

ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE GENÓTIPOS DE BABAÇU (*Orbignya phalerata* Mart) COM BASE NO MARCADOR RAPD

Michelli Ferreira dos Santos¹, Isis Gomes Britto de Souza², Eugênio Celso Emérito Araújo³,
Valdomiro Aurélio Barbosa de Souza⁴, Ilza Maria Sittolin⁵ e Paulo Sarmanho da Costa Lima⁶

Resumo

As caracterizações de germoplasma tiveram grande desenvolvimento nas últimas décadas, principalmente os métodos que identificam polimorfismo da seqüência de DNA, conhecidos como marcadores moleculares, que têm sido de grande importância para a análise de diversidade genética. Este trabalho teve como objetivo estudar a similaridade genética entre acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Babaçu da Embrapa Meio-Norte, oriundos de Tocantinópolis-TO, Balsas-MA, Teresina-PI, Ubajara-CE e Ipú-CE por meio de marcadores RAPD. Os dados obtidos a partir da presença ou ausência de bandas foram analisados utilizando-se o programa Past (método UPGMA-utilizando-se o coeficiente de Jaccard). A maior e menor similaridade entre os acessos foi observada entre os acessos de Ubajara-CE/Ipú-CE (0,82%) e Balsas-MA/ Ipú-CE (0,53%) respectivamente, o que é coerente com a proximidade e distância entre as regiões de coleta.

Introdução

O babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) é uma planta da família das palmáceas Arecaceae, dotada de frutos drupáceos com sementes oleaginosas e comestíveis das quais se extrai um óleo, empregado, sobretudo na alimentação, além de ser alvo de pesquisas avançadas para a fabricação de biocombustíveis. O babaçu constitui um recurso natural de elevada importância no Nordeste do Brasil, como fonte de óleo industrial, alimento e diversos outros produtos comerciais e de subsistência.

Atualmente, no Brasil, encontram-se vastos babaçuais espalhados ao sul da bacia amazônica, onde a floresta úmida cede lugar à vegetação típica dos cerrados. São os Estados do Maranhão, Piauí e Tocantins que concentram as maiores extensões de matas onde predominam os babaçuais, formando muitas vezes e espontaneamente, agrupamentos homogêneos, bastante densos e escuros, tal a proximidade entre os grandes coqueiros. As caracterizações de germoplasma tiveram grande desenvolvimento nas últimas décadas, principalmente os métodos que identificam polimorfismo da seqüência de ácido desoxirribonucléico, conhecidos como marcadores moleculares que têm sido de grande importância para a análise de diversidade genética.

A caracterização genética é importante para os programas de conservação de recursos genéticos vegetais, 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. Além disso, possibilita cruzamentos que favorecerão a manutenção da máxima variabilidade genética e evita esforços na manutenção de amostras que geneticamente seriam similares (EGITO *et al.*, 2001).

Os marcadores moleculares surgiram como uma nova ferramenta no processo de melhoramento genético (MOREIRA, 2001). A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) utiliza primers únicos de seqüência simples e arbitrária para amplificar fragmentos de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction) (WILLIAMS *et al.* 1990) possibilitando detectar o polimorfismo do DNA, amplificado ao acaso em múltiplas regiões do genoma (DINESH *et al.*, 1996). Essa técnica é a de menor custo, de menor número de etapas, menor tempo para se obter os resultados e maior facilidade de implementar, o que a torna um dos marcadores mais utilizado e difundido (MILACH, 1998).

A Embrapa Meio-Norte possui um banco de germoplasma de babaçu composto de acessos de babaçu que necessitam ser caracterizados para melhor uso da diversidade. Dessa forma este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de 5 acessos de babaçu coletados em Tocantinópolis-TO, Balsas-MA, Teresina-PI, Ubajara-CE e Ipú-CE, por meio de marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)

Material e Métodos

Foram coletadas folhas jovens de 5 acessos de babaçu, BRA-000078/1 (TO), BRA-000086/9(BA), BRA-000094/4(TE), BRA-0000108/1(CE) e BRA-0000116/2(CE) oriundos do banco de germoplasma da Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI.

