

VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE CAJAZEIRA IDENTIFICADA POR MARCADORES ISSR

Frederico Inácio Costa de Oliveira¹, José Jaime Vasconcelos Cavalcanti², Francisco Xavier de Souza³, Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini⁴ e Eveline Nogueira Lima⁵

Resumo

Recentemente, tem aumentado o interesse na exploração agroindustrial dos frutos da cajazeira. No entanto, a falta de cultivares recomendadas para cultivo e de conhecimentos sobre a variabilidade genética existente ainda são incipientes. Objetivou-se neste trabalho avaliar a variabilidade genética de 13 genótipos de cajazeira utilizando marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Amostras de folhas foram coletadas de plantas cultivadas em Limoeiro do Norte e Pacajus no estado do Ceará e analisadas no laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza-CE. Os DNAs foram extraídos pelo protocolo modificado de Cavalcanti (2004). Utilizaram-se sete iniciadores, que amplificaram 43 bandas polimórficas, as quais possibilitaram a identificação de diferenciações entre os genótipos. Os resultados confirmam que há presença de significativa variabilidade genética entre os genótipos estudados.

Introdução

A cajazeira (*Spondias mombin* L.) é uma espécie frutífera da família Anacardiaceae, originária da América tropical (AYRE SHAWN;FORMAN, 1967). A planta é freqüentemente encontrada nas várzeas, e matas de terra firme e argilosa, da Amazônia e Zona da Mata brasileira (SOUZA, 2000). Os frutos são ricos em carotenóides, açúcares e vitaminas A e C (BARROSO *et al.*, 1999). Com isso, o interesse na exploração agroindustrial do cajá vem aumentando, devido à ascendente demanda pela polpa, suco, sorvete e picolé. No entanto, as informações científicas sobre os genótipos existentes e tecnológicas são insuficientes para elaboração de um sistema de produção.

Em programas de melhoramento, combinações promissoras de parentais a “priori”, geneticamente divergentes, possibilitam a obtenção de populações segregantes com ampla variabilidade, o que aumenta a probabilidade de recuperação de linhagens superiores para as características de interesse. Assim, as análises de divergência genética têm se constituído num importante instrumento, auxiliando os melhoristas na quantificação da variabilidade genética e na identificação das características com maior contribuição para a dissimilaridade estimada (CRUZ;REGAZZI, 1994).

Diversas técnicas moleculares estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA, ou seja, para a determinação do polimorfismo genético, permitindo a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas situações, tanto no estudo da genética como no

1. Aluno de graduação, Curso de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, E-mail: fred.inacio@hotmail.com

2. Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical em Biologia molecular, Fortaleza, CE, E-mail: jaime@cnpat.embrapa.br

3. Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical em Melhoramento de plantas, Fortaleza, CE, E-mail: xavier@cnpat.embrapa.br

4. Professora titular do departamento de fitotecnia na Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, E-mail: candida_bertini@yahoo.com.br

5. Aluna de graduação, Curso de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, E-mail: evelinenlima@gmail.com

melhoramento de plantas (FERREIRA;GRATTAPAGLIA, 1998). As técnicas mais utilizadas são as baseadas na PCR (Polimerase Chain Reaction), tais como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) e Microssatélites. Entretanto, esses marcadores apresentam limitações: baixa reprodutibilidade do RAPD, elevado custo dos AFLPs e conhecimento prévio das seqüências que flanqueiam as regiões microssatélites. A técnica conhecida por ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) tem sido utilizada para superar essas limitações. O grande número de fragmentos gerados por uma PCR usando esses marcadores pode auxiliar no processo de exploração da variabilidade genética de uma espécie.

Objetivou-se nesse trabalho identificar a variabilidade genética de genótipos de cajazeira usando marcadores moleculares ISSR.

Material e métodos

A. Extração de DNA

Amostras de folhas foram coletadas de plantas cultivadas em Limoeiro do Norte e Pacajus, no Estado do Ceará analisadas no laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza-CE. Os DNAs foram extraídos utilizando o protocolo adaptado de Cavalcanti (2004).

B. Reações de PCR para ISSR

As análises de reações de amplificação foram feitas usando sete iniciadores ISSR da marca IDT (Integrated DNA Technologies). As reações de ISSR foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo: 1X PCR Buffer; 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM de MgCl₂; 0,8 µM do iniciador; 10 ng de DNA; 20 µg de BSA e 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador TECHNE TC-512, ajustado para: 94 °C por 1 min (desnaturação inicial); seguido de 40 ciclos programados para: 94 °C por 1 min; temperatura de anelamento (variável para cada iniciador) por um minuto e 72 °C por um minuto, concluindo-se com 72 °C por cinco minutos (extensão final). Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 2,0%, corados com brometo de etídio e visualizados em transluminador UV.

