ligase 5X (Invitrogen), 1,0 uL do adaptador da enzima de corte raro (*EcoRI*), 1,0 uL do adaptador da enzima de corte frequente (*MseI*), 1,0 uL da enzima T4 DNA Ligase (1 U/uL, Invitrogen), 5,0 uL de água ultrapura e 40 uL da solução de digestão. As reações foram realizadas a 20 °C por três horas.

Nas reações de pré-amplificação foram usados iniciadores complementares às sequências dos sítios das enzimas de restrição com um nucleotídeo seletivo, foi usada a combinação de iniciadores E+A/M+C. No preparo das reações foram utilizados 3,0 uL da amostra de DNA digerido/ligado, 0,5 uL do iniciador da enzima de corte raro (E+A) (50 ng/uL), 0,5 uL do iniciador da enzima de corte freqüente (M+C) (50 ng/uL), 4,0 uL de dNTP 2,5 mM (Gibco), 2,0 uL do tampão "Mg Free Buffer" 10X (Promega), 1,2 uL MgCl₂ 25 mM, 0,6 uL de Taq DNA *polimerase* (5,0 U/uL; Promega) e 8,2 uL de água ultrapura. O programa da PCR na pré-amplificação foi composto de 26 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos. Cada ciclo foi constituído de um minuto a 94 °C (desnaturação), um minuto a

56 °C (anelamento) e um minuto a 72 °C (extensão), sendo o ciclo final seguido por cinco minutos a 72 °C. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos acrescentando-se 80 uL de água ultrapura.

Nas reações de amplificação seletiva foram utilizados 1,5 uL do produto da pré-amplificação diluído, 0,5 uL do iniciador da enzimas de corte raro com três nucleotídeos seletivos (E+ANN) (50 ng/uL), 0,6 uL do iniciador da enzima de corte freqüente com três nucleotídeos seletivos (M+CNN) (50 ng/uL), 1,6 uL de dNTP 2,5 mM (Gibco), 2,0 uL do tampão da Taq *polimerase* 10X (Promega), 1,2 uL de MgCl₂ 25 mM, 0,32 uL de Taq DNA *polimerase* (5 U/uL, Promega) e 12,28 uL de água ultrapura. O programa da PCR na amplificação seletiva consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos, 12 ciclos compostos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C (-0,7 °C por ciclo) e um minuto a 72 °C seguidos de 23 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C e um minuto a 72 °C. O ciclo final foi seguido de dois minutos a 72 °C. Foram analisadas três diferentes combinações de iniciadores na amplificação seletiva.

3.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida [acrilamida/bisacrilamida (19:1) 6%, uréia 7,5 M, tampão 1X TEB] de 0,5 mm de espessura. Ao produto da amplificação seletiva (20 uL) foram adicionados 8 uL de tampão formamida (formamida 98%, EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,002%, p/v e xileno cianol 0,002%, p/v) sendo em seguida realizada a desnaturação das amostras à temperatura de 95 °C por cinco minutos e então aplicados 20 uL da amostra desnaturada no gel.

Foi utilizado o sistema de eletroforese Sequi-Gen GT (Biorad) 38 x 50 cm. Antes da aplicação das amostras para eletroforese foi realizada uma “pré-corrída” conduzida sob potência constante de 80 W durante 40 minutos para aquecimento e limpeza do gel. Após a aplicação das amostras, a eletroforese foi realizada sob potência constante de 60 W durante três horas.

Na revelação dos géis foi usado o método de coloração com nitrato de prata segundo o protocolo proposto por Creste et al. (2001).

Os locos polimórficos foram analisados para presença/ausência do fragmento amplificado. A partir dos dados binários foram obtidas as estimativas

de similaridade genética usando o coeficiente de Jaccard; Esse coeficiente desconsidera concordâncias negativas e permite calcular similaridade com base em variáveis binárias (0 (zero) para ausência e 1 (um) para presença de bandas) (SNEATH e SOKAL, 1973) e posteriormente realizado o agrupamento dos indivíduos e a construção do dendrograma pelo método UPGMA.

As análises de similaridade e construção do dendrograma foram efetuadas com auxílio do programa PAST (HAMMER et al., 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coleta de folhas de jambu foi realizada nas cidades Manaus, Manacapuru, Itacoatiara e Parintins. O protocolo de extração de DNA estabelecido foi utilizando-se o CTAB 2% (DOYLE e DOYLE, 1987), modificado.

