

# USO DE MARCADORES RAPD E ISSR NA ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE BABAÇU (*Orbignya phalerata* Mart)

Isis Gomes de Brito Souza<sup>1</sup>, Michelli Ferreira dos Santos<sup>2</sup>, Lorena Miranda Pereira<sup>3</sup>, Ilza Maria Sittolin<sup>4</sup> e Paulo Sarmanho da Costa Lima<sup>4</sup>

## Resumo

O babaçu é um dos principais produtos extrativistas do Brasil. O desmatamento e a expansão da fronteira agrícola contribuem para a erosão genética do babaçu implicando na perda de genes que podem ser importantes em futuros programas de melhoramento. Portanto, é de fundamental importância a realização de estudos envolvendo coleta, conservação e caracterização para a preservação da variabilidade genética existente nessa região. Assim, a variabilidade genética entre cinco genótipos de babaçu, de diferentes procedências pertencentes ao BAG da Embrapa Meio-Norte, foi analisada por meio de marcadores RAPD e ISSR. Um total de 21 e 72 *loci* foram obtidos com os primers de RAPD e ISSR, respectivamente. As matrizes geradas foram correlacionadas pelo *Mantel test* e obteve-se o coeficiente  $r=0,548$  o que indicou uma moderada correlação genética. Ambos os marcadores foram eficientes na determinação das relações genéticas entre os genótipos.

## INTRODUÇÃO

O babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) é uma fonte de óleo industrial. O interesse da exploração do babaçu concentra-se, atualmente, nas amêndoas que se encontram no fruto de onde é extraído o óleo de babaçu, produto mais importante dentre os derivados da palmeira.

Apesar da importância do babaçu, seu aproveitamento vem ocorrendo de forma extrativa e a prática da agricultura rudimentar, proliferação de projetos agropecuários e industriais desbastam irracionalmente as palmeiras de babaçu, provocando a redução da produtividade e da variabilidade importantes em futuros programas de melhoramento. Em razão disso, a preservação da variabilidade genética do babaçu, mediante a constituição de Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) e a utilização de marcadores moleculares como ferramenta de auxílio no melhoramento genético do babaçu são importantes.

Os marcadores moleculares permitem fazer distinção entre indivíduos diretamente ao nível de DNA e têm permitido acessar a variabilidade genética dentro de um pool gênico de espécies perenes, assim como identificar a diversidade disponível em Bancos de Germoplasma. O uso de marcadores moleculares como RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990) e ISSR (Seqüências Simples Invertidas) (Zietkiewicz et al., 1994) em função da simplicidade, rapidez e baixo custo, representam uma ferramenta adicional importante, oferecendo novas possibilidades no manejo do germoplasma de babaçu. Assim, o presente trabalho foi realizado com objetivo de utilizar marcadores moleculares RAPD e ISSR para avaliar a variabilidade genética contida em cinco genótipos de babaçu pertencentes ao BAG de babaçu da Embrapa Meio-Norte.

## Material e Métodos

Cinco genótipos de babaçu foram obtidos do BAG de babaçu da Embrapa Meio-Norte: BRA-000078/1 (TO), BRA-000086/9(MA), BRA-000094/4(PI), BRA-0000108/1(CE) e BRA-0000116/2(CE).

As extrações de DNA foram realizadas a partir folhas jovens conforme recomendações do manual do Kit “Dneasy Plant Mini” da Qiagen<sup>TM</sup>. A quantificação do DNA foi realizada através de

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

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

3. Aluna do Curso de Biologia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, E-mail: pereira.lorena2@yahoo.com.br

4. Pesquisadora da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI, E-mail: ilza@cpamn.embrapa.br

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

Apoio financeiro: CNPq e EMBRAPA/PAC

eletroforese em gel de agarose a 0,8%, preparado em tampão TBE 1x (Tris-Borato-EDTA) e corado com brometo de etídio, através da comparação com bandas do DNA- $\lambda$  diluído na concentração de 150 ng.

Foram testados 23 *primers* de RAPD, dos quais cinco (M16, M20, A03, A05, A15-Gibco BRL) foram selecionados para as análises de variabilidade genética. As reações de amplificação foram realizadas de acordo com o protocolo de Williams et al. (1990). O volume final utilizado nas reações foi de 20  $\mu$ l, contendo os seguintes componentes: tampão 1,0x [20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (v/v) glicerol], MgCl<sub>2</sub> a 1,0 mM, dNTP a 800 mM, 0,6  $\mu$ M de *primer*, 1U de Taq DNA polimerase e 1  $\mu$ l de DNA genômico (~15 ng). As reações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer®, modelo Gene Amp PCR System 2400, com uma fase inicial de desnaturação a 92°C por 1 min, seguida de 40 ciclos nas seguintes condições: 1 min para desnaturação a 92°C; 1 min para anelamento a 35°C; 2 min para extensão a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por cinco min.

