



**CARACTERIZAÇÕES GENÉTICAS E MOLECULARES  
EM ALGAROBA (*PROSOPIS JULIFLORA* (SW.) DC)**

**LUIZ HENRIQUE TOLENTINO SANTOS**

**2021**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÕES GENÉTICAS E MOLECULARES**  
**EM ALGAROBA (*PROSOPIS JULIFLORA* (SW.) DC)**

Autor: Luiz Henrique Tolentino Santos  
Orientador: Prof. *D.Sc.* Carlos Bernard  
Moreno Cerqueira Silva

ITAPETINGA BAHIA – BRASIL  
Novembro de 2021

LUIZ HENRIQUE TOLENTINO SANTOS

**CARACTERIZAÇÕES GENÉTICAS E MOLECULARES  
EM ALGAROBA (*PROSOPIS JULIFLORA* (SW.) DC)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECCIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

**Orientador:** Prof. *D.Sc.* Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva

**Co-orientador:** Prof. *D.Sc.* Fábio Andrade Teixeira

ITAPETINGA BAHIA – BRASIL  
Novembro de 2021

633.3 Santos, Luiz Henrique Tolentino.  
S236c Caracterizações genéticas e moleculares em algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). / Luiz Henrique Tolentino Santos. – Itapetinga-BA: UESB, 2021. 59f.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva.

1. Algaroba - Diversidade Genética. 2. Algaroba – Marcadores moleculares RGA. 3. Algaroba - Estrutura genética. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Zootecnia, *Campus* de Itapetinga. II. Silva, Carlos Bernard Moreno Cerqueira. III. Título.

**CDD(21): 633.3**

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. *Prosopis juliflora* - Extração de DNA genômico
2. Algaroba - Mesorregião sudoeste da Bahia
3. *Prosopis juliflora*

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA  
Área de Concentração: Produção de Ruminantes

Campus Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO


**Título:** “Caracterizações genéticas e moleculares em algaroba (*Prosopis juliflora* (sw.) Dc)”

**Autor (a):** Luiz Henrique Tolentino Santos

**Orientador (a):** Prof. Dr. Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva

**Coorientador (a):** Prof. Dr. Fábio Andrade Teixeira

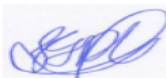
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:



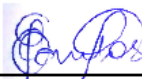
Prof. Dr. Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva – UESB



Profª. Drª. Claudine Gonçalves de Oliveira – UNIVASF



Dr. João Guilherme Portugal Vieira – UNICAMP



Profª. Drª. Elisa Susilene Lisboa dos Santos – UESB



Prof. Dr. Thiago Pereira Souza – SEC/BA

Data de realização: 20 de setembro de 2021.

*De trabalhar ninguém morre, nem de fome quem não queira,  
faça sol ou faça chuva, Mundo velho é sem porteira!*  
(Tião Carreiro)

*A Deus, por estar sempre me guiando e fazendo com que a cada dia eu me supere mais e mais. Ao meu pai de coração, Gilberto e, à minha mãe, Eliane, pelo apoio e amor incondicional: sem vocês nada disso seria possível. Às minhas irmãs, pela amizade e apoio.*

***DEDICO...***

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus, pois o Teu amor cobre as minhas fraquezas e a Tua fidelidade é maior do que todos os obstáculos na minha vida. Obrigado Senhor, por me permitir chegar até aqui, em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.*

*À minha família, por me apoiarem e pela fé que depositam em mim todos os dias.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela oportunidade de realização deste curso.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB, pela concessão da bolsa de estudos.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.*

*À FAPESB, pelos recursos financeiros e insumos de laboratório.*

*Ao professor e orientador D.Sc. Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva, pela oportunidade e disponibilidade em me orientar, pela amizade e pelo exemplo de pessoa e profissional.*

*Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pelos conhecimentos transmitidos.*

*Aos meus colegas e companheiros do LGMA, que estiveram sempre presentes ajudando, formando uma grande família, em especial, a Cibelle, Lucas, Messulan, Thaysi, Thalana, Rafa e Jardy.*

*A Samantha, pela amizade e companheirismo: você é a irmã que o doutorado me proporcionou.*

*Enfim, agradeço a todos que passaram pela minha vida e de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais essa etapa.*

*Muito obrigado!*



## BIOGRAFIA

LUIZ HENRIQUE TOLENTINO SANTOS, filho de Salviano Nunes dos Santos Neto e Eliane Tolentino Amaral, nasceu em 26 de maio de 1990, em Montes Claros, Minas Gerais.

No ano de 2007, concluiu o Ensino Médio no Centro Federal de Educação Tecnológica, CEFET- Januária, Minas Gerais.

Em 2010, iniciou o curso de graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES, sob a orientação do Professor *D. Sc.* Sidnei Tavares dos Reis, sendo finalizado em dezembro de 2014, obtendo o título de “*Zootecnista*”.

Em 2015, iniciou o curso de Pós-Graduação em Produção Animal *stricto sensu*, em nível de Mestrado, pela Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES, sob a orientação do Professor *D. Sc.* Virgílio Mesquita Gomes. Foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e, em 24 de fevereiro de 2017, defendeu a referida Dissertação para obter o título de “*Mestre em Produção Animal*”.

Em 06 de março de 2017, iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia *stricto sensu*, em nível de Doutorado, pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB *campus* Itapetinga, sob a orientação do Professor *D. Sc.* Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva. Foi bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e, em 20 de setembro de 2021, defendeu a referida Tese para obter o título de “*Doutor em Zootecnia*”.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	Viii
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	Xi
RESUMO.....	Xii
ABSTRACT.....	Xiv
I - REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
1.1 – Introdução.....	1
1.2 – Algarobeira ( <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC).....	2
1.3 – Importância Econômica e Social.....	4
1.4 – Estudos Genéticos Moleculares.....	5
1.5 – Marcadores <i>Resistance Gene Analogs</i> (RGAs).....	7
1.6 – Região Amostral (mesorregião centro sul baiano).....	8
1.7 – Referências.....	10
II – OBJETIVOS.....	15
2.1 – Objetivo geral.....	15
2.2 – Objetivos específicos.....	15
III – CAPITULO I - Análise comparativa de protocolos para extração de DNA genômico em <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC.....	16
Resumo.....	16
Abstract.....	16
3.1 – Introdução.....	17
3.2 – Material e Métodos.....	18
3.3 – Resultados e Discussão.....	20
3.4 – Conclusão.....	23
3.5 – Referências.....	24
IV – CAPITULO II - Characterization and selection of markers associated with resistance analogous genes as input for genetic analysis of <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC.....	26
Abstract.....	26
4.1 – Introdução.....	27
4.2 – Material e Métodos.....	28
4.3 – Resultados e Discussão.....	31
4.4 – Conclusão.....	35
4.5 – Referências.....	36

V – CAPÍTULO III Diversidade e Estrutura Genética de <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC na mesorregião do centro sul do Estado da Bahia.....	39
Resumo.....	39
5.1 – Introdução.....	40
5.2 – Material e Métodos.....	41
5.3 – Resultados e Discussão.....	47
5.4 – Conclusão.....	54
5.5 – Referências.....	55
VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
VII – ANEXOS.....	59

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Referencial Teórico</b>	
Figura 1: <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC em seu ambiente naturalizado. a) Árvore; b) Vagens; c) Inflorescências; d) Dispersores (equídeos).....	3
Figura 2: Representação da Mesorregião Centro Sul Baiano e as cidades em estudo.....	9
<b>Capítulo I</b>	
Figura 1: DNA genômico de <i>Prosopis. Juliflora</i> (Sw.) DC obtido a partir dos protocolos de extração.....	21
Figura 2: Padrão de amplificação dos fragmentos de DNA genômico de <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC obtidos por meio de sete protocolos de extração e avaliados com o iniciador ISSR – 5' (CA)8RG 3'.....	22
<b>Capítulo II</b>	
Figure 1: Amplification profiles obtained using <i>Resistance Gene Analogs</i> (RGA) pairs in <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC .....	32
<b>Capítulo III</b>	
Figura 1: Representação da área coletada dos acessos da coleção de germoplasma de <i>Prosopis. juliflora</i> (Sw.) DC.....	42
Figura 2: Representação da Mesorregião Centro Sul Baiano e a área de coleta das populações naturalizadas.....	42
Figura 3: Representação dos marcadores encontrados na coleção de germoplasma, populações naturalizadas e sua interação.....	47
Figura 4: Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro da coleção de germoplasma do IF baiano e populações naturalizadas.....	50
Figura 5: Estimativa de estrutura genética (pool gênicos - K - mais prováveis) com base em análises Bayesianas, adotando método descrito por Evano et al. (2005).....	51
Figura 6: Estrutura genética observada em 192 acessos de <i>Prosopis juliflora</i> (144 acessos presentes em coleção de germoplasma e 48 acessos em populações naturalizadas).....	52
Figura 7: Gráfico de dispersão baseado em análise de coordenadas principais	

(PCoA) de sete populações naturalizadas (totalizando 48 acessos) e uma coleção de germoplasma (totalizando 144 acessos) de *Prosopis juliflora* caracterizados com marcadores análogos a genes de resistência (RGA).....

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Referencial Teórico</b>	
Tabela 1. Utilização da <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC em diferentes estudos científicos.....	4
<b>Capítulo I</b>	
Tabela 1: Descrição dos protocolos utilizados para os testes de extração de DNA genômico de <i>P. juliflora</i> (Sw.) DC.....	19
Tabela 2: Quantificação e pureza de DNA genômico de <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC a partir das absorbâncias obtidas por espectrofotômetro .....	21
<b>Capítulo II</b>	
Table 1. Description of the 17 pairs of RGA ( <i>Resistance Gene Analogs</i> ) primers tested on algaroba ( <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC).....	30
Table 2. Characterization of the amplification profile of genomic regions of <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC. from 12 pairs of RGA ( <i>Resistance Gene Analogs</i> ) primers evaluated in 20 specimens.....	33
<b>Capítulo III</b>	
Tabela 1: Distribuição dos acessos de <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC nos grupos e regiões coletadas, número de acessos, localização geográfica, temperatura média anual e índice pluviométrico anual.....	43
Tabela 2: Combinações de marcadores RGA ( <i>Resistance Gene Analogs</i> ) utilizados para caracterização da <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC, e suas respectivas sequências de nucleotídeos.....	45
Tabela 3: Análise descritiva a partir de 10 combinações de iniciadores RGAs e 192 genótipos de <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AFLP** – *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado)

**AMOVA** – *Analysis molecular variance* (Análise da Variância Molecular)

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**EDTA** – Ácido Etileno diamino tetracético

**He** – Heterozigosidade Esperada

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**ISSR** – *Inter-simple sequence repeats* (Repetições de sequência inter-simples)

**LGMA** – Laboratório de Genética Molecular Aplicada

**MAPA** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**MgCl** – Cloreto de Magnésio

**NaCl** – Cloreto de Sódio

**NBS** – Sítios de ligação a nucleotídeos

**PCoA** – *Principal Coordinates Analysis* (Análises de Coordenadas Principais)

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

**PIC** – *Conteúdo de Informação de Polimorfismo* (Polymorphism Information Content)

**QTL** – *Quantitative trait locus* (Locus de característica quantitativa)

**RAPD** – *Random Amplified Polymorphic DNA* (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)

**RFLP** – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição)

**RGA** – *Resistance Gene Analogs* (Análogos a genes de resistência)

**RNA** – Ácido Ribonucleico

**SSR** – *Single Sequence Repeat* (Sequências Simples Repetidas)

**TBE** – Tampão de Tris/Borato/EDTA

**UESB** – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

## RESUMO

SANTOS, Luiz Henrique Tolentino. **CARACTERIZAÇÕES GENÉTICAS E MOLECULARES EM ALGAROBA (*PROSOPIS JULIFLORA* (SW.) DC)**. Itapetinga, BA: UESB, 2021. 59p. Tese. (Doutorado em Zootecnia, Área de Concentração em Genética e Melhoramento)\*.

A algaroba, *Prosopis juliflora* (Sw) DC, é considerada uma alternativa na alimentação de animais em regiões semiáridas, apresentando importância econômica e social. A referida espécie tem recebido atenção por pesquisadores em estudos genéticos moleculares, embora, pouco se sabe sobre a sua diversidade e estrutura genética. Assim, objetivou-se gerar informações relativas à extração de ácidos nucleicos, uso de marcadores moleculares e estimativas de diversidade e estrutura genética que contribuam para subsidiar ações de manejo e melhoramento genético em *P. juliflora* (Sw.) DC. Para isto, foram testados sete protocolos de extração de DNA genômico disponíveis na literatura, utilizados em diferentes espécies vegetais. Os protocolos foram otimizados por meio da eliminação do uso de  $\beta$ -mercaptoetanol, nitrogênio líquido, proteinase K e RNAses. Após as etapas de extração, foi analisada a qualidade e quantidade de DNA obtido e, por fim, realizado teste de amplificação com uso de marcador molecular *Resistance Gene Analogs* - RGA. Ao final, selecionou-se os três protocolos mais eficientes para a obtenção do DNA genômico: tampão SDS 10%, CTAB 5% e Sorbitol; sendo utilizado o SDS 10% para extração do DNA nos próximos estudos. Posteriormente, foram caracterizados e selecionados 17 combinações de marcadores moleculares RGA, em 20 amostras de DNA genômico da planta extraídas de espécimes coletadas no município de Itapetinga, Bahia. Com base nos perfis de amplificação os pares de iniciadores foram classificados como: Adequado; Razoável e Inadequado. Também foram realizadas análises descritivas associadas ao número de marcadores gerados, onde os percentuais de polimorfismo variou entre 60% e 100%, a média da Heterozigosidade Esperada (*He*) foi de 0,21 e, o conteúdo de informações polimórficas (PIC) médio foi de 0,17. Dos 17 pares de iniciadores analisados, 10 foram selecionados para estimar a diversidade e a estrutura genética de população referente à sete populações naturalizadas da mesorregião centro sul baiano, composta por 48 acessos e 144 acessos da coleção de germoplasma do Instituto Federal Baiano foram incluídas nas análises. Com base nos perfis de amplificação, realizou-se a genotipagem e a construção da tabela de dados binários. As análises descritivas, Análise de Variância Molecular (AMOVA) e Análise de Coordenadas Principais (PCoA) também foram realizadas. Observamos um total de 147 marcas, cuja média de polimorfismo foi de 51,7% , sendo 12 marcas raras e cinco exclusivas. A Heterozigosidade esperada apresentou média de 0,17, variando de 0,05 em Anagé e 0,32 em Caculé. O conteúdo de informação de polimorfismo variou de 0,04 a 0,25 com média de 0,14. Os acessos estudados apresentaram estruturação em dois *pools* gênicos e subestruturação em três *pools* gênicos. A partir dos atributos genéticos moleculares apresentados nesse estudo, a presente Tese busca subsidiar futuros planos de manejo das populações de *Prosopis juliflora* naturalizada na mesorregião sudoeste da Bahia.

Palavras-chave: Algaroba, RGA, Diversidade Genética, Naturalização de espécie vegetal



---

\*Orientador: Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva, D.Sc.

## ABSTRACT

SANTOS, Luiz Henrique Tolentino. **GENETIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATIONS OF ALGAROA (*PROSOPIS JULIFLORA* (SW.) DC).** Itapetinga, BA: UESB, 2021. 59p. Doctoral dissertation. (Doctorate in Animal Science, Concentration Area in Genetics and Genetic Improvement) \*.