C. Análise dos dados

Os produtos amplificados foram analisados quanto à presença ou ausência de bandas. Para a análise da divergência genética entre os genótipos utilizou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard e para o agrupamento dos genótipos utilizou-se o método do vizinho mais próximo. Todas as análises foram realizadas pelo programa computacional Genes (CRUZ, 2001). O polimorfismo dos marcadores ISSR foi estimado calculando-se a percentagem de fragmentos polimórficos pelo número total de fragmentos amplificados.

Resultados e Discussão

Em um total de 71 bandas geradas a partir dos sete iniciadores utilizados, foi possível identificar 43 fragmentos polimórficos (Tab.1). O número de bandas polimórficas por iniciador variou de quatro (iniciadores I 818 e I 824) a nove (iniciador I 826). Na Figura 1 encontra-se o padrão obtido a partir do iniciador de código I 826. A média de dissimilaridade encontrada entre os genótipos avaliados foi de 92% (Fig.2), demonstrando alta variabilidade genética que poderá ser explorada em trabalhos de melhoramento com esses genótipos de cajazeira. Para espécies cultivadas, como o trigo, o índice de similaridade média equivale a 73% (FREITAS *et al.*, 2000), o que demonstra a relação encontrada entre divergência genética e nível de domesticação em culturas.

O dendrograma gerado a partir da matriz de dissimilaridade apresentou três grupos distintos (Fig.2). No primeiro grupo, o clone 2 teve a distância máxima dos genótipos do terceiro grupo (11 e 12). O segundo grupo foi dividido em quatro subgrupos, sendo dois destes correspondentes aos genótipos 4 (subgrupo 1) e 5 (subgrupo 2) com uma distância genética de aproximadamente 90%. O terceiro subgrupo foi formado por três genótipos (3, 6 e 10) e o quarto subgrupo, que teve maior agrupamento, ou seja, maior número de genótipos (7, 8, 9, 1 e 13). O fato de a cajazeira ser uma

frutífera ainda em domesticação, explica a elevada variabilidade genética existente entre os genótipos. Segundo Fonseca *et al.* (2006) essa alta variabilidade genética possibilita a identificação de genótipos divergentes e, por conseguinte, combinações híbridas de maior efeito heterótico, permitindo em suas gerações segregantes o desenvolvimento de genótipos superiores. Devendo-se, portanto, na seleção de genitores para cruzamentos, procurar sempre aliar o bom desempenho dos genótipos com a divergência genética.

Conclusões

- Há presença de significativa variabilidade genética entre os genótipos de cajazeira.
- Marcadores moleculares ISSR são eficazes na identificação de variabilidade genética na espécie.

Referências

- AIRY SHAW, H.K.; FORMAN, L.L: The genus *Spondias* L. (Anacardiaceae) in tropical Asia. *Kew Bulletin, London*, v.21, n.1, p.1-20, 1967.
- BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. *Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 433p.
- CAVALCANTI, J. J. V. Genetic mapping and QTL identification in cashew (*Anacardium occidentale* L.). Inglaterra, 2004. *Tese (Doutorado)* - University of Reading.
- CRUZ, C. D. *Programa GENES; Aplicativo Computacional em Genética e Estatística*. Viçosa: Editora UFV, 2001, 648p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV, 1994. 390p.
- FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3º ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998, 220p.
- FONSECA, A. F. A.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C. D.; SAKAYAMA, N. S.; FERRÃO, M. A. G.; BRAGANÇA, S. M. Divergência genética em café conilon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.4, p.599-605. 2006.
- FREITAS, L.B.; JERUSALINSKY, L.; BONATTO, S. L.; SALZANO, F. M. Extreme homogeneity among Brazilian Wheat genotypes determined by RAPD markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 11, p. 2255-2260. 2000.
- SOUZA, F.X. de. Efeito do porta-enxerto e do método de enxertia na formação de mudas de cajazeira (*Spondias mombin* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.22, n.2. p.286-290, 2000.

Tabela 1. Variação genética detectada entre os 13 genótipos de cajazeira por meio de sete marcadores ISSR.

