

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Gado de Corte  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

# **Documentos 199**

## **I Workshop sobre Tolerância a Estresses Abióticos**

**18 a 19 de junho de 2013 - Campo Grande – MS**

### **Comitê Técnico-Científico:**

Cacilda Borges do Valle

Geovani Ferreira Alves

Letícia Jungmann Cançado

Liana Jank

Lucimara Chiari

Lucinete Colombo

Sanzio Carvalho Lima Barrios

Ulisses José de Figueiredo

Embrapa Gado de Corte

Brasília, DF

2013

# Caracterização Molecular de Forrageiras do Gênero *Poincianella*

---

*Raul Ferreira de Miranda Mendes*<sup>1</sup>

*Raimundo Bezerra de Araujo Neto*<sup>2</sup>

*Maria do Socorro Bona Cortez do Nascimento*<sup>3</sup>

*Paulo Sarmanho da Costa Lima*<sup>4</sup>

## Abstract

*Among the native species of the caatinga, the Poincianella pyramidalis and Poincianella bracteosa presents great potential forage. Thus, at the beginning of the rainy season cattle looking young leaves extremely acceptable, preferred by cattle, goats and sheep. Markers Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used in order to perform molecular characterization of 10 accessions of the species already mentioned. Obtained 70% of polymorphism. The average similarity was 0.59 range. The similarity matrix showed that there was variability between samples. Based on data from genetic dissimilarity between accesses the dendrogram shows the separation into two groups corresponding to the species and three subgroups as P. pyramidalis. These results indicate that, although small, this is valuable germplasm and genetic variability detected here could be exploited in breeding program of the Poincianella. The purpose of this study was to evaluate the genetic diversity of accessions Catingueira (Poincianella spp.) by RAPD markers.*

---

<sup>1</sup> Mestrando da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI. Email: raul-mendes@hotmail.com

<sup>2</sup> Pesquisador Embrapa Meio-Norte, raimundo.bezerra@embrapa.br

<sup>3</sup> Pesquisadora Embrapa Meio-Norte msbn13@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Pesquisador Embrapa Meio-Norte, paulo.costa-lima@embrapa.br

## Introdução

A vegetação de caatinga é constituída, especialmente, de espécies lenhosas e herbáceas de pequeno porte. Essas espécies são fundamentais no contexto de produção e disponibilidade de forragem no semiárido nordestino. Região com baixa precipitação pluviométrica e temperaturas elevadas, condições que diminuem a disponibilidade de forragem para o rebanho de bovinos. Entre as espécies nativas da caatinga, a Catingueira-verdadeira (*Poincianella pyramidalis* Tul.) e a Catinga-deporco (*Poincianella bracteosa* Tul.) apresentam grande potencial forrageiro, pois a primeira espécie é uma das plantas sertanejas cujas gemas brotam nas primeiras manifestações de umidade. Dessa forma, suas folhas jovens são usadas na alimentação de bovinos, caprinos e ovinos (Maia, 2004). Já a segunda espécie tem suas folhas, flores e principalmente as vagens (Costa et al, 2002) consumidas no chão, por cabras, ovelhas e bovinos.

O Brasil ocupa, desde 2004, o primeiro lugar em exportação de carne bovina no mundo (FAOSTAT, 2007). Segundo o IBGE (2006) foram 170 milhões de bovinos criados em 172 milhões de hectares de pastagens. Já em 1995 eram 153 milhões de cabeças em 178 milhões de hectares. Portanto houve um aumento da eficiência do sistema, haja vista, que houve um decréscimo na área de pastagem utilizada. Isso é fruto tanto do melhoramento animal como das pastagens.

A coleta de recursos genéticos forrageiros a partir da década de 1980, tanto no Brasil como na África, possibilitou explorar a variabilidade natural das coleções, bem como a gerar nova variabilidade por meio de cruzamentos (Savidan et al., 1985). No melhoramento genético é imprescindível a obtenção de variabilidade genética entre indivíduos de uma espécie ou entre grupos de cruzamentos interespecíficos do mesmo gênero. 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 têm sido amplamente utilizados e com sucesso para a análise genética de

espécies vegetais e para caracterizar a variabilidade entre elas (Esfahani et al. 2009, Gomes et al. 2011).

Entre os marcadores moleculares baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction), as marcas RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) apresentam muitas vantagens metodológicas que justificam sua utilização, tornando-a uma poderosa ferramenta para estudos genéticos em diferentes organismos, pois possibilita a obtenção de um grande número de marcadores genéticos sem qualquer informação prévia sobre sequências de nucleotídeos do genoma da espécie, baixo custo, rapidez, simplicidade e velocidade na aquisição dos dados (Ferreira e Grattapaglia, 1998 e Reiter et al. 1992).