The mesquite, *Prosopis juliflora* (Sw) DC, is considered an alternative for animal feeding in semiarid regions, presenting economic and social importance. The specie has received attention by researchers in molecular genetic studies, although, there are not much studies about its diversity and genetic structure. This study aimed to generate information related to the extraction of nucleic acids, use of molecular markers and estimation of diversity and genetic structure that contribute to support management and genetic improvement actions of *P. juliflora* (Sw.) DC. It was used seven genomic DNA extraction protocols available in the literature, used in different botanical species. The protocols were optimized by eliminating the use of  $\beta$ -mercaptoethanol, liquid nitrogen, proteinase K and RNAses. After the extraction steps were done, the quality and quantity of DNA obtained was analyzed and an amplification test was performed using a molecular marker Resistance Gene Analogs - RGA. At the end, three most efficient protocols for obtaining genomic DNA were selected: 10% SDS buffer, 5% CTAB and Sorbitol; using 10% SDS for DNA extraction in future studies. Subsequently, 17 combinations of RGA molecular markers were characterized and selected on 20 samples of plant genomic DNA extracted from specimens collected in the county of Itapetinga, Bahia. Based on the amplification profiles the primer pairs were classified as: Adequate; Reasonable and Inappropriate. It was also performed the description of the analyzes associated with the number of generated markers, where the polymorphism percentages ranged between 60% and 100%, the average Expected Heterozygosity (H) was 0.21, and the average polymorphic information content (PIC) was of 0.17. From the 17 pairs of primers analyzed, 10 were selected to estimate the diversity and genetic structure of the population referring to seven naturalized populations from the central southern region of Bahia, comprising 48 accessions and 144 accessions from the germplasm collection of the Instituto Federal Baiano were included in the analyses. Based on the amplification profiles, genotyping and the construction of the binary data table were performed. Descriptive analyses, Molecular Variance Analysis (AMOVA) and Principal Coordinate Analysis (PCoA) were also performed. It was observed a total of 147 brands, whose average polymorphism was 51.7%, being 12 rare brands and five exclusive ones. Expected heterozygosity averaged 0.17, ranging from 0.05 in Anagé to 0.32 in Caculé. The polymorphism information content ranged from 0.04 to 0.25 with a mean of 0.14. The studied accessions presented structure in two gene pools and substructure in three gene pools. From the molecular genetic attributes presented in this study, this doctoral dissertation intends to support future management plans for populations of *Prosopis juliflora* naturalized in the southwestern mesoregion of Bahia.

**Keywords:** Genetic Diversity, Mesquite, Naturalization of plant species, RGA

\*Advisor: Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva, D.Sc

# I REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca no contexto agropecuário por apresentar o maior rebanho comercial bovino do mundo, sendo esse setor de extrema importância social e econômica. Em 2019, estimou-se um efetivo de 214,8 milhões de cabeças de gado, sendo que o rebanho nordestino representa 13% desse total (IBGE, 2019). O clima semiárido representa cerca de 86% do nordeste brasileiro. Embora a região apresente baixos níveis de produtividade quando comparados às outras regiões do país, processa-se que o manejo nutricional adequado não ocorra em função das condições edafoclimáticas, uma vez que o rebanho bovino é criado, em sua maioria, em sistema extensivo (Da Nóbrega et al., 2011).

O uso de espécies de leguminosas adaptadas às regiões semiáridas é uma alternativa para melhorar alguns índices de produtividade voltados à nutrição de ruminantes (Deminicis et al., 2013). Devido à sua associação com bactérias fixadoras de nitrogênio, muitas espécies de leguminosas possuem a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico ao solo (Hungria et al., 2013), sendo este um dos fatores associados aos benefícios do uso destes vegetais em pastagens para a nutrição animal.

Dentre as leguminosas destaca-se a algaroba, *Prosopis juliflora* (Sw.) DC, por apresentar características de adaptação às regiões semiáridas, podendo vegetar em diferentes tipos de solo, até nos mais rasos, pedregosos e nos solos salinos (Ribaski et al., 2009). Suas vagens apresentam elevado potencial energético e aceitabilidade pelos animais (Talpada et al., 2003), podendo ser utilizada na substituição do milho ou como componente adicional à dieta de ruminantes (Alves et al., 2012; Pereira et al., 2013). Com tais características, a algaroba é considerada uma árvore de uso múltiplo, podendo ser utilizada na alimentação humana, alimentação animal, produção de madeira, proteção do solo contra erosão, sombreamento, conservação e melhoramento de pastagens e suporte à apicultura (Ribaski et al., 2009; Rodrigues et al., 2013).

Apesar da importância da algaroba em regiões semiáridas, ainda são escassos os estudos relacionados a diversidade e estrutura genética. De acordo com Souza (2015), a utilização de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética é uma técnica amplamente aceita e empregada devido à sua confiabilidade. Os marcadores moleculares

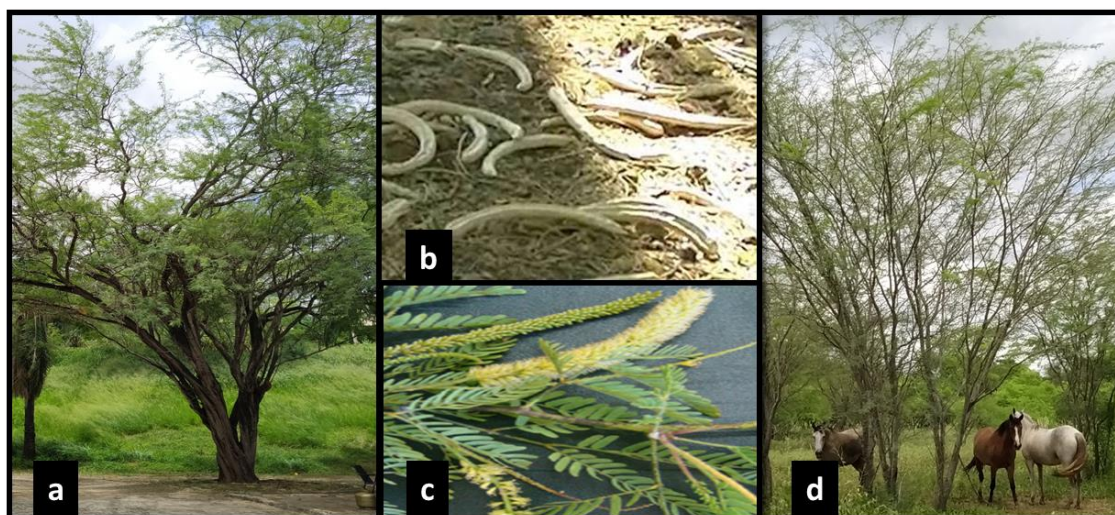
são ferramentas importantes para obtenção de grande quantidade de informações em tempo reduzido (Turchetto-Zolet et al., 2017). Diversos marcadores moleculares, dominantes e codominantes, são empregados em estudos de caracterização, tanto para aplicações filogenéticas e evolutivas, quanto para fins práticos em programas de pré-melhoramento e conservação (Faleiro et al., 2018).

Dentre os marcadores moleculares disponíveis, temos os *Resistance Gene Analogs* (RGAs). Em linhas gerais, os RGAs destacam-se por não requererem informações prévias sobre o genoma das espécies a serem avaliadas, por serem marcadores dominantes. Os RGAs estão potencialmente relacionados a regiões conservadas referentes à resistência das plantas aos patógenos, podendo auxiliar na seleção de genótipos de interesse, economizando custo e tempo dentro dos programas de melhoramento. A metodologia de aplicação destes marcadores baseia-se na amplificação em plataforma *Reação em Cadeia da Polimerase* (PCR), o que torna a técnica automatizada e de fácil execução (Borém & Caixeta, 2009).

## 1.2 Algarobeira

*Prosopis juliflora* (Sw) DC, conhecida popularmente como algarobeira ou algaroba no Brasil, mesquite no México, cuji na Venezuela, algarroba ou nacascal na Guatemala, carbón em El Salvador, acácia de Catarina em Nicarágua e aramo no Panamá, é uma espécie nativa da América do Sul, América Central e Caribe (Ribaski et al., 2009). *P. juliflora* pertence à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae e possui porte arbóreo com características de plantas xerófitas (Figura 1) (Abbas et al., 2016).

O gênero *Prosopis* spp. originou-se no continente africano, ocorrendo a migração para o continente americano antes da deriva continental, posteriormente, ocasionou a especiação surgindo a *P. juliflora* (Burkart, 1976). Esta espécie foi introduzida no Brasil, em 1942, no estado de Pernambuco, onde se disseminou rapidamente, ocupando vastas extensões de terras em praticamente todos os estados do Nordeste (Figura 1) (Pegado et al., 2006; Pereira, et al., 2018).



**Figura 1:** *Prosopis juliflora* (Sw.) DC em seu ambiente naturalizado.

a) Árvore; b) Vagens; c) Inflorescências; d) Dispersores (equídeos).

Fotos: Imagens “a,b,d”: Acervo próprio – Imagem “c”: Clóvis Eduardo de Souza Nascimento

Comumente, a algaroba apresenta ramos ascendentes ou flexuosos, espinhos ou inermes, espinhos geminados, flores amarelo-esverdeadas agrupadas em inflorescências em racemos, em forma de espiga. Já os frutos são de coloração amarelo-palha (Figura 1b), em forma de lomento drupáceo, usualmente falcado, retos, raramente espiralados, indeiscentes, com 10 a 40 cm de comprimento, 15 a 20 mm de largura e 4 a 5 mm de espessura, contendo, em média, 17 sementes (Figura 1b) (Lima, 1999).

Os visitantes florais responsáveis pela polinização são basicamente quatro espécies de abelhas, sendo as mais importantes a *Apis melífera* L. e a *Trigona spinipes* (Fabr.) (Lima, 1999). Por sua vez, os principais dispersores são os equídeos, bovinos e caprinos, pois não são capazes de digerir totalmente as vagens da algaroba, onde ocorre a disseminação das sementes nos esterco (Figura 1d). Além da dispersão das sementes por animais, a espécie também apresenta reprodução vegetativa pela quebra de dormência das gemas laterais após submeter à eventos de injúria, como herbivoria e fogo (Ribaski et al., 2009).

As espécies do gênero *Prosopis* são hermafroditas (Habit, 1981), com predominância de alogamia (Felker, 1982), que se caracteriza em realizar preferencialmente polinização cruzada. As espécies alógamas com flores hermafroditas geralmente apresentam um sistema de autoincompatibilidade, o qual evita a ocorrência de autofecundação (Kalisz; Vogler; Hanley, 2004). Dessa forma, esta estratégia influencia nos rearranjos que caracterizam a diversidade genética a nível populacional, levando à infinitas combinações, as quais servem de base para o comportamento evolutivo, determinando a sua adaptabilidade no ambiente ao longo das gerações

(Richards, 1990).

A algaroba foi introduzida no Brasil com intuito de desenvolver o progresso econômico da região semiárida, mas em um segundo momento foi considerada como espécie exótica e invasora (Burnett, 2017). A falta de conhecimento voltado à tecnologia de produção e manejo podem ser o precursor que a considerou como invasora biológica sobre a vegetação típica da Caatinga (Andrade et al., 2009), mesmo assim o meio produtivo não descarta o seu potencial de utilização em regiões semiáridas.

### 1.3 Importância Econômica e Social

Estudos relatam a importância social e as diferentes formas de utilização da algaroba (Tabela 1). Dentre as possibilidades, pode-se citar o potencial para alimentação humana (farinha da vagem) e de animais (bovinos, caprinos, equinos e ovinos), além da produção de madeira, proteção do solo, arborização urbana, promoção do bem-estar animal pelo sombreamento de pastagens, além de suporte na apicultura (Ribaski et al., 2009). Em um contexto mais amplo, o gênero *Prosopis* é usado não só para alimentação humana e de animais, mas também para fins medicinais. Seus componentes químicos (flavonóides, taninos, alcaloides e compostos fenólicos) demonstram potenciais em várias biofunções, como analgésico, anti-helmíntico, antibiótico, anti-câncer, antidiabético, anti-inflamatório; bem como efeitos probióticos e nutricionais (Henciya et al., 2017).

**Tabela 1.** Utilização da *Prosopis juliflora* em diferentes estudos científicos

<b>Categoria</b>	<b>Forma de Utilização</b>	<b>Referências</b>
Alimentação Animal	Vagens na alimentação de ovinos e caprinos	Riet-Correa et al., 2012;
	Vagens na alimentação de bovinos e equinos	Medeiros et al., 2012
	Melhorando a eficiência digestiva ruminal	Dos Santos et al., 2013
Medicina humana e fármacos	Atividade antitumoral em frente a células de câncer	Costa & Cavalcante, 2018
	Identificação de novos terpenóides anticâncer	Malik et al., 2018
	Potencial antimicrobiano	Srivastava & Aparna, 2015
Inseticida	Extrato da vagem da algaroba no combate de <i>Spodoptera litura</i>	Dhivya et al., 2018
Reflorestamento	Recuperação de áreas degradadas	Ahirwal et al., 2017

Em regiões semiáridas, a economia é fortemente baseada na agricultura familiar e a atividade pecuária é de extrema importância. O semiárido brasileiro apresenta um clima tropical seco, com precipitação média anual em torno de 700 mm (Tinôco et al., 2019). O clima na região é conhecido conforme classificação de Kopper em quente e seco, no qual é definido por longos períodos e estiagem o que aumenta os riscos de perdas na agricultura e na pecuária. Em contrapartida, o semiárido apresenta grande potencial de produção de forragem, sendo a principal fonte de alimentação animal. A produção vegetal (folhas e vagens) da algaroba é uma alternativa eficaz que assegura a disponibilidade de alimento na pecuária, principalmente em pequenas propriedades, favorecendo a sobrevivência dos rebanhos e o declínio da taxa de mortalidade animal em decorrência da escassez de alimentos (Dos Santos & Diodato, 2017).

Especificamente na nutrição animal, as vagens da algaroba são usadas por apresentarem elevado potencial energético e aceitabilidade pelos animais, posto que uma planta adulta produz entre de 5 a 111 kg de vagem por ano. Além do mais, o seu pico de produção é no período seco, coincidindo com a época de déficit de alimentos para os animais, demonstrando a capacidade de adaptação e potencial de produção/utilização da algaroba em regiões semiáridas (Lima, 1984; Talpada et al., 2003). No Brasil, a produção de vagem de algaroba está concentrada na região Nordeste, com uma produção superior a 1 milhão de toneladas, evidenciando assim seu potencial de utilização (Silva et al., 2002). Apesar da importância econômica e social da *P. juliflora*, conhecemos pouco sobre sua diversidade genética, tal conhecimento subsidiaria programas de conservação e melhoramento genético da espécie.

#### **1.4 Estudos Genéticos Moleculares**

A biodiversidade pode ser definida como a variação presente em todas as formas de vida, incluído desde espécies procarióticas a eucarióticas, tais como animais e plantas e sua informação genética (diversidade genética) nos ecossistemas em que eles incidem (comunidades de espécies e seu ambiente) (Rao & Hodgkin, 2002).

Dentro desse contexto, um marcador genético é, em síntese, qualquer característica visível, quantificável e que ao ser analisada, demonstre um padrão de

segregação de alelos conforme preconizado pelas leis mendelianas. Os marcadores genéticos, associados aos aspectos morfológicos foram os primeiros utilizados. Nestes, as características desejáveis, após determinado seu padrão de herança, são selecionadas os genitores para cruzamentos direcionados e obtenção de proles com maior proporção de descendentes com as características desejáveis. Subsequentemente, foram reconhecidos e desenvolvidos os marcadores genéticos bioquímicos (enzimáticos), como forma de aumentar a especificidade de análise, tendo como fonte de informação os metabólitos secundários sintetizados pelo complexo enzimático de cada indivíduo. Posteriormente, passaram a ser priorizados os marcadores moleculares relacionados ao DNA, sendo estes capazes de detectar uma maior variabilidade entre indivíduos além de serem em geral considerados neutros quanto às influências externas (Turchetto-Zolet et al., 2017).