Código do Iniciador	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento (°C)	Nº total de Bandas	Nº de Bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)
I 817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	49,3	8	7	87,5
I 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	50,0	16	4	25,0
I 822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	46,0	7	5	71,4
I 823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	47,1	12	9	75,0
I 824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	47,5	8	4	50,0
I 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	50,4	11	8	72,7
I 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	51,8	9	6	66,6
TOTAL			71	43	60,5

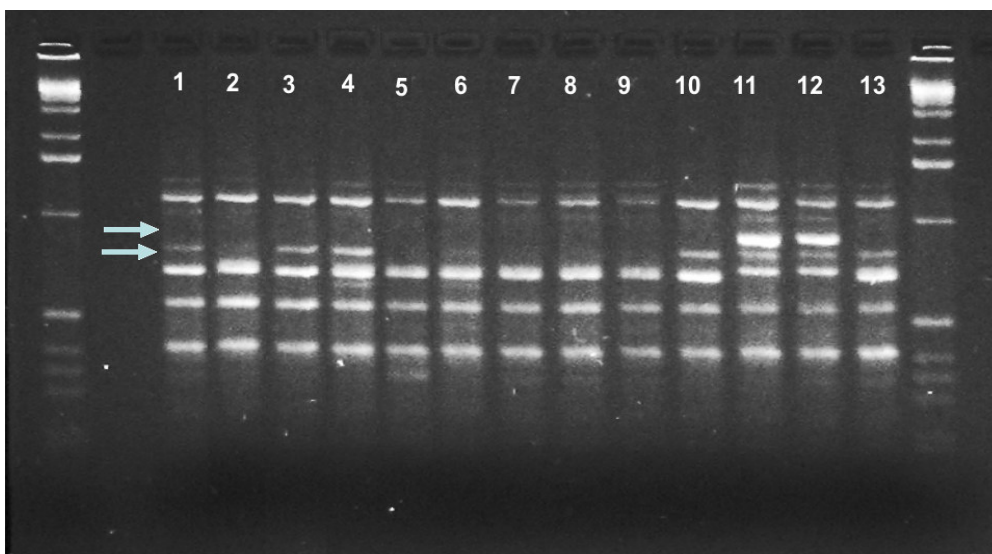


Figura 1. Padrão de amplificação de treze genótipos de cajazeira utilizando o iniciador I 826. Linhas laterais marcador de 1Kb e linhas de 1 a 13 correspondem aos genótipos de cajazeira. Setas indicam bandas polimórficas.

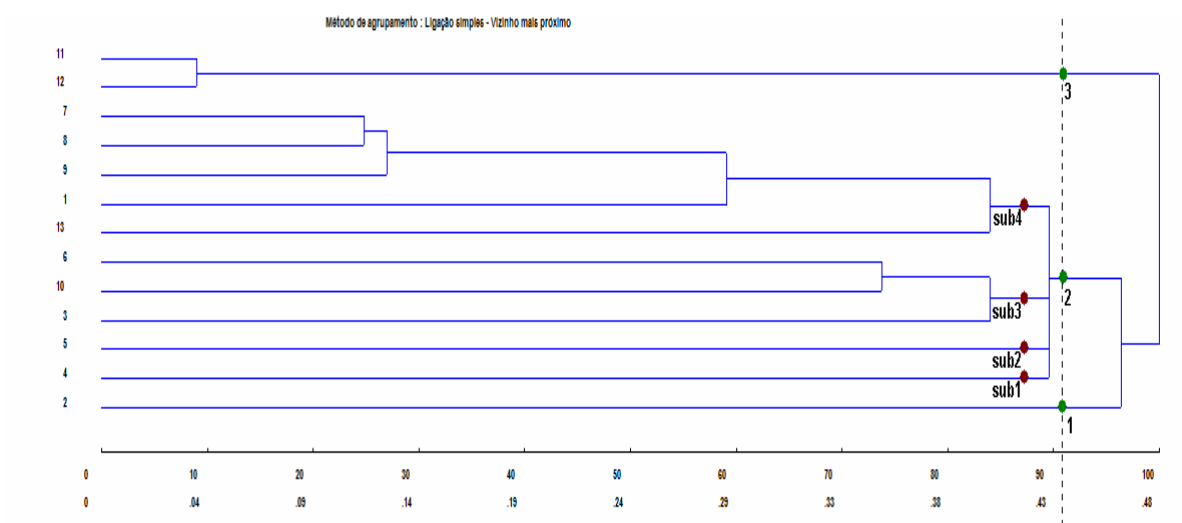


Figura 2. Dendrograma de dissimilaridade genética de 13 genótipos de cajazeira, obtido com base no índice de Jaccard, estimado a partir de 43 marcadores ISSR. Fortaleza, CE, 2009.