



Determinação da variabilidade genética de plantas da espécie *Maclura tinctoria* (L.) Gaud em uma população situada na Região Norte de Minas Gerais.

Ana Flávia Pinho Souza, Jéssica Ameline Santos Ramos, Guilherme Araújo Lacerda, Manoel Brito Júnior, Edmilson Martins de Freitas, Marcio Antonio Silva Pimenta

Introdução

Maclura tinctoria (L.) Gaud, vulgarmente conhecida por Amoreira, Amora-do-mato ou Taíuva, com distribuição significativa pelo cerrado norte-mineiro, é um vegetal caducifólio, que atinge cerca de 10 metros de altura pertencente à família Moraceae. A localização geográfica dessa espécie vegetal se faz em matas secas, sendo os exemplares mais novos recobertos por espinhos nos ramos e galhos ao passo que as espécies adultas não têm essa característica. Seus frutos, que são semidoces, são comestíveis e sua madeira é utilizada eventualmente na carpintaria. Suas flores são brancas, masculinas, em formato de espiga, medindo 3.5 até 6 cm de largura e com inflorescência feminina de cabeça redonda ou oblonga medindo 6 a 12 mm de diâmetro, ambas axilares solitárias. A dispersão se dá através de mamíferos. O exsudado do caule (látex) e o chá da casca apresentam propriedades medicinais muito utilizados como cicatrizante e anti-inflamatório. As características dos componentes presentes no látex, na casca e nas folhas (extratos) podem estar relacionadas com a variabilidade genética das plantas.

O conhecimento da variabilidade genética dessas plantas lactíferas torna-se interessante, pois, essa variabilidade pode ser correlacionada com os teores (concentração) e qualidade do látex/extrato produzido por essas plantas, permitindo a identificação de genótipos de melhor qualidade do extrato/látex e de melhor ação terapêutica. A espécie *Maclura tinctoria* (L.) Gaud apresenta-se como uma planta de grande potencial para estudos de fitoterápicos, contribuindo para a obtenção de grandes conhecimentos científicos referentes a espécie.

Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de plantas da espécie *Maclura tinctoria* (L.) Gaud em uma população situada na Região Norte de Minas Gerais.

Material e métodos

A. Área de trabalho

O material biológico desse projeto foi coletado na região Norte do Estado de Minas Gerais, na Área de Proteção Ambiental do Rio Pandeiros (APA-Pandeiros), localidade próxima ao município de Januária. Foi amostrada uma população natural de *Maclura tinctoria* (L.) Gaud para a coleta de folhas.

B. Material Biológico para estudos genéticos

Para o estudo da caracterização da estrutura genética com utilização de marcadores moleculares, o material biológico consistiu de folhas jovens de indivíduos adultos (reprodutivos). Amostras foliares de 10 indivíduos da população foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório de Genética da Conservação da Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes, para extração do DNA.

C. Extração e Amplificação do DNA

Na extração do DNA a partir das folhas jovens, foi utilizada a metodologia descrita por Doyle & Doyle (1990) [6] com modificações pertinentes. Para a técnica molecular de marcadores ISSR utilizada, foram feitas amplificações dos fragmentos via PCR (Polymerase Chain Reaction) de acordo com Borner e Branchard (2001) [3].

As reações de amplificação foram feitas em um termociclador GeneAmp PCR System 9700, com volume total de 12 µL, contendo 2 µL de DNA diluído 50x, 1,2 µL de Tampão PCR 10x (500 mM de Tris-HCl, 200 mM de KCl, pH 8.0), 0,8 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,3 µL de MgCl₂ (15 mM), 2 µL de cada *primer* (2mM) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL).

Após uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; as reações foram submetidas a 35 ciclos de amplificação iguais para todos os *primers*. Cada ciclo consistiu de 94°C por 1 minuto, 30 segundo a 47 °C e um minuto a 72 °C. Ao final do último ciclo, a extensão final, foi por sete minutos, a 72 °C. Os fragmentos foram separados em gel de poli-acrilamida (5%) em eletroforese vertical. A coloração foi realizada utilizando nitrato de prata e revelada com carbonato de sódio.



FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas
e culturais • Debates • Minicursos e Palestras

REALIZAÇÃO:



Unimontes
Universidade Estadual de Montes Claros

APOIO:



FAPEMIG



FADENOR

24 a 27 setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

D. Análise Estatística dos Dados

Para a análise dos dados uma matriz binária foi gerada para os fragmentos amplificados a partir da genotipagem dos indivíduos quanto à presença (um) e à ausência de banda (zero). Realizou-se análise cautelosa das fotografias dos géis, e, apenas fragmentos nítidos e definidos foram considerados para se determinar a frequência das bandas nas áreas.

A partir da matriz de dados binários foi estimado o Conteúdo Informativo de Polimorfismo (PIC), cujo objetivo é indicar o quanto o marcador utilizado (primer) poder ser informativo. Esse parâmetro é calculado pela fórmula $PIC = 2\pi(1 - \pi)$, onde, π é a frequência do alelo nulo, nos diferentes *primers*. Este valor de PIC significa a probabilidade de encontrar o marcador em dois estados diferentes (ausente e presente) em duas plantas aleatoriamente da população.

Foi estimado o número de alelos observados (N_a), o número efetivo de alelos (N_e), a heterozigosidade esperada (H_e) e a percentagem de locus polimórficos.

Resultados e Discussão

Baseado em um padrão de amplificação, oito *primers* foram selecionados de um total de 12 testados. Dentre os *primers* de ISSR utilizados no presente estudo, aqueles que possuem maior potencial para utilização, em análise de variabilidade genética em *Maclura tinctoria*, são: UBC-813, UBC-814, UBC-840, UBC-857, UBC-880 e TERRY, pois produziram, pelo menos, cinco ou mais bandas polimórficas.

