



III Simpósio Brasileiro de Recursos Naturais do Semiárido – SBRNS

"Manejo de bacias hidrográficas em regiões semiáridas: potencialização da produção de água"

Fortaleza - Ceará, Brasil

20 a 22 de junho de 2017

doi: 10.18068/IIISBRNS2017.crns823

ISSN: 2359-2028

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ACESSOS DE *CAESALPINIA FERREA* POR MEIO DE MARCADORES ISSR

Jarbson Henrique Oliveira Silva¹, Jéssica Barbara Vieira Viana², Raimundo Bezerra de Araújo Neto³, Sérgio Emílio dos Santos Valente⁴, Paulo Sarmanho da Costa Lima⁵

¹Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, fone: (86)99815-6721, email: oliveirahenrique2@outlook.com

²M.Sc. em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, email: jessicabarbara-@hotmail.com

³Pesquisador, Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI, email: raimundo.bezerra@embrapa.br

⁴Professor Associado II, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, email: svalente2@yahoo.com.br

⁵Pesquisador A, Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI, email: paulo.costa-lima@embrapa.br

RESUMO: Pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) é uma planta perenifólia que possui importância medicinal e comercial. Entretanto, devido a seu potencial madeireiro, populações dessa espécie têm sofrido processos de devastação, principalmente na região nordeste do país, o que tem levado a perda de variabilidade genética. Dessa forma, tornam-se necessários estudos moleculares como subsídio aos programas de conservação e melhoramento da espécie. Nesse estudo, objetivou-se caracterizar e avaliar a diversidade genética entre acessos de Pau-Ferro (*Caesalpinia ferrea*) do Banco de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte a partir de 5 *primers* ISSR selecionados. Os 5 *primers* geraram um total de 36 loci nos 9 acessos trabalhados com a presença de bandas que variaram de aproximadamente 1650 a 250 bp (pares de base). Os marcadores utilizados foram eficientes no estudo da diversidade genética da população trabalhada, já que foi possível observar presença de diversidade genética entre os acessos, assim como a formação de dois grupos distintos dentro da mesma população de *C.ferrea* do Banco Ativo de Germoplasma de Forrageiras Nativas da Embrapa Meio-Norte.

PALAVRAS-CHAVE: Pau-ferro, Banco de Germoplasma, Inter Repetições de Sequência Simples

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN ACCESSES OF *CAESALPINIA FERREA* THROUGH MARKERS ISSR

ABSTRACT: Pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul. Var. *Ferrea*) is a perennial plant that has medicinal and commercial importance. However, due to their logging potential, populations of this species have suffered devastation processes, mainly in the northeast region of the country, which has led to loss of genetic variability. Thus, molecular studies are necessary as a subsidy to the conservation and breeding programs of the species. The objective was to characterize and evaluate the genetic diversity between the accessions of Pau-Ferro (*Caesalpinia ferrea*) from the Germplasm bank of Embrapa Meio-Norte with 5 selected ISSR primers. the 5 primers generated a total of 36 loci in the 9 accesses worked with the presence of bands ranging from approximately 1650 to 250 bp (base pairs). The markers used were efficient in the study of the genetic diversity of the work population, since it was possible to observe the presence of genetic diversity among the accessions, as well as the formation of two distinct groups within the same population of *C.ferrea* of the Active Bank of Forage Germplasm Natives of Embrapa Meio-Norte.

KEYWORDS: Pau-ferro, Germplasm Bank, Inter Simple sequence repetitions

INTRODUÇÃO

O pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*), também conhecido como jucá, é uma planta pertencente à família Fabaceae que ocorre nos estados do Piauí, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro. A árvore é bastante ornamental, principalmente pelo o formato arredondada da copa. É uma planta perenifólia ou semidecídua, heliófita, seletiva higrófila, característica de mata pluvial atlântica, apresentado ampla dispersão, porém geralmente em baixa densidade populacional (LORENZI, 2003). Além disso, o Pau-ferro é considerada uma importante forrageira da Região Nordeste, pois além das folhas e ramos forrageiros, produz seus frutos e vagens, durante o período de seca, servindo de alimento aos animais. Na região do semiárido, onde a seca é um grande obstáculo para a produção de rebanhos, a folhagem e os frutos do pau-ferro constituem boa parte da dieta dos bovinos, caprinos e ovinos que vivem nas áreas de ocorrência da planta (CNIP, 2002).