A extração de DNA foi realizada com material devidamente desidratado, macerado em nitrogênio líquido, utilizando-se DNeasy® Plant Mini Kit. A quantificação do DNA extraído foi feita em gel de agarose a 0,8% com TBE (Tris-Borato-EDTA) 1x e corado com brometo de etídio, foi feita a quantificação comparando o DNA das amostras com o DNA- λ na concentração de 100 ng.

Para a análise de marcadores RAPD foram testados 22 primers (Gibco BRL) dos quais 5 foram selecionados. As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 20 μ l com Tampão 1X [20 mM Tris-HCL pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs 250 μ M de primer, 1U de Taq DNA Polymerase (INVITROGEN).

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti seguindo um programa de 1 min a 92°C para completa desnaturação do DNA moldes, foram efetuados 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C, seguindo-se de 5 min a 72°C para completa extensão dos produtos amplificados, que foram separados eletroforicamente em gel de agarose (1,4%) com tampão TBE 1x. em voltagem constante de 60 Volts, por aproximadamente 2 horas. Utilizou-se como marcador de massa molecular o *ladder* de 1Kb (Gibco-BRL). A coloração do gel foi feita com brometo de etídio, sendo este, em seguida, fotografado sob luz ultravioleta.

Foi construída uma matriz para os fragmentos polimórficos amplificados codificados em sistema binário, atribuindo-se (1) para presença e (0) para ausência de banda. Somente foram consideradas as bandas que não davam margens a dúvidas. Bandas muito fracas, de difícil resolução, não foram incluídas. Para análise dos dados, utilizou-se o programa Past. A similaridade entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Jaccard, que gerou a matriz de similaridade. Esta análise viabilizou a construção de um dendograma que mostrou graficamente a similaridade entre as amostras.

Resultado e Discussão

Foi feita uma seleção de 5 primers (M16, M20, A03, A05, A15) dos 22 testados dos quais apresentaram bandas polimórficas indicando a existência de variabilidade genética entre os acessos utilizados. De acordo com a presença ou ausência de bandas, os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa Past (método UPGMA-utilizando-se o coeficiente de Jaccard) (Tabela 1).

O dendograma obtido demonstrou haver uma variabilidade entre as amostras, com coeficientes de similaridade variando de 0,53 a 0,82. (Fig. 1.) A maior similaridades está entre os acessos de Ubajara-CE e Ipú-CE(0,82%) e a menor entre os acessos de Balsas-MA e Ipú-CE(0,53%).

Conclusão

O resultado da análise mostrou que poderá ser obtido um número de combinações híbridas a partir das linhagens avaliadas com similaridades menores que 0,82. O dendograma será útil na seleção de linhagens pouco similares para produção de híbridos experimentais, evitando-se testar todas as combinações possíveis.

Referências

DINESH, K.R.; LIM, T.M.; CHAN, W.K.; PHANG, V.P.E. *Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia*. Aquaculture international, v. 4, 19-30, 1996.

EGITO. A.de; ALBUQUERQUE. M. S.; MARIANTE, A da S. Caracterização genética de raças naturalizadas. In: *Simpósio de recursos genéticos para América latina e Caribe*, 3., 2001, Londrina. Anais... Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2001.

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.

Moreira, H.L.M., S. Zimmermann, R.P. Ribeiro, R.G. Bastos, L.D. Vargas, and J.A. Povh. 2003. *The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia*. Page 460. In: *World Aquaculture*, Salvador, Brasil (Abstract).

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.6531-6535, 1990.

