

NÚMERO DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS PARA A CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE INDIVÍDUOS DE *Cordia trichotoma*

Letícia Aparecida Pereira Gomes, Otávio Jerônimo Silva, Adelson Lemes da Silva Júnior, Gabriel Henrique de Assis Bernini, Dulcinéia de Carvalho, Lucas Amaral de Melo.

Universidade Federal de Lavras/Departamento de Ciências Florestais, Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos - 37203-202 - Lavras – MG, Brasil, leticia.gomes1@estudante.ufla.br, otavio.silva@estudante.ufla.br, adelson.lemes@ufla.br, gabriel.bernini@estudante.ufla.br, dulce@ufla.br, lucas.amaral@ufla.br.

Resumo

Objetivou-se determinar o número de fragmentos polimórficos obtidos via marcadores *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR), suficientes para a caracterização genética em indivíduos de *Cordia trichotoma*. Para isso, em um teste de progênie da espécie, foi conduzida uma seleção de 96 indivíduos, dos quais, foram coletadas amostras foliares para extração do DNA. A genotipagem foi realizada com seis *primers*, resultando em uma matriz binária com 34 fragmentos polimórficos. Posteriormente, a matriz foi submetida à análise de *bootstrap* que estima o número de fragmentos polimórficos suficientes, baseada em comparações com matrizes simuladas. Portanto, 32 fragmentos polimórficos foram assumidos como suficientes, resultando em alta correlação ($r = 0,9758$) e baixo estresse ($E = 0,0475$). A definição de um número suficiente de fragmentos polimórficos obtidos por marcadores ISSR torna-se um parâmetro essencial para a condução de pesquisas genético-populacionais de alta qualidade, promovendo a sustentabilidade e o avanço do conhecimento científico em genética florestal.

Palavras-chave: Conservação. Louro-pardo. Marcadores moleculares. Melhoramento florestal.

Área do Conhecimento: Engenharia Agrônômica. Engenharia Florestal.

Introdução

Cordia trichotoma (Vell.) Arráb. ex Steud, uma espécie arbórea da família *Boraginaceae*, conhecida como louro-pardo, apresenta potencial ecológico e econômico devido a uma combinação de características como rápido crescimento, boas taxas de regeneração natural, madeira de qualidade e interesse comercial nos mercados interno e externo, frutificação abundante e alta produção de mudas. A espécie é encontrada nas fitofisionomias das florestas pluviais atlânticas, semidecíduas e no Cerrado, estando presente nos estados do Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil (Lorenzi, 2002).

Sua relevância comercial destaca-se, sobretudo, pela densidade da madeira, que varia de 0,60 a 0,80 g/cm³, facilidade no manuseio e resistência à flexão, além de sua alta produtividade, com incremento médio anual de até 23 m³ por hectare/ano. A madeira do louro-pardo é utilizada na movelaria de luxo, revestimentos, embarcações, entre outros. Além disso, a espécie é adequada para reflorestamentos heterogêneos voltados à restauração de áreas degradadas, devido ao seu potencial regenerativo e ao papel que desempenha como pioneira em capoeiras (Carvalho, 1988).

O louro-pardo integra o programa de conservação *ex situ* de espécies nativas conduzido pelo Instituto Florestal de São Paulo desde 1982, com o objetivo de preservar seus recursos genéticos para futuros programas de melhoramento florestal e produção de sementes destinadas à recuperação áreas degradadas (Freitas, 2006). Ademais, o entendimento da variabilidade genética dentro de uma amostragem ou população é fundamental para orientar os esforços de conservação e melhoramento (Sebbenn *et al.*, 1994).

Para isso, os marcadores moleculares são ferramentas eficientes, caracterizados por qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma (Ferreira; Grattapaglia, 1998). Dentre eles, o *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) é classificado como dominante, multiloco, que utiliza sequências

de microssatélites altamente variáveis e distribuídas no genoma, com alta reprodutibilidade e custo reduzido (Ng; Tan, 2015).

Para garantir confiabilidade aos resultados obtidos por essa classe de marcadores, análises como a avaliação do número ótimo de fragmentos polimórficos, são imprescindíveis por contribuir para otimização de tempo e recursos (Gonçalves *et al.*, 2014). Neste contexto, objetivou-se determinar o número de fragmentos polimórficos obtidos via marcadores ISSR, suficientes para a caracterização genética em indivíduos de *Cordia trichotoma*.