Com o uso dos marcadores moleculares é possível estudar a diversidade genética de uma espécie. Nessas análises, são acessadas informações precisas, a nível molecular, sendo possível direcionar a partir de tais estudos estratégias associadas à caracterização, à conservação e ao uso de recursos genéticos, potencializando os ganhos genéticos de uma determinada espécie (Faleiro et al., 2018).

Com o aprimoramento da biologia molecular, principalmente com o surgimento da tecnologia de amplificação do DNA via PCR, do sequenciamento automático do DNA e das modernas técnicas de genotipagem com base em polimorfismos pontuais (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs), mapas de QTLs e seleção genômica ampla (*Genome Wide Selection* – GWS), foram desenvolvidas poderosas estratégias com potencial de acelerar o melhoramento genético assistido por marcadores moleculares (Borém & Caixeta, 2009; Faleiro et al., 2018).

Os marcadores de DNA podem ser classificados de acordo com o tipo de herança alélica, dominantes ou codominantes, bialélico ou multialélicos. Dessa forma, os marcadores codominantes possibilitam diferenciação entre indivíduos homocigotos e heterocigotos, o que não é possível com marcadores dominantes, para os quais apenas é possível identificar a presença ou ausência de um determinado marcador (Turchetto-Zolet et al., 2017). Marcadores dominantes são amplamente utilizados, especialmente por não requerer informações prévias sobre o genoma das espécies a serem avaliadas (Borém & Caixeta, 2009). Cada estratégia possui particularidade em termos de composição e tamanho das sequências do genoma em que acessa, porcentagem de *locus* polimórficos que pode ser detectado, além da abundância no genoma, metodologias de



execução, reprodutibilidade e o custo (Nadeem; Nawaz; Shahid et al., 2018)

Marcadores genéticos moleculares têm sido aplicados com sucesso como ferramentas auxiliares em diferentes etapas do melhoramento genético do gênero *Prosopis* e vários são os artigos que evidenciam tais aplicações (Pomponio et al., 2015; Padaria et al., 2015; Sivalingam et al., 2016; Rai et al., 2017; Shekhawat et al., 2018). No gênero *Prosopis*, marcadores microssatélites têm sido desenvolvidos através da construção de bibliotecas genômicas pelas técnicas de sequenciamento de nova geração (Bessega et al., 2013; Torales et al., 2013; Alves et al., 2014; George et al., 2017).

O entendimento e identificação dos recursos genéticos específicos de cada espécie do gênero *Prosopis* é muito importante para programas de melhoramento, visto que a caracterização da diversidade genética está na base das informações necessárias para se potencializar a integração dos recursos genéticos aos programas de melhoramento.

Diante da diversidade de marcadores moleculares, vários fatores podem influenciar na escolha da técnica mais adequada aos objetivos do estudo. Cada marcador molecular tem sua especificação, diferindo entre si quanto ao nível de polimorfismo detectado, a abundância no genoma, a especificidade de *locus*, a reprodutibilidade e os requisitos de detecção e automatização da técnica (Silva et al., 2019). Apesar das variadas possibilidades, ainda são poucos os estudos dedicados às estimativas de diversidade e estrutura genética com *P. juliflora* (Elmeer & Almalki, 2011), inexistindo sobretudo com uso de marcadores RGAs.

### **1.5 Marcadores *Resistance Gene Analogs* (RGAs)**

Os marcadores *Resistance Gene Analogs* (RGA) possuem herança dominante e destacam-se por estarem diretamente relacionados com regiões conservadas, denominadas *motifs*, envolvidos em regiões genômicas ricas em leucina (LRR – *Leucine Rich Repeats*), sítios de ligação a nucleotídeos (NBS – *Nucleotide Binding Sites*), estruturas complexas de NBS-LRR (*Nucleotide Binding Site Leucine Rich Repeat*) e proteínas quinase, regiões que foram identificadas por meio do processamento bioinformático de dados de NGS e que identificaram genes candidatos à resistência (gene *R*) em plantas contra os patógenos (Hammond-Kosack & Jones, 1997; Rommens & Kishore, 2000).

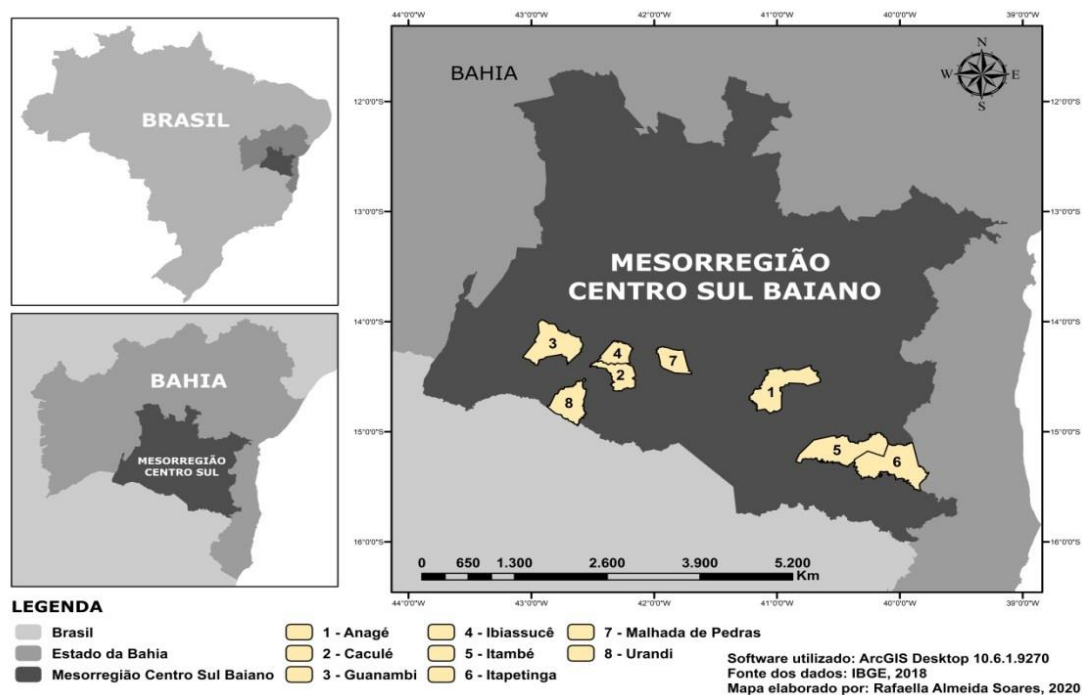
Os marcadores RGA são eficientes para rastrear a resistência às doenças em

plantas, podendo projetar marcadores de diagnóstico e identificação de loci de características quantitativas (QTL) ou marcadores associados à resistência a doenças de plantas (Parvaiz et al., 2021). São utilizados em diferentes estudos com várias espécies de plantas tanto para identificar genes de resistência, bem como em estudos de diversidade genética (Li et al., 2016; Naresh et al., 2017; Wang et al., 2017; Zhang et al., 2018; Agbagwa et al., 2018; Reddy et al., 2019), os quais têm demonstrado seu potencial de utilização, sendo uma opção para estudos genéticos moleculares em *P. juliflora*.

### **1.6 Região Amostral (mesorregião centro sul baiano)**

O Centro Sul Baiano é formado pela união de 118 municípios agrupados em oito microrregiões: microrregião de Boquira (11 municípios); Brumado (14 municípios); Guanambi (18 municípios); Itapetinga (nove municípios); Jequié (26 municípios); Brumado (cinco municípios); Seabra (18 municípios) e Vitória da Conquista (14 municípios). A área total da mesorregião é de 127.878,30 km<sup>2</sup> (IBGE, 2010), sendo considerada como de potencial agropecuário, localizada em sua grande parte dentro do semiárido, cuja característica é a alta variabilidade climática espaço-temporal, verificadas em episódios extremos, seja de baixa ou alta precipitação (Oliveira et al., 2017). A algaroba está presente nesta região, devido a sua fácil adaptação ao semiárido e por sua alta capacidade forrageira durante a época de seca, período com poucas opções de alimento para os animais.

O presente estudo foi desenvolvido em oito municípios inseridos na mesorregião centro sul baiano (IBGE, 1990). Esses municípios (Figura 2) têm em comum a temperatura média anual equivalente de 23°C com índice pluviométrico entre 624 e 800 mm, os quais se classificam em clima tropical seco e subtropical em transição com pluviométrico semiárido, classificado como quente e seco segundo Köppen, cujo solo apresenta-se característica pedregosa e rasa e sua vegetação é típica de écotone de Caatinga, Mata Atlântica e floresta estacional decidual e semi-decidual.



**Figura 2:** Representação da Mesorregião Centro Sul Baiano e as cidades em estudo

A algaroba tem se destacado na região, sendo utilizada na arborização das cidades, produção de madeira, proteção do solo contra erosão, sombreamento e alimentação animal. É evidente o papel econômico e social da algaroba no semiárido brasileiro, mesmo assim existem poucos estudos voltados ao manejo e conservação e sobre a diversidade genética da espécie, espécie essa exótica, que se naturalizou, compondo assim a formação vegetal do nordeste brasileiro.

## 1.7 REFERÊNCIAS

ABBAS, Ahmed M. et al. Predicting the spatial spread of invasive *Prosopis juliflora* (SW.) DC along environmental gradients in Gabel Elba National Park, Egypt. **Int. J. Sci. Eng. Res.**, v. 7, p. 596-599, 2016.

ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C.; GODOI, A. R.; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 37, p. 260-258, 2008.

AGBAGWA, I. O. et al. Identification, Characterization, and Phylogenetic analysis of Pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) Resistance Gene Analogs using PCR cloning and in silico methods. **GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH**, v. 17, n. 3, 2018.

AHIRWAL, Jitendra; MAITI, Subodh Kumar; REDDY, M. Satyanarayana. Development of carbon, nitrogen and phosphate stocks of reclaimed coal mine soil within 8 years after forestation with *Prosopis juliflora* (Sw.) Dc. **Catena**, v. 156, p. 42-50, 2017.

ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, A. M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, C. E. C.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 2155–2159, 2011.

ALVES, E.M.; PEDREIRA, M.S.; PEREIRA, M.L.A.; ALMEIDA, P. J. P; NETO, J.G.; FREIRE, L.D.R. Farelo da vagem de algaroba associado a níveis de ureia na alimentação de ovinos: balanço de nitrogênio, N ureico no plasma e parâmetros ruminais. **Acta Scientiarum Animal Science**, v.34, n.3, p. 287 295, 2012.

ALVES, F.M.; ZUCCI, M.I.; AZEVEDO-TOZZI, A.M.; SARTORI, A.L.B.; SOUZA, A.P. Characterization of microsatellite markers developed from *Prosopis rubriflora* and *Prosopis ruscifolia* (Leguminosae-Mimosoideae), legume species that are used as models for genetic diversity studies in Chaquenan areas under anthropization in South America. **BMC Research Notes** 7: 375, 2014.

ANDRADE, L. A.; FABRICANTE, J. R.; OLIVEIRA, F. X. Invasão biológica por *Prosopis juliflora* (Sw.) DC.: impactos sobre a diversidade e a estrutura do componente arbustivo-arbóreo da caatinga no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta bot. bras.** 23(4): 935-943. 2009.

ARGÔLO, L.S.; PEREIRA, M.L.A.; DIAS, J.C.T.; CRUZ, J.F.; DEL REI, A.J.; OLIVEIRA, C.A.S. Farelo da vagem de algaroba em dietas para cabras lactantes: parâmetros ruminais e síntese de proteína microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 3, p.541-548, 2010.

BESSEGA, C.F.; POMETTI, C.L.; MILLER, J.T.; WATTS, R.; SAIDMAN, B.O.; VILARDI, J.C. New Microsatellite loci for *Prosopis alba* and *P. chilensis* (Fabaceae). **Applications in Plant Sciences** 5: 1200324, 2013.

BURKART, A. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfm. Mimosidae).

**Journal of the Arnold Arboretum**, Cambridge, v. 57, p 219-249. 1976.

BURNETT, Annahid. "A "saga" político-ecológica da algaroba no semiárido brasileiro." **Revista de Estudos Sociais**. 19.38 148-175, 2017.

CLIMATE-DATA. Dados Climáticos para Cidades Mundiais. 2020.

Disponível em: <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/bahia/itapetinga-1071/>  
Acesso em: 16 de fev. 2020.

COSTA, Ana Carla Ferreira; CAVALCANTE, Giani Maria. Atividade antitumoral in vitro de *prosopis juliflora* frente a células de câncer de mama e câncer de ovário. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 9, n. 1, p. 130-136, 2018.

DA NÓBREGA, G. H., DA SILVA, E. M. N., DE SOUZA, B. B., & MANGUEIRA, J. M. A produção animal sob a influência do ambiente nas condições do semiárido nordestino. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, 6(1), 67-73, 2011.

DHIVYA, Kumarasamy et al. Bioprospecting of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC seed pod extract effect on antioxidant and immune system of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Physiological and molecular plant pathology**, v. 101, p. 45-53, 2018.

DOS SANTOS, Edilene T. et al. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on in vitro ruminal digestion. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 4, p. 8496-8516, 2013.

DOS SANTOS, J. P. S.; DIODATO, M. A. Histórico da implementação da algaroba no Rio Grande do Norte. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 90, p. 201-212, 2017.

ELMEER, Khaled et al. DNA finger printing of *Prosopis cineraria* and *Prosopis juliflora* using ISSR and RAPD techniques. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 04, p. 527, 2011

FALEIRO, F.G.; AMABILE, R. F.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M. Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento genético de plantas. **Embrapa Cerrados-Livro Técnico (INFOTECA-E)**, Planaltina, DF. (p. 44-66), 2018.

FELKER, P. 1982. Seleção de genótipos de *Prosopis* para uma produção de vagens e de combível de Madeira. Em: Simpósio Brasileiro sobre Algaroba, *Anais*. **EMPARNA**, Natal. 2: 7-24.

GEORGE, Suja et al. Transcriptomic responses to drought and salt stress in desert tree *Prosopis juliflora*. **Plant Gene**, v. 12, p. 114-122, 2017.

HABIT, MA 1981. *Prosopis tamarugo*: arbustos de quatro zonas para zonas áridas. Em: Programa regional para a produção de alimentos regionais baseados em diários para a América Latina. **FAO / DANIDA**, Roma. p.116.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.575-607, 1997.

HENCIYA, Santhaseelan et al. Biopharmaceutical potentials of *Prosopis* spp.(Mimosaceae, Leguminosa). **journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 1, p. 187-196, 2017.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 49, p. 791-801, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA [IBGE]. (2019). Pesquisa da pecuária mundial 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>  
Acesso em: 03 fev. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA [IBGE] (2010). Censo Demográfico 2010. Bahia, 2010. Acesso em: 04 fev. 2020.

KALISZ, S.; VOGLER, D. W.; HANLEY, K. M. Context-dependent autonomous selffertilization yields reproductive assurance and mixed mating. **Nature**. London, v.430, p.884-887, 2004.

LI, Pingchuan et al. RGAugury: a pipeline for genome-wide prediction of resistance gene analogs (RGAs) in plants. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 852, 2016.

LIMA, Paulo César Fernandes. **Recursos genéticos e avaliação do gênero *Prosopis* no Nordeste do Brasil**. In: QUEIROZ, MA de; GOEDERT, CO; RAMOS, SRR (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

MALIK, Shazia Kanwal; AHMED, Maqsood; KHAN, Farah. Identification of novel anticancer terpenoids from *Prosopis juliflora* (Sw) DC (Leguminosae) pods. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 4, p. 661-668, 2018.

MEDEIROS, Marcia A. et al. Utilização de vagens de *Prosopis juliflora* na alimentação de bovinos e equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 1014-1016, 2012.

NARESH, P. et al. Isolation, characterization and genetic diversity of NBS-LRR class disease-resistant gene analogs in multiple virus resistant line of chilli (*Capsicum annum* L.). **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 114, 2017.

