

VARIABILIDADE MOLECULAR DE ACESSOS DE FAVELEIRA [*Cnidoscolus phyllacanthus* (M. Arg.) Pax & Hoffm.] INERMES E COM ESPINHOS

CARLOS EDUARDO DE ARAÚJO BATISTA¹, CARLOS HENRIQUE SALVINO GADELHA MENESES²,
JOSÉ PIRES DANTAS³, LÚCIA VIEIRA HOFFMANN⁴, ADRIANA TAVARES ESTEVAM³ e PAULO
AUGUSTO VIANNA BARROSO⁴

RESUMO: *Cnidoscolus phyllacanthus* (M. Arg.) Pax & Hoffm. é uma planta xerófila endêmica do semi-árido do nordeste do Brasil. A espécie apresenta potencial para exploração comercial, principalmente como planta forrageira. Tentativas de torná-la uma planta cultivada em maior escala estão sendo implementadas, sendo desejável a ausência de espinhos nas folhas. Caso plantas inermes contenham elevada diversidade, programas de melhoramento podem ser realizados utilizando apenas este tipo de planta. Este trabalho teve por objetivo determinar a variabilidade genética entre e dentro de acessos de faveleira, medida por marcadores moleculares. Dezoito pares de plantas de faveleira foram coletados no semi-árido do Rio Grande do Norte e Paraíba e avaliados com marcadores RAPD. Cada par foi composto por indivíduos com e sem espinhos coletados em um mesmo local. Constatou-se que acessos conjuntos de faveleira com e sem espinhos apresentam variabilidade similar e que existem contrastes maiores entre os acessos provenientes de locais de coleta diferentes. Portanto, é possível que apenas plantas sem espinhos sejam usadas para fornecer a variabilidade necessária para que o melhoramento seja realizado com sucesso.

Termos para indexação: Faveleira, Euphorbiaceae, diversidade genética, RAPD.

MOLECULAR VARIABILITY OF INERMIS AND SPINESCENT FAVELEIRA [*Cnidoscolus phyllacanthus* (M. Arg.) Pax & Hoffm.]

ABSTRACT: *Cnidoscolus phyllacanthus* (M. Arg.) Pax & Hoffm. (faveleira) is a xerophilous plant, endemic from Brazilian Northeast Semi-Arid region, with potential to be economically explored, with several uses, mainly as a forage crop. Actions to enlarge the agricultural importance of this species have been implemented. Leaves without spines are desirable and, if this kind of faveleira has enough genetic variability, they could be preferentially used on breeding programs. The aim of this work was to determine how the genetic variability, measured by RAPD markers, is structured into spinescent and inermis genotypes. Eighteen pairs of faveleira plants, compounded by one plant with and other without spines, were collected at semi arid regions from Paraíba and Rio Grande do Norte States and evaluated by RAPD markers. The results indicated that plants containing leaves with or without spines have similar variability, with more pronounced differences found between different places of collection. Then, groups of inermis plants can be used as main source of variability by breeding programs.

Index terms: Faveleira, Euphorbiaceae, genetic diversity, RAPD

¹ESAL/USP. E-mail: cadu.bio@ig.combr

²Universidade Federal Rio de Janeiro, E-mail: carlos.meneses@ufrj.br

³Universidade Estadual da Paraíba, E-mail: gpcnpq@terra.com.br

⁴Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, Campina Grande, PB, E-mail: hoff@cnpa.embrapa.br; pbarroso@cnpa.embrapa.br

INTRODUÇÃO

Poucas espécies vegetais têm aptidão agrícola para as condições climáticas do semi-árido da região Nordeste do Brasil. Como conseqüência, é muito pequena a gama de opções agrícolas capazes de gerar renda para os agricultores. A ampliação do número de espécies aproveitáveis economicamente é difícil, principalmente considerando-se a baixa intensidade e a instabilidade das chuvas. Uma alternativa pouco explorada é o aumento do grau de domesticação de espécies nativas com boa tolerância ou resistência à seca. Iniciativas neste sentido estão sendo realizadas e uma das espécies mais promissoras é a faveleira [*Cnidoscolus phyllacanthus* (M. Arg.) Pax & K. Hoffm.] (VIANA E CARNEIRO, 1991).