Para o ISSR, foram testados 22 *primers*, dos quais oito (UBC 814, UBC 821, UBC 822, UBC 827, UBC 829, UBC 840, UBC 845, UBC 857) foram selecionados para a análise. Essas reações foram preparadas em volume final de 20  $\mu$ L, com Tampão 1X [20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1,0 mM DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM ; dNTPs a 800 mM; 0,6  $\mu$ M de *primer*, 1 U de Taq DNA Polimerase e 1  $\mu$ l de DNA genômico (~15 ng). As reações de amplificação foram realizadas no equipamento Perkin Elmer®, modelo Gene Amp PCR System 2400, com uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 1min30seg, seguida de 40 ciclos nas seguintes condições: 40s para desnaturação a 94°C; temperatura de anelamento variando em função da temperatura de fusão do *primer*; 2 min para extensão a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 min.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,4% para RAPD e 2% para ISSR com tampão TBE 1X, conduzida em 80 V por 3,5 horas. Ao final, os géis foram tratados com brometo de etídio, por 40 minutos, visualizados em transluminador UV e fotografados.

A análise dos dados foi realizada com o software PAST v1.34 (Hammer et al., 2001), a partir do qual determinou-se a matriz de similaridade genética e o dendrograma (método UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard) e a correlação genética entre os marcadores RAPD e ISSR foi obtida pelo *Mantel test*.

## Resultados e Discussão

Os *primers* de RAPD amplificaram um total de 21 *loci* sendo 13 polimórficos, e os *primers* de ISSR amplificaram um total de 72 *loci*, dos quais 45 foram polimórficos. A técnica ISSR gerou um pouco mais polimorfismo (62,5%) que a técnica RAPD (61%). Os dendrogramas construídos utilizando os marcadores RAPD e ISSR foram correlacionados pelo *Mantel test* e revelaram um coeficiente de  $r = 0,548$  indicando moderada correlação genética. Os índices de similaridade variaram de 0,82 a 0,53 (RAPD) , 0,86 a 0,51 (ISSR) e 0,85 a 0,55 (RAPD e ISSR) com uma média de similaridade 0,664, 0,637 e 0,589 para RAPD, ISSR e para os dados correlacionados (Tabelas 1, 2, e 3).

Foi possível correlacionar à similaridade genética com a procedência dos genótipos, uma vez que os dois genótipos do Ceará agruparam-se mostrando a maior similaridade. Os genótipos BRA-000086/9(MA) e BRA-000094/4(PI), apresentaram também uma alta similaridade, podendo-se inferir como causa disso a proximidade das regiões geográficas, uma vez que são estados limítrofes. O genótipo de Tocantins (BRA-000078/1) apresentou uma menor similaridade com os outros genótipos, supondo-se como causa a sua maior distância geográfica. Os resultados demonstraram que os marcadores RAPD e ISSR individualmente ou combinados foram eficientes na determinação das relações genéticas entre os genótipos de babaçu.

## Referências

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, v.4, p.1-9, 2001.

WELSH, L.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.

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.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, v.20, p.176-183, 1994.

**Tabela 1.** Matriz de similaridade genética entre cinco genótipos de babaçu gerado pelo coeficiente de Jaccard, utilizando marcadores RAPD (abaixo da diagonal) e ISSR (acima da diagonal).

	BRA000078/1	BRA000086/9	BRA000094/4	BRA0000108/1	BRA0000116/2
BRA000078/1		0,59	0,56	0,53	0,51
BRA000086/9	0,74		0,74	0,58	0,62
BRA000094/4	0,56	0,57		0,67	0,71
BRA0000108/1	0,67	0,75	0,67		0,86
BRA0000116/2	0,53	0,62	0,71	0,82	

**Tabela 2.** Matriz de similaridade genética entre cinco genótipos de babaçu gerada pelo coeficiente de Jaccard, utilizando marcadores ISSR e RAPD correlacionados.

	BRA000078/1	BRA000086/9	BRA000094/4	BRA0000108/1	BRA0000116/2
BRA000078/1	1				
BRA000086/9	0,58	1			
BRA000094/4	0,56	0,74	1		
BRA0000108/1	0,55	0,60	0,68	1	
BRA0000116/2	0,55	0,59	0,69	0,85	1