Muitos trabalhos realizaram a análise genética de forrageiras com a utilização de marcadores RAPD (Yanaka et al. 2005, Ambiel et al. 2008, Chiari et al. 2010). No entanto estudos sobre a diversidade genética de espécies do gênero *Poincianella* são escassos, o conhecimento e a organização da variabilidade genética é uma etapa importante para a conservação genética e para um programa de melhoramento futuro. O propósito deste estudo foi avaliar a diversidade genética de acessos de Catingueira (*Poincianella* spp .) por meio de marcadores RAPD.

## Material e Métodos

Foram coletadas folhas jovens de 8 acessos de plantas de *Poincianella pyramidalis* (acessos PP2, PP3, PP4, PP5, PP6, PP8, PP9 e PP10) e 2 acessos (acessos FG1 e FG2) de *Poincianella bracteosa* oriundos do Banco de Germoplasma de Forrageiras da Embrapa Meio-Norte localizado em Teresina-PI. As folhas foram colocadas em uma caixa de isopor com gelo até serem armazenadas no freezer a -20°C, 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, segundo recomendações do fabricante. 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  $\lambda$  na concentração de 100 ng.

Para a análise de marcadores RAPD foram testados 100 primers dos quais 11 foram selecionados. As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 20  $\mu$ l contendo 15 ng de DNA, 0,25 mM de dNTP, 1U de TaqPolimerase (Invitrogen), 0,2  $\mu$ M de primer, 3,0 mM de  $MgCl_2$ , 2,0  $\mu$ l I de tampão 1X e H<sub>2</sub>O 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.

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 versão 1.34 (Hammer et al., 2001) pelo método de Ligação Média entre Grupos (UPGMA). A similaridade entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Dice. Esta análise viabilizou a construção de um dendrograma que mostrou graficamente a similaridade entre as amostras.

O ponto de corte no dendrograma foi definido com base na estimativa da similaridade genética média (sgm), que foi obtida a partir da proximidade genética entre cada par de indivíduos dividido pelo número de pares obtidos. O índice de confiabilidade de bootstrap foi calculado a partir de 1.000 permutações.

## Resultados e Discussão

Foram selecionados 11 primers: A08, A09, F02 M01, M04, M15, M19, M20, N06, N08 e P06, retirados de um set de 100 primers. Um

total de 167 loci foi gerado, perfazendo uma média de aproximadamente 15 loci por primer, que variaram de 10 a 22 loci por primer.

O número total de loci amplificados e polimórficos foram, respectivamente, 146 e 126, portanto 86,30% de polimorfismo em *P. pyramidalis*. Já em *P. bracteosa* obteve-se 53,26% de polimorfismo.

A média de similaridade foi de 0,59 e a amplitude de variação do coeficiente de similaridade variou de 0,44 a 0,75. Em *P. pyramidalis*, a variação foi de 0,50 a 0,75 sendo os acessos PP4 e PP8 os mais similares (0,75) e PP2 e PP6 os mais divergentes (0,50) (Tabela 1). A similaridade entre os dois acessos (FG1 e FG2) de *P. bracteosa* foi de 0,64. A maior diferença genética (0,442) foi observada entre dois acessos de espécies diferentes, PP2 e FG2 (Tabela 1).

O número de fragmentos amplificados foi muito superior ao encontrado por Chiari et al. (2006) quando analisaram a diversidade genética de *Stylosanthes guianensis*, uma importante leguminosa forrageira, com marcadores RAPD e que obtiveram uma média de 5,25 bandas por primer. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 396 a 4000 pb. Uma variação bem mais elevada a que Santos et al. (2012) encontrou em seu trabalho com 13 acessos de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P., que variou entre 250 e 1.000 pb.

A alta variabilidade que se obteve em *P. pyramidalis* foi semelhante ao 94,6% encontrado por Santos et al. (2012) na mesma espécie. Diferente da *P. bracteosa*, que foi baixa se comparado com a *P. pyramidalis*. Isso pode ser devido ao baixo número de acessos utilizado nesse estudo. Mesmo assim foi superior ao polimorfismo encontrado por Chiari et al. (2010) analisando também duas espécies de forrageiras, obtendo 39,13% em *S. capitata* e 34,28% em *S. macrocephala*.

Esse alto polimorfismo nos acessos de *Poincianella* pode ser devido à autoincompatibilidade, pois em *P. pyramidalis* segundo Leite e Machado (2009) só há formação de frutos apenas quando ocorre polinização cruzada manual e polinização natural.

