



VARIABILIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE *Hymenaea courbaril* L. POR MEIO DE MARCADORES ISSR

TIAGO¹, Poliana Vicente, CARPEJANI², Adriano Aygnes; TIAGO¹, Auana Vicente; ROCHA³, Vinicius Delgado; ROSSI⁴, Ana Aparecida Bandini

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT. e-mail: polianavt29@gmail.com

²Professor e Mestre, Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT.

³Graduando de Biologia, Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT.

⁴ Professora e Doutora Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT.

Seção temática: Genética e Melhoramento vegetal

Resumo: O presente estudo objetivou avaliar a variabilidade genética em genótipos de jatobá (*H. courbaril*), por meio de marcadores moleculares ISSR. Foram coletado material foliar de 24 genótipos nativos de jatobá no município de Marcelândia, MT. Os indivíduos foram genotipados utilizando cinco *primers* ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Os *primers* amplificaram um total de 54 locos, sendo 41 polimórficos (75,9%), com uma variação de 4 a 10 locos polimórficos, apresentando uma média de 8,2 bandas por *primer*. O dendrograma gerado a partir da matriz de dissimilaridade apresentou sete grupos a um corte de 70%. O método de agrupamento de Tocher evidenciou a formação de oito grupos, sendo a constituição de seis grupos idêntica ao agrupamento do UPGMA. Os marcadores ISSR foram eficientes na amplificação do genoma de *H. courbaril* e identificaram polimorfismo no material avaliado. Os dois métodos de agrupamentos revelaram haver variabilidade genética entre os 24 genótipos de *H. courbaril*.

Palavras-chave: Jatobá; diversidade genética; recursos genéticos.

GENETIC VARIABILITY IN GENOTYPES OF *Hymenaea courbaril* L. BY USING ISSR MOLECULAR MARKERS

Abstract: This study aimed to evaluate the genetic variability in jatobá genotypes (*H. courbaril*), through molecular markers ISSR. They were collected leaf material of 24 native genotypes jatobá in the municipality of Marcelândia, MT. The subjects were genotyped using five ISSR *primers* (*Inter Simple Sequence Repeat*). The *primers* amplified a total of 54 loci with 41 polymorphic (75.9%), ranging from 4 to 10 loci, with an average of 8.2 bands per *primer*. The dendrogram generated from the presented dissimilarity matrix seven groups to a cut of 70%. The Tocher grouping method revealed the formation of eight groups, with the creation of six groups identical to the grouping of UPGMA. The ISSR markers were efficient in amplification of *H. courbaril* genome and identified polymorphism rated material. The two groupings of methods shown no genetic variability among 24 genotypes of *H. courbaril*.

Keywords: Jatoba; genetic diversity; genetic resources.



INTRODUÇÃO

Hymenaea courbaril L. (jatobá) é uma espécie arbórea, pertencente à subfamília Caesalpinoideae e à família Fabaceae. Possui uma distribuição geográfica que abrange toda a América Latina. No Brasil sua distribuição se estende por todas as regiões geográficas (ANDRADE et al., 2010).

É uma espécie que apresenta grande importância ecológica, pois serve de alimento para muitas espécies e na recomposição vegetal. Apresenta grande potencial agrônomo devido à utilização do caule como madeira na construção civil e na indústria de móveis (MELO e MENDES, 2005). Apesar de sua importância e do potencial de mercado, nacional e internacional, a espécie está ameaçada de extinção, como consequência do avanço da fronteira agrícola na Amazônia que vem reduzindo progressivamente as populações naturais desta espécie.

As respostas das espécies vegetais ao processo de fragmentação são altamente variáveis, dependendo de suas características e das alterações ambientais ocorridas (LEWIS et al., 2005). Assim conhecer e avaliar a existência de locais onde tenha uma maior variabilidade genética e genótipos que possam servir de matrizes em programas de manutenção da espécie é muito importante.

A biologia molecular tem fornecido ferramentas valiosas para análises da variabilidade e estrutura populacional em espécies vegetais, sendo os marcadores moleculares uma dessas ferramentas que detectam as diferenças a nível de DNA, presentes em dois ou mais indivíduos e auxiliam na caracterização molecular do material analisado (PESTSOVA et al., 2000).

