Similaridade genética entre indivíduos de palmeira-ráfia (*Rhapis excelsa* (Thumberg) Henry ex. Rehder) avaliado por marcadores RAPD

Pereira, M.B.M.[1]; Nogueira, G.F.[2]; Lacerda, G.A.[3]; Mendonça, E.G.[4]; Paiva, P.D.O.[5]; Paiva, R.[5]; Paiva, L.V.[5]

[1]Bolsista do Projeto Genoma Minas Gerais – BDTI-V, e-mail: michelemestrado@yahoo.com.br; [2]Graduanda em Ciências Biológicas (UFLA), bolsista de Iniciação Científica – FAPEMIG, e-mail: gabi_bioufla@hotmail.com; [3]Doutorando do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal (UFLA), bolsista FAPEMIG, e-mail: guilhermebiologia@hotmail.com; [4]Mestranda do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal (UFLA), bolsista CNPq, e-mail: evaniafloresta@hotmail.com; [5]Professores Associados da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, Caixa Postal 303, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, fone: (35) 3829-1359

INTRODUÇÃO

A palmeira *Rhapis excelsa* (Thumberg) Henry ex. Rehder pertencente à família Palmae (Arecaceae) sendo popularmente denominada palmeira-senhora ou palmeira-ráfia.

Os genótipos de palmeiras com maior potencial agronômico são normalmente reunidos em coleção, constituindo-se assim o Banco Ativo de Germoplasma (BAG). Trabalhos de caracterização dos BAGs de palmeiras vêm sendo realizados sob o aspecto botânico, genético e agronômico (Bovi *et al*., 1995a, 1995b). Sob o aspecto genético, vários trabalhos têm utilizado marcadores moleculares tipo RAPD para estimar a divergência genética de plantas de palmeiras, como o dendê (*Elaeis guineensis*) (Shah *et al*.,1994). Os marcadores moleculares RAPD baseiam-se no fato de que os "primers" são curtos o suficiente para que as seqüências complementares arbitrárias de oligonucleotídeos encontrem seqüências complementares no genoma, de tal forma que pares de "primers" estejam localizados próximos e com os respectivos finais 3' direcionados uns para os outros.

A palmeira-ráfia possui um grande valor ornamental e poucos estudos científicos foram realizados com a espécie. Um agravante neste sentido deve-se ao fato de plantas provenientes de um mesmo local apresentaram diferenças genéticas, pois o que se busca quanto ao parâmetro ornamental é a homogeneidade dos indivíduos. Assim, sabendo-se da alta eficácia dos marcadores moleculares tipo RAPD para distinguir geneticamente palmeiras, o intuito deste trabalho foi avaliar a similaridade genética em 10 plantas de palmeiras-ráfia provindas de um mesmo local.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Dez plantas de palmeira-ráfia provenientes de um mesmo local (Jardim Botânico – Rio de Janeiro – RJ) foram utilizadas nos estudos. Para análise do DNA foram coletadas e identificadas folhas jovens, acondicionadas em saco plástico em gelo e transportadas ao Laboratório Central de Biologia Molecular – UFLA onde foram armazenadas em freezer a -80 ºC, até o momento da extração.

Extração e quantificação do DNA

O DNA foi extraído utilizando-se metodologia com adaptações, descrita por Wadt (1997). Cerca de 500mg de folhas jovens foram maceradas em almofariz de porcelana contendo N_2 líquido, até a obtenção de um pó fino. Durante a maceração adicionou-se 0,1g de PVP (polivinilpirrolidona) para auxiliar na prevenção da oxidação.

Para igualar as diferentes concentrações de DNA a 10ng/ml, foram feitas, para todos os genótipos, diluições em tampão TE de acordo com a expressão: Vol TE em µl = [(volume da amostra * concentração da amostra) – (10* volume da amostra)]/10. A partir de então, as amostras se apresentaram totalmente adequadas para as reações de PCR-RAPD.

O volume final de cada reação de amplificação foi 12 µl contendo 3 µl de DNA (10 ng/µl), 1,2 µl Tris-HCl pH 8,4 (20 nmol/L), 0,24 µl de dNTPs (10 µmol/L), 1,8 µl do *primer* RAPD (10 µmol/L) correspondente e 0,6 unidades (U) de enzima *Taq* DNA polimerase. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf, Hanburg, Germany), utilizando-se um programa com desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, seguido por desnaturação 94 °C por 10 segundos, anelamento a 36 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Os passos da desnaturação, anelamento e extensão foram repetidos 34 vezes e, em seguida, a reação foi finalizada por uma extensão a 72 °C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,2% (m/v), em eletroforese e visualizados sob luz ultravioleta e fotografados no equipamento EDAS 290 (Kodak®). Somente foram consideradas as bandas monomórficas e polimórficas que se apresentaram de forma consistente e reproduzível nos géis de agarose.

