

CIRCULAR TÉCNICA

n. 105 - outubro - 2010

ISSN 0103-4413



Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Av. José Cândido da Silveira, 1.647 - Cidade Nova - 31170-000
Belo Horizonte - MG - site: www.epamig.br - e-mail: faleconosco@epamig.br



Divergência genética entre populações de *Anacardium humile* St. Hill. por marcadores AFLP¹

Luciana Nogueira Londe²
Emerson Brito Ribeiro³
Cristina Soares de Souza⁴
Warwick Estevam Kerr⁵
Ana Maria Bonetti⁶

INTRODUÇÃO

O *Anacardium humile* St. Hill., conhecido como cajuzinho-do-cerrado ou cajuí, é uma espécie de fruto pertencente à família Anacardiaceae que ocorre, naturalmente, em Campo Sujo e no Cerrado do Brasil. Tem grande importância alimentar, industrial, medicinal e econômica. A castanha tem as mesmas características e usos do cajueiro comum, com ampla utilização para o consumo. A casca da castanha, por ser bastante dura e rica em óleo viscoso, cáustico e inflamável, transformou-se em um produto estratégico para a indústria e para a medicina. Da amêndoa, rica em proteína, calorias, lipídios, carboidratos, fósforo e ferro, é extraído um óleo comestível, que pode ser utilizado em substituição ao azeite de oliva (ALMEIDA et al., 1998).

Entre as várias técnicas moleculares disponíveis atualmente, a da amplificação seletiva de fragmentos de restrição – amplified fragment length polymorphism (AFLP), também conhecida por selective restriction fragment amplification (SRFA) descrita por Zabeau e Vos (1993), tem-se mostrado eficiente para análise de diferenças entre indivíduos geneticamen-

te distintos. Essa técnica alia as características de duas outras, polimorfismo gerado por enzimas de restrição - restriction fragment length polymorphism (RFLP) e a amplificação seletiva pelo uso de *primers* com alguns nucleotídeos randômicos na extremidade 3' – random amplified polymorphism DNA (RAPD). A técnica AFLP baseia-se no polimorfismo resultante de mutações de ponto, inversões, deleções e inserções, que levam à perda ou a ganho de sítios de restrição, reconhecidos pelas enzimas utilizadas ou na alteração da sequência reconhecida pelos nucleotídeos arbitrários nas extremidades 3' dos *primers* seletivos, complementares ao adaptadores (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O objetivo desta pesquisa foi analisar a divergência genética entre populações de *Anacardium humile* St. Hill. do Cerrado do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, MG, e de populações do Cerrado do Parque Estadual da Serra de Caldas – Caldas Novas, Goiás. E, também, comparar molecularmente, por AFLP, as populações analisadas, que diferem morfológicamente para verificar se as características resultam de processo de especiação.

¹Circular Técnica produzida pela Unidade Regional EPAMIG Norte de Minas (U.R. EPAMIG NM). Tel.: (38) 3834-1760. Correio eletrônico: ctnm@epamig.br

²Bióloga, D. Sc., Pesq. U.R. EPAMIG NM, CEP 38525-000 Nova Porteirinha-MG. Correio eletrônico: luciana@epamig.br

³Téc. Química, U.R. EPAMIG NM, CEP 38525-000 Nova Porteirinha-MG. Correio eletrônico: britorib@hotmail.com

⁴Bióloga, Dr^a, Universidade Federal de Uberlândia - Instituto de Genética e Bioquímica, CEP 38904-000 Uberlândia-MG.

⁵Eng^o Agr^o, Dr., Universidade Federal de Uberlândia - Instituto de Genética e Bioquímica, CEP 38904-000 Uberlândia-MG. Correio Eletrônico: kerr@ufu.br

⁶Bióloga, Dr^a, Universidade Federal de Uberlândia - Instituto de Genética e Bioquímica, CEP 38904-000 Uberlândia-MG. Correio eletrônico: ambonetti@hotmail.com

MATERIAL E MÉTODOS

Análises de AFLP foram realizadas a partir de plantas de folhas lisa e pilosa de cajuí, provenientes do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, MG, e Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, GO.

Nesse experimento, fez-se a utilização de *bulks* compostos de DNA de 15 indivíduos de folha coriácea e cinco indivíduos de folha pilosa.

Foi utilizado o protocolo de extração de DNA de acordo com Doyle, J. J. e Doyle J.L. (1987).

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro, modelo GBC-UV/VIS911A, por leitura de absorvância (260 nm) e qualificado em gel de agarose 0,8%. Uma vez quantificada e avaliada, a amostra foi diluída em água milliQ para a concentração de trabalho 50 ng/ μ l, a qual foi mantida em freezer a 20 °C.

Para reações de AFLP, utilizou-se o *Kil AFLP™ Analysis System I* (GIBCO BRL), segundo instruções do fabricante.