OLIVEIRA, W. P., SILVA, M. A. V., SOUZA, S. A., SANTANA, C. C., OLIVEIRA JUNIOR, A. DO R. Caracterização da variabilidade espacial e temporal da precipitação pluviométrica do Centro. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 10, n. 4, p. 1143-1151, 2017.

PADARIA, J. C. et al. Development of a heat-responsive cDNA library from *Prosopis cineraria* and molecular characterisation of the Pchsp17. 9 gene. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 318-324, 2015.

PARVAIZ, Aqsa et al. Characterization and Expression Analysis of Resistance Gene Analogues in Elite Sugarcane Genotypes. **Protein Pept. Lett** , 2021.

PEGADO, C. M. A. et al. Efeitos da invasão biológica de algaroba - *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. sobre a composição e a estrutura do estrato arbustivo-arbóreo da caatinga no Município de Monteiro, PB, Brasil. *Acta Botanica Brasiliensis*, São Paulo, v. 20, n. 4, p.887-898, maio 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abb/v20n4/13.pdf>>. Acesso em:19/SET/2019.

PEREIRA, T.C.J.; PEREIRA, M.L.A.; OLIVEIRA, C.A.S.; ARGOLO, L.S.; SILVA, H.G.O.; PEDREIRA, M.S.; ALMEIDA, P.J.P.; SANTOS, A.B. Mesqui te pod meal in diets for lactating goats. **Revista Brasileira de Zootecnia** , v.42, n.2, p.102-108, 2013.

PEREIRA, M. D.; ROMEIRO, T. C. O. S.; FLORES, A. V.; SEVERIANO, R. L. Germinação e biometria de frutos e sementes de *Prosopis juliflora* (Sw) D.C. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 1271-1281, jul.- set., 2018.

POMPONIO, M. F., ACUÑA, C., PENTREATH, V., LAUENSTEIN, D. L., POLTRI, S. M., & TORALES, S. Characterization of functional SSR markers in *Prosopis alba* and their transferability across *Prosopis* species. **Forest systems**, 24(2), 13, 2015.

RAI, Manoj K. et al. Cross species transferability and characterization of microsatellite markers in *Prosopis cineraria*, a multipurpose tree species of Indian Thar Desert. **Arid Land Research and Management**, v. 31, n. 4, p. 462-471, 2017.

RAO R.V.; HODGKIN T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.68, p.1-19, 2002.

REDDY, Anand C. et al. Isolation and characterization of NBS-encoding disease resistance gene analogs in watermelon against fusarium wilt. **CURRENT SCIENCE**, v. 117, n. 4, p. 617, 2019.

RIBASKI, J, DRUMOND, MA, OLIVEIRA, VR, NASCIMENTO, CES. 2009. Algaroba (*Prosopis juliflora*): árvore de uso múltiplo para a região semiárida brasileira. Colombo, PR: Embrapa Florestas, Comunicado Técnico, 240p

RICHARDS, A. J. Plant breeding systems. 2n ed. London: Chapman; Hall. 1990. 529 p.

RIET-CORREA, Franklin et al. Utilização de vagens de *Prosopis juliflora* na alimentação de ovinos e caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 987-989, 2012.

RODRIGUES, L. C. et al. Conhecimento e uso da carnaúba e da algaroba em comunidades do Sertão do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Revista Árvore**, v. 37, n. 3, p. 451-457, 2013. DOI: 10.1590/s0100-67622013000300008.

ROMMENS, C.M.; KISHORE, G.M. Exploiting the full potential of disease-resistance genes for agricultural use. **Current Opinion Biotechnol.**, v.11, p. 120-25, 2000.

SHEKHAWAT, Jatan K. et al. Exploring genetic variability in *Prosopis cineraria* using two gene targeted CAAT box-derived polymorphism (CBDP) and start codon targeted (SCoT) polymorphism markers. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 6, p. 2359-2367, 2018.

SILVA, E. L.; SILVA, J. H. V.; JORDÃO FILHO, J. Valores energéticos e efeitos da inclusão da Farinha Integral de Vagem de Algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC. Em rações de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira Zootecnia** , v.31, n.6, p.2255-2264, 2002.

SILVA, T. S. S. et al. Contribuições da biologia molecular para caracterização, conservação e uso do gênero *Croton L.* (Euphorbiaceae) **Enciclopédia Biosfera**, v.16 n.29; p539, 2019.

SIVALINGAM, PALAIYUR N. et al. Molecular markers to distinguish ‘Thar Shoba’, a variety of khejri [*Prosopis cineraria* (L.) Druce], from trees in natural populations. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 353-361, 2016.

SOUZA, D. C. L.. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 495-503, 2015. DOI: 10.1590/1983-084X/13\_071

SRIVASTAVA, APARNA; ANANDRAO, RAVEESHA KOTESHWAR. Antimicrobial potential of fungal endophytes isolated from leaves of *Prosopis juliflora* (SW.) DC. an important weed. **Int J Pharm Pharmacol Sci**, v. 7, p. 128-136, 2015.

TALPADA P.M.; PANDYA, P.R.; PANDE, M.B. Technical Bulletin on Unconventional feed resources for livestock . Anand, India: Animal Nutrition Research Department, Anand Agricultural University; 2003.

TINÔCO, Izabelly Cristina Mendes et al. CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES DE PRECIPITAÇÃO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 41, n. 2, p. 397-409, 2019.

TORALES S, RIVAROLA ML, POMPONIO MF, GONZÁLEZ S, ACUÑA CV, FERNÁNDEZ P, LAUENSTEIN D L, VERGA A, HOPP EH, PANIEGO NB, MARCUCCI POLTRI SN. De novo assembly and characterization of leaf transcriptome for the development of functional molecular markers of the extremophile multipurpose tree species *Prosopis alba*. **BMC Genomics** 14: 705, 2013.

TURCHETTO-ZOLET, A.C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C.M.; PASSAIA, G. Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações –Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 2017.181 p.

WANG, Yan et al. Identification and characterization of expressed TIR-and non-TIR-NBS-LRR resistance gene analogous sequences from radish (*Raphanus sativus* L.) de novo transcriptome. **Scientia horticultrae**, v. 216, p. 284-292, 2017.

ZHANG, Lei et al. Analysis of three types of resistance gene analogs in PmU region from *Triticum*. **Journal of integrative agriculture**, v. 17, n. 12, p. 2601-2611, 20



## II OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Contribuir com informações genético-moleculares em populações de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC, por meio da análise da diversidade e estrutura genética a partir de marcadores análogos a genes de resistência, bem como subsidiar estratégias para a conservação e melhoramento genético.

### 2.2 Objetivos Específicos

- (i) Coletar acessos de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC, presentes na Mesorregião do Centro-Sul Baiano;
- (ii) Comparar a eficiência na extração de DNA genômico de sete protocolos para espécies vegetais em *Prosopis juliflora* (Sw.) DC;
- (iii) Caracterizar o perfil de amplificação de diferentes combinações de primers RGA e selecionar as combinações mais adequadas para subsidiar estudos genéticos em *Prosopis juliflora* (Sw.) DC;
- (iv) Estimar a diversidade e estrutura genética de populações de *Prosopis juliflora* (Sw) DC, por meio de marcadores moleculares RGAs.

### III CAPITULO I

Manuscrito publicado na revista Biotemas

DOI: 10.5007/2175-7925.2021.e76552

#### **Análise comparativa de protocolos para extração de DNA genômico em *Prosopis juliflora* (Sw.) DC**

**RESUMO:** Objetivou-se comparar a eficiência entre sete protocolos adaptados para a extração de DNA genômico da espécie *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. Os protocolos utilizados tiveram como base em seus tampões: SDS 10%; CTAB 5%; Sorbitol, CTAB 3% e Sorbitol; SDS 0,7% e NaCl; CTAB 2%; CTAB 2% e NaCl 1,4M. Em todos os testes, eliminou-se o uso de  $\beta$ -mercaptoetanol, nitrogênio líquido, proteinase K e RNAses. As amostras consistiram de primórdios folhares de cada espécime em triplicata. A quantidade e a qualidade do DNA extraído foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose a 1% e da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro. Para as reações de amplificação, utilizou o iniciador ISSR. Entre os tampões de extração testados, os de SDS 10%, de CTAB 5% e de CTAB 3% e Sorbitol foram os mais eficientes para *P. juliflora*. Desses três protocolos, o CTAB 3% e Sorbitol apresentaram melhor nível de pureza apesar da menor quantidade de DNA (123 ng/ $\mu$ L) se comparado aos tampões de SDS 10% e de CTAB 5% (312 e 321 ng/ $\mu$ L, respectivamente, e com alto teor de contaminantes). Conclui-se que é possível o uso de protocolos de extração sem aditivos nocivos à saúde e com menor custo no processo de extração.

**Palavras chave:** Ácidos nucleicos, Algaroba, Genética molecular, PCR

**ABSTRACT:** Comparative analysis of protocols for genomic DNA extraction in *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. The objective of the present research was to compare the efficiency among seven protocols adapted for the extraction of genomic DNA from the species *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. The protocols used were based on their buffers:

SDS 10%, CTAB 5%, Sorbitol, CTAB 3% and Sorbitol, SDS 0.7% and NaCl, CTAB 2%, CTAB 2% and NaCl 1.4M. In all tests, the use of  $\beta$ -mercaptoethanol, liquid nitrogen, proteinase K and RNAses was eliminated. The samples consisted of leaf primordia in each specimen in triplicate. The quantity and quality of the extracted DNA were evaluated by electrophoresis in 1% agarose gel and by reading the absorbances in a spectrophotometer. For amplification reactions, the ISSR primer was used. Among the tested extraction buffers, SDS 10%, CTAB 5% and CTAB 3%, and Sorbitol were the most efficient for *P. juliflora*. Of these three protocols, CTAB 3% and Sorbitol showed a better level of purity despite the lower amount of DNA (123 ng/ $\mu$ L) compared to 10% SDS and 5% CTAB buffers (312 and 321 ng/ $\mu$ L, respectively, and high content of contaminants). We conclude that it is possible to use extraction protocols without additives that are harmful to human health and at a lower cost in the extraction process.

**Keywords:** Algaroba; Molecular genetics; Nucleic acids; PCR

### 3.1 INTRODUÇÃO

*Prosopis juliflora* (Sw.) DC é, conforme The Legume Phylogeny Working Group (Lpwg, 2017), uma espécie arbórea, da família das leguminosas (Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae). Originária da região tropical andina e bem adaptada às regiões semi-áridas de baixa precipitação. Popularmente conhecida como algaroba ou algarobeira, essa espécie possui diversos usos, bem como importância econômica (Dos Santos; Diodato, 2017), entre eles: a alimentação humana e de animais, a produção de madeira e a recuperação de áreas degradadas. Pode, ainda, ser utilizada, entre outras possibilidades, como inseticida, analgésico, anti-helmíntico, antibiótico, probióticos e como suplemento nutricional (Ahirwal et al., 2017; Henciya et al., 2017; Dhivya et al., 2018).

Embora a espécie possua muito potencial de uso pelo ser humano e estudos de diversidade genética sejam o ponto de partida para se efetivar ações de conservação e de melhoramento de espécies com potencial econômico (Lopes et al., 2011; Bessega et al., 2018; Faleiro et al., 2018), pouco se conhece quanto à diversidade genética de *P. juliflora*. Para estudos dessa natureza, faz-se necessário a obtenção de ácidos nucleicos, em quantidades e

qualidades que possibilitem a amplificação do material genômico (Michel-López et al., 2013), e a seleção de iniciadores potenciais.

O processo de extração de DNA é parte fundamental em estudos moleculares, sendo sua eficiência diretamente relacionado à quantidade e à qualidade do material genômico obtido (Da Rocha et al., 2017). A extração de DNA de tecidos vegetais requer protocolos específicos devido à presença de metabólitos secundários e polissacarídeos comuns a cada espécie. Portanto, a adequação de protocolos é indispensável para obtenção de DNA puro e íntegro e para melhor eficiência na amplificação do material genômico em estudos moleculares (Oliveira et al., 2017; Dias et al., 2018).

Pelas razões apresentadas nos parágrafos anteriores, a realização de estudos associados à proposição, comparação, seleção e otimização de protocolos para extração de ácidos nucleicos em diferentes espécies tem sido reportada na literatura (Oliveira et al., 2015; Matos-Oliveira et al., 2017; Dias et al., 2018). Porém, para a algaroba, estudos de estabelecimento de protocolo e seleção de iniciadores ainda são incipientes. Diante do exposto, objetivou-se comparar a eficiência na extração de DNA genômico de sete protocolos para espécies vegetais em *Prosopis juliflora* (Sw.) DC.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta das amostras foliares de três espécimes de *P. juliflora* foi realizada no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano (IF Baiano), em Itapetinga, Bahia, Brasil (coordenadas geográficas: 15°14'38,57"S, 40°13'38,95"W), em um ecótono de Caatinga e floresta estacional decidual e semidecidual. As amostras encontram-se cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado – SisGen (número: AFF0E34).

O material vegetal foi condicionado em isopor com gelo e transferido para o Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA), da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB, campus Juvino de Oliveira), no município de Itapetinga, Bahia, onde foi armazenado em freezer -18°C e, posteriormente, foram realizadas as extrações do DNA.

Os testes de extração de DNA genômico foram realizados de acordo com sete protocolos previamente publicados, com modificações apresentadas na Tabela 1. Para todos os protocolos, foram realizadas três extrações em duplicata. A maceração das folhas

prosseguiu-se de 0,4 g de tecido foliar e 3 mL de solução tampão referente a cada protocolo, sendo conduzido com auxílio de almofariz e pistilo em temperatura ambiente até total rompimento das estruturas foliares. Portanto, não houve adição de nitrogênio líquido,  $\beta$ -mercaptoetanol, proteinase K e RNAses em nenhum dos protocolos, respectivamente. As padronizações do material genômico foram obtidas por meio da ressuspensão em 60  $\mu$ L de água ultrapura (q.s.p.).

**Tabela 1:** Descrição dos protocolos utilizados para os testes de extração de DNA genômico de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC

Protocolos	Referências	Tampão de Extração	Modificações
P1	Sunnucks e Hales (1996)	SDS* 10%	Proteinase K
P2	Doyle e Doyle (1990)	CTAB** 5%	Nitrogênio líquido, $\beta$ -mercaptoetanol, RNase
P3	Método modificado por Štorchová et al. (2000)	Sorbitol	$\beta$ -mercaptoetanol
P4	Método modificado por Russell et al. (2010)	CTAB* * 3% e Sorbitol	Nitrogênio líquido, $\beta$ -mercaptoetanol, RNase
P5	Mogg e Bond (2003)	SDS* 0,7% e NaCl 500 mM	Proteinase K e RNase
P6	Barnwell et al. (1998)	CTAB 2%	Nitrogênio líquido
P7	Método modificado por Silva et al.(2014)	CTAB* * 2% e NaCl 1,4M	Nitrogênio líquido, $\beta$ -mercaptoetanol, RNase, Proteinase K

\* *Sodium Dodecyl Sulfate*. \*\* *Cetyl Trimethylammonium Bromide* Modificações: Reagentes não utilizados no referido protocolo de extração.

Os ácidos nucleicos foram quantificados por espectrofotometria nas razões de absorvância em ng/ $\mu$ L a,  $A_{260/230}$  e  $A_{260/280}$ , utilizando o *BioDrop*®  $\mu$ LITE (*Whitehead Scientific*). Para melhor atribuição dos resultados, as amostras foram avaliadas também em gel de agarose a 1% (m/v) corado com *GelRed*® (*Biotium*) e corrida em solução TBE 0,5X (Tris-Ácido Bórico-EDTA) durante 90 min a 90 V. Os resultados foram comparados com o marcador de peso molecular (DNA Lambda; *Invitrogen*) nas concentrações de 25 e 75 ng/ $\mu$ L. O gel foi visualizado em luz UV e registrado em sistema de fotodocumentação Kodak (*KODAK MI Software*). De posse das leituras espectrofotométricas, mensurou-se as médias e o desvio-padrão com o auxílio do Software *BioEstat*® 5.0 (Ayres et al., 2007).

