

Diversidade genética entre acessos de canafístula (*Senna spectabilis*) por marcadores RAPD

Michelli Ferreira dos Santos¹, Raimundo Bezerra de Araujo Neto²,
Maria Perpetuo Socorro Bona Cortez do Nascimento², Paulo Sarmanho da Costa Lima²

Introdução

A caatinga possui uma flora caracterizada por grande presença de espécies forrageiras, constituindo-se na mais importante fonte de alimentação para os rebanhos dessa região, chegando a participar em até 90% da dieta de caprinos e ovinos (GONZAGA NETO et al., 2001).

Uma das espécies de forrageira bastante utilizada na alimentação animal é a Canafístula (*Senna spectabilis* (DC.) H.S. Irwin & Barneby.), uma leguminosa Fabaceae arbórea que tem utilização forrageira e madeireira.

Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) são uma alternativa para a conservação dos recursos genéticos. A avaliação da diversidade genética entre os acessos de um BAG resulta em informações sobre potenciais genitores a serem utilizados em programas de melhoramento; possibilita a identificação de duplicatas e o intercâmbio de germoplasma entre pesquisadores; e de acordo com Nass (2007), é uma forma de conciliar os esforços de conservação da agrobiodiversidade com o desenvolvimento sustentável.

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na caracterização de germoplasma, principalmente por fornecer informações sobre a variabilidade genética do DNA, ao eliminar possíveis efeitos ambientais (CASTRO et al., 2004; CHIORATO et al., 2007).

Entre os marcadores moleculares baseados em PCR (Reação em cadeia de polimerase), a técnica RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) tem sido mais utilizada na análise da diversidade genética de populações naturais, populações de melhoramento e em acessos de bancos de germoplasma, por ser considerada de baixo custo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Outra vantagem da técnica RAPD é que os *primers* utilizados podem encontrar, aleatoriamente, regiões no DNA e, portanto, não

necessita do conhecimento prévio de sequências do genoma a ser analisado (CAIXETA et al., 2003).

Nesse sentido, objetivou-se estudar a diversidade genética existente entre os acessos de canafístula do banco de germoplasma de forrageiras da Embrapa Meio-Norte por meio de marcadores RAPD.

Material e Métodos

Para extração de material genético foram utilizadas folhas jovens e sadias de plantas de canafístula, oriundos do banco de germoplasma de forrageiras da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI, sendo aproximadamente, 100 mg de tecido foliar de cada planta. A extração do DNA foi realizada obedecendo-se as recomendações dos kits de purificação da Qiagen. A quantificação foi realizada em gel de agarose a 0,8% com TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5 x corado com SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), comparando-se o DNA das amostras com o DNA - λ na concentração de 150 ng.

Neste estudo foram utilizados 15 *primers* previamente selecionados para análise de diversidade genética em canafístula por possuírem maior número de marcadores polimórficos e de boa qualidade para leitura (SANTOS et al., 2009). Os *primers* utilizados nesse trabalho foram A07, A12, B04, M02, M04, M05, M07, M09, M15, M16, M19, N06, N10, N12, e N14.

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 MgCl₂, 2,0 μ l l de tampão 1X e H₂O ultrapura. Essas reações foram realizadas 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 SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) e fotodocumentados sob luz ultravioleta.

1. Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga, CEP: 64049-550, Teresina, PI. Email: michelly_m_santos@yahoo.com.br

2. Pesquisador Embrapa Meio Norte, Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001 ,CEP: 64006-220, Teresina, PI. Email: sarmanho@cpamn.embrapa.com.br; sbona@cpamn.embrapa.com.br; rbezerra@cpamn.embrapa.br



As bandas dos fragmentos amplificadas ao acaso foram codificadas como caracteres binários, 0 e 1, correspondendo a ausência e presença de bandas, respectivamente. A partir desses dados, foi estimada a similaridade genética entre os genótipos, utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard, calculado pelo programa PAST v.1.34 (HAMMER et al., 2001).

A partir da matriz de similaridade gerada foi realizada a análise de agrupamento pelo método de Ligação Média entre Grupos (UPGMA). O coeficiente de correlação cofenético (r) foi calculado, por meio da matriz de similaridade e do dendrograma obtido. E a partir da matriz binária dos fragmentos amplificadas, foi calculado o índice de confiabilidade de *bootstrap*, gerando um dendrograma a partir de 1.000 permutações.

