

VARIABILIDADE GENÉTICA DE MATRIZES DE PEQUIZEIRO SELECIONADAS PARA ESTUDOS NA EMBRAPA CERRADOS E NA UPIS - FACULDADES INTEGRADAS, COM BASE NOS MARCADORES RAPD

Graciele Bellon^{1,2}, Fábio Gelape Faleiro¹, Janine Tavares Camargo², Solange R. Monteiro de Andrade¹, Ailton Vitor Pereira¹, Elaine Botelho C. Pereira^{1,3}

¹Embrapa Cerrados, Caixa Postal 08223, CEP 73310-970, Planaltina-DF; ²UPIS-Faculdades Integradas
³Agência Goiana de Desenvolvimento Rural e Fundiário. e-mail: bellon@cpac.embrapa.br, ffaleiro@cpac.embrapa.br

Introdução

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma planta nativa do Cerrado e da Amazônia, apresenta algumas características que estimulam o seu estudo como cultura comercial. Dentre as plantas típicas do cerrado, o pequi, tem ampla utilização pela população local, sendo considerada por muitos o rei do Cerrado, devido ao seu valor alimentício, medicinal, melífero, ornamental, oleaginoso e tanífero (Almeida et al., 1998).

Oliveira (1998) encontrou taxas de cruzamento que caracterizam a espécie como alógama. Estudos realizados com marcadores izoenzimáticos e morfológicos têm mostrado uma grande variabilidade genética dentro de sub-populações (Oliveira, 1998; Trindade et al., 1998), o que é característico de populações alógamas sem restrições ao fluxo gênico.

A crescente ocupação do Cerrado pela expansão agrícola tem levado a destruição de espécies arbóreas com potencial madeireiro e frutícola. Apesar da grande produção de frutos não se observa a regeneração natural do pequi devido ao extrativismo predatório e a dormência das sementes. Assim, na recuperação e áreas degradadas de cerrado e nos trabalhos de melhoramento genético de espécies nativas torna-se necessário conhecer as características fenotípicas e a variabilidade genética do material disponível visando a seleção, propagação e cultivo.

Objetivo

Avaliar a variabilidade genética de matrizes de pequi selecionadas para estudos nas áreas experimentais da Embrapa Cerrados e na UPIS Faculdades Integradas, utilizando marcadores moleculares RAPD.

Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados. Foram analisadas amostras foliares de sete matrizes de pequi: duas plantas da Embrapa Cerrados (Embrapa Reserva e Embrapa Restaurante) e cinco amostras da UPIS- Campus II, Fazenda Lagoa Bonita (UPIS 1 a 5) (Tabela 1).

O DNA genômico de cada matriz foi extraído utilizando o método do CTAB, com modificações (FALEIRO et al., 2003). Amostras de DNA de cada matriz foram amplificadas pela técnica de RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 µM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM 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 13 *primers* decâmeros: OPD-04, OPD-08, OPD-16, OPE-18, OPE-20, OPF-01, OPF-13, OPF-15, OPF-17, OPG-08, OPG-09, OPH-12 e OPH-17. 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. As amplificações foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio. 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 distâncias genéticas entre as matrizes, 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 por métodos hierárquicos utilizando como critério o método do UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com auxílio do Programa Statistica (Statsoft Inc., 1999).



Figura 1. Fotos da matriz de pequi Embrapa Restaurante, flores e frutos do pequi, mudas obtidas via enxertia e viveiro de mudas da Embrapa Cerrados. Fotos de Ailton Vitor Pereira, Elaine B. Carvalho Pereira e Fábio Gelape Faleiro.

RESULTADOS

Os 13 *primers* utilizados nas amplificações geraram um total de 178 marcadores RAPD, dos quais 133 (74,7%) foram polimórficos (Tabela 1). O grande número de marcadores polimórficos evidenciou as diferenças genéticas entre as matrizes de pequi avaliadas. A Figura 2 ilustra os produtos de amplificação gerados pelo *primer*

As distâncias genéticas entre as matrizes de pequi analisados variaram de 0,189 (distância entre as matrizes Embrapa Restaurante e UPIS 1) a 0,400 (distância entre as matrizes UPIS 4 e UPIS 5) (Tabela 1). A distância genética média entre as matrizes foi de 0,275. Todos os genótipos da UPIS eram fenotipicamente diferentes, observando-se uma grande variabilidade no tamanho, forma frutos e coloração dos frutos.