Na Figura 1 observa-se o DNA genômico extraído das amostras de jambu coletadas em Manaus bem como o ajuste da diluição para alíquotas de trabalho a 20 ng/uL.

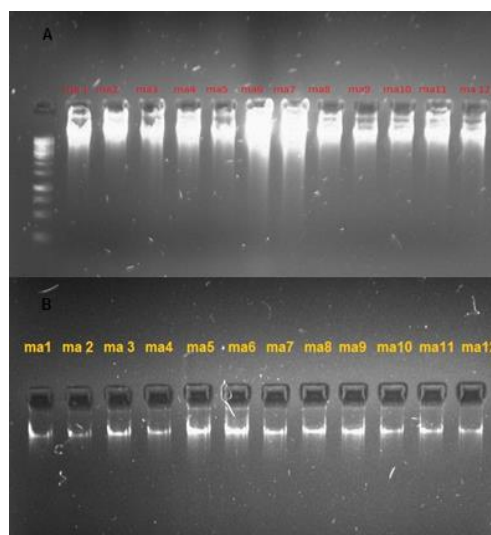


Figura 01. (A) DNA genômico extraído de folhas de jambu (*Acmella oleracea*) de amostras coletadas no município de Manaus/AM. (B) Diluição do DNA extraído para alíquotas de trabalho 20 ng/uL

Foi realizada uma pré-seleção dos fragmentos gerados com as enzimas de restrição com a combinação E+A/M+C. Para a amplificação seletiva foram testadas sete combinações de *primers*: E+AGC/M+CTC, E+ATC/M+CTC, E+ACA/M+CTC, E+AGT/M+CTC, E+AAC/M+CTC, E+AGC/M+CAT e E+ATC/M+CTA.

O polimorfismo existente nas amostras de jambu foi revelado pelas combinações E+AAC/M+CTC, E+ATC/M+CAT e E+ATC/M+CTC. O par de *primers* E+AAC/M+CTC apresentou 57 bandas, o E+ATC/M+CAT apresentou 22 e o terceiro par E+ATC/M+CTC 50 bandas.

O dendrograma gerado apresentou dois grupos distintos. No grupo I foi representado por it4 e pa5, de Itacoatiara e Parintins. Foram os indivíduos mais distantes geneticamente dos demais. Embora coletados em municípios diferentes apresentaram similaridade aproximadamente de 50% (Figura 2).