Análise dos dados RAPD

Para determinar a freqüência de banda para cada indivíduo, foi feita uma análise cuidadosa das fotografias dos géis. Através desta foi montado uma matriz fenotípica composta de 0 e 1, sendo 0 a ausência de banda e 1 a presença.

Identificação do número ótimo de marcadores

Com o intuito de verificar se o número de bandas polimórficas geradas pelos 19 primers de RAPD foi suficiente para determinar com precisão as estimativas de similaridades genéticas entre os indivíduos, foi realizada a análise de *bootstrap*.

Similaridade genética

A representação simplificada das similaridades foi realizada pela construção de dendogramas pelo método de agrupamento UPGMA –Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average (Sneath & Sokal, 1973).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Polimorfismo de marcadores RAPDs

Entre os 59 *primers* inicialmente testados para as reações de RAPD, 19 foram selecionados por apresentarem amplificação de pelo menos um produto com padrão adequado (presença ou ausência). Foram obtidos 51 marcadores RAPD polimórficos e 30 marcadores monomórficos entre os indivíduos avaliados, logo 62,96% apresentaram polimorfismo.

Sawazaki *et al.* (1998) estudando a diversidade genética em palmeiras através dos marcadores isoenzimáticos e RAPD detectaram 96% de polimorfismo com os *primers* utilizados. No presente trabalho verificou-se que cada *primer* revelou de 1 a 7 locos polimórficos, produzindo cerca de 2,55 locos polimórficos por *primer*. A Figura 1 mostra exemplo dos perfis de amplificação obtidos com o *primer* OPP-10.

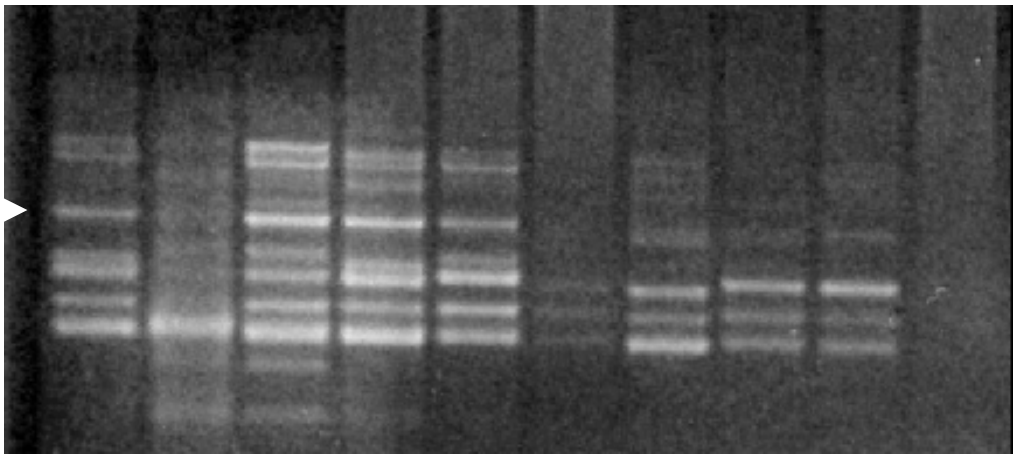


Figura 1: Eletroferograma de gel de agarose 1,2%, corrido a 100 v por 90'obtido a partir dos produtos da amplificação por RAPD com o primer OPP-10. A seta indica o perfil de banda considerada no trabalho.

Uma análise estatística descritiva das matrizes de distâncias geradas pelo coeficiente de similaridade mostrou que as distâncias entre os genótipos variaram de 0,18 a 1,00, apresentando média de 0,55.

O número de fragmentos polimórficos utilizados na avaliação da variabilidade genética em plantas é bastante variável, independente do grau de domesticação da espécie. Para espécies como samambaia *Drypteris cristata*, espécie ainda não domesticada, Landergott *et al*. (2001) encontraram 27 fragmentos. Estopa *et al.* (2006), investigando a diversidade genética em duas populações naturais de *Eremanthus erythropapus* encontraram 56 fragmentos polimórficos. Portanto, os 51 fragmentos obtidos neste trabalho, podem ser considerados suficientes para a análise dos indivíduos em questão.

Com o propósito de avaliar o poder de discriminação dos marcadores RAPD, com base nas similaridades genéticas obtidas, procedeu-se a uma análise de agrupamento UPGMA, formando seis grupos distintos (Figura 2).