Metodologia

O experimento foi realizado em uma área de aproximadamente 1 hectare, localizada na Fazenda Palmital (21°09'3"S e 44°55'55"W), pertencente à Universidade Federal de Lavras, no município de Ijaci – MG. No local, foi instalado um teste com 33 progênies de meios-irmãos da espécie *Cordia trichotoma*, utilizando um delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), com 10 repetições para cada progênie e parcelas compostas por uma única planta.

Neste teste de progênies foi conduzida uma seleção baseada em caracteres fenotípicos, na qual, 96 indivíduos foram selecionados. Posteriormente, folhas jovens e com bom estado fitossanitário foram coletadas de cada indivíduo, armazenadas em sacos kraft contendo sílica gel, identificadas e transportadas para o Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas da Universidade Federal de Lavras.

A extração do DNA genômico das amostras foi realizada utilizando o método CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) (Doyle; Doyle, 1990), com ajustes nas concentrações para 1% de polivinilpirrolidona (PVP) e 2% de brometo de cetiltrimetilamônio. A genotipagem foi efetuada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando seis primers ISSR (UBC's 808, 809, 810, 811, 827 e 840) desenvolvidos pela University of British Columbia. Cada reação foi conduzida em um volume final de 20 µL, contendo: tampão 1X (10 mM Tris-HCl (pH 8,5) e 50 mM de KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 0,2 µM de *primer*, e 50 ng de DNA genômico.

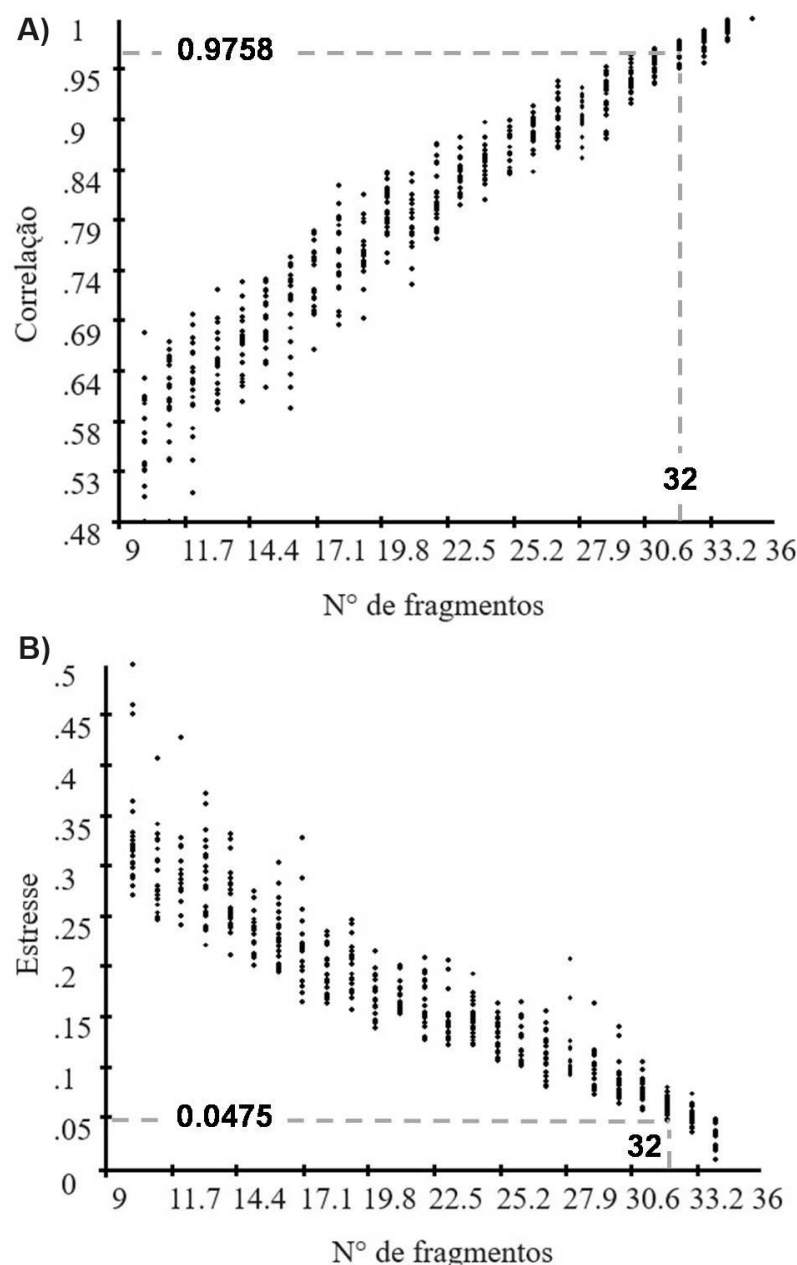
As amplificações foram realizadas em termociclador (GeneAmp PCR System 9700), com uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 45 s), anelamento (52 °C por 45 s) e extensão (72 °C por 90 s), finalizando com um alongamento a 72 °C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% com adição de *Gel Red* em cuba horizontal (Bio-RadSub-Cell®) acrescida de tampão TBE 1X (10,8 g/L Tris-base; 5,5 g/L ácido bórico; 0,83 g/L EDTA) a 100 volts por 3 horas. Após a separação dos fragmentos, os géis foram submersos em solução de brometo de etídio (0,50 µg/mL) por 30 minutos e, em seguida, fotografados sob luz UV em fotodocumentador. A separação dos fragmentos foi realizada de acordo com o peso molecular, utilizando o marcador Ladder de 100 pb (Ludwig Biotechnology).

