

Diversidade Genética de Populações Naturais de *Orbignya phalerata* Mart. (Babaçu) por Marcadores RAPD.

Michelli Ferreira dos Santos¹; Kaesel Jackson Damasceno e Silva²; Mariana Aparecida Carvalhaes²; Paulo Sarmanho da Costa Lima²

Resumo

O babaçu, *Orbignya phalerata* Mart., é uma espécie de grande importância ecológica e econômica da região Meio-Norte do Brasil, onde é encontrada com grande abundância. Devido à sua vasta utilização as populações naturais de babaçu necessitam que sejam traçadas estratégias visando à sua conservação. Para isso, é necessário o conhecimento de como a variabilidade genética encontra-se distribuída nestas populações. Portanto, objetivou-se estudar os efeitos do manejo na estrutura genética de três populações naturais de *O. phalerata* localizadas em três Municípios do Estado do Piauí por meio de marcadores RAPD. Os 20 *primers* RAPD, OP-K15; OP-K19; OP-M01; OP-M05; OP-M09; OP-M12; OP-M14; OP-M16; OP-M18; OP-N02; OP-N03; OP-N04; OP-N06; OP-N09; OP-N10; OP-N11; OP-N12; OP-N15; OP-P03; OP-P04, revelaram um total de 146 bandas, sendo 141 polimórficos (96,58%). Foi observada uma variação de 4 a 12 locos polimórficos e média de 7 bandas por *primer*. O dendrograma permitiu a identificação de três grupos delimitados pela similaridade média ($dg_m = 0,57$), correspondendo às três populações. A confiabilidade dos dados e a consistência dos nós foram constatadas pelos valores maiores que 50% do *bootstrap* e pelo coeficiente de correlação cofenético (88,15%). O coeficiente de similaridade entre os pares de genótipos variou de 0,26 a 0,86 e apresentou média de 0,57. A diversidade genética de Nei (H_e) foi de 0,212 para populações amostradas em Teresina, 0,195 para populações de Esperantina e 0,207 para populações de José de Freitas. Os valores estimados para o Índice de Shannon (H_o) evidenciaram alta diversidade genética dentro e entre as populações variando de 0,302 a 0,336. A maior porcentagem de locos polimórficos foi observada na população de Teresina, área em que existe um manejo não muito intenso, enquanto a menor foi observada na população de Esperantina área totalmente manejada. Em média, foram obtidos 106,33 locos polimórficos. Os marcadores RAPD mostraram-se eficientes no estudo da diversidade genética entre e dentro das populações naturais de babaçu, detectando um elevado nível de polimorfismo.

Introdução

O babaçu, *O. phalerata*, é considerado uma espécie pioneira e dominante, que geralmente possui baixa densidade na vegetação primária (ANDERSON; MAY, 1995) e sua presença associa-se fortemente às áreas antropizadas (RIBEIRO; WALTER, 1998). Silva (2008) afirma que a distribuição do babaçu nas áreas antropizadas apresenta comportamento extremamente variável, sendo que os vários sistemas de manejo alteraram a sua diversidade e concentração. O conhecimento sobre a variabilidade entre populações naturais de *O. phalerata* é importante para trabalhos de melhoramento genético, preservação e manejo adequado.

Os marcadores moleculares têm-se mostrado eficientes no sentido de quantificar a variabilidade genética existente numa população em um período de tempo bastante reduzido. Marcadores RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), descritos por Williams et al. (1990), são dominantes e amplificam sequência do genoma de eucariotos, revelando polimorfismo, ao empregar *primers* curtos de sequências arbitrárias. Estes tipos de marcadores foram os escolhidos por apresentarem algumas vantagens sobre os demais, tais como: são rapidamente obtidos, altamente polimórficos, e de baixo custo (CASTIGLIONE; BICUDO, 2003).

Nesse sentido, objetivou-se estudar a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações naturais de *Orbignya phalerata*, em áreas com as seguintes características: área de floresta nativa sem ação antrópica, localizada no município de José de Freitas, área de floresta nativa submetida a uma intensa coleta de frutos, no município de Esperantina e uma área de baixa coleta de frutos, localizada no município de Teresina, por meio de marcadores RAPD.

¹Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí. Campus da Socopo, Bairro Ininga, CEP: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil. E-mail: michelly_m_santos@yahoo.com.br.

²Pesquisador (a) da Embrapa Meio-Norte. Av. Duque de Caxias – 5650, Buenos Aires, CEP: 64006-220, Teresina, PI – Brasil. E-mail: kaesel@cpamn.embrapa.br; carvalhaes@cpamn.embrapa.br; sarmanho@cpamn.embrapa.br.