Entre os métodos que usam marcadores moleculares está o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) que tem sido amplamente utilizado por ser uma técnica rápida, eficiente, possuir alta reprodutibilidade e gerar altos índices de polimorfismo, fornecendo grande número de dados com custo baixo para o pesquisador, podendo ser transferido para qualquer espécie de planta (BARTH et al., 2002).

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética em genótipos de jatobá (*H. courbaril*), por meio de marcadores moleculares ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram caracterizados 24 genótipos de jatobá provenientes do município de Marcelândia, MT. Após a coleta do material foliar de cada genótipo, este foi transportado e armazenado no laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular de Plantas do *Campus* Universitário de Alta Floresta /UNEMAT.

O DNA foi extraído de aproximadamente 100mg de tecido foliar com base no protocolo de CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990). O DNA extraído foi submetido a eletroforese em gel de agarose (1%) corados com brometo de etídio, e suas concentrações estimadas pela intensidade de fluorescência emitida. Posteriormente as amostras foram diluídas até atingirem uma concentração de 10 ng/μL, a qual foi utilizada nas reações de PCR (reação em cadeia de polimerase).

Foram testados 15 *primers* de ISSR para amplificação inicial via PCR em dois indivíduos da espécie. Com base no padrão de amplificação foram selecionados 5 *primers* para análise da diversidade em toda a amostra.



As reações de amplificações dos ISSRs foram conduzidas em termociclador Biocycler sob as seguintes condições: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 45-55°C (dependendo do *primer* utilizado) por 45 segundos e 72°C por 1,5 minutos e 1 ciclo de extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) em tampão de corrida TBE 1X. A coloração do gel foi feita com brometo de etídeo (0,2mg/mL). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação em transiluminador UVB LTB-21x26 (Loccus Biotecnologia) com auxílio de máquina fotográfica digital.

Foi calculada a diversidade genética do loco ou PIC (Índice de Conteúdo Polimórfico) onde a informatividade do loco p_i é a frequência do alelo p no loco p_i , calculado pela equação: $PIC = 1 - \sum_i p_i^2$, e a informatividade do *primer* p_{ij} é a frequência do alelo p do loco i , no *primer* j , sendo calculada pela equação: $PIC_{primer} = 1 - \sum_i \sum_j p_{ij}^2$ (REZENDE et al. 2009).

A partir da matriz de caracteres binários, presença (1) e ausência (0) de bandas foram estimadas as dissimilaridades genéticas (d_{ij}) de acordo com o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard (1901) e realizado o agrupamento pela ligação média entre grupos (UPGMA), essas análises foram realizadas com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cinco *primers* utilizados na genotipagem amplificaram um total de 54 locos, sendo 41 polimórficos (75,9%), com uma variação de 4 a 10 locos polimórficos, apresentando uma média de 8,2 bandas por *primer* (Tabela 1). O *primer* (GAG)₄ gerou o menor número de bandas polimórficas (4).

Tabela 1. *Primer*, número total de bandas amplificadas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) porcentagem de polimorfismo (%P) e valor do PIC dos *primers* utilizados nesse estudo com a espécie *H.courbaril*.

<i>Primer</i>	NTB	NBP	%P	PIC
DI(CA) ₈ 5'CY	11	8	72,7	0,441
Di(AG) ₈ 5' (YC)	12	9	75,0	0,671
Di(AC) ₈ 5' (G)	12	10	83,3	0,473
Di(AC) ₈ 5' (YT)	12	10	83,3	0,649
Tri(GAG) ₄	7	4	57,1	0,538
Total	54	41	75,9	

O valor do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), calculado para estimar a informatividade de cada iniciador, variou entre 0,441 (Primer DICA5'CY) e 0,671 [Primer DiAG(YC)] (Tabela 1), demonstrando a qualidade dos marcadores selecionados para este estudo, pois segundo Botstein et al. (1980), marcadores que apresentam PIC acima de 0,50 são considerados muito informativos, valores entre 0,25 e 0,50 são mediamente informativos e valores inferiores a 0,25 pouco informativos.