A visualização das bandas foi feita em gel de poli-acrilamida 8% desnaturante, 19:1. Para análise dos dados foi montada uma matriz binária de acordo com presença (1) e ausência (0) de bandas reproduzíveis e mais intensas.

Foram realizadas duas repetições de cada gel. As bandas que estiveram presentes em ambos géis foram analisadas.

A matriz, gerada pelo programa STATISTICA 4,5A (CRESSIE, 1993), foi usada para o cálculo das distâncias genéticas e análise de agrupamento. As distâncias genéticas foram calculadas pelo método de Porcentagem de Desacordo, que é dado pela fórmula: N'_{AB}/N_T , na qual N'_{AB} é o número total de bandas polimórficas entre os genótipos comparados e N_T é o número total de bandas.

A análise de grupos ou *clusters* foi feita pelo método não ponderado de agrupamento aos pares, utilizando médias aritméticas Unweighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA), o qual agrupa indivíduos de acordo com a similaridade.

Amostras de folhas coriáceas e pilosa de cajuí foram submetidas a análises de micronutrientes e o solo foi submetido a análises de textura e micronutrientes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método Doyle, J. J. e Doyle J.L. (1987) foi eficiente na amplificação do DNA para as análises de AFLP, sendo que foram geradas 118 bandas polimórficas e 242 bandas monomórficas nas 16 combinações de *primers* testadas.

Os lócus polimórficos 37% foram gerados entre as duas populações de cajuí. Essa taxa é relativamente baixa, indicando que não existem diferenças genóticas que possam ser responsáveis na expressão das características fenotípicas contrastantes entre e dentro dessas populações.

O Gráfico 1 mostra o dendrograma gerado dos quatro genótipos, utilizando 16 combinações de *primers*.

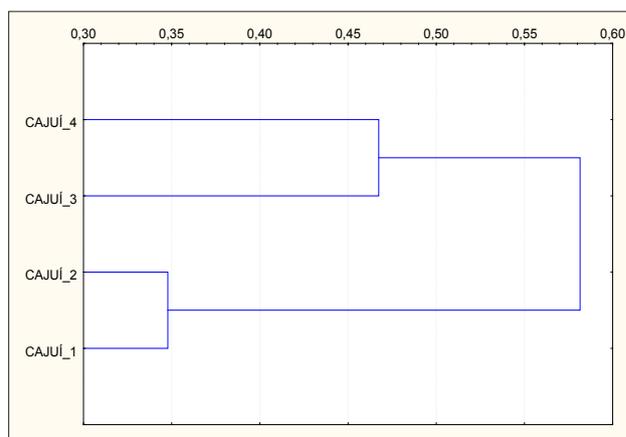


Gráfico 1 - Dendrograma representativo da divergência genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método UPGMA entre quatro genótipos, utilizando 16 combinações de *primers*

NOTA: Cajuí 1 – Uberlândia: folha coriácea (Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia); Cajuí 2 – Uberlândia: folha lisa (Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia); Cajuí 3 - Caldas Novas: folha coriácea (Parque Estadual da Serra de Caldas); Cajuí 4 - Caldas Novas: folha lisa (Parque Estadual da Serra de Caldas).

As populações do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia apresentaram uma divergência genética de 35%. A divergência genética nas populações do Parque Estadual da Serra de Caldas apresentaram divergência de 47%, enquanto que a divergência entre as populações das duas regiões foi de 58%.

Esses dados indicam que há maior divergência genética entre populações de diferentes regiões do que entre populações da mesma região, esses dados são congruentes com o número de bandas monomórficas obtidas no gel de poli-acrilamida, mas que diferem com artigos de literatura em populações de outras espécies.

A alta similaridade genética nas populações de cajuí levou ao questionamento se essas diferenças morfológicas estão ligadas ao processo de plasticidade fenotípica. No entanto, essas populações

encontram-se no mesmo local e após análises de micronutrientes foliar e de textura e micronutrientes de solo permitiram excluir essa possibilidade entre as populações.

Estudos de fluxo gênico devem ser conduzidos para a elucidação dessas características contrastantes entre as populações estudadas.

CONCLUSÃO

- a) a divergência genética encontrada entre as populações de Minas Gerais e as de Goiás foram relativamente baixas, isto é, 35% e 47%, respectivamente;
- b) as populações de Minas Gerais e de Goiás mostraram uma divergência genética de 58%;
- c) com base nos marcadores AFLP e nas análises de características morfológicas, as diferenças entre as populações não podem

ser atribuídas ao processo de plasticidade fenotípica, muito menos ao processo de especiação.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P. de et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
- CRESSIE, N.A.C **Statistics for spatial data**. New York: John Wiley, 1993. Revised edition.
- DOYLE, J.J; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1987.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220p.
- ZABEAU, M.; VOS, P. EP534858A1: selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application**, 1993. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/EP0534858.pdf>>. Acesso em: ago. 2010.