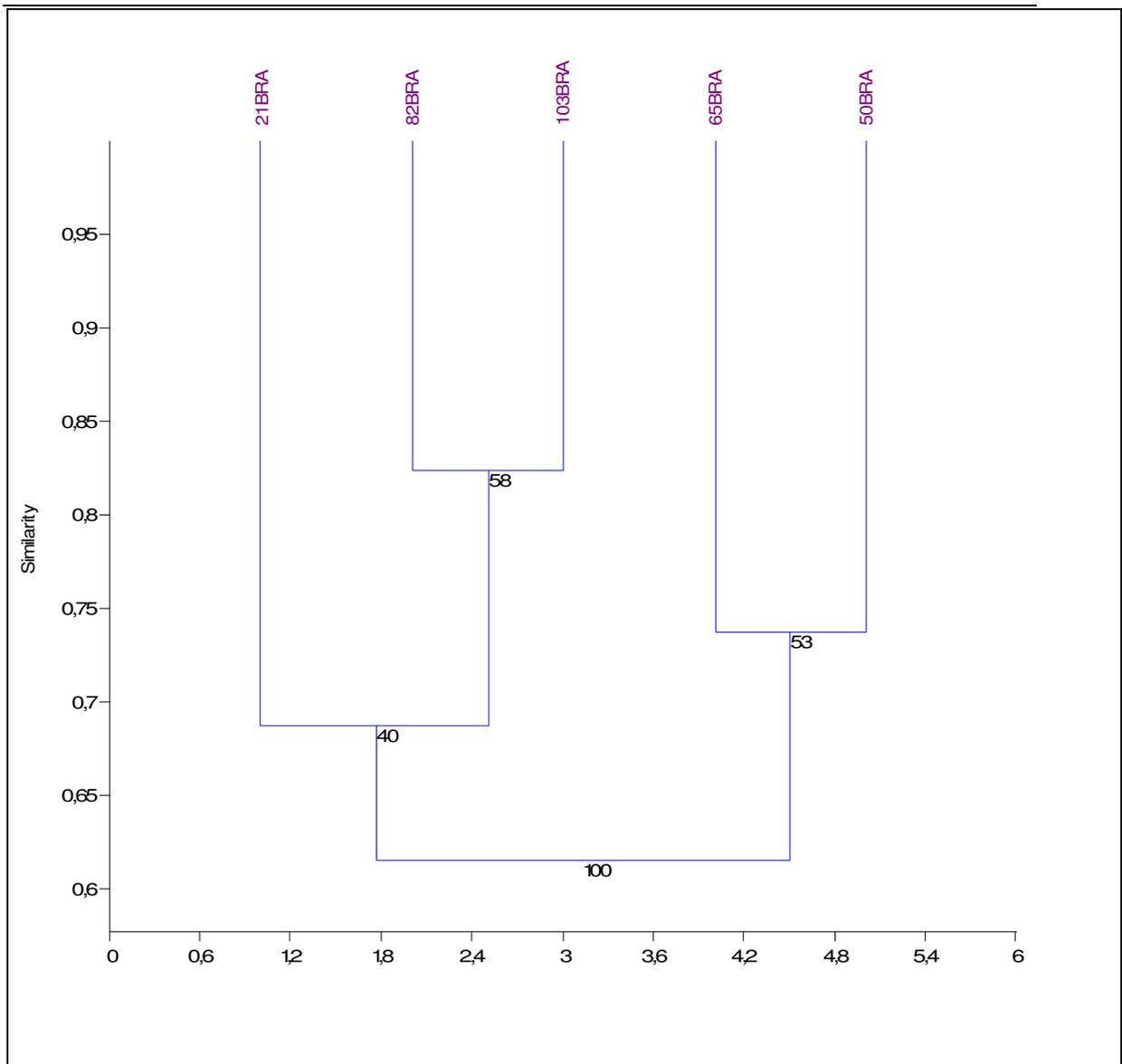


Figura 1. Agrupamento de 5 acessos de babaçu originários de cinco lugares diferentes.

Tabela 1. Matriz de similaridade genética entre cinco genótipos de babaçu gerado pelo coeficiente de Jaccard de locus de RAPD.

	50 BRA	65 BRA	21 BRA	82 BRA	103 BRA
50 BRA	1	0,74	0,56	0,67	0,53
65 BRA	0,74	1	0,57	0,75	0,62
21 BRA	0,56	0,57	1	0,67	0,71
82 BRA	0,67	0,75	0,67	1	0,82
103 BRA	0,53	0,62	0,71	0,82	1