

Identificação de indivíduos de cará (*Dioscorea sp*) da cidade de Caapiranga (AM) e Manaus (AM)

Palavras-Chave: Identificação molecular, *Dioscorea*, Diversidade genética.

Autores(as):

Tháisa Albino Idesti¹ (autora)

Henrique Rodolfo Nogueira¹ (coautor)

Dr. Danilo Augusto Sforça² (coorientador)

Prof.^a. Anete Pereira de Souza^{1,2} (orientador)

¹Instituto de Biologia (IB) – UNICAMP, ²Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP

INTRODUÇÃO

O Cará, planta do gênero *Dioscorea*, é cultivado em áreas tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Este gênero, desde sua origem e domesticação na Ásia, é conhecido como "inhame". No Brasil, nas regiões Norte e Nordeste, a planta é chamada de "cará", enquanto no Sul e Sudeste é frequentemente referida como "inhame" (Pedralli, 2002¹ e Mesquita, 2002)². No Amazonas, o cará é muito apreciado na culinária local e é facilmente encontrado em feiras livres. Na região de Caapiranga, onde está a maior área plantada no Estado, ele é cultivado principalmente por agricultores familiares (Castro et al., 2012)³. Além disso, o município de Caapiranga celebra a "Festa do Cará", destacando esta cultura como a principal cultivada na região (Castro, 2011)⁴. A *D. trifida* foi domesticada na América do Sul, mas há poucas informações sobre seu processo de domesticação.

Existem mais de 600 espécies de cará, sendo as mais importantes para a agricultura: *D. alata* L., *D. rotundata* Poir., *D. cayenensis* Lam., *D. trifida* L. f., *D. esculenta* (Lour.) Burkill, *D. bulbifera* L., *D. opposita* Thunb., *D. pentaphylla* L., *D. transversal* R. Br. e *D. nummularia* Lam. (Arnau et al., 2010)⁵.

Girma e colaboradores (2015)⁶ destacam que a diferenciação entre espécies de inhame depende exclusivamente de descritores morfológicos, que são suscetíveis a classificações ambíguas e incorretas. Analisando 69 indivíduos de 21 espécies diferentes de *Dioscorea*, os autores descobriram que o uso das regiões *rbcL* + *matK* é mais eficaz na separação das espécies do que os espaçadores *trnH-psbA* do genoma do cloroplasto e as regiões ITS nucleares. O gene *rbcL* é uma Ribulose-1, 5-Bisphosphate Carboxylase Large-subunit (Blaxter et al., 2005)⁷ e o *matK* é uma Megakaryocyte-Associated Tyrosine Kinase, também conhecido como gene da Maturase K (Selvaraj et al., 2008⁸; Janzen et al., 2009)⁹. Castro e colaboradores (2012)³ identificaram, através de caracteres morfológicos, o cará-roxo e o cará-branco cultivados em Caapiranga (AM) como *Dioscorea trifida*. Existem duas ploidias conhecidas de *D. trifida*: as variedades cultivadas são autotetraploides ($2n=4x=80$) (Bousalem et al. 2006)¹⁰, enquanto uma *D. trifida* selvagem com genoma diploide ($2n=2x=40$) foi encontrada na

Guiana Francesa (Bousalem et al. 2010)¹¹. Não há descrições na literatura sobre a identificação das variedades amazônicas por caracteres moleculares, apenas por descritores morfológicos. Outros estudos apresentam indivíduos de *D. trifida* utilizados para filogenia, provenientes de bancos de germoplasma. Este projeto visa utilizar as sequências dos genes *matK* e *rbcL*, conforme sugerido por Girma e colaboradores (2015)⁶, para diferenciar as espécies dos indivíduos coletados em Caapiranga (AM) e Manaus (AM). O sequenciamento desses genes em indivíduos usados na produção de cará nessas cidades do Amazonas representará um avanço significativo na cultura do cará na região.

METODOLOGIA

O material vegetal (folhas) foi coletado em seis propriedades de Caapiranga e Manaus (Tabela 01) e armazenado em biofreezer a -80°C. Foram selecionadas propriedades que plantam Cará e os comercializam in natura ou processado em forma de farinha em feiras locais, sem identificação botânica ou molecular da espécie.

Tabela 01: Local das coletas e número de indivíduos selecionados para sequenciamento dos genes *matK* e *rbcL*.