A faveleira é uma espécie da família *Euphorbiaceae*, endêmica das caatingas secas hiperxerófilas de solos rasos do Nordeste brasileiro (MELO, 2000) e muito adaptada às condições adversas existentes em seu ambiente natural. Apresenta porte arbustivo, com galhagem entrecruzada, lactescente e pode atingir cinco metros de altura. Sua casca é suberosa e rica em proteínas, suas raízes são tuberculadas, as flores dióicas e brancas (LORENZI, 1998). Seu principal uso é como planta forrageira.

A maioria das plantas de faveleira possui grande quantidade de espinhos pequenos, agudos e urticantes nos limbos e pecíolos das folhas. A presença dos espinhos torna algumas operações de manejo difíceis, como o corte e o manuseio das folhas. Plantas inermes também podem ser encontradas, porém, em frequência muito menor que as plantas com espinhos.

Trabalhos de melhoramento genético da faveleira estão sendo iniciados, e atenção especial deve ser dada ao conhecimento da diversidade existente nas plantas inermes. Caso possuam diversidade semelhante à encontrada

nas plantas com espinho, o processo de melhoramento genético poderá ser realizado usando a variabilidade contida apenas em plantas inermes. O presente trabalho foi realizado para determinar a variabilidade genética entre e dentro de acessos de *C. phyllacanthus* inermes e com espinhos coletados em diferentes localidades.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezoito pares de plantas de faveleira foram avaliados com marcadores RAPD. Cada par foi composto por uma planta com espinho e outro sem espinho coletadas em um mesmo local. Amostras de tecido foliar jovem das plantas matrizes foram coletadas para extração do DNA genômico total, no ano de 2000 nos municípios de Parelhas (RN), Acari (RN) e Caicó (RN) e Santa Luzia (PB), todos situados na região do Seridó e sob clima semi-árido.

O DNA total da faveleira foi extraído de folhas, segundo procedimento rotineiramente usado no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão (VIDAL et al., 2005).

As reações de amplificação de marcadores RAPD foram realizadas em solução contendo tampão PCR (10 mM de Tris-HCl pH 8,3 e 50 mM KCl), 4 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de *primer*, 1,5 unidades de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de dNTP e 50 ng de DNA genômico das plantas. Nas reações de PCR foram usados os *primers*: OPA₁₁, OPC₂, OPC_{5'}, OPC_{20'}, OPP_{7'}, OPP_{8'}, OPP_{12'}, OPP_{13'}, OPP_{14'} e OPP₁₅ e OPP₁₆ (OPERON Technologies, Inc. Alameda, CA). Após a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 45 ciclos de amplificação foram realizados. Cada ciclo foi constituído por uma desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto, um anelamento do *primer* a 35°C por 1 minuto e uma amplificação do DNA a 72°C por 2 minutos. Ao final dos 45 ciclos, realizou-se uma extensão adicional de 5 minutos a 72°. Os produtos de amplificação foram separados por

eletroforese em gel de agarose 1,4% e visualizados sob ultravioleta após coloração com brometo de etídio.

A matriz binária originária da leitura dos géis foi usada para estimar a similaridade genética de acordo com o coeficiente de Jaccard e os genótipos agrupados segundo UPGMA (SNEATH e SOKAL, 1973). Análises *bootstrap* foram realizadas para verificar se o número de marcadores polimórficos obtidos foi suficiente para fornecer estimativas precisas das similaridades genéticas (TIVANG et al., 1994). A consistência dos agrupamentos do dendrograma foi avaliada por 2000 reamostragens com repetição (FELSENSTEIN, 1985).

A variabilidade genética foi medida por análises moleculares de variância (AMOVA), segundo descrito por EXCOFIER et al. (1992). Foram realizadas duas AMOVAs: Na primeira, os acessos foram subdivididos de acordo com a presença de espinhos; na segunda os genótipos foram classificados quanto ao local de coleta. A proporção da variabilidade molecular entre e dentro dos grupos (f_{ST}) foi estimada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das reações de RAPD envolvendo todos os acessos de faveleira com os 11 *primers* gerou 95 produtos de amplificação, dos quais 52 foram polimórficos. O número de marcadores polimórficos foi suficiente para obter estimativas confiáveis de similaridade genética, segundo a análise *bootstrap* realizada, pois houve uma relativa estabilização do coeficiente de variação, em torno de 5%, a partir de 70 marcadores (YAP e NELSON, 1996). Os valores máximo e mínimo das estimativas de similaridade segundo o coeficiente de Jaccard foram 0,94 e 0,66, respectivamente.

