

Análise de similaridade entre acessos de Catingueira (*Caesalpinia spp.*) com base nos marcadores RAPD

Raul Ferreira de Miranda Mendes¹, Michelli Ferreira dos Santos², Raimundo Bezerra de Araujo Neto³,
Maria Perpetuo Socorro Bona Cortez do Nascimento³, Paulo Sarmanho da Costa Lima³,

Introdução

A vegetação de caatinga é constituída, especialmente, de espécies lenhosas e herbáceas de pequeno porte. As espécies lenhosas são fundamentais no contexto de produção e disponibilidade de forragem no semi-árido nordestino. Entre as espécies nativas da caatinga, a Catingueira-verdadeira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) apresenta grande potencial forrageiro, pois é uma das plantas sertanejas cujas gemas brotam nas primeiras manifestações de umidade. Dessa forma, no início do período das chuvas o gado procura as folhas jovens extremamente palatáveis, sendo, entre outras, preferidas por bovinos, caprinos e ovinos (HARDESTY et al., 1988).

Segundo Kadama (2006), uma etapa fundamental, no melhoramento genético, é a obtenção de variabilidade genética entre indivíduos de uma espécie ou entre grupos de cruzamentos interespecíficos. Portanto, uma das etapas indispensáveis é o conhecimento da diversidade genética, principalmente em espécies que ainda não foram domesticadas, como a Catingueira. Os marcadores moleculares são ferramentas eficazes para estudos de genética, especialmente para o melhoramento genético das espécies de interesse econômico. Existem diversos tipos de marcadores moleculares e cada marcador apresenta características específicas.

Entre os marcadores moleculares baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem sido amplamente utilizada, pois apresenta vantagens, quando comparado com outros marcadores. Apresenta um custo inferior e é mais fácil a execução. Também não é necessário o conhecimento prévio dos organismos de interesse, como por exemplo, desenvolvimento prévio de uma biblioteca

de sondas específicas. Outra vantagem é que um conjunto único de *primers* arbitrários pode ser utilizado para qualquer organismo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de Catingueira por meio de marcadores RAPD.

Material e métodos

Foram coletadas folhas jovens de 10 acessos de plantas de catingueira oriundos do Banco de Germoplasma de Forrageiras da Embrapa Meio-Norte localizado em Teresina-PI. As folhas foram colocadas no isopor com gelo até serem armazenadas no freezer para posterior extração.

A extração de DNA foi realizada com material fresco e macerada em homogeneizador Precellys. Utilizou-se o Kit de extração da Quiagen. A quantificação do DNA extraído foi feito em gel de agarose a 0,8% com TBE (Tris-Borato-EDTA) 1x e corado com GelRed™, 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 100 *primers* dos quais 8 foram selecionados. As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 20 μ l contendo 15 ng de DNA, 0,25 mM de dNTP, 1U de *Taq*Polimerase (Invitrogen), 0,2 μ M de *primer*, 3,0 mM de $MgCl_2$, 2,0 μ l l de tampão 1X e H_2O ultrapura.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti seguindo um programa com uma etapa inicial de desnaturação de 1 min a 92°C, seguida de 45 ciclos de 1 min a 92°C para desnaturação, 1 min a 35°C para anelamento, 2 min a 72°C e uma extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com GelRed™ e fotodocumentados sob luz ultravioleta.

1. Biólogo, Universidade Estadual do Piauí, Teresina, PI. Email: raul-mendes@hotmail.com

2. Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI. Email: michelly_m_santos@yahoo.com.br

3. Pesquisador Embrapa Meio Norte, Teresina, PI. Email: sarmanho@cpamn.embrapa.com.br; sbona@cpamn.embrapa.com.br; rbzerra@cpamn.embrapa.br



Foi construída uma matriz para os fragmentos polimórficos amplificados que foram codificados em um 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 (método UPGMA). A similaridade entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Dice, que gerou a matriz de similaridade. Esta análise viabilizou a construção de um dendrograma que mostrou graficamente a similaridade entre as amostras.

Resultados

Foram selecionados oito *primers*: A08, A09, M01, M04, M15, M20, N06 e P06.

A matriz de similaridade obtida demonstrou haver variabilidade entre as amostras, com coeficientes de similaridade variando de 0,45 a 0,74 (Tabela 1). Apresentou uma média de similaridade de 0,59. A maior similaridades está entre os genótipos 8 e 9 e a menor entre os genótipos 2 e FG 2.

O Dendrograma gerado permitiu a separação em três grupos ($dg_m = 0,59$) (Figura 1). Demonstra também a diversidade genética das duas espécies analisadas, a *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (acessos 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10) e a *Caesalpinia bracteosa* Tul. (acessos Fg1 e Fg2), ficando separadas no dendrograma.

Discussão

A aplicabilidade de marcadores RAPD em estabelecer a relação genética de germoplasmas de Catingueira mostrou-se satisfatório, pois se observou grande diversidade genética entre os genótipos analisados. Os resultados obtidos aqui evidenciaram uma menor diversidade genética entre os genótipos 8 e 9 que são da mesma espécie. A maior diversidade genética observada foi entre os genótipos 2 e Fg2, que está de acordo com o esperado, pois o genótipo 2 é classificado como *Caesalpinia pyramidalis* Tul. e o Fg2 pertence a espécie *Caesalpinia bracteosa* Tul.