Na matriz de similaridade (Tabela 1), observa-se que os coeficientes entre os acessos da mesma espécie foram baixos e variaram muito. Chiari et al. (2010) utilizando 26 primers obteve coeficientes de similaridade alto e assim com pouco variação em duas espécies de forrageiras. Este autor encontrou em *Stylosanthes capitata* a variação de 0,741 a 0,913 e em *Stylosanthes macrocephala* os coeficientes variaram de 0,724 a 0,924. Esses resultados indicam uma variabilidade intraespecífica muito abaixo em comparação aos resultados do presente trabalho, mostrando a riqueza em variabilidade genética desses acessos do gênero *Poincianella*.

A árvore de classificação mostra claramente a separação dos acessos em dois grupos representando as duas espécies analisadas nesse trabalho, a *P. pyramidalis* (acessos PP2, PP3, PP4, PP5, PP6, PP8, PP9 e PP10) e a *P. bracteosa* Tul. (acessos FG1 e FG2) além de formar três subgrupos entre os acessos de *P. pyramidalis* (Fig. 1).

Estes resultados indicam que, apesar de pequeno, este germoplasma possui elevada variabilidade inter e intraespecífica. Isso poderá ser explorado em um programa de melhoramento genético do gênero.

Por fim, este estudo mostrou que 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 acessos analisados.

## Agradecimentos

PAC/Embrapa pelo suporte financeiro.

## Referências

AMBIEL, A. C.; GUALBERTO, L. M.; VANDERLEY, T. M.; MACHADO NETO, N. B. Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 30, n. 4, p. 457-464, 2008.

CHIARI, L.; VALLE, J. V. R. do; RESENDE, R. M. S.; CANÇADO, L. J.; SALGADO, L. R.; LEGUIZÁMON, G. O. de C. *Análise da diversidade genética em *Stylosanthes guianensis**

**utilizando marcadores RAPD.** Campo Grande, Mato Grosso do Sul: Embrapa Gado de Corte, 2006. 25p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 20).

CHIARI, L. ; JERBA, V. de F. ; FERNANDES, C. D. ; RESENDE, R. M. S. **Variabilidade genética molecular entre acessos de *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*, resistentes e suscetíveis à antracnose.** Campo Grande, Mato Grosso do Sul: Embrapa Gado de Corte, 2010. 28p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 21).

COSTA, J.A.S.; NUNES, T.S.; FERREIRA, A.P.L.; STRADMANN, M.T.S.; QUEIROZ, L.P. DE. **Leguminosas forrageiras da caatinga: espécies importantes para as comunidades rurais do sertão da Bahia.** Feira de Santana, Universidade Estadual de Feira de Santana, SASOP. 2002.

ESFAHANI S. T.; SHIRAN B.; BALALI G. AFLP markers for the assessment of genetic diversity in European and North American potato varieties cultivated in Iran. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 9, 2009. 75-86.

FAOSTAT: **FAO statistical database**, 2007. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569>>. Acessado em: 10 de maio de 2013.

FERREIRA M. E.; GRATTAPAGLIA D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Embrapa/Cenargen, Brasília, 1998. 220p.

GOMES L. R. P.; LOPES M. T. G.; BENTO J. L. S.; BARROS W. S.; COSTA NETO P. Q.; CONTIM L. A. S. Genetic diversity in natural populations of Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, p. 216-223, 2011.

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

IBGE: **Censo agropecuário**, 2006. Disponível em <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_imprensa.php?id\\_noticia=1064](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_imprensa.php?id_noticia=1064)> Acessado em: 10 de maio de 2013.

LEITE A. V.; MACHADO I. C. Biologia reprodutiva da “catingueira” (*Caesalpinia pyramidalis* Tul., Leguminosae-Caesalpinioideae), uma espécie endêmica da Caatinga. **Revista Brasil**, v. 32, p. 79-88, 2009.

MAIA G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades.** São Paulo: D&Z, 2004. 413p.



REITER R. S., WILLIAMS J. G. K., FELDMANN K. A., RAFALSKI J. A., TINGEY S. V., SCOLNIK P. A. Global and local genome mapping in *A. thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 1477-81, 1992.

SANTOS J. S., MENDES S. S., CONDE D. C., DELMONDEZ R. C., MANN R. S., THOMAZZI S. M. Genetic diversity assessment of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz accessions using RAPD markers. **Scientia plena**, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2012.

SAVIDAN Y. H., JANK L.; PENTEADO M. (1985) **Introdução, avaliação e melhoramento de plantas forrageiras tropicais no Brasil: novas propostas de Modus operandi**. Campo Grande, Mato Grosso do Sul: Embrapa Gado de Corte, 1985. 36p. (Documentos, 24).

YANAKA F. Y.; DALL'AGNOL, M.; SHIFINO-WITTMANN, M. T.; DIAS, P. M. B.; GOMES, K. E. Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (Poaceae) com Base em Isoenzimas e Marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1897-1904, 2005.

