

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE ARATICUM DA COLEÇÃO DE TRABALHO DA EMBRAPA CERRADOS COM BASE EM MARCADORES RAPD

Marcela Versiani Venancio Pires¹, Fábio Gelape Faleiro², José Carlos Sousa Silva², João Gilberto Alves Villela³, Bernardo Coutinho de Almeida³, José Teodoro de Melo², Sueli Matiko Sano², Graciele Bellon², Tadeu Graciolli Guimarães², Nilton Tadeu Vilela Junqueira²

¹Estudante de mestrado em Agronomia da Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília, DF, maversiani@yahoo.com.br,

²Pesquisadores da Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina, DF, ffaleiro@cpac.embrapa.br,

³Bolsistas de IC/Estagiários, CNPq/Embrapa Cerrados/UnB.

Introdução

O araticum (*Annona crassiflora* Mart.) é uma espécie frutífera da família Annonaceae, nativa da região do Cerrado, muito estudada atualmente em diversas áreas, desde a culinária, como fonte nutricional, até a medicinal, pelo grande potencial antioxidante (Roesler *et. al.*, 2007). O Cerrado é considerado o segundo maior bioma brasileiro, com aproximadamente 200 milhões de hectares e aproximadamente 33% da diversidade biológica brasileira (Aguiar *et. al.*, 2004). Algumas estimativas indicam que o Cerrado apresenta 40% da vegetação alterada pela atividade humana. Muitas espécies estão ameaçadas pela ocupação antrópica desordenada do Cerrado e o extrativismo predatório. Para preservar as espécies com potencial econômico, além da criação de unidades de conservação maiores, deve-se realizar a recuperação de áreas degradadas e a recomposição da reserva legal das propriedades rurais com mudas oriundas destas espécies.

Estudos sobre a variabilidade genética destas espécies geram importantes informações para subsidiar diferentes práticas de manejo, estabelecimento e manejo de bancos de germoplasma e também etapas iniciais de seleção e melhoramento genético. Nesse sentido, a Embrapa Cerrados tem trabalhado na caracterização morfo-agronômica de uma coleção de trabalho de araticum. Para complementar tais informações, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a variabilidade genética da coleção de trabalho de acessos de araticum da Embrapa Cerrados e outros materiais próximos ao Distrito Federal, utilizando marcadores moleculares RAPD.

Material e Métodos

Os materiais genéticos analisados no presente trabalho foram 18 acessos de *A. crassiflora*, sendo 7 da coleção de trabalho da Embrapa Cerrados e outros de localidades próximas ao DF e dois acessos de outras espécies da família Annonaceae, utilizados como outgroup (Tabela 1). Folhas de cada material foram coletadas e o DNA genômico extraído

utilizando o método do CTAB, com modificações (Faleiro et al., 2003). Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas pela técnica de RAPD.

Tabela 1. Acessos de araticum e sua respectiva origem

Número	Código	Locais de coleta
1	CPAC AR-9	Águas Emendadas
2	CPAC AR-11	Colégio Agrícola
3	CPAC AR-15	Cabeceiras – GO
4	CPAC AR-16	Cabeceiras - GO
5	CPAC AR-26	Reserva do Exército
6	CPAC AR-27	Reserva do Exército
7	CPAC AR-31	Reserva do Exército
8*	CPAC AR-7	Jardim ACN
9*	CPAC AR-8	Jardim transportes
10*	CPAC AR-1	Viveiro
11*	CPAC AR-1-1	Viveiro
12*	CPAC AR-1-2	Viveiro
13*	CPAC AR1-3	Viveiro
14*	CPAC AR1-4	Viveiro
15	CPAC AR-5	Consórcio
16	CPAC AR-6	Consórcio
17	Out group	Paraná
18	Out group	Terra Fria

* Acessos da coleção de trabalho da Embrapa Cerrados

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 uL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 uM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 uM de um “primer” (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Para obtenção dos marcadores RAPD foram utilizados 10 *primers* decâmeros: OPD-05, OPD-07, OPD-08, OPD-16, OPE-16, OPF-01, OPF-16, OPG-05, OPH-07 e OPH-08. As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C, e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 ul de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar a análise de

agrupamento com o auxílio do Programa Statistica (Statsoft Inc., 1999), utilizando como critério de agrupamento o método do UPGMA. Ainda com base na matriz de distâncias genéticas, foi realizada a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS e Statistica (Statsoft Inc., 1999).