Material e Métodos

O estudo foi realizado em três populações naturais de *O. phalerata* localizadas nos municípios de Teresina, área de baixa intensidade de manejo, Esperantina área de intenso manejo e José de Freitas área totalmente preservada, no Estado do Piauí. Em cada município, foram amostradas 20 plantas de *O. phalerata*, das quais foram coletados os tecidos foliares. A extração do material vegetal foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte, e utilizou-se aproximadamente, 100 mg de tecido foliar de cada planta proveniente das três populações. A extração do DNA foi realizada obedecendo-se as recomendações dos kits de purificação Invitex (INVISORB, 2008). A quantificação de DNA foi realizada em gel de agarose a 0,8% com TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X, corado com GelRed-Biotium® 10.000X comparando a resolução do DNA das amostras com o DNA- λ na concentração de 100 ng. As amostras de DNA foram diluídas em tampão TE, na concentração de 15 ng. μ L⁻¹, para ser posteriormente usado nas reações de PCR. O DNA foi armazenado em temperatura de - 20°C. Um total de 100 *primers* RAPD foram avaliados (ou testados), utilizando-se sempre três indivíduos, um de cada população, amostrados para o respectivo estudo. A seleção dos *primers* foi realizada com base na maior obtenção de marcadores polimórficos e de boa qualidade para leitura.

Para análise da diversidade genética de populações naturais de babaçu, dos 100 *primers*, 20 foram selecionados. As reações de amplificação foram realizadas de acordo com o protocolo de Williams et al. (1990) modificado. O volume final utilizado nas reações foi de 20 μ L, contendo os seguintes componentes: tampão 1,0X [20 mM Tris HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (v/v) glicerol] (Invitrogen), 3,0 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,75 mM de dNTP (Invitrogen), 0,2 μ M de *primer*, 1U de *Taq* DNA polimerase (New England), 1 μ L de DNA genômico (~15 ng) e H₂O ultrapura. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®), 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 para extensão e uma extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, tamponados e revelados com GelRed-Biotium®, ao final os géis foram visualizados em transluminador UV e fotodocumentados.

As bandas obtidas a partir dos fragmentos amplificados 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 das três populações amostradas, utilizando-se o coeficiente de similaridade de Dice, 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 UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). O coeficiente de correlação cofenético (*r*) foi calculado, através da matriz de similaridade e do dendrograma obtido. A consistência e estabilidade dos agrupamentos formados foram calculados a partir do índice de confiabilidade de *bootstrap*, gerando um dendrograma a partir de 5.000 permutações. Para a análise intra e interpopulacional de *O. phalerata* foi utilizado o software POPGENE (*Population Genetic Analysis*) versão 1.32 (YEH et al., 2000), utilizando parâmetros para dados diplóides dominantes. Foram obtidas as seguintes estatísticas descritivas: número e percentual de locos polimórficos (*P*%), a diversidade gênica de Nei (1973) (*H_e*) e o índice de Shannon (*H_o*).

Resultados e Discussão

Os 20 *primers* RAPD revelaram um total de 146 bandas, sendo 141 polimórficos (96,58%). Foi observada uma variação de 4 a 12 locos polimórficos e média de 7 bandas por *primer*, sendo evidente o polimorfismo entre os genótipos, como demonstrado pelo padrão de bandas de RAPD obtido com o *primer* OP-K19 (Figura 1). Resultado semelhante em palmeiras foi obtido em açaí, por Oliveira et al (2007), onde 28 *primers* selecionados geraram 263 produtos de amplificação, sendo 100% polimórficos. Os marcadores RAPD possibilitaram a diferenciação genética das três populações de *O. phalerata*.

O dendrograma permite a identificação entre as três populações (*dg_m* = 0,57) (Figura 2). A população de Teresina e Esperantina localizadas em duas áreas manejadas pela coleta de frutos mostrou-se mais similares, enquanto que a população de José de Freitas localizada em uma área preservada, sem nenhum tipo de manejo, mostrou-se distante das demais populações. A confiabilidade dos dados e a consistência dos nós foram constatadas pelos valores do *bootstrap* e pelo coeficiente de correlação cofenético (88,15%).