Para avaliar a qualidade e a viabilidade de uso do DNA, eles foram submetidos à amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando o marcador molecular tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) DiCA3'RG (5' - CAC ACA CAC ACA CAC ARG-3'). As amplificações foram realizadas com a seguinte programação: 1) desnaturação: 5 minutos a 94°C; 2) 35 ciclos: desnaturação – 50 segundos a 94°C; anelamento – 50 segundos a 48°C e extensão – 1 minuto a 72°C; e 3) extensão final: 5 minutos a 72°C. Os padrões de amplificação foram avaliados por eletroforese a 120 minutos, sob uma corrente elétrica de 120 V em gel de agarose a 2% (m/v), com solução de corrida TBE 0,5X (Tris-Ácido Bórico-EDTA). As ampliações foram comparadas com o marcador tamanho (1 kb plus; *Invitrogen*) e os resultados visualizados e registrados conforme acima descrito.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA genômico da espécie *Prosopis juliflora* (Sw.) DC apresentou pureza média de  $0,56^{\pm 0,17} A_{260}/A_{230}$  e  $1,16^{\pm 0,15} A_{260}/A_{280}$  (Tabela 2).

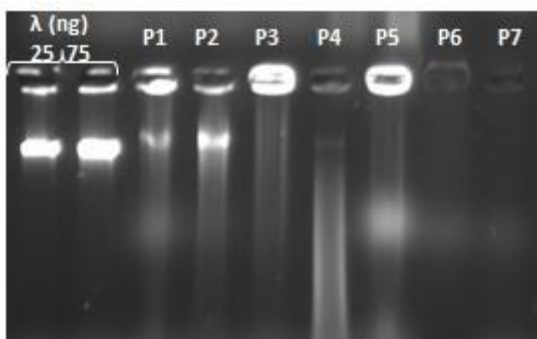
Os protocolos o P1, P2 e P4 (SDS 10%, CTAB 5% e Sorbitol) apresentaram melhores performances para a espécie, sendo que o tampão SDS 10% e o CTAB 5% apresentaram boa concentração de DNA (312 e 321 ng/μl), porém com alto teor de contaminantes. Já o CTAB 3% e Sorbitol apresentou menor quantidade de DNA (123 ng/μL), mas se destacou em nível de pureza. Dos testes, o protocolo P6 (CTAB 2%) apresentou-se menos eficiente.

Conforme os resultados observados com a eletroforese, foi possível identificar diferença na eficiência da extração de DNA genômico de *P. juliflora* entre os protocolos (Figura 1). A partir dos resultados observados para os protocolos P1 (SDS 10%), P2 (CTAB 5%) e P4 (CTAB 3% e Sorbitol), foi possível verificarem relação aos valores de baixa pureza estimada a partir de todos os protocolos, a presença de marcas (DNA) definidas, as quais não foram observadas nos demais protocolos. Na amplificação com o marcador tipo ISSR, (CA)8RG, observou-se a eficiência dos protocolos P1 (SDS 10%), P2 (CTAB5%) e P4 (CTAB 3% e Sorbitol), o que confirma o sucesso desses protocolos para a extração de DNA (Figura 2).

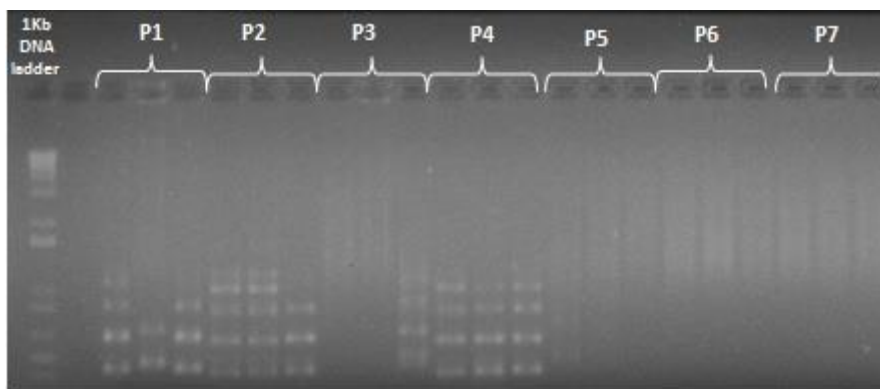
**Tabela 2:** Quantificação e pureza de DNA genômico de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC a partir das absorbâncias obtidas por espectrofotômetro

Protocolos	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	Concentração (ng/ $\mu$ l)
	Média $\pm$ dp*	Média $\pm$ dp*	Média $\pm$ dp*
P1	0,421 $\pm$ 0,154	1,191 $\pm$ 0,353	312,25 $\pm$ 152,69
P2	0,808 $\pm$ 0,204	1,343 $\pm$ 0,170	321,333 $\pm$ 118,88
P3	0,399 $\pm$ 0,044	1,298 $\pm$ 0,073	415,400 $\pm$ 252,55
P4	1,344 $\pm$ 0,341	1,759 $\pm$ 0,041	123,655 $\pm$ 71,89
P5	0,295 $\pm$ 0,080	0,965 $\pm$ 0,176	130,482 $\pm$ 110,84
P6	0,220 $\pm$ 0,143	0,440 $\pm$ 0,169	48,635 $\pm$ 12,375
P7	0,476 $\pm$ 0,257	1,155 $\pm$ 0,119	263,417 $\pm$ 168,39

dp\*: Desvio Padrão



**Figura 1:** DNA genômico de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC obtido a partir dos protocolos de extração. \*  $\lambda$ - DNA Lambda nas concentrações de 25 e 75 ng/ $\mu$ l.



**Figura 2:** Padrão de amplificação dos fragmentos de DNA genômico de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC obtidos por meio de sete protocolos de extração e avaliados com o iniciador ISSR – 5' (CA)<sub>8</sub>RG 3'. \* 1kb DNA Ladder

Para que o DNA seja considerado puro, ele deve apresentar uma razão de absorvância  $A_{260}/A_{280}$  média de 1,8 (Nelson; Cox, 2004), o que de fato não ocorreu nas extrações realizadas, cujas razões de absorvância média  $A_{260}/A_{280}$  variaram de 0,44 a 1,76. O mesmo foi observado para a quantificação, pois, para amostras isentas de RNA, esperavam-se valores  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,8 e 2,0, sendo o valor obtido abaixo do esperado para todos os protocolos. Esse fato pode ser explicado pela ausência de RNase nos protocolos. Em relação à absorvância  $A_{260}/A_{230}$ , que é um indicador secundário de pureza do DNA, seus resultados inferem a presença de fenol e clorofórmio e de acordo as especificações do fabricante do *BioDrop*®  $\mu$ LITE, para considerar o DNA “puro”, os valores desta absorvância devem estar entre 2,0 e 2,2. Ademais, é sabido que o gênero *Prosopis* inclui árvores com altos níveis de polissacarídeos, compostos fenólicos e outros constituintes químicos (Rathore, 2009), sendo provável que tais compostos secundários tenham relação direta com os baixos valores observados para as razões ( $A_{260}/A_{230}$ ) de absorvância.

A obtenção de DNA de boa qualidade tem impacto direto sobre os resultados de técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Sendo que os procedimentos de extração de DNA devem proporcionar uma eficiente lise das células para liberação dos nucleotídeos e uma adequada remoção de proteínas, restos celulares e de organelas. Na amplificação do DNA com o marcador tipo ISSR, a principal vantagem observada para os procedimentos foi a ausência de nitrogênio líquido e do  $\beta$ -mercaptoetanol. Os quais conferiram baixo custo e maior segurança operacional, uma vez que esse último reagente é



tóxico e acarreta vários prejuízos à saúde humana. O  $\beta$ -mercaptoetanol se caracteriza por ser um antioxidante muito utilizado em protocolos de extração do DNA genômico em plantas (Ausubel et al., 2005). Entretanto, sua remoção não inviabilizou a extração de DNA em quantidade e qualidade necessárias para uso em reação de PCR quando se utilizou os protocolos com tampão CTAB5%, CTAB 3% e Sorbitol. Outros estudos corroboram esses resultados, demonstrando não haver necessidade da utilização do  $\beta$ -mercaptoetanol na extração de DNA (Schmitt et al., 2014; Silva et al., 2014).

A utilização de nitrogênio líquido no processo de extração de DNA possibilita uma melhor neutralização enzimática e favorece o rompimento do envoltório celular. Em contrapartida, sua utilização eleva os custos do procedimento. No presente estudo, a ausência de nitrogênio líquido não foi determinante para a qualidade e quantidade do DNA extraído, os quais apresentaram resultados satisfatórios para utilização em plataforma de PCR. Outros estudos reportaram que a ausência de nitrogênio líquido no processo de maceração torna custo operacional menos oneroso (Michel-López et al., 2013; dos Santos; Araújo, 2017).

### **3.4 CONCLUSÃO**

Os resultados apresentados possibilitaram a seleção de três dos protocolos de extração de DNA genômico: SDS10%, CTAB5% puro e CTAB 3% com Sorbitol. Esses métodos foram propostos por Sunnucks e Hales (1996), Doyle e Doyle (1990) e por Russell et al. (2010). Por fim, este estudo certifica que a utilização desses protocolos com adaptações metodológicas reduz os insumos nocivos à saúde humana e o custo elevado, podendo ser utilizados em estudos de diversidade genética de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- Ausubel, F., R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith y K. Struhl. (2005). **Current Protocols in Molecular Biology**, tomo 1-4. Greene & John Wiley, New York, E.E.U.U.
- Ayres, M., Ayres Júnior, M., Ayres, D. L. & Santos, A. S. (2007). BioEstat 5.0: **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamiraná.
- Barnwell, P., Blanchard, A. N., Bryant, J. A., & Smirnoff, N. (1998). Isolation of DNA from the highly mucilaginous succulent plant *Sedum telephium*. **Plant Molecular Biology Reporter**, 16, 33-138.
- Bessega, C., Pometti, C., López, R. P., Larrea-Alcázar, D., Fortunato, R. H., Saidman, B., & Vilardi, J. C. (2018). Genetic diversity and differentiation among *Prosopis alba* (Leguminosae) populations from dry valleys of Bolivia with different levels of human disturbance and altitude. **Ecology and evolution**, 8(22), 11309-11321.
- Da Rocha, Vinicius Delgado et al. Efeito da idade da folha na qualidade do DNA extraído de *Piper aduncum* L. **REVISTA DE CIÊNCIAS AGROAMBIENTAIS**, v. 15, n. 2, p. 218-222, 2018. DOI: 10.5327/Z1677-606220172072
- Demeke, T., & Jenkins, R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 396(6), 1977-1990.
- Dias, Cibelle Santos et al. Comparação de protocolos para extração de DNA genômico de *Calotropis procera* Ait. R. Br.(Apocynaceae: Asclepiadoideae). **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 13, p. 277-281, 2018.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12, 13-15.
- Matos-Oliveira, C. F., Rocha S. O., Dias, C. S., Santos, E. S. L., & Cerqueira-Silva, C. B. M. (2017). Comparação de protocolos para extração de DNA genômico da espécie *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, 14 (25), 66-76.
- Michel-López, C. Y., González-Mendoza, D., & Grimaldo-Juarez, O. (2013). Fast protocol for extraction of DNA from *Prosopis* spp leaves (plant adapted to arid environment) without liquid nitrogen. **Genetics and Molecular Research**, 12(3), 4090-4094.
- Mogg, R. J., & Bond, J. M. (2003). A cheap, reliable and rapid method of extracting high-quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, 3, 666-668.
- Rathore M. (2009). Nutrient content of important fruit trees from arid zone of Rajasthan. **J. Hortic. For.** 1: 103-108.

Ribaski, J, Drumond, MA, Oliveira, VR, Nascimento, CES. 2009. Algaroba (*Prosopis juliflora*): árvore de uso múltiplo para a região semiárida brasileira. Colombo, PR: **Embrapa Florestas**, Comunicado Técnico, 240p

Rodrigues, L. C. et al. Conhecimento e uso da carnaúba e da algaroba em comunidades do Sertão do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Revista Árvore**, v. 37, n. 3, p. 451-457, 2013. DOI: 10.1590/s0100-67622013000300008.

Russell, A.; Samuel, R.; Rupp, B. E.; Barfuss, M. H. J. (2010). Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. **Taxon**, 59, 389-404.

Santos, J., & Diodato, M. (2017). Histórico da implementação da algaroba no Rio Grande do Norte. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 37(90), 201-212. doi:<https://doi.org/10.4336/2017.pfb.37.90.859>

Santos, Edyane Moraes Dos; Araújo, Raimundo Reis.(2017). Testes de comparação de protocolos de extração de DNA e de maceração de tecido de *Platonia insignis* Mart.(Clusiaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 4.

Silva, B. M., Dalbosco, E. Z., Botini, N., Faria, R. B., & Rossi, A. A. B. (2014). Protocolo para extração de dna genômico de *Anacardium giganteum* W. Hancock Ex Engl. (Anacardiaceae). **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer, 10(19), 2401.

Štorchová, H., Hrdliková, R., Chrtěk, J., Tetera, M., Fitze, D., Fehrer, J. (2000). An Improved Method of DNA Isolation from Plants Collected in the Field and Conserved in Saturated NaCl/CTAB Solution. **Taxon**, 49 (1), 79-84.

Sunnucks, P., & Hales, D. F. (1996). Numerous Transposed Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I-II in Aphids of the Genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular Biology and Evolution**, 13(3), 510-524.

Oliveira, L. C.; Rodrigues, D. P.; Hopkins, M. J. G. The effects of leaf age on the quality of DNA extracted from *Parkia* R.Br. (Fabaceae) occurring in the Central Amazon. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 2, p. 22-28, 2017.

## IV - CAPITULO II

Manuscrito publicado na revista Acta Scientiarum Biotechnology

DOI: 10.4025/actascitechnol.v43i1.51983

### **Characterization and selection of markers associated with resistance analogous genes as input for genetic analysis of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC**

**ABSTRACT:** The characterization and selection of molecular markers are important for genetic pre-breeding programs since they make it possible to choose the most appropriate markers to be used in future research. Therefore, enabling the generation of subsidies for genetic-molecular studies in algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). The amplification profile was characterized. It was generated from 17 pairs of RGA primers (*Resistance Gene Analogs*) in 20 samples of genomic DNA of *P. juliflora* extracted from specimens collected in the city of Itapetinga, Bahia. The amplifications were performed according to previously published laboratory routines and the amplification profiles analyzed from the photodocumentation of the electrophoresis results in 2% agarose gels. Based on the amplification profiles the primer pairs were classified as: Suitable: amplifications in the whole samples and with easy visualization; Reasonable: amplification in parts of the samples and/or difficult to visualize or Inadequate: absence of visible amplification products. Descriptive analyzes associated with the number of generated markers, percentage of polymorphism, expected heterozygosity (*He*) and the content of polymorphic information (PIC) were also performed. In a nutshell, 12 out of the 17 pairs of RGA primers generated amplification products with easy visualization and only two of these 12 pairs of primers were monomorphic. The percentage of polymorphism varied from 60% to 100%, *He* and PIC presented an average of 0.21 (ranging from 0 to 0.38) and 0.17 (ranging from 0 to 0.29), respectively. The results confirm that the RGA primers present adequate characteristics for genetic studies in *P. juliflora*, making it possible to prioritize 12 pairs of primers, which are subject to genetic improvement studies.