Resultados e Discussão

Os 10 *primers* decâmeros geraram um total de 146 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 14,6 marcadores por *primer*. As dissimilaridades genéticas entre os 18 genótipos de araticum variaram entre 0,152 e 0,697 (Dados não apresentados). A menor distância foi observada entre o genótipo CPAC AR 1-3 e CPAC AR 1-4 (0,152), já esperada por terem origem da mesma matriz (CPAC AR 1), bem como a similaridade dos outros acessos localizados na Embrapa Cerrados, como mostra a dispersão gráfica na Figura 1. A maior distância observada foi entre o genótipo do out group de Terra Fria e CPAC AR 9, de Águas Emendadas (0,697).

Do total de marcadores, 100% foram polimórficos. Verifica-se também coeficientes de distâncias genéticas altos, evidenciando a ampla base genética do material total avaliado. Analisando apenas o grupo de acessos já inseridos no CPAC, as distâncias diminuem, indicando maior similaridade entre os acessos, mostrando que a base genética da atual coleção de trabalho é mais estreita. Os genótipos do out group foram os que mais diferiram dos outros, com maiores valores de dissimilaridade genética e maior distância na análise do gráfico de dispersão (Números 17 e 18, Figura 1) .

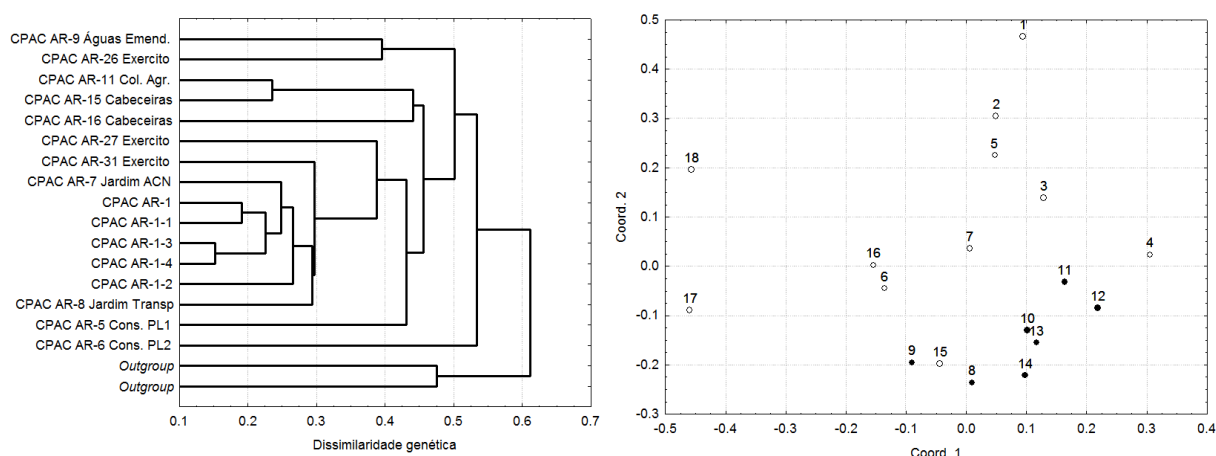


Figura 1. Análise de agrupamento e dispersão gráfica de 18 acessos de araticum, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 146 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,85. Os números dos acessos correspondem aos informados na Tabela 1.

Conclusões

Verificou-se proximidade genética entre os acessos da coleção de trabalho da Embrapa Cerrados. Por outro lado, foram verificadas alta variabilidade genética entre acessos das reservas de Águas Emendadas, do Exército, do Colégio Agrícola e de acessos implantados em áreas experimentais de consórcio. Esses acessos são importantes fontes de variabilidade para enriquecimento da atual coleção de trabalho da Embrapa Cerrados e para futuros estudos de caracterização morfo-agronômica.

Referências Bibliográficas

- CRUZ, C.D. Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa : UFV, 2001. 648p.
- FALEIRO, F.G. MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.
- FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R., KARIA, C.T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. (Comunicado Técnico N°92) 6p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília : EMBRAPA, 1995. 220p.
- MORELL, M.K. et al. DNA profiling techniques for plant variety identification. Australian Journal of Experimental Agriculture , Merbein, n.35, p.807-819, 1995.
- NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Washington, v. 76, n. 10, p. 5269-5273. 1979.
- ROESLER, R; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciência e Tecnologia Alimentos. v.27 n.1 Campinas Jan./Mar. 2007
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT user`s guide. Version 6, 4th. Ed. Cary, North Caroline, 1989. 846 p.
- STATSOFT INC. Statistica for Windows [Computer program manual] Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.