Propriedade	Coordenadas	Município	Indivíduos coletados	Indivíduos selecionados
Propriedade 01	3°17'20.6"S 61°12'42.3"W	Caapiranga - AM	29	10
Propriedade 02	3°17'23.0"S 61°12'47.2"W	Caapiranga - AM	21	10
Propriedade 03	3°04'36.7"S 59°55'47.2"W	São José Operário, Manaus - AM	30	10
Propriedade 04	3°04'50.8"S 59°56'02.7"W	Armando Mendes, Manaus - AM	30	10
Propriedade 05	3°04'54.4"S 59°56'04.9"W	Armando Mendes, Manaus - AM	30	10
Propriedade 06	3°04'54.4"S 59°56'04.5"W	Armando Mendes, Manaus - AM	30	10

O DNA foi extraído das folhas coletadas, método que consiste na separação do DNA de outras moléculas, como proteínas, lipídios e carboidratos, através de uma série de precipitações e centrifugações, resultando no DNA precipitado. O protocolo final usado para as propriedades utiliza a lise mecânica da célula com o auxílio de duas *beads* metálicas, associado ao tampão de extração composto por CTAB e N-Lauroylsarcosine (detergente), e diversos outros componentes. A maceração foi feita em TissueLyser (Qiagen), programada com um ciclo de 45 segundos a 30 Hz, com um curto intervalo a cada 15 segundos. O DNA foi analisado por meio da eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, e para a visualização foi utilizado brometo de etídeo.

A quantificação do DNA foi realizada em Qubit™ e as relações de qualidade 260/280 e 230/280 foram realizadas em NanoDrop™ para avaliar o grau de pureza da extração. O DNA foi diluído a 2ng/μl e seguiu para a amplificação dos genes *rbcL* e *matK* (Tabela 02), que ocorreu por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Diversas condições de amplificação foram testadas nos termocicladores para ambos os primers. Os amplificadores foram visualizados via eletroforese, utilizando gel de agarose 2% em tampão TBE 0,5X, com visualização por meio de brometo de etídeo.

Tabela 02: Sequências de nucleotídeos dos primers para os genes matK e rbcL.

Nome do primer	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')
RbcL_1_F	ATGTCACCACAAACAGAAAC
RbcL_74R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC
RbcL2_1_F	ACTTATTATACTCCTGACTACGA
RbcL2_74R	ACATTCATAAACGGCTCTGC
MatK_F	CCTATCCATCTGGAAATCTT
MatK_R	GTTCTAGCACAAGAAAGTCG
MatK2_F	CCATCTGGAAATCCTGGTTCA
MatK2_R	TGAGGATCCACTGTGATAATGAG

Os produtos da PCR foram purificados utilizando protocolo de polietilenoglicol, e o pellet ressuscitado em 10 µl de água e visualizados em gel de agarose a 2% com tampão TBE 0,5X. Para a reação de sequenciamento, foram utilizados 3,0 µl para os indivíduos menos concentrados e 1,5 µl para indivíduos mais concentrados, de acordo com a banda visualizada no gel. Para o sequenciamento das amostras, duas reações de sequenciamento foram feitas: uma utilizando o *Primer Forward* do gene e outra utilizando o *Primer Reverse*. As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando BigDye™ (v3.1) de acordo com o fabricante, seguido de uma purificação com EDTA e ressuscitado em 10 µl de formamida Hi-Di™. As amostras foram sequenciadas utilizando o Sequenciador Automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

Os resultados do sequenciamento foram analisados utilizando o software Chromas. Foram selecionados os cromatogramas de qualidade satisfatória, caracterizados pela presença de picos de nucleotídeos bem definidos e pela ausência de ruído excessivo.

As análises dos dados do sequenciamento serão realizadas posteriormente em softwares especializados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram realizados testes de extrações de DNA com o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990)¹² e não foi possível obter DNA de qualidade. Diferentes protocolos foram testados (Collins and Symons, 1992¹³; Schierenbeck, 1994¹⁴; De la Cruz et al, 1995¹⁵; Bandana and Ahuja, 1999¹⁶; Mercado et al, 1999¹⁷; Tel-Zur et al, 1999¹⁸), novamente sem sucesso. Dessa forma, após os testes se estabeleceu um protocolo final, que foi utilizado para extrair o DNA de todos os indivíduos.