O dendrograma gerado a partir da matriz de dissimilaridade apresentou sete grupos a um corte de 70% (Figura 1). O primeiro grupo foi formado por 15 genótipos, podendo ser dividido em dois subgrupos IA com seis genótipos e IB com nove. Já os grupos II, III e IV englobaram apenas um único genótipo cada, os quais foram 1, 2 e 3 respectivamente, este resultado demonstra que estes genótipos são geneticamente diferentes de todos os demais. Os grupos V, VI e VII agruparam dois genótipos cada. Os genótipos 15 e 16 foram os que apresentaram a menor dissimilaridade, em relação aos demais (Figura 1).

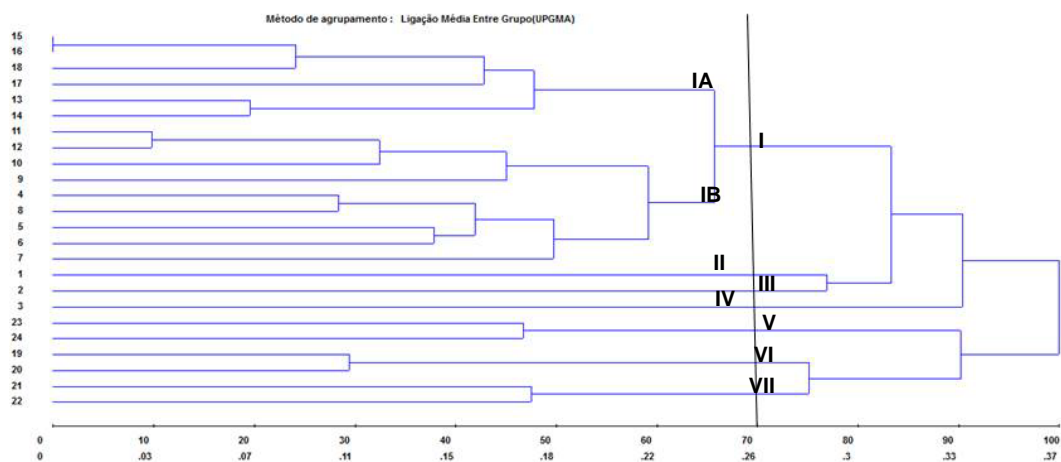


Figura 1. Dendrograma obtido através de marcadores ISSRs com o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA, dos 24 genótipos de *H. courbaril*.

Tabela 2. Agrupamento dos 24 genótipos de jatobá pelo método Tocher, a partir da análise molecular por meio dos marcadores ISSR.

Grupos	Genótipos													
I	15	16	18	13	17	14	11	12	8	4	10	5	6	7
VI	19	20												
V	23	24												
VII	21	22												
III	2													
IV	3													
II	1													
VIII	9													

CONCLUSÕES

Os marcadores ISSR são eficientes para amplificação de *H. courbaril* e revelaram polimorfismo no material avaliado. Os dois métodos de agrupamentos utilizados neste estudo revelaram haver variabilidade genética entre os 24 genótipos de *H. courbaril*.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L.A.; BRUNO, R.L.A.; OLIVEIRA, L.S.B.; SILVA, H.T.F. Aspectos biométricos de frutos e sementes, grau de umidade e superação de dormência de jatobá. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 293-299, 2010.
- BARTH, S.; MELCHINGER, A.E.; LUBBERSTEDT, T.L. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and *inter-simple sequence repeat* (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 3, p. 495–505, 2002.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.H.; DAVIES, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, local, v. 32, n. 3, p. 314–31, 1980.
- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003. 585 p.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES**: Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2008.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura Bull. **Society Vaudoise Scientific Nature**, v. 37, p. 547-579, 1901.
- LEWIS, G.; SCHRINE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 577 p.
- MELO, M.G.G.; MENDES, A.M.S. **Jatobá** (*Hymenaea courbaril* L.). Rede de sementes da Amazônia, 2005.
- PESTSOVA, E.; GANAL, M.W.; RÖDER, M.S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. **Genome**, v. 43, n. 4, p. 689-697, 2000.
- REZENDE, R.K.S.; PAIVA, L.V.; PAIVA, R.; JUNIOR, A.C.; TORGA, P.P.; MASETTO, T.E. Divergência genética entre cultivares de gérbera utilizando marcadores RAPD. Santa Maria, **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2435-2440, 2009.