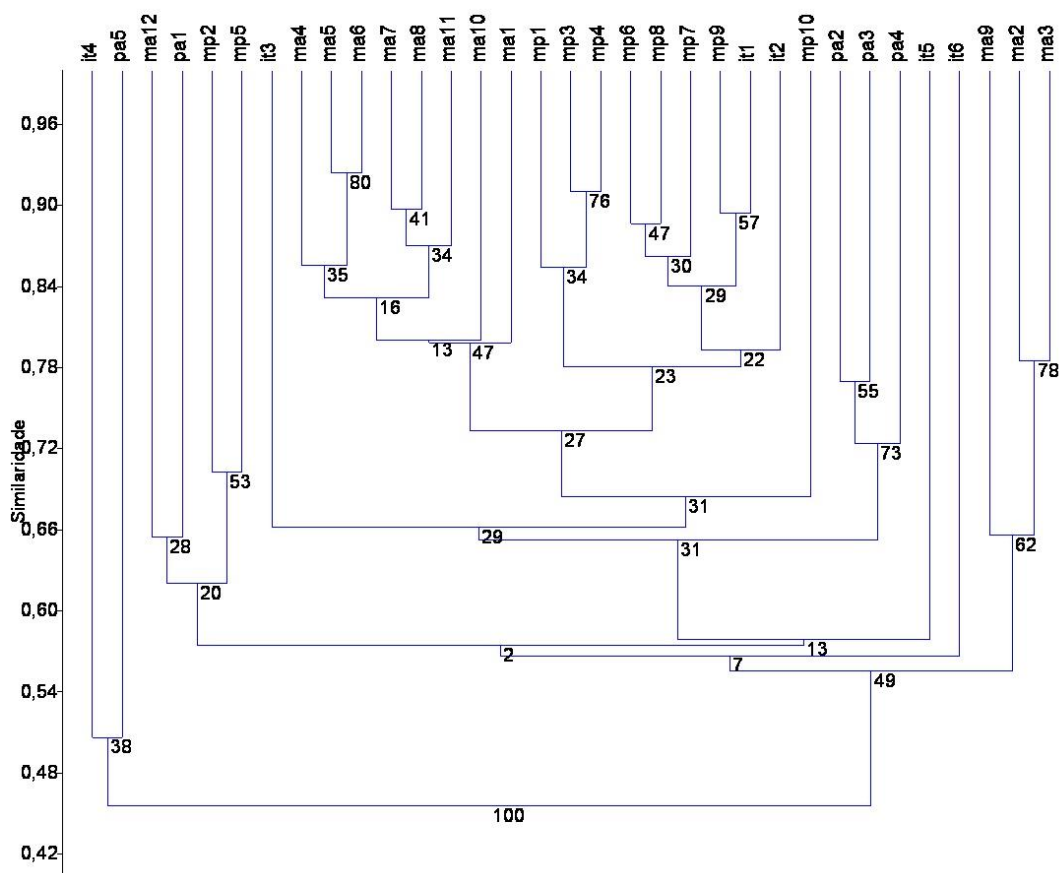


Figura 02. Dendrograma gerado com matriz de similaridade utilizando Jaccard. Variabilidade genética entre 33 indivíduos de jambu (*Acmella oleracea*) de Manaus, Manacapuru, Parintins e Itacoatiara, Amazonas. Utilizando os marcadores AFLP E+AAC/M+CTC, E+ATC/M+CAT e E+ATC/M+CTC, representado 129 bandas amplificadas

O grupo II apresentou subgrupos assim discriminados: II.a – ma12, pa1, mp2 e mp5; II.b – it3; II.c – ma4, ma5, ma6, ma7, ma8, ma11, ma10 e ma1; II.d – mp1, mp3, mp4, mp6, mp8, mp7, mp9, it1 e it2; II.e – mp10; II.f – pa2, pa3 e pa4; II.g – it5; II.h – it6; e II.i – ma9, ma2 e ma3. Apesar desses indivíduos estarem agrupados apresentaram variabilidade.

Nos subgrupos aparecem indivíduos de locais diferentes com similaridade. No subgrupo II.a pa1 se agrupou com indivíduos de Manacapuru e de Manaus. No subgrupo II.d it1 e it2 se agruparam com indivíduos de Manacapuru.

Nos subgrupos II.c, II.f e II.i, ficaram agrupados somente indivíduos da mesma localidade: Manaus, Parintins e Manaus, respectivamente. Apesar desse fato, apresentaram variabilidade.

Fato relevante ficou destacado entre os indivíduos de Itacoatiara. Ficou configurada a alta variabilidade existente entre os indivíduos amostrados. Os seis indivíduos analisados ficaram distribuídos entre os dois grupos observados. No grupo I ficou o it4 e os demais nos subgrupos do grupo II, it3, it5 e it6 ficaram em subgrupos isolados, e somente it1 e it2 no subgrupo II.d, mesmo assim demonstrando variabilidade genética entre eles.

O dendrograma gerado ficou suportado com índice cofenético de 88% com leitura de 129 bandas. Quando analisado com *Bootstrap* de 1000 reamostragens os valores não foram suficientes para confirmar a árvore do dendrograma. Esse fato demonstrou a necessidade de novas análises com esses indivíduos de modo que os marcadores AFLP forneçam uma resposta mais robusta.

Diante desse fato fica patente a necessidade de ajuste na metodologia referente ao tempo de corrida para confirmar se a variabilidade existente no aumento do tempo da corrida pode ser mais informativo ou se há a necessidade de ampliar o número de combinações de *primers* para uma resposta mais real dessa variabilidade.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COUTINHO, L.N.; APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. Galhas e deformações em Jambu (*Spilanthus oleraceae* L.) causadas por *Tecaphora spilanthus* (Ustilaginales). *Summa Phytopathology*, v. 32, p. 283-285, 2006.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 19, p. 299-306, 2001.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.I. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1987.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Brasília (EMBRAPA-CENARGEN), 1998. 222p.

YASUDA, I.; TAKEYA, K; ITOKAWA, H. The geometric structure of spilanthol. *Chemical e Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, n. 7, p. 2251-2253, 1980.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.S. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP): Aspectos técnicos e interpretação genética. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 29, p. 64-68, 2003.

SARAF, D.K.; DIXIT, V.K. *Spilanthus acmella* Murr.: Study on its extract spilanthol as larvicidal compound. *Asian Journal of Experience Sciences*, v. 16, n. 1/2, p. 9-19, 2002.

SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. Numerical taxons. W.H. Freeman and company. San Francisco, 1973, 573p.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