Resultados

Os 15 *primers* RAPD revelaram um total de 107 bandas, sendo 59 polimórficas (55,14%) (Tabela 1). Foi observada uma variação de 1 a 8 locos polimórficos e média de 7 bandas por *primer*, sendo evidente o alto polimorfismo entre os acessos.

A matriz de similaridade obtida por meio do coeficiente de Jaccard entre os acessos com base nos marcadores RAPD (Tabela 2) revelou que o coeficiente de similaridade entre os pares de acessos variou de 0,65 a 0,83 e apresentou média de 0,74, o par mais similar ocorreu entre os indivíduos CAN.4 e CAN.5, enquanto o par mais dissimilar foi registrado entre os indivíduos CAN.1 e CAN.6.

Os marcadores RAPD possibilitaram a diferenciação genética e o dendrograma permitiu a separação em três grupos ($dg_m = 0,74$) (Figura 1). A confiabilidade dos dados e a consistência dos nós foram constatadas pelos valores do *bootstrap* e pelo coeficiente de correlação cofenético (83,76%).

Discussão

Dentre os *primers* de RAPD utilizados no presente estudo, aqueles que possuem maior potencial para utilização, em análise de variabilidade genética em canafistula, são: A07, A12, M04, M05, M07 e M15, pois produziram, pelo menos, cinco ou mais bandas polimórficas, resultado semelhante foram observados como por Santos et al. (2009).

A importância de índices de dissimilaridade genética está na avaliação das relações entre genótipos com o objetivo de administrar informações disponíveis em bancos de germoplasma ou para recomendar cruzamentos entre parentais divergentes em programas de hibridação (CRUZ, 2001). A alta diversidade genética entre os acessos de canafistula foi observada, sendo que, 53,57% dos pares de acessos demonstraram diversidades genéticas iguais ou abaixo da média geral, podendo ser indicados em programas de melhoramento. Altos índices de diversidade genética pode ser observado em outras espécies de forrageiras utilizando os marcadores RAPD, como o trabalho realizado por Zorzatto et al. (2009), com *Brachiaria dictyoneura*, onde observaram uma média de 0,53 denotando uma alta variabilidade entre os acessos.

Referências

- CAIXETA, R. P. et al. Variação genética em populações de *Eucalyptus spp.* detectadas por meio de marcadores moleculares. **Revista Árvore**, v.27, n.3, p.357-363, 2003.
- CASTRO, H. G. de; SILVA, D. J. H. da; OLIVEIRA, L. O. et al. Diversidade genética entre acessos de mentrasto avaliados por características botânico-agronômicas, moleculares e fitoquímicas. **Revista Ceres**, v.51, p.227-241, 2004.
- CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; BENCHIMOL, L. L.; CHIAVEGATO, M. B.; DIAS, L. A. S.; COLOMBO, C. A. Genetic diversity in common bean accessions evaluated by means of morpho-agronomical and RAPD data. **Scientia Agricola**, v.64, p.256-262, 2007.
- CRUZ, C.D. A informática no melhoramento genético. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-ILGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento**: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.1085-1118.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.
- GONZAGA NETO, S.; BATISTA, A. M. V.; CARVALHO, F. F. R. de et al. Composição bromatológica, consumo e digestibilidade in vivo de dietas com diferentes níveis de feno de catingueira (*Caesalpinia bractesa*), fornecido para ovinos morada nova. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p.553-562, 2001.
- HAMMER, O.; HARPER, D.A.T., P.D.R. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v.4, n.1, 2001. 9pp.
- NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858p
- SANTOS, M. F.; SOUZA, I. G. B.; LIMA, P. S. C.; NASCIMENTO, M, P, S, B, C. Seleção de *primers* RAPD para análise de diversidade genética em canafistula (*Senna spectabilis*). In: II SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS, 2009, Campo Grande.
- ZORZATTO, C.; CHIARI, L.; VALLE, C. B. do; LEGUIZAMON, G. O. C. Estudo da variabilidade genética em *Brachiaria dictyoneura* por marcadores RAPD. UEPG Ciências Biológicas e da Saúde, v. 15, n. 1, p. 59-66, jan./jun., 2009.



Tabela 1 - Primers de RAPD selecionados, com suas respectivas seqüências, número de fragmentos amplificados e polimórficos.