**Keywords:** RGA primers, Algaroba, PCR

## 4.1 INTRODUCTION

The species *Prosopis juliflora* (Sw.) DC, popularly known as algaroba, belongs to the family Fabaceae, subfamily Mimosoideae. It is a tree species, native to Central and South America, inserted in Brazil in the 1942s, adapting well to semi-arid regions (Leão, Almeida, Dechoum, & Ziller, 2011; Cunha & Gomes, 2012). Algaroba has diverse potential for human and animal feeding, as well as for wood production, soil protection, afforestation and pasture shading (Ribaski, Drumond, Oliveira, & Nascimento, 2009; Rodrigues, Silva, Silva, Oliveira, & Andrade, 2013).

Although the algaroba has ecological and economic importance, there are still few genetic and molecular studies related to estimates of its diversity and genetic structure. However, this knowledge is a prerogative both for the elaboration of strategies for sustainable management and conservation of genetic resources as well as for the advancement of breeding programs (Faleiro, Amabile, & Cerqueira-Silva, 2018).

The use of molecular markers in studies of genetic diversity is widely accepted and used, among other factors, due to the reliability and reproducibility of the results (Souza, 2015; Pomponio et al., 2015). Several molecular markers are used in genetic characterization studies, both for phylogenetic and evolutionary applications, as well as for practical purposes in breeding programs and conservation actions (Rai, Shekhawat, Kataria, & Shekhawat, 2017; Bessega et al., 2019). The genetic diversity study of *Prosopis cineraria* L. and *Prosopis juliflora* (Sw.) DC L. using ISSR and RAPD markers is an example of research of this nature that contributes to the understanding of the intra-specific diversity in the genus *Prosopis* (Elmeer & Almalki, 2011).

For genetic diversity studies, the crucial step, after identification and collection of the sample population, is the definition of the molecular markers to be used in it. In this context, the characterization and selection of primers contribute to cost reduction and to optimize the time spent before the evaluation of the entire population, thus avoiding the use of primers unsuitable for the target species (Silva, Freitas, Santos, Cardoso, & Cerqueira-Silva, 2018).

Among the molecular markers used in genetic studies of plants are the RGA (Resistance Gene Analogs). These are markers associated with regions considered rich in leucine and nucleotide binding sites (Nucleotide Binding Site Leucine Rich Repeat - NBS-

LRR). In plants, these NBS-LRR domains have their function associated with disease resistance as a response to hypersensitivity and the LRR domain, specifically, they are responsible for the primary recognition of possible pathogens, causative agents of cell damage (Jones & Dangl, 2006).

In addition, RGA primers are also useful in genetic studies related to diversity estimates, genetic mapping (Paula, Fonseca, Boiteux, & Peixoto, 2010; Carmo, Martins, Musser, Silva, & Santos, 2017) and genomic marker selection (Fritsche-Neto, Resende, Miranda, & DoVale, 2012). The main advantage of this marker is the possibility of using it without necessarily requiring previous information about the genome of the species to be evaluated, being easily manipulated and having greater reproducibility (Borém & Caixeta, 2009).

Considering the present context, the objective was to characterize the amplification profile of different combinations of RGA primers and to select the most appropriate combinations to support genetic studies in *Prosopis juliflora* (Sw.) DC.

## **4.2 MATERIAL AND METHODS**

### **Collection of samples**

Leaf samples of 20 *Prosopis Juliflora* (Sw.) DC. specimens were collected at the Federal Institute of Bahia (IFBA) in Itapetinga, Bahia, Brazil. These specimens are located in the following geographical coordinates: Latitude 15 ° 14'38.57 "S and Longitude 40 ° 13 '38.95" W and are registered in the National System for Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge - SisGen, under the registration number AFF0E34.

The vegetation of the region where the IFBA of Itapetinga is located is characterized as ecotone between Caatinga and Deciduous and Semi-deciduous Seasonal Forest. The plant material was taken to the Laboratory of Applied Molecular Genetics (LGMA) of the State University of the Southwest of Bahia (UESB, Juvino de Oliveira campus), in the municipality of Itapetinga, where they were stored in a freezer at -20 ° C until extraction Genomic DNA.

### **Nucleic Acid Extraction**

The extraction of genomic DNA was performed by the method proposed by Sunnucks and Hales (1996), and 0.4g of *P. juliflora* young leaf tissue was macerated using 3.0 ml SDS (sodium dodecyl sulfate) buffer without addition of liquid nitrogen and  $\beta$ -mercaptoethanol. DNA quantification was performed from horizontal electrophoresis on 1% (w / v) agarose gels stained with 0.2% w v<sup>-1</sup> of Red Invitrogen Gel Biotium<sup>®</sup>, compared to a number of known concentrations of DNA phage lambda Invitrogen<sup>®</sup> ( $\lambda$ ). The purity of the DNA was estimated by spectrophotometric reading ( $A_{260 / 230}$  and  $A_{260 / 280}$  absorbance ratios) using *BioDrop  $\mu$ LITE* (Whitehead Scientific). Subsequently samples of the genomic DNA were standardized in 2 ng.  $\mu$ L<sup>-1</sup> and stored in a freezer -20 ° C.

### **Characterization of molecular markers**

The characterization of the markers was performed in two steps sequentially. The first step consisted in characterizing and classifying the amplification profiles of the 17 pairs of RGA primers (Table 1) for a set of five DNA samples, being: Adequate - amplifications in all the samples and with easy visualization; Reasonable - amplification in parts of the samples or difficult to visualize and Inadequate - absence of visible amplification products. For the second stage, the pairs of primers classified as "Adequate" in the first step were selected, and the amplification profiles observed in another 15 *P. juliflora* samples were evaluated, totaling 20 individuals used.

Polymerase chain reaction (PCR) reactions were performed with the volume of 16  $\mu$ L, containing 8  $\mu$ L of DNA at 2 ng, 1  $\mu$ L of each primer, 0.11  $\mu$ L Taq DNA Polymerase, 1  $\mu$ L of each dNTP mix, 0.25  $\mu$ L each, 1  $\mu$ L Magnesium Chloride ( $MgCl_2$ ), 1.7  $\mu$ L 10X Buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.4] and 50 mM KCl) and 2.19  $\mu$ L sterile H<sub>2</sub>O. The reactions were subjected to 35 cycles of amplification after initial denaturation at 95 ° C for 1 minute. Each cycle consisted of 40 seconds at 95 ° C, 1 minute at 37 ° C and 1minute and 20 seconds at 72 ° C for annealing and extension. At the end of the cycles, a final extension of 5 minutes was performed at 72 ° C. PCR reactions were performed in triplicate on a Veriti 96 Well Thermal Cycler thermal cycler (Applied Biosystems<sup>®</sup>).

**Table 1.** Description of the 17 pairs of RGA (*Resistance Gene Analogs*) primers tested on algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC)

Pairs	Code	Sequences 5'- 3'	References
1	S1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACGYCT	Leister et al.,1996
	NBSr1	AGTTGTRAYDATDAYYYTRC	Yu et al., 1996
2	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC	Leister et al.,1996
	As1	CAACGCTAGTGGCAATCC	
3	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC	Leister et al.,1996
	As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC	
4	NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC	Yu et al., 1996
	As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC	Leister et al.,1996
5	S1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG	
	As1	CAACGCTAGTGGCAATCC	
6	S1	GGT GGGGTT GGAAGACAACG	Leister et al.,1996
	As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC	
7	S1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG	Leister et al.,1996
	As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC	
8	NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC	Yu et al., 1996
	NBRs1	YCTAGTTGTRAYDATDAYYYTRC	
9	NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC	Leister et al.,1996
	As1	CAACGCTAGTGGCAATCC	
10	NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC	Yu et al., 1996
	As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC	Leister et al.,1996
11	RGA1f	AGTTTATAATTYSATTGCT	Kanazin et al., 1996
	RGA2r	CACACGGTTTAAAATTCTCA	
12	RGA1f	AGTTTATAATTYSATTGCT	Kanazin et al., 1996
	RGA5r	TCAATCATTCTTTGCACAA	
13	RGA1f	AGTTTATAATTYSATTGCT	Kanazin et al., 1996
	RGA6r	AACTACATTTCTTGCAAGT	
14	RGA1f	AGTTTATAATTYSATTGCT	Kanazin et al., 1996
	RGA8r	CCGAAGCATAAGTTGGTG	
15	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC	Leister et al.,1996
	As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC	
16	As1	CAACGCTAGTGGCAATCC	Leister et al.,1996
	As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC	
17	As1	CAACGCTAGTGGCAATCC	Leister et al.,1996
	As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC	

I= A/T/G/C; D= A/G/T; E=C/G; R= A/G; Y= C/T



Reagents for preparation of the genomic DNA extraction buffer were obtained from Sigma-Aldrich®. RGA markers and oligonucleotides for the PCR reaction, as well as intercalating and molecular weight markers, were obtained from Thermo Fisher Scientific®, supplied by Invitrogen®.

Electrophoresis in 2% (mv<sup>-1</sup>) agarose gels with 0.5X TBE run buffer were performed from 6 µL aliquots of PCR products for 2 hours in 120 V electrical current. The gels was stained with Red Invitrogen Gel Biotium ® which were exposed to the transilluminator (LPIX-EX, Loccus Biotecnologia, Cotias, São Paulo, Brazil) with incidence of ultraviolet light and photo documented.

Specifically for the second step of the characterization of the markers, descriptive analyzes of the amplification profiles were performed using Genes and GenAlex (Cruz, 2013; Peakall & Smouse, 2012) software, considering (i) the number of markers generated, the number and percentage of polymorphic markers (absent in at least one of the samples); the informative potential (PIC), calculated by the formula:  $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1+1}^n 2p_i^2 p_j^2$  proposed by Botstein et al. (1980); (iii) the expected heterozygosity (*He*) for each pair of primers, obtained according to Nei (1987)  $He = 1 - \sum_{p_i} 2$ , where  $p_i$  = estimated allelic frequency of the it allele.

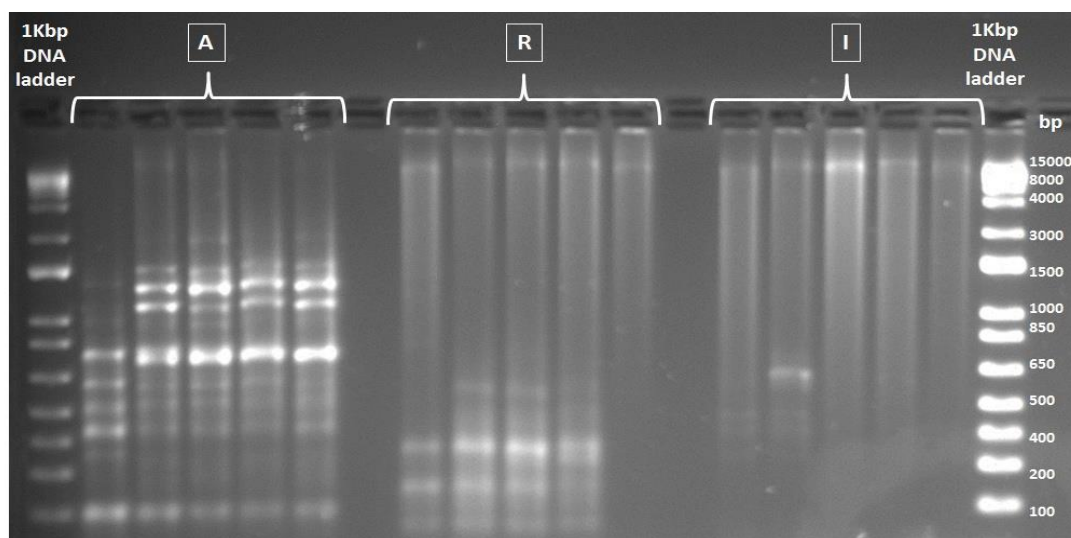
### 4.3 RESULTS AND DISCUSSION

The genomic DNA of the species *Prosopis juliflora* (Sx) PC showed average quality (purity) with ratio A260/A280=1.919<sup>±0.35</sup> and A 260/A230=0.421<sup>±0.15</sup> and average concentration of 321.0<sup>±0.15</sup> ng/µL. The obtained value presented good purity even without having its RNA and proteins digested by RNase and proteinase enzymes. For this observation, the physiological nature of the species was considered, which holds many polysaccharides and phenolic compounds among other chemical constituents that favors low values of purity (Rathore, 2009). Although the absorbances showed values lower than 2.0, they corroborate the literature, because they were over 1.8, in which according to reports, values smaller than these are considered contaminated with proteins (Nelson & Cox, 2004). Therefore, this value is satisfactory, taking into account that we waived the treatment with RNase and proteinase to this species which contributed to the reduction of extraction and

purification cost.

Another important factor which justified the result, is the operationalization of the extraction technique, it was also possible because we did not use  $\beta$ -mercaptoethanol and liquid nitrogen in order to make the extraction less harmful to health. It is known that the use of liquid nitrogen in the DNA extraction process allows for a better enzymatic neutralization and favors the disruption of the cell wrap. However, such use raises the procedure costs. Therefore, in the present study, the absence of liquid nitrogen, it did not interfere with the quality of the extracted DNA, offering good results, which are also in agreement with the literature which advocates a low cost technique and with fewer steps in the procedure (Michel-López et al., 2013; Dos Santos & Araújo, 2017).

Regarding the characterization of the amplification results, 70% of the combinations tested RGA primers were classified as adequate (A) corresponding to primer number 7. In turn, they were classified as reasonable (R), corresponding to primer number 9 and inadequate (I) corresponding to primer number 2, with 12% and 18%, respectively, of the other amplifications observed. Considering that the large majority of RGA primer pairs (82%) made it possible to obtain molecular markers, it demonstrates the potential use of this technique in genetic studies of *P. juliflora* species (Figure 1).



**Figure 1:** Amplification profiles obtained using *Resistance Gene Analogs* (RGA) pairs in *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. \* A = Adequate; R = Regular; I = Inadequate.

The size of the fragments obtained with the RGA primers being considered in regard to two classifications (adequate and reasonable) ranged from 200 to 2.000 bp. These results corroborate Poolsawat, Kativat, Arsakit and Tantasawat (2017), who reported bands between 100 and 2.072 bp when associated with ISSR-RGA primers for *Vigna radiata L. Wilczek*. The 'A' pairs produced 68 markers in the 20 accessions studied, averaging 5.7 markers per primer pair. 10 out of these pairs showed 83% of polymorphic marks. The number of markers generated ranged from one for primer pairs 4 (NBsf1 and As2) and 10 (NBsf1 and As3) to 16 for primer pair 7 (S1 and As3) (Table 2). In turn, the percentage of polymorphism ranged from 60% for primer pair 14 (RGA1f and RGA8r) to 100% for primer pair 17 (As1 and As3) (Table 2).

Table 2. Characterization of the amplification profile of genomic regions of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. from 12 pairs of RGA (*Resistance Gene Analogs*) primers that presented adequate to 20 specimens.

Oligonucleotides Pairs	Markers generated	% Polymorphism	<i>He</i>	PIC
1	5	80	0.25	0.2
4	1	0	0	0
6	9	88.9	0.29	0.24
7	16	93.5	0.3	0.24
8	5	80	0.17	0.15
10	1	0	0	0
11	6	83.3	0.18	0.15
12	5	80	0.38	0.29
13	4	75	0.2	0.17
14	5	60	0.23	0.18
16	3	66.7	0.21	0.18
17	8	100	0.31	0.26
Total	68	-	-	-
Mean	5.7	67.3	0.21	0.17

*He*: Heterozigosidade esperada; PIC: Conteúdo de Informação Polimórfica

As to the expected heterozygosity (*He*), considering the pairs of suitable primers selected for algaroba, a mean of 0.21 (ranging from 0 to 0.38) was observed. While the polymorphic information content (PIC) was 0.17 and ranged from 0 to 0.29. Variations of this

nature aid in the selection of primers to be used in genetic studies. In algaroba for example, the combinations of these primers contributed to this selection, in which presented satisfactory values (Table 2). The variation observed in the efficiency of the amplifications, both with respect to identification of pairs of primers unsuitable for *P. juliflora*, and relative to the number of markers, percentage of polymorphism and other descriptive variables (Table 2), reinforce the importance of studies dedicated to the characterization and selection of primers.