C. ferrea é ainda empregada na construção civil e marcenaria em geral por apresentar uma madeira resistente (dura e pesada). Entretanto, devido a essas características, a espécie têm sido devastadas no nordeste do Brasil e atualmente é uma árvore em processo de erosão genética (SOUSA *et al.*, 2014). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos moleculares de caracterização da diversidade genética como subsídio aos programas de conservação e melhoramento da espécie. A caracterização molecular é uma das formas de se avaliar essa diversidade, que se destaca por deduzir o grau de diversidade entre indivíduos e entre populações, sem a interferência de fatores ambientais (COSTA *et al.*, 2011).

O emprego de marcadores dominantes, como os ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), são ferramentas úteis para analisar a diversidade genética, principalmente em organismos não-modelo ou pouco estudados (VELEZ *et al.*, 2016). O marcadores ISSR, que amplifica regiões entre sequências de microssatélites adjacentes, apresentam elevado grau de reprodutibilidade, polimorfismo e baixo custo, além de não possuir a necessidade de se ter conhecimento prévio do genoma a ser trabalhado (SANTANA *et al.*,). Desse modo, objetivou-se avaliar a diversidade genética entre os 9 acessos Pau-Ferro do Banco de Germoplasma de Forrageiras Nativas da Embrapa Meio-Norte.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados no laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte (PI). O DNA genômico foi extraído de acordo com o kit Qiagen DNeasy® a partir de folhas

jovens dos nove acessos de pau-ferro, logo após a coleta no Banco de Germoplasma de Forrageiras Nativas da Embrapa Meio-Norte. Foram testados 23 *primers* oriundos de outras espécies da mesma família do pau-ferro.

As reações de amplificação do DNA foram completadas para se obter um volume final de 10 μL , contendo os seguintes reagentes: 1X Tampão [20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl]; 1,5 mmol L^{-1} MgCl_2 ; 1 mmol L^{-1} dNTP; 0,3 μM de oligonucleotídeos iniciadores, 0,5 unidade de Taq DNA polimerase, 0,5 μL de DNA (7 ng/ μL) e água ultra pura. As mesmas foram conduzidas em termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) sob os seguintes passos: 1 min e 30 seg a 94°C para desnaturação inicial, seguido de 40 ciclos. Cada ciclo consistiu de 94°C por 40 seg, temperatura de anelamento por 45 seg, 72° por 2 min, e uma extensão final a 72° por 7 min.

Os fragmentos de DNA gerados a partir da amplificações foram separados em gel de agarose (1,5%) utilizando o agente intercalante GelRed com tampão de carregamento; aplicou-se também 1Kb (Invitrogen) e 100bp (Invitrogen) de tamanhos de bandas conhecidos. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta. Para a corrida das amostras no gel, utilizou-se voltagem igual a 100V durante 4 horas. Foram selecionados cinco primers que apresentaram maior número de bandas e polimorfismo dentre os primers avaliados. Realizou-se reações de amplificação com todos os acessos de pau-ferro (PF-01, PF-02, PF03, PF-04, PF-05, PF-06, PF-07, PF-08 e PF-10) para que realiza-se a genotipagem dos acessos. O alinhamento das bandas foi processado pelo programa CorelDRAW® Graphics Suite X8 Copyright © (1989-2016 Corel Corporation), na qual elaborou-se uma matriz utilizando 1 para representar presença de banda e 0 para ausência e obteve-se uma matriz de similaridade a partir do coeficiente de Jaccard. A partir dos resultados construiu-se o dendograma com o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e utilizou-se índice de confiabilidade bootstrap com 1000 repetições. Essas análises foram realizadas no programa PAST v.3.08 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 5 *primers* ISSR utilizados para avaliar a diversidade genética dos 9 acessos de pau-ferro da EMBRAPA Meio-Norte geraram ao todo 36 locos. O primer 836 foi o que mais gerou bandas, enquanto que o primer 842 foi o mais polimórfico (Tabela 1). O polimorfismo é um parâmetro frequentemente utilizado para estimar a eficiência dos marcadores na avaliação da diversidade genética (GRAVITOL, 2011).