A identificação dos genótipos de Catingueira com maior e menor divergência genética possibilitará a execução de melhoramento com a forrageira que vise a obtenção de maior segregação e a recuperação das características do parental recorrente (Franco et al, 2001).

A alta concentração de genótipos (4, 8, 9, 6, 3 e 2) reunidos no terceiro grupo permitiu inferir que esses materiais genéticos apresentam a mesma procedência.

Referências

HARDESTY, L. H.; BOX, T. W.; MALECHEK, J. C. Season of cutting affects bio mass production by coppicing browse species of the Brazilian caatinga. *Journal of Range Management*, v.41, n.6, p.447-80, 1988.

KAMADA, Takesi. Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de beta-ecdisona. Viçosa:UFV,2006.

HAYMER, D. S., McINNIS, D. O. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome*, v. 37, p. 244-8, 1994.

FRANCO, Marília Caixeta; CASSINI, Sérgio Túlio Alves; OLIVEIRA, Valter Rodrigues; TSAI, Siu Mui. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. *Brasília:Pesq. agropec. bras.* vol.36 no.2. 2001



Tabela 1. Matriz de similaridade genética entre 10 genótipos de Catingueira gerada pelo coeficiente de Dice de locus de RAPD.

	2	3	4	5	6	8	9	10	FG1	FG2
2										
3	0,68889									
4	0,68085	0,66667								
5	0,55102	0,61702	0,61224							
6	0,50505	0,67368	0,64646	0,58252						
8	0,59794	0,64516	0,72165	0,51485	0,68627					
9	0,58252	0,66667	0,71845	0,65421	0,7037	0,73585				
10	0,54167	0,63043	0,52083	0,66	0,49505	0,54545	0,62857			
FG1	0,54945	0,5977	0,57143	0,48421	0,58333	0,53191	0,54	0,49462		
FG2	0,4466	0,58586	0,50485	0,50467	0,55556	0,50943	0,51786	0,47619	0,68	

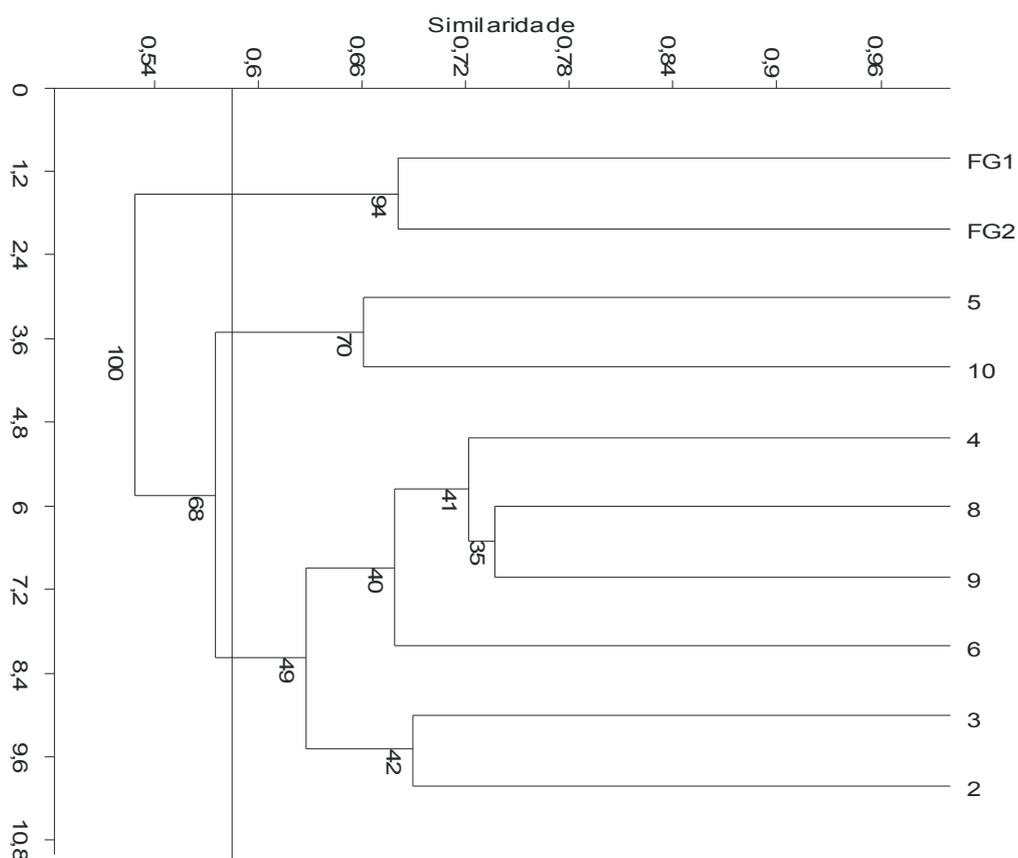


Figura 1. Agrupamento de 10 genótipos de Catingueira.

