

Diversidade Genética de Germoplasma de Nim Indiano Utilizando Marcadores ISSR

*Renato Guimarães Silveira*¹; *Marina Ferreira Vitória*²; *Ana Veruska Cruz da Silva*³

Resumo

Muitas espécies exóticas são introduzidas no Brasil com a finalidade econômica, porém é necessário um estudo sobre a diversidade genética para futuros programas de melhoramento, conduzindo-as à seleção de indivíduos superiores. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética entre 39 acessos de nim indiano, pertencentes a Embrapa Tabuleiros Costeiros. O uso de 18 marcadores ISSR resultou em 127 fragmentos, 100% polimórficos. Foi possível estimar a variabilidade existente entre os acessos pelo coeficiente de similaridade de Jaccard e método UPGMA. Os marcadores ISSR permitiram a caracterização molecular do BAG nim, sendo uma ferramenta útil para estimar a diversidade genética.

Palavras-chave: *Azadirachta indica*, marcadores moleculares, variabilidade genética.

¹ Graduando de Engenharia Florestal, bolsista do PIBIC/FAPITEC, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, renatosilveira16@hotmail.com.

² Graduanda em Engenharia Florestal da Universidade Federal de Sergipe, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

³ Engenheira-agrônoma, pós-doutora em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, adenir.teodoro@embrapa.br.

Introdução

Azadirachta é um gênero de plantas pertencentes à família Meliaceae, e apresenta duas espécies importantes: *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs, e *Azadirachta indica* (MABBERLEY et al., 1995). Ambas são popularmente conhecidas por nim indiano, nativas da região Indo-Malásia e utilizadas na produção agropecuária, medicamentos e cosméticos (NATIONAL..., 1992).

Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) são uma alternativa para a conservação dos recursos genéticos vegetais. A avaliação da diversidade genética entre os acessos de um BAG resulta em informações sobre potenciais genitores a serem utilizados em programas de melhoramento; possibilita a identificação de duplicatas e o intercâmbio de germoplasma entre pesquisadores; e de acordo com Nass (2007), é uma forma de conciliar os esforços de conservação da agrobiodiversidade com o desenvolvimento sustentável.

Em 2009 foi implantado o Banco Ativo de Germoplasma de Nim indiano, na Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, SE. O objetivo do presente trabalho foi estimar a variabilidade genética entre os acessos desse germoplasma, utilizando marcadores ISSR.

Material e Métodos

O processo de extração de DNA seguiu o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com modificações (PINHEIRO et al., 2012). A concentração do DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Após a quantificação, as amostras foram diluídas em solução TE para a concentração de 25 ng/ μ L e armazenadas a -20 °C para subsequente uso nas reações de ISSR.

As reações de PCR foram preparadas para volume final de 20 μ L, constituído por: água ultrapura, dNTPs (10 mM), tampão (10x), MgCl₂ (50 mM), primers (5 mM), Taq DNA polimerase Promega® (5 u/ μ L) e DNA (25 ng/ μ L).

Os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo e corridos em eletroforese horizontal a 90 V por 1 h e 15 min. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e as imagens foram armazenadas digitalmente.

Foram geradas matrizes binárias, em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência de bandas (0). O cálculo da similaridade genética (S_{ij}) entre cada par de indivíduos foi realizada por meio do programa FreeTree, empregando-se os coeficientes de Jaccard. A partir da matriz de similaridade de Jaccard, foi gerado um dendrograma por UPGMA, utilizando-se o programa Tree View.

Resultados e Discussão

As reações de PCR com os 18 primers ISSR resultaram em 127 fragmentos, todos polimórficos, indicando alta variabilidade entre os acessos. Esse alto índice de polimorfismo também foi encontrado por Pinheiro et al., 2012, quando utilizaram ISSR para avaliar a divergência genética de *Cattleya labiate* no nordeste brasileiro. O número de fragmentos foi superior ao encontrado por Silva et al. (2013), em germoplasma de nim indiano, utilizando marcadores RAPD, onde 17 primers resultaram em 43 bandas, com também 100% de polimorfismo.

As distâncias genéticas entre os acessos, estimada pelo coeficiente de similaridade de Jaccard, foram usados para construção de um dendrograma UPGMA (Figura 1), onde é possível observar os agrupamentos formados pelos acessos.