In genotypes of *Passiflora* sp. (passion fruit) for example, Paula et al. (2010) used six pairs of RGA primers and obtained an average of 16.5 markers per primer pair.

Other studies with the same markers the RGAs of the present study were also carried out for passion fruit species. These described adequate amplification with 100% polymorphism for *Passiflora* Spp. (Souza et al., 2020). In *Passiflora setacea*, they registered polymorphism ranging from 99 to 100% (Pereira, Corrêa, & Oliveira, 2015). According to the authors, although the primers are adequate and with good amplification, the expected heterozygosity inferred in these two studies was low. This observation emphasizes that the RGA initiators can be used as a biomarker of genetic diversity, since the low heterozygosity is related to the domestication and adaptation of genotypes in an *ex situ* environment, to examples of accessions maintained in germplasms with good vegetative propagation and not the quality of molecular marker (Pires & Kageyama, 1985). Thus, the heterogeneity presented by the variation in the number of polymorphic loci between the pairs of RGA, favors studies of this nature, being useful in molecular genetic diagnostics.

Variations of the percentage of polymorphic profiles in RGA primers are also observed in other species, such as in *Croton linearifolius* MULL. ARG, where a total of 24 pairs of RGA primers generated 73 marks and 14 combinations showed polymorphic marks (Silva et al., 2018). Studies with other species of *Prosopis* sp. were also realized with other classes of molecular markers. From the selection of 80 pairs of RAPD, in study of the natural population of *Prosopis cineraria* (L.) Druces, only nine pairs were polymorphic (Sivalingam, Samadia, Singh, & Chauhan, 2016). Another study also analyzed the diversity between *Prosopis cineraria* (L.) Druce and *Prosopis juliflora* Sw. DC. populations collected at different sites in Qatar in Asian continent using other primers like ISSR and RAPD markers, where Elmeer and Almalki (2011) found a total of 190 bands in 29 ISSR primers and 19 bands of 7 RAPD primers with an average polymorphism of more than 99% in all genotypes,

being able to distinguish between the two species. Nevertheless Alves et al. (2018), researching *Prosopis rubriflora* Hassl. and *Prosopis ruscifolia* Griseb. with microsatellites reported similar genetic diversity between species ( $He = 0.59$  and  $He = 0.60$ , respectively).

Already to the specie in study, the *P. juliflora*, Pires and Kageyama (1985) mentioned the possibility of inbreeding in this species during its adaptation, justifying the low expected heterozygosity compared to the species above. Despite the widespread use of molecular markers and the already proven efficiency of RGA markers in different genetic approaches, the results presented are pioneering for *Prosopis juliflora* Sw. DC. Thus, it is expected that the 12 pairs of RGA primers used in this study will subsidize genetic research, especially actions to characterize diversity that contribute to the improvement and conservation of the naturalized species. Finally, it is suggested for future works the sequencing for primers design of the fragments obtained by 7 and 12 pairs of primers which presented the highest indexes of polymorphic bands and information (Table 2) (George, Manoharan, Li, Britton, & Parida, 2017). Thus, it will be possible to better understand the distribution, adaptation as well as the resistance of the algaroba specie to abiotic factors.

#### 4.4 CONCLUSION

The twelve pairs of Resistance Gene Analogs (RGA) primers (S1 + NbSr1 = 1); Bsf1 + As2 = 4; S1 + As2 = 6; S1 + As3 = 7; NBsf1 + NBrs1 = 8; NBsf1 + As3 = 10; RGA1f + RGA2r = 11; RGA1f + RGA5r = 12; RGA1f + RGA6r = 13; RGA1f + RGA8r = 14; As1+As2 = 16 e As1 + As3 = 17) presented satisfactory polymorphism and pairs 7 and 12 can be used to genetic study and genetic improvement.

#### 4.5 REFERENCES

Alves, F. M.; Sartori, Â. L.; Zucchi, M.L.; Azevedo- Tozzi, A.M.; Tambarussi, E.V. Alves-Pereira, A.; & de Souza, A. P (2018). Genetic structure of two *Prosopis* species in Chaco areas: a lack of allelic diversity diagnosis and insights into the allelic conservation of the affected species. **Ecology and evolution**, 8(13), 6558-6574. doi: 10.1002/ece3.4137

Bessega, C., Cony, M., Saidman, B. O., Aguiló, R., Villagra, P., Alvarez, J. A., ... & Vilardi, J. C. (2019). Genetic diversity and differentiation among provenances of *Prosopis flexuosa* DC (Leguminosae) in a progeny trial: Implications for arid land restoration. **Forest Ecology and Management**, 443, 59-68. doi: 10.1016/j.foreco.2019.04.016

Borém, A.; Caixeta, E. T. Marcadores moleculares. 2ª Ed. UFV, Viçosa, 532 p., 2009.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, 32(3), 314. PMID: PMC1686077. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6247908>

Carmo, T. V. B., Martins, L. S. S., Musser, R. D. S., Silva, M. M. D., & Santos, J. P. O. (2017). Genetic diversity in accessions of *Passiflora cincinnata* Mast. based on morphoagronomic descriptors and molecular markers. **Revista Caatinga**, 30(1), 68-77. doi: 10.1590/1983-21252017v30n108rc

Rodrigues, L. C., Silva, A. A., Barbosa da Silva, R., Morais de Oliveira, A. F., & de Holanda Cavalcanti Andrade, L. (2013). Conhecimento e uso da carnaúba e da algaroba em comunidades do Sertão do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Revista Árvore**, 37(3). doi: 10.1590/S0100-67622013000300008

Cruz, C. D. (2013). Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, 35(3), 271-276. doi: 10.4025/actasciagron.v35i3.21251

Cunha, L. H., & Silva, R. A. G. (2012). A trajetória da algaroba no semiárido nordestino: dilemas políticos e científicos. **Raízes**, 32(1). [http://revistas.ufcg.edu.br/raizes/artigos/Artigo\\_284.pdf](http://revistas.ufcg.edu.br/raizes/artigos/Artigo_284.pdf)

Elmeer, K., & Almalki, A. (2011). DNA finger printing of *Prosopis cineraria* and *Prosopis juliflora* using ISSR and RAPD techniques. **American Journal of Plant Sciences**, 2(04), 527. doi: 10.4236/ajps.2011.24062

Faleiro, F.G.; Amabile, R. F.; Cerqueira-Silva, C.B.M. (2018). Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento genético de plantas. **Embrapa Cerrados-Livro Técnico (INFOTECA-E)**, (p. 44-66). Planaltina, DF.

- Fritsche-Neto, R., Resende, M. D. V., Miranda, G. V., & DoVale, J. C. (2015). Seleção genômica ampla e novos métodos de melhoramento do milho. **Ceres**, 59(6). doi: 10.1590/S0034-737X2012000600009
- George, S., Manoharan, D., Li, J., Britton, M., & Parida, A. (2017). Transcriptomic responses to drought and salt stress in desert tree *Prosopis juliflora*. **Plant Gene**, 12, 114-122. doi: 10.1016/j.plgene.2017.09.004
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. **Nature**, 444(7117), 323-329. doi: 10.1038/nature05286
- Kanazin, V., Marek, L. F., & Shoemaker, R. C. (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 93(21), 11746-11750. doi: 10.1073/pnas.93.21.11746
- Leão, T. C., Almeida, W. D., Dechoum, M. D. E. S., & Ziller, S. R. (2011). Espécies exóticas invasoras no Nordeste do Brasil: contextualização, manejo e políticas públicas. *Centro de Pesquisas Ambientais do Nordeste e Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental*. 33. Recife, PE.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F., & Gebhardt, C. (1996). A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature genetics*, 14(4), 421-429. doi: [10.1038/ng1296-421](https://doi.org/10.1038/ng1296-421)
- Nei, M. (1987). **Molecular evolutionary genetics**. Columbia university press.
- Paula, M. D. S., Fonseca, M. D. N., Boiteux, L. S., & Peixoto, J. R. (2010). Caracterização genética de espécies de Passiflora por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 32(1), 222-229. doi: 10.1590/S0100-29452010005000021
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2012). GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research -an update. **Bioinformatics**, 28: 2537-2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Pires, I. E. & Kageyama, P. Y. (1985). Caracterização da base genética de uma população de algaroba – *Prosopis juliflora* (Sw) DC- existente na região de Soledade – PB. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, 30: 1-8. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/180579/1/IPEF-n.30-p.29-36-1985.pdf>
- Pomponio, M. F., Acuña, C., Pentreath, V., Lauenstein, D. L., Poltri, S. M., & Torales, S. (2015). Characterization of functional SSR markers in *Prosopis alba* and their transferability across *Prosopis* species. **Forest systems**, 24(2), 13. doi: 10.5424/fs/2015242-07188

- Poolsawat, O., Kativat, C., Arsakit, K., & Tantasawat, P. A. (2017). Identification of quantitative trait loci associated with powdery mildew resistance in mung bean using ISSR and ISSR-RGA markers. **Molecular breeding**, 37(12), 150. doi: 10.1007/s11032-017-0753-2
- Rai, M. K., Shekhawat, J. K., Kataria, V., & Shekhawat, N. S. (2017). Cross species transferability and characterization of microsatellite markers in *Prosopis cineraria*, a multipurpose tree species of Indian Thar Desert. **Arid land research and management**, 31(4), 462-471. doi: 10.1080/15324982.2017.1338791
- Ribaski, J., Drumond, M. A., de Oliveira, V. R., & Nascimento, C. D. S. (2009). Algaroba (*Prosopis juliflora*): árvore de uso múltiplo para a região semiárida brasileira. **Embrapa Florestas-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**.
- Silva, T. S. S., Freitas, J. S., Santos, E. S. L., dos Santos Cardoso, T., & Cerqueira-Silva, C. B. M. (2018). Caracterização e seleção de marcadores moleculares em *Croton linearifolius* Mull. Arg. como subsídio para estudos genéticos. **Multi-Science Journal**, 1(10), 4-8. doi: 10.18677/EnciBio\_2019A40
- Sivalingam, P. N., Samadia, D. K., Singh, D., & Chauhan, S. (2016). Molecular markers to distinguish 'Thar Shoba', a variety of khejri [*Prosopis cineraria* (L.) Druce], from trees in natural populations. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 91(4), 353-361. doi: 10.1080/14620316.2016.1160545
- Silveira, L. A. (2019). Diversidade e estrutura genética em acessos de *Passiflora edulis* Sims. presentes em bancos de germoplasma por meio de marcadores moleculares. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, Brasil.
- Souza, D. C. L. (2015). Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 495-503. doi: 10.1590/1983-084X/13\_071
- Souza, L. N. B. (2018). Caracterização genética em acessos de *Passiflora* spp. com base em marcadores moleculares. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, Brasil.
- Sunnucks, P., & Hales, D. F. (1996). Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular biology and evolution**, 13(3), 510-524. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025612
- Yu, Y. G., Buss, G. R., & Maroof, M. A. (1996). Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 93(21), 11751-11756. doi: 10.1073/pnas.93.21.11751



### V CAPÍTULO III

*Manuscrito a ser submetido à revista Plant Gene*

#### **Diversidade e Estrutura Genética de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC na mesorregião do centro sul do Estado da Bahia**

**RESUMO:** Objetivou-se estimar a diversidade genética e a estruturação de populações de *Prosopis juliflora* (Sw) DC, referentes às populações naturalizadas da mesorregião centro sul baiano e da coleção de germoplasma pertencentes ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano *campus* Itapetinga, por meio de marcadores moleculares *Resistance Gene Analogs* (RGAs). O material genômico da *P. juliflora* foi coletado a partir de amostras de folhas jovens e saudáveis, obtidas de 192 plantas, 144 acessos da coleção de germoplasma existente no IF Baiano e 48 acessos coletados em sete populações naturalizadas. O DNA genômico foi extraído e as amostras de DNA foram submetidas à amplificação utilizando dez marcadores RGA. Com base nos perfis de amplificação, foi realizada a genotipagem e construção da tabela de dados binários. Realizamos análises descritivas, análise molecular de variância (AMOVA), coordenadas principais (PCoA) e Bayesiananossa partir dos programas Genes Software, GenALEX v.6.5 e Structure, respectivamente. Foram observadas um total de 147 marcadores (média de 51,7% polimórficos), sendo 12 raros e cinco exclusivos entre as populações. A Heterozigosidade esperada (*He*) apresentou média de 0,17, variando de 0,05 (Anagé) e 0,32 (Caculé). O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) médio foi de 0,14, variando entre 0,04 (Anagé) a 0,25. A análise Bayesiana apresentou estruturação em dois *pools* gênicos e subestruturação em três *pools* gênicos. Os resultados obtidos contribuem com o conhecimento genético-molecular de *P. juliflora* na região de estudo, o que pode auxiliar nas estratégias aplicadas ao manejo e conservação da espécie.

**Palavras chave:** Algaroba, variabilidade, genética de populações, genética molecular

## 5.1 INTRODUÇÃO

Na atualidade discute-se muito sobre sustentabilidade ou produção sustentável na pecuária, esses termos vêm ganhando impulso não apenas por fatores de ordem ecológica, mas também pela sua importância econômica e social (Edrisi et al., 2020). As leguminosas forrageiras possuem um papel fundamental na pecuária sustentável, pois além de ser fonte de nutrientes, também atuam no processo de recuperação das áreas degradadas (Terra et al., 2019). Assim, a procura por espécies vegetais bem adaptadas, com valor econômico de uso sustentável, está cada vez mais frequente pelos produtores agropecuários que visam a conservação e manejo do meio ambiente. Dentre as espécies, pode-se citar a *Prosopis juliflora* (Sw.) DC.

*Prosopis juliflora* A(SW.) D.C., popularmente conhecida como algaroba, é uma espécie nativa da América do Sul, América Central e Caribe. Essa espécie pertence à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae (Abbas et al., 2016) e caracteriza-se por ser uma espécie arbórea, xerófita, com características de adaptação a regiões semiáridas (Ribaski et al., 2009; Santos & Diodato, 2017).

A algaroba possui um espectro de aplicabilidade, dentre elas o potencial para alimentação humana e de animais, produção de madeira, proteção do solo, arborização urbana, suporte à apicultura, promoção do bem estar animal pelo sombreamento de pastagens, além de potencial uso farmacológico (Ribaski et al., 2009; Rodrigues et al., 2013). Suas vagens são utilizadas na alimentação animal, apresentando elevado potencial energético e aceitabilidade pelos animais (Talpada et al., 2003). Essas vagens podem ser utilizadas na substituição do milho ou como componente adicional à dieta. Além disso, a algaroba se destaca pela capacidade de adaptação e, portanto, potencial de produção em regiões semiáridas (Alves et al., 2012; Pereira et al., 2013).

Diante de tantos atributos da espécie, pouco se conhece sobre o comportamento genético de algaroba, tendo em vista a sua introdução em cultivo gerenciado e a distribuição de populações naturalizadas. Portanto, faz-se necessária a compressão de aspectos relativos à diversidade e estrutura genética existentes da espécie em seus diferentes locais de ocorrência e adaptação. Uma vez que esta espécie foi introduzida na década de 40, com o propósito inicial de recuperação de áreas degradadas e paisagismo e, ao longo dos anos conquistou espaço pela

boa adaptação no semiárido brasileiro, comportando-se como forrageira para o bem estar animal com o fornecimento de sombra e alimento em pastagens descampadas (Pires; Kageyama, 1985; Pereira et al., 2018). Entretanto, os marcadores moleculares inserem-se como ferramentas importantes nesse processo. Eles possibilitam a quantificar a diversidade genética de populações vegetais gerenciadas e comercializadas, traçando um comparativo com a informação genética de populações silvestres ou introduzidas e adaptadas, tais como a algaroba. As análises moleculares podem subsidiar futuros planos de manejo dos recursos genéticos, bem como em estratégias de melhoramento genético da espécie (Faleiro et al., 2018; Meira et al., 2020).