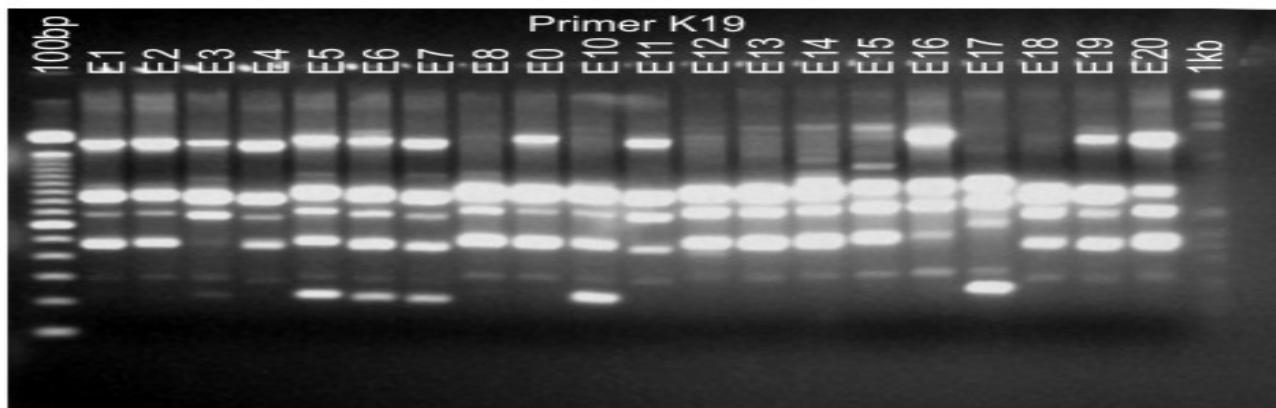


Figura 1 - Perfil eletroforético obtido pela amplificação do DNA de 20 genótipos de *O. phalerata* da população de Esperantina (E) com o *primer* OP-K19, Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI, 2011.

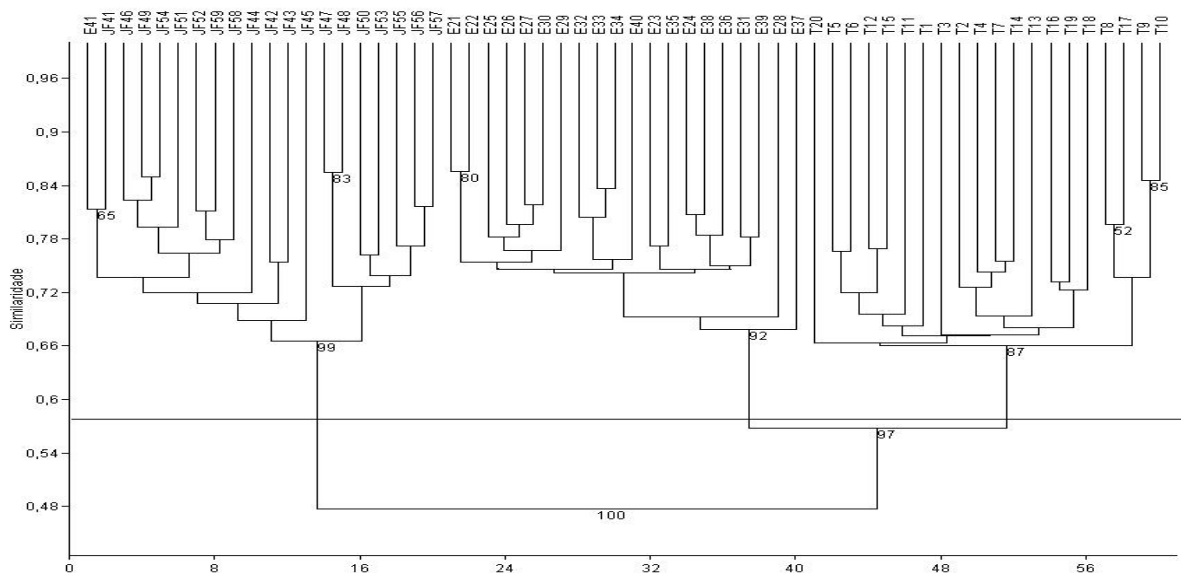


Figura 2 - Dendrograma obtido de 60 genótipos de babaçu, utilizando o índice de similaridade de Dice, e o método de agrupamento UPGMA, Teresina (T), Esperantina (E), José de Freitas (JF).

A matriz de similaridade por meio do coeficiente de Dice entre os 60 genótipos com base nos marcadores RAPD revelou similaridade variando de 0,26 a 0,86 com média de 0,57. As estimativas dos índices de diversidade genética encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Índices de diversidade genética para populações naturais de *Orbignya phalerata* Mart. amostradas nos municípios de Teresina, Esperantina e José de Freitas, Piauí.