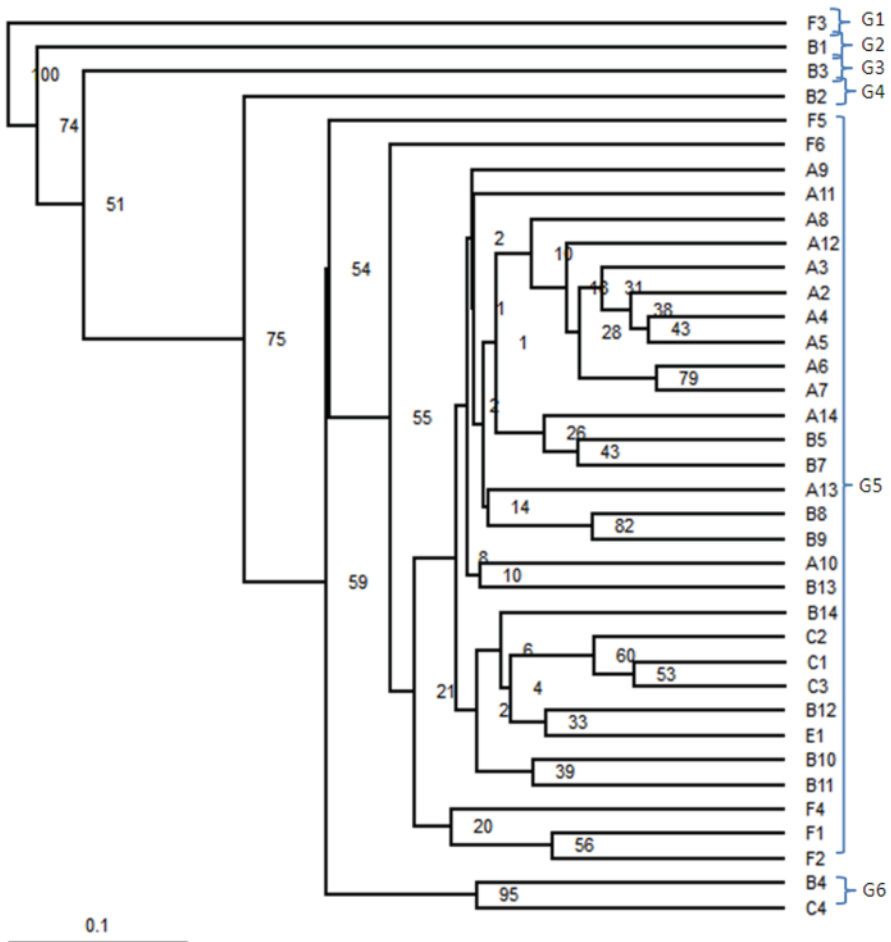


Figura 1. Dendrograma gerado pelo coeficiente de Jaccard e método UPGMA com análises bootstraps (7.000 X) para acessos de nim indiano (*Azadirachta* sp.), pertencentes a Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracaju, Sergipe, Brasil).

Os genótipos F3, B1, B3 e B2 foram os mais distantes e formaram grupos isolados. Houve a formação de um grande grupo, formado por A9, A11, A8, A12, A3, A2, A4, A5, A6, A7, A14, B5, B7, A13, B8, B9, A10, B13, B14, C2, C1, C3, B12, E1, B10, B11, F4, F1, F2. Os indivíduos mais similares foram B4 e C4 ($0,95 \pm 0,05$) e formaram o último grupo.

Conclusão

Os marcadores ISSR permitem a caracterização molecular de germoplasma de nim indiano, sendo uma ferramenta útil para estimar a diversidade genética.

Referências

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Califórnia, v. 19, p. 11-15, 1987.

MABBERLEY, D. J.; PANNELL, C. M.; SING, A. M. **Meliaceae**: flora malesiana. Leiden, Netherlands: Foundation Flora Malesiana, 1995. (Series I, v. 12, n. 1).

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Neem**: a tree for solving global problems. Washington: National Academy Press, 1992. p. 152.

NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858 p.

PINHEIRO, L. R.; RABBANI, A. R. C.; SILVA, A. V. C.; LEDO, A. S.; PEREIRA, K. L. G.; DINIZ, L. E. C. "Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers". **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 298, p. 1815-1825, 2012.

SILVA A.V.C, RABBANI A.R.C., ALMEIDA C.S., CLIVATI D. Genetic structure and diversity of the neem germplasm bank from Brazil Northeast, **African Journal of Biotechnology**, Bowie, MD, v. 12, p. 2822-2829, 2013.