Após estabelecer um protocolo para a extração de DNA, obteve-se sucesso na extração dos indivíduos de todas as propriedades, exceto da propriedade 3. Porém, após diversos testes e modificações nos processos, foi possível obter bons resultados na extração do DNA desta propriedade.

Os resultados obtidos na amplificação do gene rbcL foram bons, ou seja, tiveram bandas claras e específicas no gel de agarose e ausência de bandas inespecíficas (Figura 02, B), enquanto que para o gene matK

foram insatisfatórios (com a presença de bandas inespecíficas ou smears no gel de agarose), com apenas 5 indivíduos tendo resultados após testes com mais de 40 amostras (Figura 02, A).

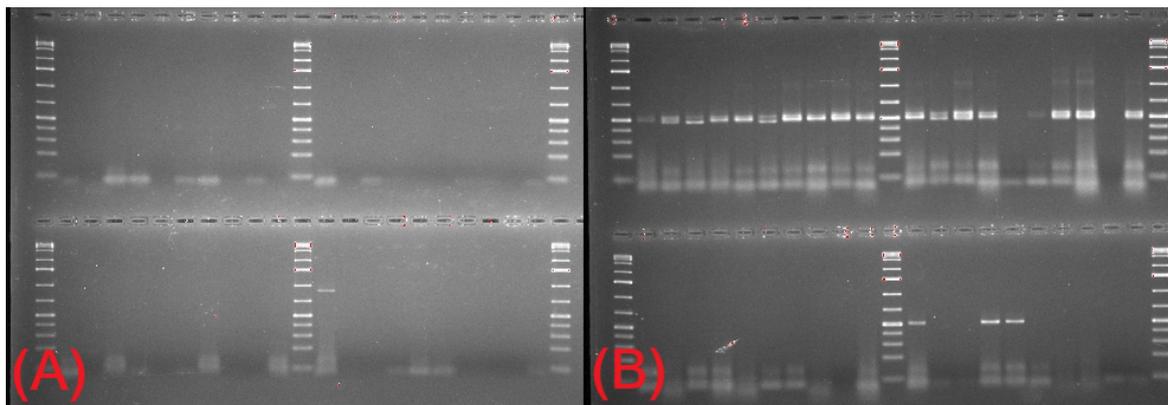


Figura 02: Em (A) amplificação do gene matK. Em (B) a amplificação do gene rbcL.

Foi sequenciado o material genético de 60 amostras, sendo 56 amostras para o gene rbcL e 4 amostras para o gene matK. Foram obtidos bons dados de cromatograma para apenas 23 indivíduos (Tabela 03). Esse resultado pode ter ocorrido devido à baixa qualidade e pureza do DNA extraído, amplificação inadequada dos genes-alvo, e possíveis contaminações durante o processo de purificação.

Tabela 03: Indivíduos sequenciados com sucesso para os genes matK e rbcL.

Indivíduos	Genes		Indivíduos	Genes			
	rbcL F	rbcL R		rbcL F	rbcL R	matK F	matK R
1.12	✓	✓	4.20		✓		
1.18	✓		5.1	✓	✓		
1.19	✓		5.12	✓	✓		
1.21	✓	✓	5.15	✓	✓		
1.22	✓	✓	5.16	✓	✓		
1.25	✓	✓	5.17	✓	✓		
2.1	✓	✓	6.2	✓	✓		
2.11	✓		6.6				✓
2.13	✓		6.14		✓		
2.14	✓		6.27		✓		
2.15	✓		6.28		✓	✓	✓
4.12	✓	✓					

Melhorias no protocolo da PCR são necessárias, como otimização das condições de amplificação (temperaturas de anelamento e extensão, concentração de MgCl₂, e ciclos de amplificação), além da melhoria na pureza do DNA extraído para evitar inibições na reação.

CONCLUSÕES

A dificuldade na obtenção de DNA de qualidade inicial das amostras da Propriedade 3 foi superada com modificações no protocolo de extração, permitindo a obtenção de DNA de boa qualidade após ajustes, demonstrando a necessidade de protocolos específicos para diferentes condições de amostras.

Estes resultados, embora limitados, representam um avanço significativo no projeto, pois permitem a identificação genética preliminar dos indivíduos de cará, a qual está em andamento, essencial para o entendimento da diversidade genética. A continuidade deste trabalho com ajustes nos protocolos de amplificação pode aumentar a taxa de sucesso.