Não houve tendência de agrupamento de plantas inermes e com espinhos, exceto por um

agrupamento de sete plantas inermes, representado na Figura 1A. Entretanto, a estabilidade deste agrupamento medida pela reamostragem por *bootstrap* foi pequena (3,3%), sugerindo que a estrutura (similaridade) genética a que ele corresponde tem baixa confiabilidade. Os demais agrupamentos não revelaram tendência definida de agrupar plantas segundo a presença de espinhos.

Em geral, também não houve tendência de os pares de plantas coletados em um mesmo local agruparem-se. Apenas três entre os dezoito pares de genótipos se agruparam diretamente, permitindo inferir que os pares não são, necessariamente, mais similares entre si que os materiais coletados em locais diferentes. Este fato é corroborado pelos valores semelhantes das médias das estimativas de similaridades entre os três pares de plantas e das demais combinações de genótipos, 0,84 e 0,82, respectivamente. A análise *bootstrap* revelou que os agrupamentos são pouco consistentes. A maior percentagem de vezes que um agrupamento se repetiu nos 2000 dendrogramas gerados pela análise foi 76%, valor relativamente baixo (YAP e NELSON, 1996). A maioria dos valores foi inferior a 50%. Uma provável razão para o baixo valor da probabilidade *bootstrap*, que representa uma pequena robustez dos agrupamentos, pode ser a existência de elevado fluxo gênico entre as populações de faveleira usadas neste estudo, fato favorecido pela alogamia da espécie (ARRIEL et al., 2005).

Segundo a AMOVA, a variabilidade genética dos grupos de plantas com ou sem espinho foi muito maior dentro dos grupos que entre estes grupos (Tabela 1). A variabilidade dentro de grupos foi de 98,31%, enquanto que aquela entre grupos foi muito baixa, apenas 1,69% ($f_{ST} = 0,0169$).

Na análise em que os acessos foram divididos segundo os pares de indivíduos coletados em

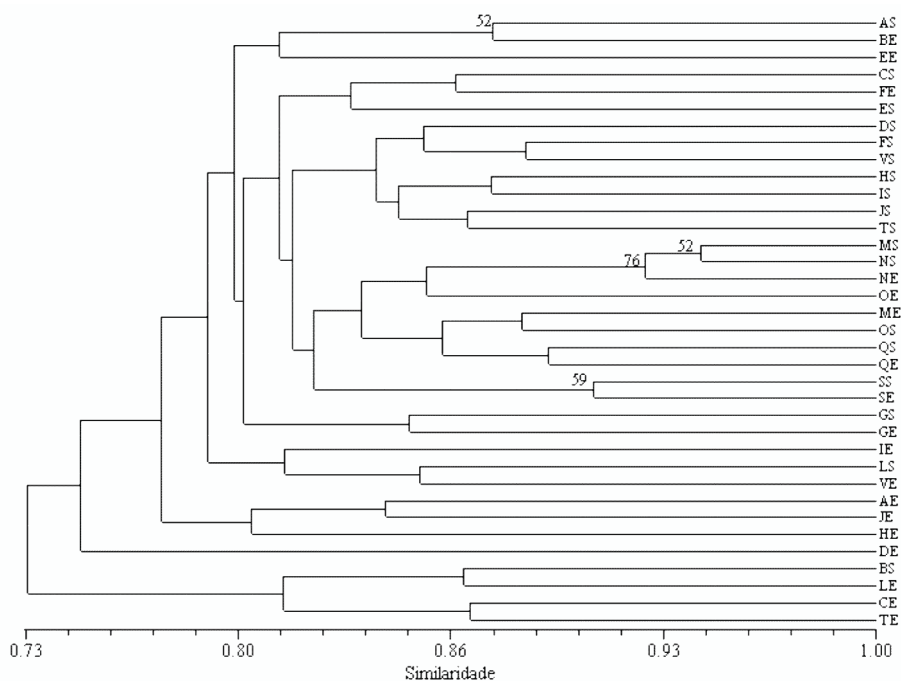


FIG. 1. Dendrograma dos genótipos de faveleira baseado nas similaridades segundo o coeficiente de Jaccard e UPGMA. Valores à esquerda do agrupamento representam a percentagem de vezes que o agrupamento apareceu nas 2000 repetições *bootstrap*. Agrupamentos sem a percentagem apresentaram percentagens inferiores a 50%. A primeira letra de cada acesso corresponde aos diferentes locais de coleta, a segunda letra correspondem a presença e a ausência de espinhos (E: com espinhos; S: sem espinhos).