A análise do perfil eletroforético dos géis produziu uma matriz binária, onde cada fragmento amplificado foi codificado como presente (1) ou ausente (0). No total, foram identificados 35 fragmentos, dos quais 34 eram polimórficos. A partir dessa matriz, foi realizada uma análise de *bootstrap* para determinar o número necessário de fragmentos polimórficos para uma caracterização genética dos indivíduos de *Cordia trichotoma*, utilizando marcadores ISSR. Para essa análise, primeiramente estimou-se a similaridade genética entre os indivíduos, com 20 simulações para cada quantidade de fragmentos (10, 11, 12...34), utilizando o *software* Genes (Cruz, 2016). Esse *software* calcula a correlação (*r*) entre a matriz de similaridade original e as matrizes simuladas, além de determinar o valor de estresse (*E*), que indica o nível de concordância entre a matriz original e as matrizes simuladas.

Resultados

Dentre os 34 fragmentos polimórficos identificados com os marcadores ISSR aplicados aos indivíduos de *C. trichotoma*, a análise de *bootstrap* indicou que a utilização de 32 fragmentos é suficiente para as análises subsequentes voltadas à caracterização genética. Este resultado é confirmado por uma alta correlação de 0,9758 e um baixo valor de estresse de 0,0475 (Figura 1).

Figura 1 – Número de fragmentos polimórficos (*n* = 32) suficientes para caracterização genética de indivíduos da espécie *Cordia trichotoma*. A - Estimativas das correlações (*r*) entre as similaridades genéticas para números crescentes de fragmentos polimórficos ISSR. B - Valores de estresse (*E*) entre as similaridades genéticas para números crescentes de fragmentos polimórficos ISSR.



Fonte: Autores (2024).

Discussão

A análise de *bootstrap* é uma abordagem inicial nos estudos genético-populacionais, permitindo a otimização de recursos como reagentes e insumos laboratoriais. Ao estabelecer um limite mínimo de fragmentos a serem avaliados, essa abordagem contribui significativamente para a redução do tempo necessário para a obtenção de resultados robustos e confiáveis (Gonçalves *et al.*, 2014). Essa metodologia se mostra particularmente útil em estudos com espécies florestais, em situações onde o manejo eficiente de recursos e a rapidez na geração de dados são cruciais para a conservação e o melhoramento genético.

A quantidade ideal de fragmentos polimórficos é considerada adequada quando o valor de estresse é inferior a 0,05 e a correlação se aproxima de 1 (Kruskal, 1964). Nesse sentido, a determinação de 32 fragmentos polimórficos como número suficiente para a caracterização genética dos indivíduos amostrados de *Cordia trichotoma* garantem a confiabilidade das análises subsequentes.