Populações	H_e	H_o
Teresina	0,212	0,336
Esperantina	0,195	0,302
José de Freitas	0,207	0,322
Para o conjunto de populações	0,320	0,485

H_e : diversidade genética de Nei; H_o : índice de Shannon;

A diversidade genética de Nei (H_e) foi de 0,212 para população de Teresina, 0,195 para população de Esperantina e 0,207 para população de José de Freitas. A população não manejada de José de Freitas obteve uma diversidade genética maior, quando comparada com a população de Esperantina onde existe um manejo intensivo de coleta de frutos. Sebbenn et al. (2001) obtiveram resultados semelhantes comparando os níveis de diversidade genética entre uma população natural e uma manejada, encontrando média de H_e de 0,314 para populações naturais e 0,266 para a manejada, obtendo os mesmos resultados encontrados neste trabalho, quanto ao manejo adotado.

Os valores estimados para o índice de Shannon (H_o) evidenciaram alta diversidade genética dentro e entre as populações de *O. phalerata*, sendo de 0,336 para a população amostrada em Teresina, 0,302 para a amostrada em Esperantina e 0,322 para populações de José de Freitas, e 0,485 para o conjunto de populações, sendo bem próximos nas três populações, o índice de Shannon varia de 0 a 1 e considera-se que quanto mais próximo o valor for de zero, mais baixa é a diversidade. A população que apresenta menores índices de diversidade é a que está localizada na área submetida a um intensivo sistema de manejo.

A maior porcentagem de locos polimórficos foi observada na população de Teresina, área em que existe um manejo não muito intenso, enquanto a menor foi observada na população de Esperantina (Tabela 3) área totalmente manejada. Em média foram obtidos 106,33 locos polimórficos. A baixa porcentagem de locos polimórficos na população de Esperantina é devido a intensa coleta de frutos nessa região, o que está levando a uma perda da sua variabilidade. Sebbenn et al., (2001) estudando a estrutura genética em populações de *Tabebuia cassinoides*, com implicações para o manejo florestal e a conservação genética encontrou maior porcentagem de locos polimórficos na população natural e menor na manejada, 84,6% e 76,9%, respectivamente evidenciando que o manejo não sustentável pode levar a perda de variabilidade.

Tabela 3 - Número e porcentagem de locos polimórficos. Teresina, PI, 2011.

Municípios	Nº de locos polimórficos	% de locos polimórficos
Teresina	117	80,14
Esperantina	97	66,44
José de Freitas	105	71,92
Média	106,33	72,83

Referências

ANDERSON, A.B.; MAY, P.H.; BALICT, M.J. **The Subsidy Fruem Nature: Palm Forest, Peasantry And Development On Anamazonian Frontier**. NOVA YORK: COLUMBIA UNIVERSIT, 1995.

CASTIGLIONI, L.; BICUDO, H. E. M. C. **A Técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e suas aplicações para estudos em genética molecular**. Revista UNORP, v. 3 (2): 63-77, abril 2003.

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.

INVISORB. **Spin Plant Mini Kit for DNA extractions**, *Invitek*, 2008

OLIVEIRA, M., S., P.; AMORIM, E., P.; SANTOS, J., B.; FERREIRA, D., F. **Diversidade Genética entre acessos de açazeiro baseada em marcadores RAPD**. Ciên. Agrotec. Lavras, v.31, n. 6, p. 1645-1653, 2007.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, R. M. T. **Fitofisionomia do bioma Cerrado**. In : SANO,S. M.; ALMEIDA, S. P de (Eds.). Cerrado: ambiente e flora. Planaltina. EMBRAPA-CPAC, 1998. P. 86-166.

SEBBENN, A.M.; SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; LACERDA, C.M.B. **Estrutura genética em populações de *Tabebuia cassinoides*: implicações para o manejo florestal e a conservação genética**. Revista do Instituto Florestal, São Paulo, v.13, n.2, p.93-113, 2001.

SILVA, C. G. B. **Estado de conservação dos fragmentos florestais na área de proteção ambiental – APA estadual cachoeira do urubu (PI) e avaliação de indicadores para monitoração ambiental**. Teresina, 2008.103 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente (PRODEMA), Universidade Federal do Piauí, 2008.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.K.; LIVAK, J.L.; RAFASLA, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitraty primers are useful as genetic markers. **Nucleid Acids Res.**, v. 18, p. 6531-5, 1990.

YEH F., Yanh R., Boyle T. **Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis, Ppopgene version 1.31**. 2000.