Primer	Seqüência de Nucleotídeos	Nº de fragmentos	
		Amplificados	Polimórficos
A07	5' GTA ACC AGC C 3'	8	8
A12	5' TCG GCG ATA G 3'	8	6
B04	5' GGA CTA GAG T 3'	5	3
M02	5' ACA ACG CCT C 3'	4	2
M04	5' GGC GGT TGT C 3'	14	8
M05	5' GGG AAC GTG T 3'	11	5
M07	5' CCG TGA CTC A 3'	8	5
M09	5' GTC TTG CGG A 3'	3	1
M15	5' GAC CTA CCA C 3'	8	6
M16	5' GTA ACC AGC C3'	9	2
M19	5' CCT TCA GGC A 3'	6	3
N06	5' GAG ACG CAC A 3'	5	2
N10	5' ACA ACT GGG G 3'	5	2
N12	5' CAC AGA CAC C 3'	8	4
N14	5' TCG TGC GGG T 3'	5	2
Total		107	59

Tabela 2 - Matriz de Similaridade Genética (Jaccard) obtida a partir de 107 marcadores RAPD para 08 indivíduos de canafistula provenientes do BAG de forrageiras da Embrapa Meio-Norte.

	CAN.1	CAN. 2	CAN. 4	CAN. 5	CAN. 6	CAN. 7	CAN. 8	CAN. 9
CAN. 1								
CAN. 2	0,71							
CAN. 4	0,78	0,77						
CAN. 5	0,71	0,76	0,83					
CAN. 6	0,65	0,68	0,74	0,66				
CAN. 7	0,71	0,72	0,77	0,74	0,73			
CAN. 8	0,72	0,73	0,73	0,67	0,61	0,74		
CAN. 9	0,71	0,7	0,76	0,79	0,67	0,77	0,74	

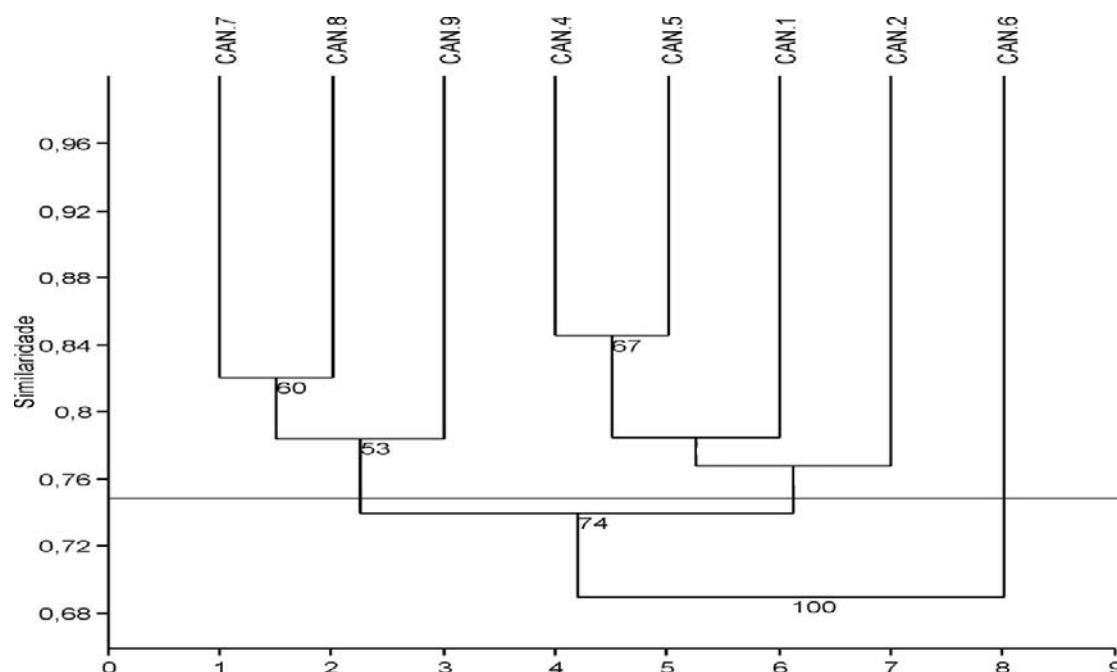


Figura 1- Dendrograma gerado pelas similaridades genéticas entre os 08 acessos de canafistula, utilizando o índice de similaridade de Jaccard, e o método de agrupamento UPGMA.