As análises de agrupamento por métodos hierárquicos (Figura 2) mostraram a formação de dois grupos a uma distância relativa de 0,37. Um grupo formado pelas matrizes Embrapa Restaurante, UPIS 1 e UPIS 2 e o outro formado pelas matrizes Embrapa Reserva e UPIS 3. As matrizes UPIS 4 e UPIS 5 foram as mais divergentes, não se agrupando com as demais matrizes.

Tabela 1. Primers utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas.

Primer	Seqüência 5' → 3'	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
OPD-04	TCTGGTGAGG	17	3
OPD-08	GTGTGCCCA	8	4
OPD-16	AGGGCGTAAG	12	3
OPE-18	GGACTGCAGA	6	4
OPE-20	AACGGTGACC	12	3
OPF-01	ACGGATCCTG	12	4
OPF-13	GGCTGCAGAA	4	5
OPF-15	CCAGTACTCC	13	2
OPF-17	AACCCGGGAA	5	5
OPG-08	TCACGTCCAC	17	2
OPG-09	CTGACGTCCAC	9	4
OPH-12	ACGCGCATGT	10	3
OPH-17	CACTCTCTC	8	3
TOTAL		133	45

Tabela 2. Matriz de distâncias genéticas entre sete matrizes de pequi, calculadas com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando-se 178 marcadores RAPD.

Matrizes de Pequi	1	2	3	4	5	6	7	
Embrapa Restaurante	1	0,000						
Embrapa Reserva	2	0,220	0,000					
UPIS 1	3	0,189	0,298	0,000				
UPIS 2	4	0,195	0,230	0,212	0,000			
UPIS 3	5	0,263	0,250	0,290	0,244	0,000		
UPIS 4	6	0,244	0,309	0,272	0,309	0,318	0,000	
UPIS 5	7	0,315	0,273	0,326	0,306	0,304	0,400	0,000

Figura 2. Produtos de amplificação de DNA genômico de sete matrizes de pequi, gerados pelo *primer* OPG-08. Os números correspondem às matrizes da Tabela 2.