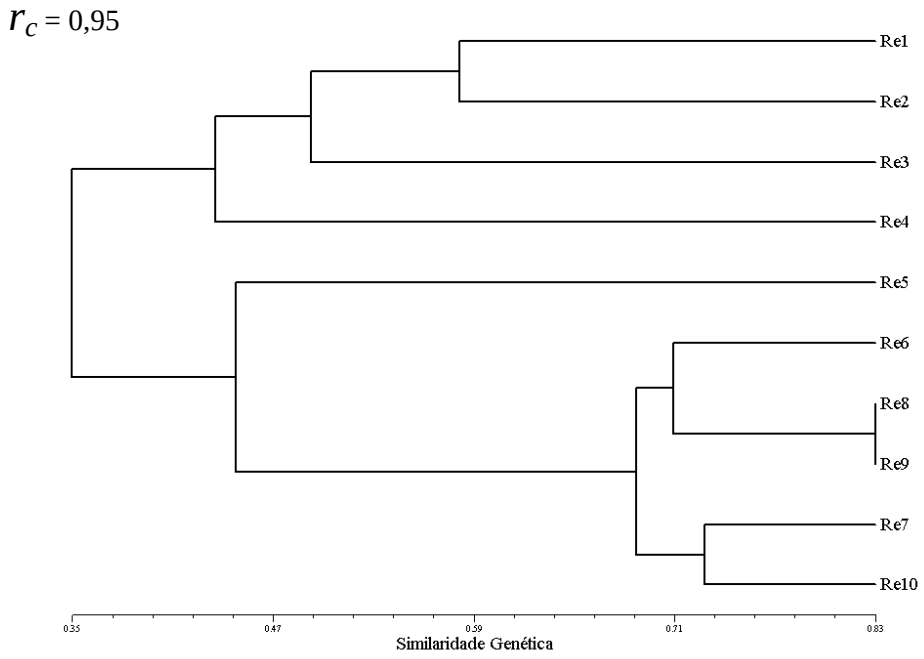


Figura 2: Dendograma UPGMA para representação de 10 genótipos de palmeiras em função de similaridades genéticas entre elas calculadas, a partir de 51 bandas RAPDs.

Pode-se observar o forte agrupamento das plantas Re6, Re8, Re9, Re7, Re10, sendo que as plantas Re8 e Re9 podem ser consideradas clones já que não há diferença genética entre elas.

Os resultados obtidos confirmam que os 51 fragmentos polimórficos obtidos a partir de 19 *primers* RAPD foram eficientes para quantificar a similaridade genética das plantas de *Rhapis excelsa* Thumberg, já que o número ótimo de marcadores encontrados foi de 47 marcas polimórficas (Figura 3).

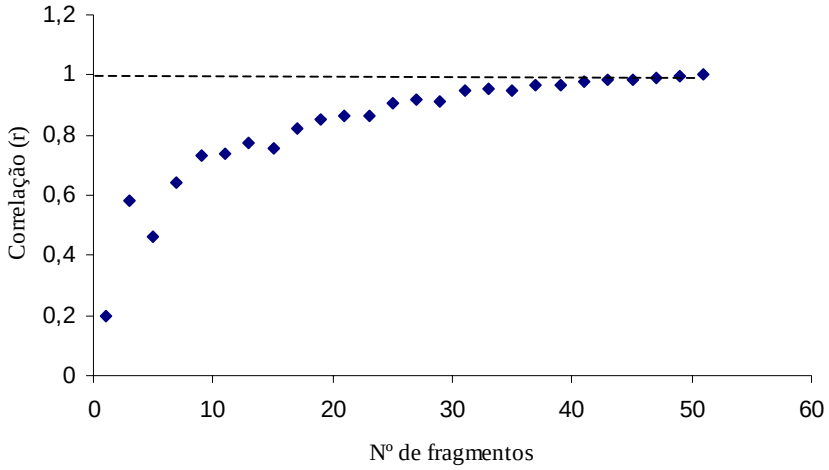


Figura 3: Resumo da análise de reamostragem contendo as correlações obtidas para diferentes números de fragmentos polimórficos do marcador RAPD na determinação do número ideal de bandas de *Rhapis excelsa.*

Além disso, pode ser considerada uma alta confiabilidade no agrupamento dos indivíduos com base no valor de correlação cofenética (r_c) 0,95 (Figura 2). Segundo Xavier (2001), os resultados gerados pelo RAPD são muito confiáveis, pois os genótipos foram analisados em âmbito molecular. Isso significa que toda a variação detectada é de causa genética, anulando a influência do ambiente.