O valor de PIC (Conteúdo informativo de Polimorfismo) é um parâmetro utilizado para indicar a qualidade do marcador. Segundo a classificação de Botstein *et al.* (1980) [4], marcadores com PIC superior a 0,5 são considerados satisfatórios em conteúdo informativo, com valores entre 0,25 e 0,5 mediamente informativos, e, com valores inferiores a 0,25 possuem pouca informação. Dos *primers* utilizados nesse estudo, pode-se observar que este parâmetro variou de 0,29 a 0,47, com valor médio de 0,37, o que classifica esses locus como marcadores medianos em conteúdo informativo.

O número de alelos observados (N_a) foi de 2,1 e, o número de alelos efetivos (N_e) 1,58. A percentagem de locus polimórficos variou foi de 100%. Foram considerados polimórficos os locus nos quais a frequência do alelo mais comum foi menor ou igual a 95% (Nei, 1987) [9]. O alto valor observado indica que os iniciadores utilizados foram mais que satisfatórios para a detecção de polimorfismo para a espécie *Maclura tinctoria*. Utilizando gel de poliacrilamida e marcadores ISSR, Morales (2010) [8] também encontrou 100% dos locus polimórficos para cultivares de morangueiro. Ferreira (2011) [7] estudando a espécie *Annona crassiflora*, utilizando gel de agarose, encontrou 93,4% dos locus polimórficos com marcadores ISSR. Almeida *et al.* (2009) [1] encontraram 95% de locus polimórficos para cultivares de cana-de-açúcar com este mesmo tipo de marcador molecular.

As estimativas de diversidade genética de Nei (H_e) foi de 0,34. Esse resultado está em conformidade com outros trabalhos que utilizaram dados obtidos por marcadores dominantes. Oliveira *et al.* (2008) [10] utilizando marcadores moleculares RAPD, encontram um valor de (H_e) médio de 0,32 em populações de *Acrocomia aculeta*. Batista *et al.* (2008) [2] encontraram um valor razoável de diversidade genética (0,23) para *Tibouchina papyrus* com o uso de marcadores ISSR. Cota *et al.* (2011) [5], pesquisando populações naturais de *Annona crassiflora* com auxílio de marcadores RAPD, encontraram um valor de (H_e) médio de 0,30, sendo que esse índice variou de 0,21 a 0,30 entre as populações estudadas.

Conclusão

Obteve-se razoáveis níveis de polimorfismo e de diversidade genética para a população de *Maclura tinctoria* estudada, o que evidência o potencial da espécie para a prospecção de componentes biológicos importantes (bioprospecção).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (Processo 562885/2010-2), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela Bolsa de Incentivo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Tecnológico de M. A. S. Pimenta e pelas Bolsas de Iniciação Científica de A. F. Pinho Souza e J.A.S. Ramos; e a Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES pelo apoio logístico.



FÓRUM ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas
e culturais • Debates • Minicursos e Palestras

REALIZAÇÃO:



APOIO:



FAPEMIG



FADENOR

24 a 27 setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

Referências

- [1] Almeida, C. M. A.; Lima, S. E. N. de.; Lima, G. S. de. A.; Brito, J. Z. de.; Donato, V. M. T. S.; Silva, M. V. da. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. *Ciência e Agrotecnologia*. Lavras, v. 33, edição especial, p. 1771 -1776, Jan, 2009.
- [2] Batista, E. C.; Telles, M. P. C.; Ramos, J. R.; Soares, T. N.; Diniz-Filho, J. A. F.; Ferreira, H. D. Variabilidade genética intrapopulacional utilizando marcadores ISSR em *Tibouchina papyrus*. *Simpósio Nacional do Cerrado*, 9., 2008. Brasília. Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócios e recursos naturais. Brasília, 2008.
- [3] Bornet, B. & Branchard, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, Georgia, v.19, p.209-215, 2001.
- [4] Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M.; Davis, R. V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, Utah, v. 32, p. 314-331. Mai, 1980.
- [5] Cota, L. G.; Vieira, F. A.; Melo Júnior, A. F.; Brandão, M. M.; Santana, K. N. O.; Guedes, M. L.; Oliveira, D. A. Genetic diversity of *Annona crassiflora* (Annonaceae) in northern Minas Gerais State. *Genetics and Molecular Research*. v. 10, n. 3, p. 2172-2180, Set. 2011.
- [6] Doyle, J. J. & J. L. Doyle. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15. 1990.
- [7] Ferreira, M. F. M. Análises genéticas da *Annona crassiflora* (ANNONACEAE): Implicações para a conservação da espécie. 2011. 53p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2011.
- [8] Morales, R. G. F. Divergência genética entre cultivares de morango por meio de Marcadores moleculares e caracteres morfoagronômicos. 2010. 36P. Dissertação (mestrado produção vegetal)- Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO-PR. Guarapuava-PR. 2010.
- [9] Nei, M. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press, 1987.512 p.
- [10] Oliveira, D. A.; Melo Júnior, A. F.; Brandão, M. M.; Rodrigues, L. A.; Fonseca, F. S. A.; Ferreira, M. F. M.; Silva, G. M. Diversidade genética de populações de *Acrocomia aculeata* (jacq.) lodd. (arecaceae) no norte do estado de minas gerais. *Simpósio Nacional do Cerrado*, 9., 2008. Brasília. Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócios e recursos naturais. Brasília, 2008.