Tabela 1. Relação de *primers* ISSR utilizados e os dados obtidos a partir das ampliações dos 9 acessos de pau-ferro da EMBRAPA Meio-Norte.

Primer	Quantidade de loci gerados	de	Porcentagem de bandas polimórficas (%)	de	Amplitude das bandas geradas (bp)
834	6		83.3		1050 – 500
836	11		54.5		1650 – 300
842	5		100		800 – 250
855	8		87.5		1650 – 550
889	6		50		1650 – 500
Total	36		75		250 – 1650

O polimorfismo genético é a variação genética na sequência de alelos, na sequência de bases nucleotídicas ou na estrutura cromossômica (STRACHAN, 2002). No gel de agarose esse polimorfismo pode ser observado pela diferença no padrão das bandas (Figura 1).

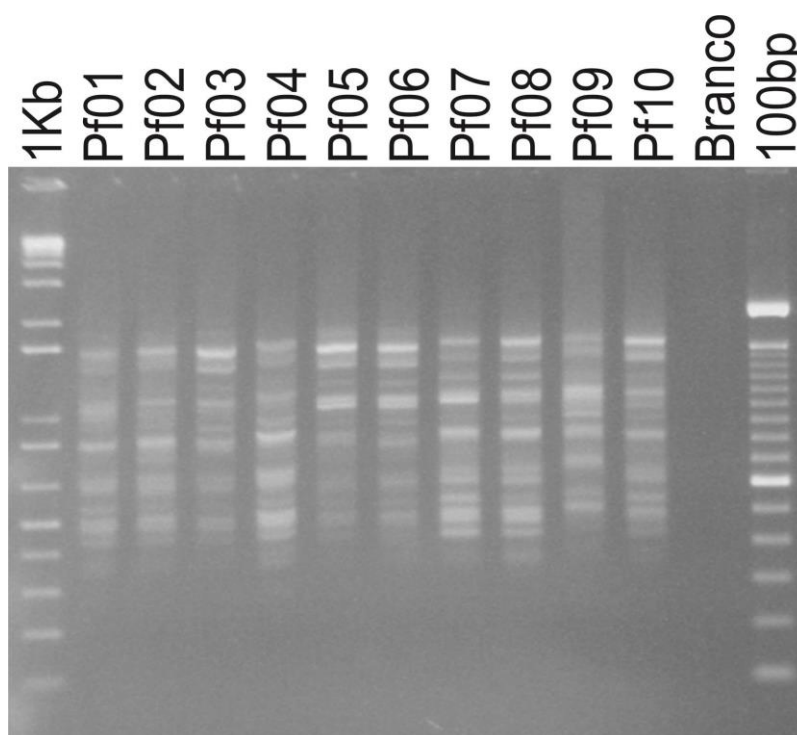


Figura 1. Perfil eletroforético do primer UBC 889 em 9 acessos de pau-ferro (PF01, PF02, PF03, PF04, PF05, PF06, PF07, PF08 e PF10).

As análises realizadas no programa PAST v.3.08 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001) resultaram em um dendrograma baseado nos índices de similaridade e de distância em que foi possível identificar a formação de dois grupos. O primeiro grupo engloba todos os acessos com

exceção do acesso PF-03, que por apresentar maior distância genética de todos os outros acessos da mesma população, apresenta-se isolado no grupo II. O coeficiente cofenético (r) foi de 0,79, que indica associação entre a matriz de similaridade e o dendrograma (Figura 2).