BIBLIOGRAFIA

- ¹Pedralli, G. Revisão taxonômica das espécies de Dioscoreaceae (R.Br.) Lindley da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais e Bahia, Brasil. 1998. 400 p. Tese (Doutorado em Ciências – Botânica) - Depto. Botânica/Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ²Mesquita, A. S. Inhamé *Dioscorea cayennensis* Lam. e taro *Colocasia esculenta* (L.) Schott., Cenários dos mercados brasileiro e internacional. Inhamé: Anais v.I do II Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhamé e do Taro. 2002.
- ³Castro, A. P.; Pereira, H. S.; Fraxe, T. J. P.; Kinuppe, V. F. Etnobotânica das variedades locais do cará (*Dioscorea* spp.) cultivados em comunidades no município de Caapiranga, estado do Amazonas. *Acta Botanica Brasilica*, v. 26, p. 658-667, 2012.
- ⁴Castro, A. P. Agrodiversidade e cadeia produtiva do cará (*Dioscorea* spp.) na agricultura familiar: um estudo etnográfico no município de Caapiranga-AM. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical, área de concentração: Cultivo e Domesticação de Plantas) — Universidade Federal do Amazonas, 2011.
- ⁵Arnau G, Abraham K, Sheela MN, Chair H, Sartie A, Asiedu R. 2010. Yams. In: Bradshaw JE ed. *Root and tuber crops*. New York: Springer. 127–148.
- ⁶Girma, G., Spillane, C. and Gedil, M. (2015) DNA Barcoding of the Main Cultivated Yams and Selected Wild Species in the Genus *Dioscorea*. *Journal of Systematic and Evolution*, 9999, 1-10.
- ⁷Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, Abebe E. 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1935–1943.
- ⁸Selvaraj D, Sarma RK, Sathishkumar R. 2008. Phylogenetic analysis of chloroplast matK gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformation* 3: 24–27.
- ⁹Janzen DH, Hallwachs W, Blandin P, Burns JM, Cadiou J-M., Chacon I, Dapkey T, Deans AR, Epstein ME, Espinoza B, Franclemont JG, Haber WA, Hajibabaei M, Hall JPW, Hebert PDN, Gauld ID, Harvey DJ, Hausmann A, Kitching IJ, Lafontaine D, Landry J-F, Lemaire C, Miller JY, Miller JS, Miller LEE, Miller SE, Montero J, Munroe E, Green SR, Ratnasingham S, Rawlins JE, Robbins RK, Rodriguez JJ, Rougerie R, Sharkey MJ, Smith MA, Solis MA, Sullivan JB, Thiaucourt P, Wahl DB, Weller SJ, Whitfield JB, Willmott KR, Wood DM, Woodley NE, Wilson JJ. 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources* 9: 1–26.
- ¹⁰Bousalem, Mustapha & Arnau, Gemma & Hochu, Isabelle & Arnolin, Richard & Viader, Veronique & Santoni, Sylvain & David, Jacques. (2006). Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the Dioscoreae. *TAG. Theoretical and applied genetics*.
- ¹¹Bousalem M, Viader V, Mariac C, Gomez RM, Hochu I, Santoni S, et al. Evidence of diploidy in the wild Amerindian yam, a putative progenitor of the endangered species *Dioscorea trifida* (Dioscoreaceae). *Genome*. 2010;53(5):371–83.
- ¹²Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313–321.
- ¹³Collins, G.G. and Symons, R.H. (1992) Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure. *Plant Molecular Biology Reporter* 10, 233–235.
- ¹⁴Schierenbeck, K.A. (1994) Modified polyethylene glycol DNA extraction procedure for silica gel dried tropical woody plants. *Biotechniques* 16, 392–394.
- ¹⁵De la Cruz, M., Whitkus, R.M. and Motabravo, L. (1995) Tropical tree DNA isolation and amplification. *Molecular Ecology* 4, 787–789.
- ¹⁶Bandana, S.M. and Ahuja, P.S. (1999) Isolation and PCR amplification of genomic DNA from market samples of dry tea. *Plant Molecular Biology Reporter* 17, 171–178.
- ¹⁷Mercado, J.A., Mansouri, E.I., Bermudez, J.S., Alfaro, F.P. and Quesada, M.A. (1999) A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 35, 152–153.
- ¹⁸Tel-Zur, N., Abbo, S., Myslabodski, D. and Mizrahi, Y. (1999) Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter* 17, 249–254.