A aplicação dessa estratégia em outras espécies florestais, como *Zeyheria tuberculosa* (Assunção *et al.*, 2024) e *Melanoxylon brauna* (Gibson *et al.*, 2023), reafirma sua relevância e versatilidade. Nesses estudos, a utilização de um número adequado de fragmentos polimórficos não apenas assegurou a validade das análises genéticas, mas também permitiu a determinação da variabilidade genética entre indivíduos, crucial para programas de melhoramento e conservação genética. Assim, a definição de um número suficiente de fragmentos polimórficos obtidos por marcadores ISSR torna-se um parâmetro essencial para a condução de pesquisas genético-populacionais de alta qualidade, promovendo a sustentabilidade e o avanço do conhecimento científico em genética florestal.

Conclusão

A análise de *bootstrap* indicou que 32 fragmentos polimórficos representam o valor mínimo necessário para a caracterização genética dos indivíduos amostrados de *Cordia trichotoma*. Essa quantidade foi considerada adequada, com base nos valores de correlação e estresse, garantindo que as análises subsequentes sejam confiáveis.

Referências

- ASSUNÇÃO, R. R.; SILVA JÚNIOR, A. L.; ALMEIDA, R. S.; CARVALHO, D.; MELO, L. A. Genetic characterization of *Zeyheria tuberculosa* progenies and evaluation for formation of a seed orchard. **Acta Sci. Agro.**, v. 46, n. 1, p. 1-11, 2024. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v46i1.66986>. Acesso em: 15 ago. 2024.
- CARVALHO, P. E. R. Louro-Pardo. **Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo**, n. 17, p. 63-66, 1988. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/310659/louro-pardo>. Acesso em: 15 ago. 2024.
- CRUZ, C.D. Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Sci. Agron.**, v.38, n.4, p. 547-552, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/asagr/a/sLvDYF5MYv9kWR5MKgxb6sL/?lang=en>. Acesso em: 05 ago. 2022.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990. Disponível em: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=633608](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=633608). Acesso em: 15 ago. 2024.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introduccion al uso de marcadores moleculares em el analisis genético. **Embrapa-Cenargen**, 1998. Disponível em: <http://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00064700.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2024.
- FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M.; ZANATTO, A. C. S.; VERARDI, C. K.; PINHEIRO, A. N. Parâmetros genéticos em progênies de polinização aberta de *Cordia trichotoma* (Vell.) ex Steud. **Ver. Inst. Flor.**, v. 18, p. 95-102, 2006. DOI: <https://doi.org/10.24278/2178-5031.200618327>. Acesso em: 15 ago. 2024.
- GIBSON, E. L.; GONÇALVES, E. O.; SILVA JÚNIOR, A. L.; SANTOS, A. R.; ARAÚJO, E. F.; MIRANDA, F. D.; PEZZOPANE, J. E. M. Molecular characterization of *Melanoxylon brauna* (Fabaceae) matrices established in a multiclonal minigarden. **Plant Gen.**, v. 35, p. 1-7, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2023.100428>. Acesso em: 15 ago. 2024.
- GONÇALVES, L. O.; PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-MANN, R. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 45, n. 2, p. 290-298, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rca/a/RyMhP5mbzxmkFPXGjkQXDJk/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 05 ago. 2022.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. *Psychometrika*, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964. Disponível em: http://cda.psych.uiuc.edu/psychometrika_highly_cited_articles/kruskal_1964a.pdf. Acesso em: 15 ago. 2024.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. São Paulo, SP: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002. 367 p.

NG, W. L.; TAN, S. G.: Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right?. **ASM Sci. J.**, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.

SEBBENN, A. M.; PIRES, C. L. S.; STORCK, L.; CUSTODIO FILHO, A.; ROSA, P. R. F. Variação genética em progênies de meios-irmãos de *Pinus caribaea* Mor. var. *bahamensis* Bar. et Gol. Na Região de Bebedouro-SP. **Rev. Inst. Flor.**, v. 6, p. 63-73. 1994. DOI: <https://doi.org/10.24278/2178-5031.19946503>. Acesso em: 15 ago. 2024.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao Projeto. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) - Código de Financiamento 001. Ao Convênio UFLA/FUNDECC nº 230/2018 e TED UFLA/SFB nº 01/2018 pelo financiamento de parte do experimento. À Universidade Federal de Lavras pelo suporte e espaço físico para realização da pesquisa. Ao Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas e Laboratório de Estudos em Silvicultura e Restauração Florestal (Laserf-UFLA). Ao Grupo de Pesquisa em Silvicultura e Melhoramento Florestal (SilMef-UFLA).