

# Seleção de *primers* RAPD para análise de diversidade genética em canafístula (*Senna spectabilis*)

Michelli Ferreira dos Santos<sup>1</sup>, Isis Gomes Brito de Souza<sup>2</sup>, Paulo Sarmanho da Costa Lima<sup>3</sup> e Maria Perpetuo Socorro Bona Cortez do Nascimento<sup>4</sup>

## Introdução

As espécies lenhosas são fundamentais no contexto de produção e disponibilidade de forragem no Semi-árido Nordestino, merecendo destaque a canafístula (*Senna spectabilis* (DC) H.S. Irwin & Barneby). À medida que a estação seca progride e com o aumento da disponibilidade de folhas secas de árvores e arbustos, esta espécie se torna cada vez mais importante na dieta, principalmente dos caprinos (ARAÚJO FILHO et al., 1995). Segundo Lacerda e Kageyama (2003), o desenvolvimento de estratégias para a conservação genética de uma espécie passa pelo estudo da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de suas populações. As características morfológicas são muito utilizadas para a caracterização de uma espécie, mas os marcadores moleculares fornecem uma abordagem mais específica de cada indivíduo e são muito mais eficientes para a determinação da variabilidade genética, por analisarem diretamente o material genético (YANAKA et al., 2005).

A caracterização genética é importante para os programas de conservação de recursos genéticos vegetal, pois avalia a distância entre as populações em estudo e pode auxiliar na escolha das espécies a serem utilizadas na conservação mediante a estimativa de índices de similaridade entre os indivíduos analisados. (MOREIRA, 2001).

Entre os marcadores moleculares baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction), a técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tem sido mais utilizada na análise da diversidade genética de populações naturais, populações de melhoramento e em acessos de bancos de germoplasma, por ser considerada de custo mais baixo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Outra vantagem da técnica RAPD é que os *primers* utilizados podem encontrar, aleatoriamente, regiões de homologia no DNA e, portanto, não necessita do conhecimento prévio de seqüências do genoma a ser analisado (CAIXETA et al., 2003).

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de selecionar *primers* para serem usados em reações de

RAPD para futuras análises de diversidade genética em canafístula.

## Material e Métodos

Foram coletadas folhas jovens de oito acessos de canafístula, oriundos do banco de germoplasma de forrageiras da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI. Foram realizadas extrações de DNA genômico de tecido foliar jovem de plantas de canafístula. A quantificação foi realizada em gel de agarose a 0,8% com TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5 x corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), comparando-se o DNA das amostras com o DNA - λ na concentração de 150 ng.

Foram testados 100 *primers* e as reações de amplificação foram preparadas em volume final de 20 µl contendo 15 ng de DNA, 0,25 mM de dNTP, 1U de *Taq*Polimerase (Invitrogen), 0,2 µM de *primer*, 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,0 µl l de tampão 1X e H<sub>2</sub>O ultrapura. Essas reações foram realizadas com uma etapa inicial de desnaturação de 1 min a 92°C, seguida de 45 ciclos de 1 min a 92°C para desnaturação, 1 min a 35°C para anelamento, 2 min a 72°C e uma extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain a (Invitrogen) e fotodocumentados sob luz ultravioleta.

## Resultados

Dos 100 *primers* de RAPD testados 18 foram selecionados (A07, A12, B04, M01, M02, M04, M05, M07, M09, M15, M16, M17, M19, M20, N06, N10, N12, N14), por serem mais informativos e produzirem bandas (produtos de amplificação) mais nítidas. Foram obtidas 93 bandas, sendo 43 polimórficas e 50 monomórficas (Tab. 1). A Fig. 1 ilustra o padrão de bandas obtido em dois acessos de canafístula (C1 e C2), com os 18 *primers* selecionados.

## Discussão

A técnica de RAPD mostrou-se eficiente na detecção de polimorfismos nos acessos de

1. Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI. E-mail: michelly\_m\_santos@yahoo.com.br

2. Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI. E-mail: isisgomesmd@hotmail.com

3. Pesquisadora Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI. E-mail: sbona@cpamn.embrapa.com.br

4. Pesquisador Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI. E-mail: sarmanho@cpamn.embrapa.com.br

canafistula. A Tabela 1 apresenta os *primers* selecionados e o respectivo número de bandas polimórficas obtidas, observando-se variação de 1 a 5. Os resultados obtidos indicam a presença de variabilidade e que os marcadores RAPD tem potencial para a caracterização molecular dos acessos do banco de germoplasma de canafistula da Embrapa Meio-Norte.

## Referências

ARAÚJO FILHO, J.A. de. 1985. Pastoreio múltiplo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 7., Piracicaba, 1985. [**Anais**]. Piracicaba: FEALQ, 1985. p. 209-233.