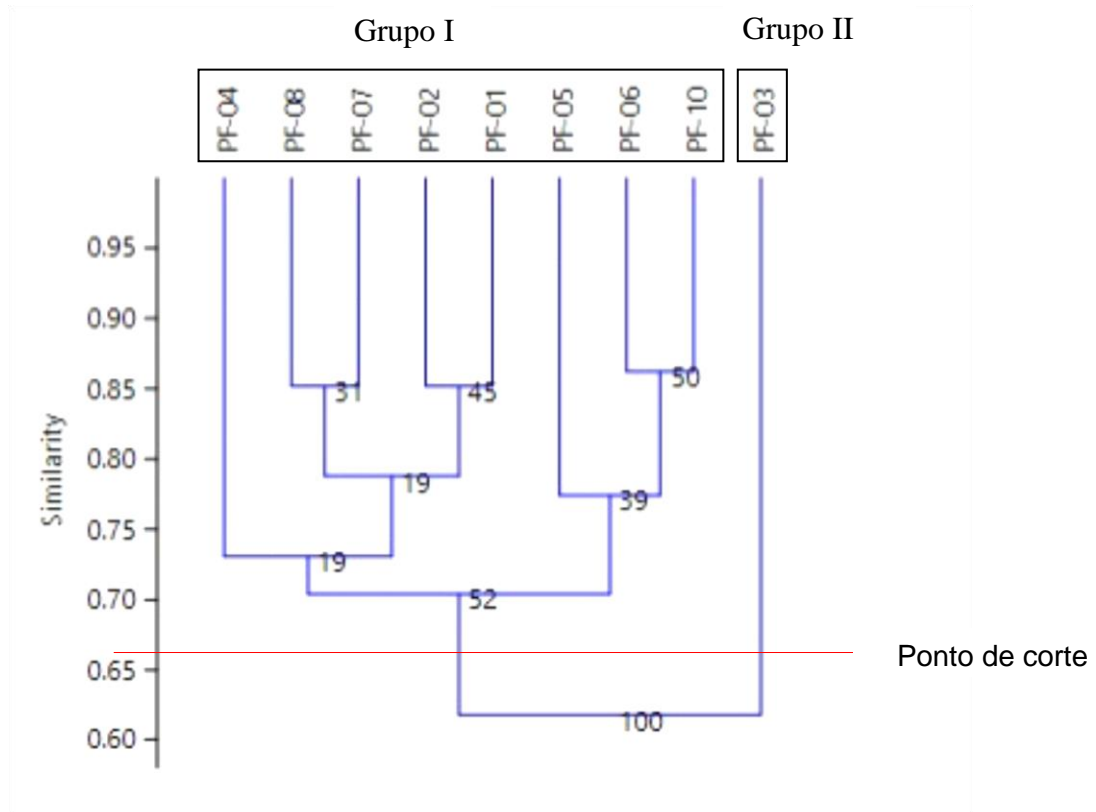


Figura 2. Dendrograma da análise de agrupamento UPGMA baseado no índice de similaridade de Jaccard entre os acessos de Pau-Ferro da EMBRAPA Meio-Norte.

CONCLUSÕES

Os marcadores ISSR utilizados se mostraram eficientes para o estudo de diversidade de *Caesalpinia ferrea*. A partir das análises preliminares realizadas, foi possível identificar a ocorrência de diversidade genética entre os acessos e a formação de grupos diferentes dentro da mesma população de pau-ferro do BAG de Forrageiras da Embrapa Meio-Norte.

Agradecimentos: à Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária - Embrapa pelo apoio.

REFERÊNCIAS:

CNIP - CENTRO NORDESTINO DE INFORMAÇÕES SOBRE PLANTAS. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Série Forrageiras Nativas. 2002.

COSTA, T. S. et al. Diversidade genética em acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 46, n. 5, p. 499-508, 2011.

GRAVITOL, C; MEDEIROS, C. F. L.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. High efficiency and reability of inter-simple sequence repeats (ISSR) makers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatopha curcas* L, acessions.. **Mol. Biol. Rep.**, v. 38, p. 4245-4256, 2011.

HARRI, L. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1992.

SANTANA, I. B. B. et al; Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR, São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SOUSA, C.C. et al. Comparison of methods to isolate DNA from *Caesalpinia ferrea*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 4486-4493, 2014.

STRACHAN, T.; READ, A.P. **Genética molecular humana**. 2a ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.

VELEZ, P.; QUINTERO, C. A.; GASCA-PINEDA, J.; GONZÁLEZ, M. C. An ISSR-based approach to acess genetic diversity in the marine arenicolous fungus *Corollospora maritime* sensu lato. **Mycoscience** , v. 57, p. 187-195, 2016.