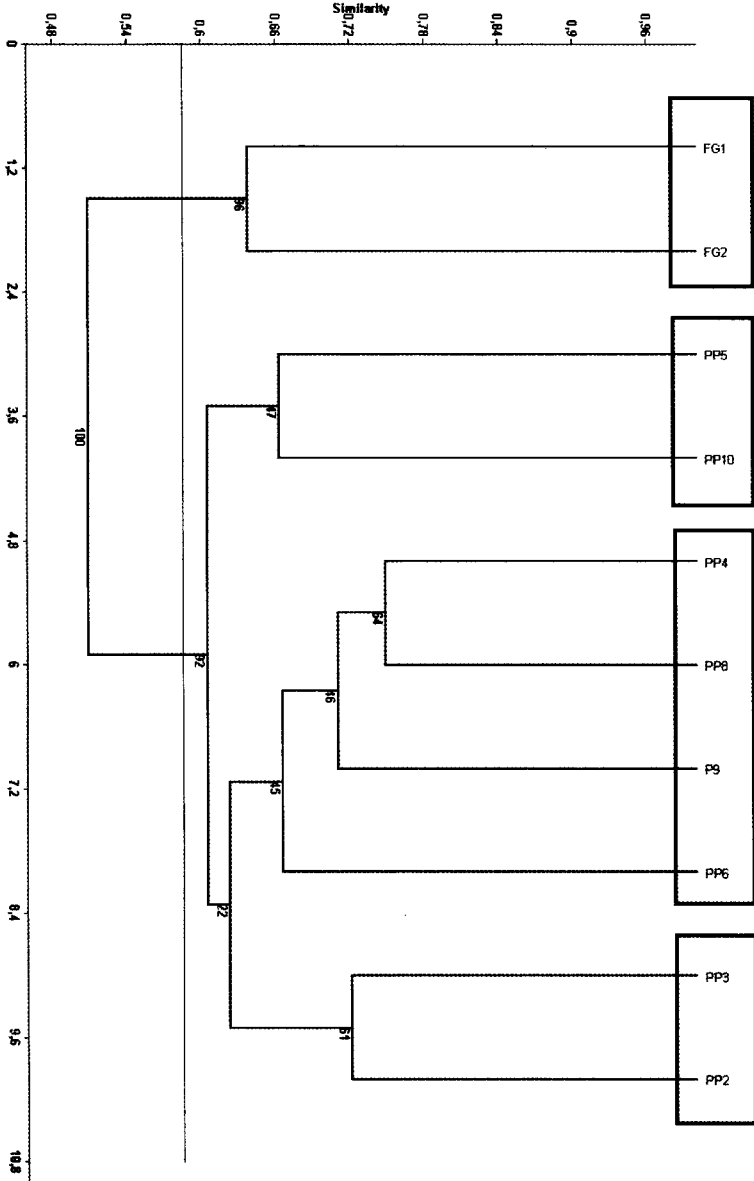


Figura 1. Agrupamento de 10 genótipos de Catingueira. *Poincianella pyramidalis* (acessos PP2, PP3, PP4, PP5, PP6, PP8, PP9 e PP10) e 2 acessos de *Poincianella bracteosa* (acessos FG1 e FG2).

**Tabela 1 - Similaridades genéticas entre os acessos de Camaratuba pelo coeficiente de Jaccard.**

|      | PP2     | PP3     | PP4     | PP5     | PP6     | PP8     | PP9     | PP10    | FG1     |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| PP3  | 0,72000 |         |         |         |         |         |         |         |         |
| PP4  | 0,61905 | 0,63415 |         |         |         |         |         |         |         |
| PP5  | 0,59420 | 0,68148 | 0,58824 |         |         |         |         |         |         |
| PP6  | 0,50370 | 0,63636 | 0,64662 | 0,59310 |         |         |         |         |         |
| PP8  | 0,61654 | 0,66154 | 0,74809 | 0,55944 | 0,67143 |         |         |         |         |
| PP9  | 0,60870 | 0,69630 | 0,69118 | 0,67568 | 0,67586 | 0,72727 |         |         |         |
| PP10 | 0,57576 | 0,63566 | 0,58462 | 0,66197 | 0,51799 | 0,59854 | 0,64789 |         |         |
| FG1  | 0,55285 | 0,56667 | 0,51240 | 0,49624 | 0,55385 | 0,50000 | 0,54135 | 0,47244 |         |
| FG2  | 0,44286 | 0,54015 | 0,47826 | 0,49333 | 0,54422 | 0,49655 | 0,49333 | 0,44444 | 0,63704 |