CAIXETA, R. P. et al. Variação genética em populações de *Eucalyptus spp.* detectadas por meio de marcadores moleculares. **Revista Árvore**, v.27, n.3, p.357-363, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p

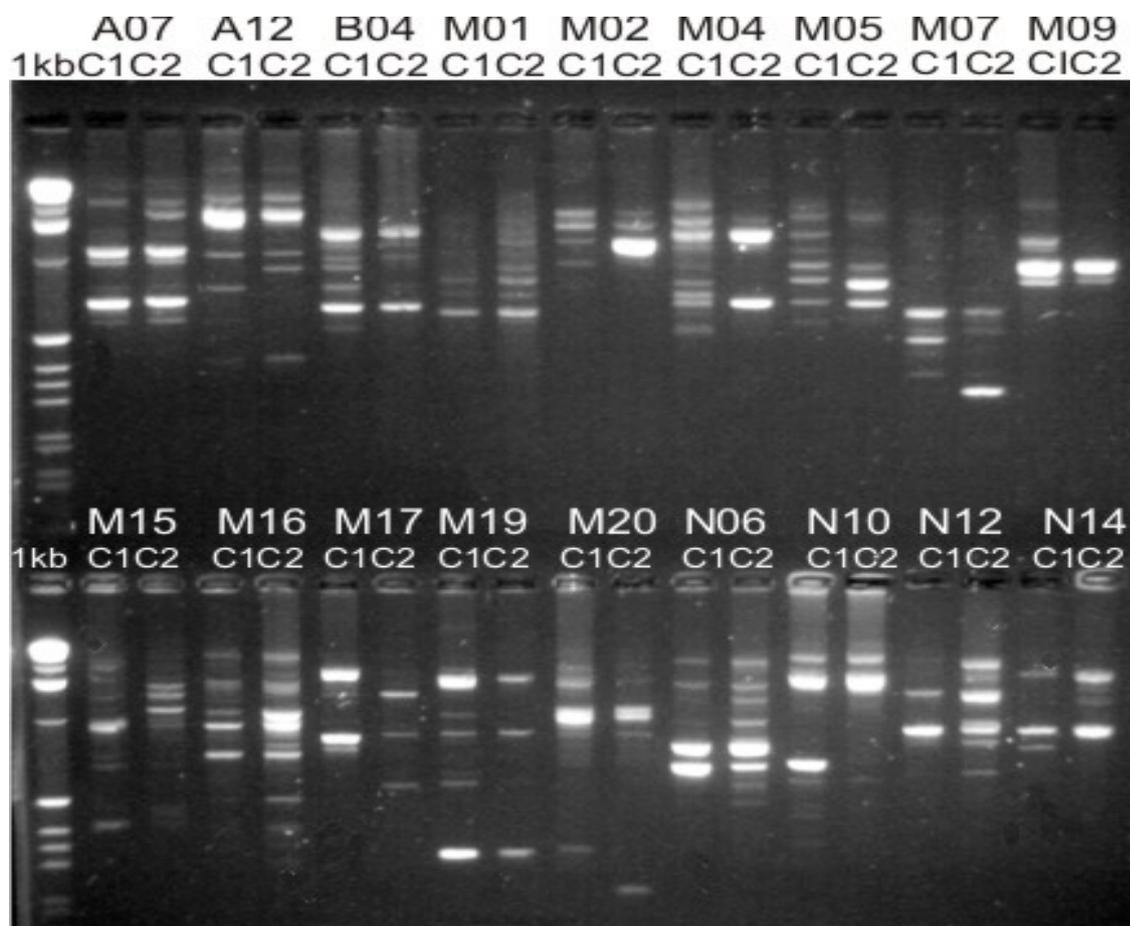
LACERDA, C. M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética de duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* M. Allemão na Região Semi-árida, Brasil. **Revista Árvore**, v.27, n.2, p.145-150, 2003

MILACH, S. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Sandra Milach, 1998, p. 17-28.

YANAKA, F. Y. et al. Variabilidade genética em populações naturais de *Bromus auleticus* Tris. Ex Ness (Poaceae) com base em isoenzimas e marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.1897-1904, 2005.

**Tabela 1.** Número de bandas polimórficas, monomórficas e total de bandas por iniciador usado na caracterização da variabilidade genética em canafístula.

<i>Primer</i>	Seqüência de Nucleotídeos	Total de bandas polimórficas	Total de bandas monomórficas	Total de bandas
A07	5' GTA ACC AGC C 3'	1	5	6
A12	5' TCG GCG ATA G 3'	2	3	5
B04	5' GGA CTA GAG T 3'	3	3	6
M01	5' GTT GGT GGC T 3'	2	3	7
M02	5' ACA ACG CCT C 3'	1	3	4
M04	5' GGC GGT TGT C 3'	5	2	7
M05	5' GGG AAC GTG T 3'	2	4	6
M07	5' CCG TGA CTC A 3'	2	1	3
M09	5' GTC TTG CGG A 3'	2	2	4
M15	5' GAC CTA CCA C 3'	4	2	6
M16	5' GTA ACC AGC C 3'	2	5	7
M17	5' TCA GTC CGG G 3'	4	1	5
M19	5' CCT TCA GGC A 3'	2	3	5
M20	5' AGG TCT TGG G 3'	1	2	3
N06	5' GAG ACG CAC A 3'	4	4	8
N10	5' ACA ACT GGG G 3'	1	2	3
N12	5' CAC AGA CAC C 3'	3	2	5
N14	5' TCG TGC GGG T 3'	2	2	4



**Figura 1.** Perfil eletroforético dos produtos de amplificação gerados pelos *primers* selecionados para estudos de variabilidade genética em canafístula.