A obtenção de marcadores associados às plantas ornamentais de interesse é bastante desejável, uma vez que poucos estudos são feitos no intuito de identificar estas plantas. A identificação precoce por meio de marcadores tipo RAPD, é de muita importância em se tratando de espécies perenes, de ciclo longo, como as palmeiras (Sawazaki *et al.,* 1998). No entanto, deve ser ressaltado que os estudos realizados neste trabalho visaram apenas à prévia distinção de 10 plantas como clones ou não, estudos mais detalhados como a comparação com os aspectos morfológicos, devem ser realizados.

A multiplicação da palmeira-ráfia é realizada por meio de semente ou divisão de touceira, sendo mais difícil o primeiro processo, devido ao lento crescimento das mudas. As sementes germinam em torno de 130 dias (Lorenzi, 1996). Os resultados deste estudo sugerem que estes 10 indivíduos de palmeira-ráfia poderiam ser oriundos da propagação vegetativa através de touceiras, o que causaria o maior grau de similaridade.

Devido ao fato do Jardim Botânico - RJ ser, reconhecidamente, considerado uma forma de conservação *ex situ* sugere-se duas populações de palmeira-ráfia. Onde a população A seja propagada por sementes a fim de se manter a variabilidade genética e a população B propagada por touceiras para uniformizar a arquitetura ornamental desejada dos indivíduos.

CONCLUSÕES

O polimorfismo RAPD observado nos 10 indivíduos de palmeira-ráfia possibilitou a diferenciação entre essas plantas provenientes de mesmo local (Jardim Botânico do Rio de Janeiro - RJ). Mesmo sendo os 10 indivíduos de *Rhapis excelsa* oriundos do JB, nota-se

que existe uma distinção genética ocasionando uma possível variação também no fenótipo podendo esta interferir na arquitetura ornamental dos espécimes.

Para uma diferenciação genética entre plantas da espécie *Rhapis excelsa* (Thumberg) Henry ex. Rehder são necessários à obtenção de no mínimo 47 bandas polimórficas, sendo os marcadores RAPD eficientes para esta análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOVI, M.L.A.; SPIERING, S.H.; SÁES, L.A. & GODOY, Jr.; G., **Coleta e caracterização morfológica de germoplasma de Euterpe***.* Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas, 1995a. *Resumos*, p. 34.

BOVI, M.L.A.; GERMEK, E.B.; GALLO, P.B.; SÁES, L.A.; GODOY Jr.G.; MARTINS, A.L.M., PAULO, E.M.; KANTHACK, R.A.D.; MARTINS, F.P.; SANTOS, R.R.; BORTOLETTO, N.; CAMPANA, M.P. & CAMARGO, A.P. **Conservação e caracterização de germoplasma de pupunheira (Bactris gasipaes) em uso no Instituto Agronômico***.* Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas. , 1995b, *Resumos*, p. 66.

ESTOPA, R.A.; SOUZA, A.M.; MOURA, M.C.O.; BOTREL, M.C.G.; MENDONÇA, E.G.; CARVALHO, D. **Diversidade genética em populações naturais de candeia (Eremanthus erytropapus (DC.) MacLeish)**. Scientia Florestalis**.** N. 70, p. 97-106, abril 2006.

LANDERGOTT, U.; HOLDEREGGER, R.; KOZLOWSKI; SCHNELLER, J.J. **Historical bottlenecks decrease genetic diversity in natural populations of Dryopteris cristata. Heredity**, Oxford, v.87, n.3, p.334-335, 2001.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; COSTA, J.T.M.; CERQUEIRA, L.S.C.; FERREIRA, E. **Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 1996. 272 p.

SAWAZAKI, H.E.; BOVI, M.L.A.; SODEK, L.; COLOMBO, C.A. **Diversidade genética em palmeiras através de isoenzimas e RAPD**. Rev. Brasil. Biol*. v.58* n.4, p. 681-691, 1998.

SHAH, F.H.; RASHID, O.; SIMONS, A.J. & DUNSDON, A.; **The utility of RAPD markers for the determination of genetic variation in oil palm (Elaeis guineensis)**. Theor. Appl. Genet. 89: p.713-718, 1994.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. W. H. Freeman, San Francisco, 1973.

XAVIER, K.G**. Diversidade genética em clones de Eucalyptus avaliados por marcadores RAPD, e variações nas propriedades da madeira**. Dissertação (Mestrado em Florestas de Produção) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, p. 2001.

PALAVRAS-CHAVE
Rhapis excelsa, marcador molecular, dendograma.