TABELA 1. Análise molecular de variância (AMOVA) entre grupos formados por faveleiras com e sem espinhos.

Fonte de Variação	GL	SQ	Componente variância	Percentagem Variação
Entre grupos	1	8,306	0,09241	1,37
Dentro de grupos	34	225,833	6,64216	98,63
Total	35	234,139	6,73457	

um mesmo local, verificou-se que as proporções da variabilidade dentro e entre os pares foram, respectivamente, 83,06% e 16,94% (Tabela 2). O valor de f_{ST} (0,1694) é elevado e representa uma grande diferenciação entre pares coletados em locais diferentes, sendo

muito maior do que o obtido quando os genótipos foram classificados quanto à presença de espinhos.

As estimativas de f_{ST} e a análise de agrupamento indicam que conjuntos de plantas

TABELA 2. Análise molecular de variância (AMOVA) entre grupos formados por faveleiras coletadas em um mesmo local.

Fonte de Variação	GL	SQ	Componente variância	Porcentagem Variação
Entre grupos	17	133,64	1,139	16,94
Dentro de grupos	18	100,50	5,583	83,06
Total	35	234,139		

de faveleira com e sem espinhos apresentam proporção de variabilidade genética similar, sendo a presença de espinhos um fator pouco importante sob o ponto de vista da caracterização da diversidade. É muito provável que a presença de espinhos nas folhas seja controlada por um ou poucos genes e que a maior abundância das plantas com espinhos se deva a menor frequência dos alelos que conferem ausência dos espinhos e/ou à recessividade destes alelos. Caso estas hipóteses estejam corretas, as faveleiras inermes devem possuir a mesma base genética das plantas com espinho, explicando a pequena diferença da variabilidade entre os conjuntos de acessos com e sem espinhos estudados. Como a diversidade entre pares de plantas coletadas em diferentes locais foi elevada, as novas coletas de faveleira, necessárias para fornecer a variabilidade para o melhoramento genético, devem incluir o maior número de locais possível.

O conjunto dos resultados obtidos indica que pode-se realizar o melhoramento genético da faveleira tendo os genótipos inermes como base. A variabilidade similar encontrada nos genótipos sem e com espinhos deve garantir que os programas de melhoramento possam selecionar genótipos superiores a partir de genótipos inermes. Este fato é particularmente verdadeiro no estágio em que o melhoramento da faveleira se encontra, ainda muito inicial.

CONCLUSÕES

O estudo de faveleiras com e sem espinhos com marcadores RAPD permitiu concluir que:

1. Conjuntos de faveleiras com e sem espinhos possuem diversidade genética similar, portanto, os genótipos sem espinhos podem ser a principal fonte de variabilidade para os programas de melhoramento;

2. A diversidade genética entre locais de ocorrência de faveleiras sem espinhos da região do Seridó é elevada e deve ser considerada quando do planejamento de expedições para coletas de novos acessos.

REFERÊNCIAS

ARRIEL, E. F.; PAULA, R.C.; BAKKE, O. A.; ARRIEL, N.H.C.; SANTOS, D.R. Genetic variability among *Cnidocolus phyllacanthus* (Mart.) Pax & K. Hoffm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, p.207-214, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p. 479-491, 1992.

- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998. v.2, p.92.
- MELO, A. L. **Estudos taxonômicos sobre o gênero *Cnidoscopus* Pohl (Crotonoideae – Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco – Brasil**. 2000. 43f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.
- SNEATH, P.H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973.
- TIVANG, J.G.; NIENHUIS, J.; SMITH, O.S. Estimation of sampling variance of molecular marker data using bootstrap procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.259-64, 1994.
- VIDAL, M.S.; MILANI, M.; MENESES, C.H.S.G.; BEZERRA, C.S. **Comparação entre protocolos para extração de DNA total de *Ricinus communis* L.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 5p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 252).
- VIANA, O. J.; CARNEIRO, M. S. S. Plantas forrageiras xerófilas – Faveleira [*Cnidoscopus phyllacanthus* (M. Arg.) Pax & K. Hoffm] inerme no semi-árido cearense. **Ciência Agrônômica**, v.22, p.17-21, 1991.
- YAP, I. V.; NELSON, R. J. **Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms**. [S.l.]: International Rice Research Institute, 1996. 22.p. (IRRI Discussion Paper Series 14)