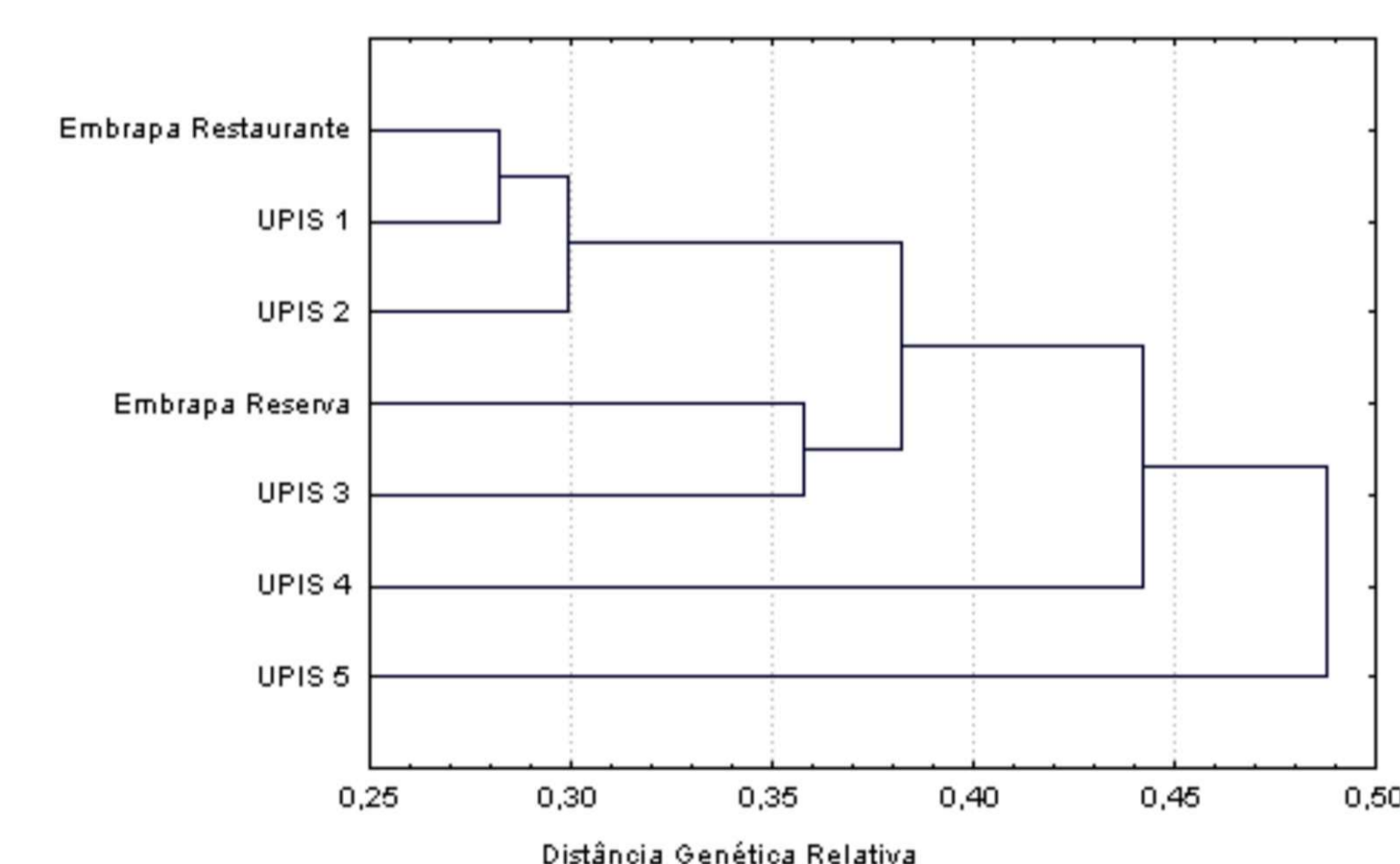
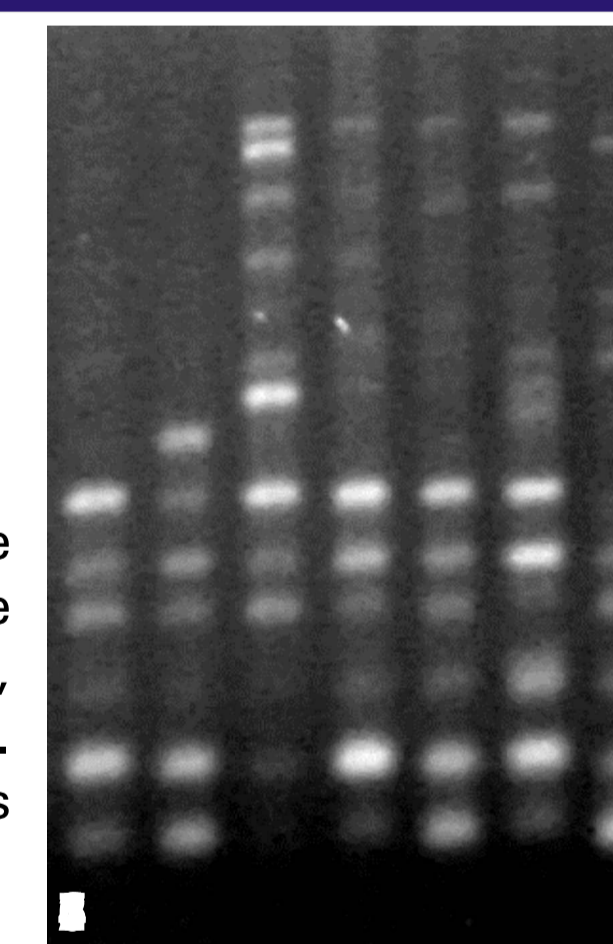


Figura 2. Análise de agrupamento de sete matrizes de pequi com base na matriz de distâncias genéticas calculadas usando 178 marcadores RAPD.

CONCLUSões

Os marcadores moleculares do DNA evidenciaram a variabilidade genética das matrizes de pequi analisadas, a qual responde em parte o comportamento diferenciado das matrizes nas respostas aos protocolos de multiplicação vegetativa por enxertia e *in vitro*. Tal variabilidade deve ser considerada no estabelecimento dos protocolos de multiplicação *in vitro* e em estudos agrônômicos das diferentes matrizes.

Literatura citada

- ALMEIDA, S. P. de. Cerrados: Aproveitamento alimentar. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 188p.
- CRUZ, C. D. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV, 1997. 648p.
- 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.
- OLIVEIRA, K. A. K. B. Variabilidade genética entre e dentro de populações de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) do sudeste do Estado de Goiás. Goiânia, 1998. 106 p. Dissertação (Mestrado), UFG, Goiânia, 1998.
- STATSOFT Inc. Statistica for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa, 1999.
- TRINDADE, M. G.; RUGGIERO, J. A.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V e Borges, J. D. Variabilidade genética entre progênies e sub-populações de pequi quanto ao desenvolvimento de plântulas. Águas de Lindóia, Genetics and Molecular Biology, 21(3, suplemento), 1998. p. 373. (Resumo)