A utilização de marcadores moleculares dominantes vem se destacando em estudos de diversidade genética, por não requerer informações prévias sobre o genoma das espécies a serem avaliadas. Um bom exemplo são os marcadores moleculares *Resistance Gene Analogs* (RGAs), marcadores esses que estão diretamente relacionados com regiões conservadas do genoma referentes à resistência das plantas aos patógenos (Selvaraj et al., 2011).

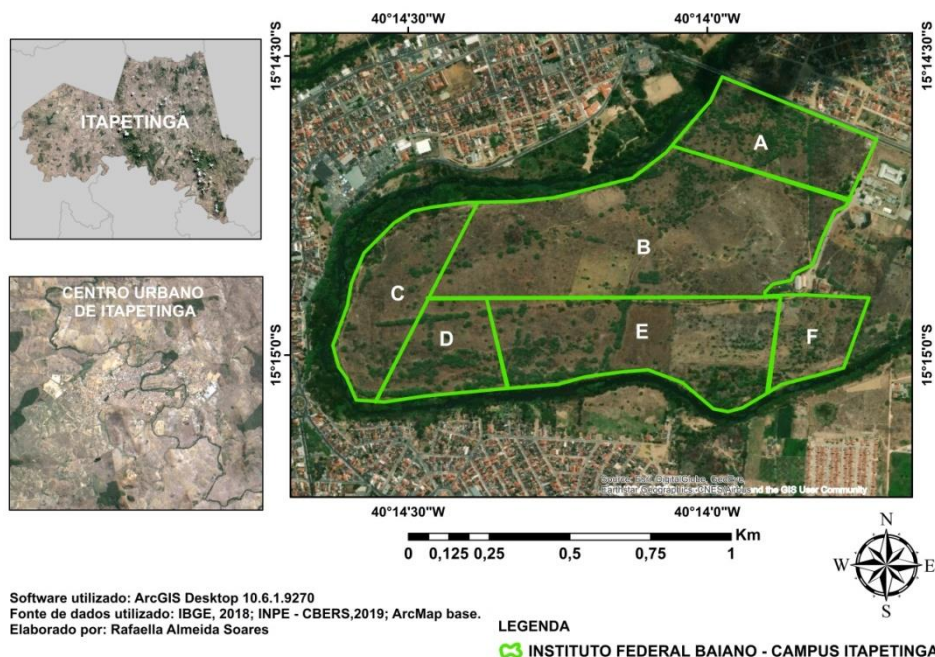
Devido à necessidade de caracterizar geneticamente os acessos existentes em diferentes regiões da Bahia e de identificar as características de resistência da espécie, objetivou-se estimar a diversidade genética e a estruturação de populações de *P. juliflora* (Sw) DC, referentes às populações naturalizadas da mesorregião centro sul baiano e da coleção de germoplasma pertencentes ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano *campus* Itapetinga, por meio de marcadores moleculares RGAs.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

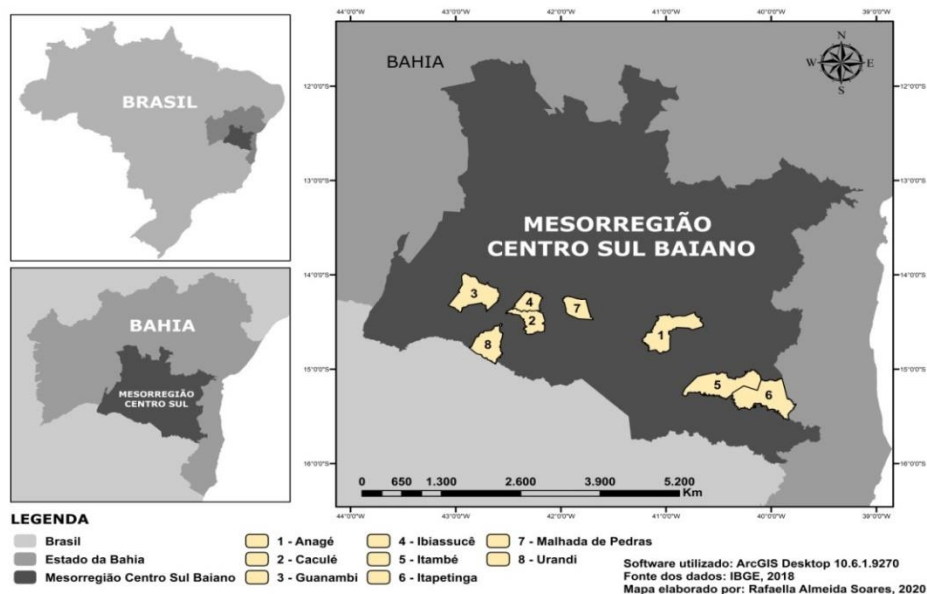
### Obtenção do material vegetal

O material genômico da *P. juliflora* foi coletado a partir de amostras de folhas jovens e sadias obtidas de 192 plantas, sendo 144 oriundas da coleção de germoplasma existente no IF Baiano (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, *campus* Itapetinga, Bahia, Brasil) (Figura 1), e 48 coletadas em sete municípios da mesorregião centro sul do estado da Bahia, representando a população naturalizada (Figura 2). Os acessos provenientes da coleção de germoplasma do IF Baiano foram divididos em seis áreas de coleta (A, B, C, D, E, F), divisão essa realizada com o intuito de facilitar a análise de parâmetros relativos à

dinâmica da informação genética e uniformidade de distribuição no local (Figura 1). As populações foram georreferenciadas com o Garmin GPS Oregon (Sistema de Posicionamento Global) e registrado no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado) sob o número de registro AFF0E34 .



**Figura 1:** Localização dos acessos de *Prosopis juliflora* (SW) DC. no Campus do Instituto Federal Baiano, Campus Itapetinga.



**Figura 2:** Localização dos acessos de *Prosopis juliflora* (SW) DC. na mesorregião Centro Sul Baiano.

O material foi coletado em oito ambientes distintos da mesorregião centro – sul baiano, as quais são caracterizadas como ecótono entre Caatinga e Mata Atlântica, cujo clima predominante é de semiárido, com temperatura média anual de 23°C e pluviosidade média anual de 738 mm (Tabela 1).

**Tabela 1:** Distribuição dos acessos de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC nos grupos e regiões coletadas, número de acessos, localização geográfica, temperatura média anual e índice pluviométrico anual

Grupo	Subgrupo	Número de acessos	Longitude (W)	Latitude (S)	T. med (°C)	Pluviosidade (mm)
Ambiente Naturalizado	(1) Caculé	7	14°26.894'	42°13.622'	22,9	736
	(2) Urandi	7	14°45.732'	42°39.177'	23	800
	(3) Ibiassucê	7	15°15.060'	40°15.105'	23,1	758
	(4) Guanambi	7	14°15.100'	42°46.916'	23,6	720
	(5) Malhada de Pedra	6	14°14.599'	41°56.600'	23,6	624
	(6) Itambé	7	15°14'19,9	40°37'49,2	23,4	750
	(7) Anagé	7	14°36'26,54	41°09'01,3	23,5	664
Germoplasm a IF-baiano	A	32	15°14'36,62	40°13'51,19	23,6	857
	B	32	15°14'48,85	40°13'54,62		
	C	16	15°14'59,98	40°14'33,03		
	D	16	15°15'1,31	40°14'20,39		
	E	32	15°14'55,8	40°13'54,7		
	F	16	15°14'59,70	40°13'47,93		

Fonte: Dados climáticos - CLIMATE-DATA.ORG (2021)

### Obtenção do material genético

O material vegetal foi condicionado em gelo seco e caixa de isopor e conduzido ao Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA), da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB, *campus* Juvino de Oliveira), no município de Itapetinga, onde foi condicionado em freezer -20°C até o momento da extração do DNA genômico. O protocolo de extração do DNA genômico utilizado foi o preconizado por Sunnucks e Hales (1996) e adaptado por Santos et al. (2021a), utilizando o tampão de extração SDS (Dodecil Sulfato de Sódio).

A quantificação do DNA foi realizada a partir de eletroforese horizontal em gel de agarose 1% (p/v) corados com 0,2% p/v de *Gel Red Biotium*<sup>®</sup>, comparados com uma série de concentrações conhecidas de DNA do fago lambda ( $\lambda$ ). A pureza do DNA foi estimada por

meio da leitura espectrofotométrica (razões de absorbância  $A_{260/230}$  e  $A_{260/280}$ ) utilizando o *BioDrop  $\mu$ LITE* (*Whitehead Scientific*). Posteriormente, amostras do DNA genômico foram padronizadas em  $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  e armazenado em freezer  $-20^\circ\text{C}$ .

### **Genotipagem das Amostras**

Para a caracterização da diversidade genética utilizou-se 10 pares de iniciadores RGAs (Tabela 02). As reações de amplificação em cadeia de polimerase (PCR) foram realizadas com o volume final de  $16 \mu\text{L}$ , contendo  $15 \text{ ng}$  de DNA genômico,  $1 \mu\text{L}$  de cada iniciador,  $2,5 \text{ mM}$  de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs),  $1 \mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  ( $50 \text{ mM}$ ),  $50 \text{ mM}$  de Tampão 10X ( $20 \text{ mM}$  Tris-HCl [pH 8,4]) e  $0,11$  unidade de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*, Carlsbad, Califórnia, EUA).

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®). As configurações de temperatura para amplificação de DNA *in vitro* foram: Desnaturação inicial a  $95^\circ\text{C}$  por 1 minuto; seguido de em 35 ciclos de 40 segundos a  $95^\circ\text{C}$ , anelamento de 1 minuto a  $37^\circ\text{C}$  e 1 minuto e 20 segundos a  $72^\circ\text{C}$  para extensão. Ao final dos ciclos, realizou-se uma extensão final de 5 minutos a  $72^\circ\text{C}$ .

Os produtos de amplificação foram separados por meio de corrida de eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v) imerso em tampão de corrida TBE 0,5X em corrente elétrica de 120V por 120 minutos. A geração das imagens resultantes da corrida foi realizada a partir do sistema de fotodocumentação L-Pix-EX (LOCCUS Biotecnologia, São Paulo, Brasil), sob incidência de luz ultravioleta, utilizando como intercalante de DNA o GelRed® (BIOTIUM).

**Tabela 2:** Combinações de marcadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) utilizados para caracterização da *Prosopis juliflora* (Sw.) DC, e suas respectivas sequências de nucleotídeos.

Combinação	Código	Sequência 5'- 3'	Referências
cb1	S1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACGYCT	Leister et al.,1996
	NBSr1	AGTTGTRAYDATDAYYYTRC	
cb2	NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC	Yu et al.,1996
	As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC	
cb3	S1	GGT GGGGTT GGAAGACAACG	Leister et al.,1996
	As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC	
cb4	S1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG	
	As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC	
cb5	NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC	Yu et al.,1996
	NBrs1	YCTAGTTGTRAYDATDAYYYTRC	
cb6	NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC	Leister et al.,1996
	As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC	
cb7	RGA1f	AGTTTATAATTYSATTGCT	
	RGA2r	CACACGGTTTAAAATTCTCA	
cb8	RGA1f	AGTTTATAATTYSATTGCT	Kanazin et al.,1996
	RGA5r	TCAATCATTCTTTGCACAA	
cb9	RGA1f	AGTTTATAATTYSATTGCT	
	RGA8r	CCGAAGCATAAGTTGGTG	
cb10	As1	CAACGCTAGTGGCAATCC	Leister et al.,1996
	As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC	

I= A/T/G/C; D= A/G/T; E=C/G; R= A/G; Y= C/T

Fonte: Santos et al. (2021b)

### Análise Estatísticas

Todos os géis de agarose foram analisados por meio da construção manual de tabelas de dados binários de presença e ausência de marcadores (zero e um) em Excel. As análises estatísticas descritivas para a caracterização do perfil de amplificação genética foram conduzidas, tais como: Determinação do percentual de locos polimórficos por combinação de iniciadores; médias de marcadores por combinação, percentual de marcadores e raros (M. R) para cada amostragem, considerando como marcadores raros aqueles com ocorrência em até 5% da população analisada ( $p \leq 0,05$ ) e o percentual de marcadores exclusivos (M. Ex), como aqueles com ocorrência registrada em apenas umas das populações.

Com o perfil de amplificação genômica de regiões RGAs, parâmetros estatísticos referente à diversidade, diferenciação e estrutura genética foram analisados por meio de

*softwares* bioinformáticos. O índice de Heterozigosidade esperada (He) para marcadores moleculares com herança genética dominante foi estimado por meio da fórmula:

$$He = 1 - \sum_{p_i} 2 p_i^2$$

onde  $p_i$  é a frequência alélica estimada do  $i$ -ésimo alelo Nei (1987).

Também foi estimado o PIC (*Polymorphism Information Content*) conforme fórmula proposta por Botstein; White; Skolnick *et al.* (1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

Essas análises foram viabilizadas pelo *software* Genes (Cruz, 2013).

Para analisar a diferenciação genética no conjunto de dados, utilizou-se a Análise de Variância Molecular (AMOVA), considerando dois grupos (coleção de germoplasma do IF baiano e populações naturalizadas). Para acurácia da análise, realizou-se 999 permutações ao acaso para o particionamento da variação genética em níveis hierárquicos com 1% de significância ( $p < 0,01\%$ ), estimando o valor médio de PhiPT, índice análogo ao  $F_{ST}$  de Wright (WRIGHT, 1965), segundo a equação:

$$(PhiPT = AP / (WP + AP) = AP / Total Est. Var)$$

Valores de PhiPT  $> 0$  indicam diferenças genéticas entre as populações, onde AP é a variação genética entre populações e WP é a variação estimada dentro das populações. A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi utilizada para visualizar a distribuição dos genótipos em um plano bidimensional, ambas as análises foram conduzidas com o auxílio do *software* GenALEX v.6.5 (Peakall e Smouse, 2012).

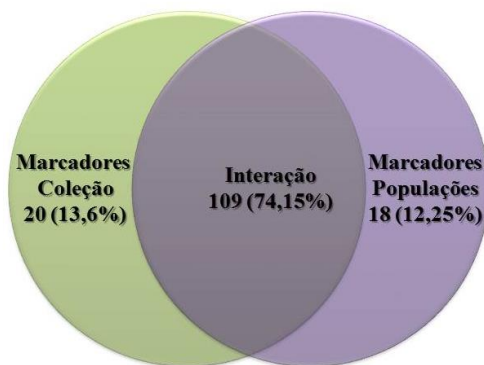
A análise Bayesiana foi conduzida para estimar a estrutura genética através da alocação de *Clusters* em modelos populacionais pré-definidos utilizando o no *Software* STRUCTURE versão 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Nestas análises, assumiu-se o modelo de mistura da frequência de alelos/marcadores via fluxo gênico independente (*admixture model*), avaliando a possível existência de *Pools* gênicos (K), testando de 1 a 10 modelos de



populações. Para cada estimativa de K foram realizadas 5 simulações e em cada simulação/estimativa foi considerado um período de *Burn-in* de 50 mil, seguido de 500 mil permutações coletadas via Cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC). Para estimativa do número de *Pools* gênicos mais representativo, utilizou-se a ferramenta *Online STRUCTURE Harvester* (Earl e VonHoldt, 2012), tendo como modelo o método proposto por Evano et al. (2005).

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de amplificação genética de *P. juliflora*, para o conjunto de combinações de marcadores RGAs analisados, mostrou um total de 147 marcadores em 192 amostras (144 acessos presentes em coleção de germoplasma e 48 genótipos em populações naturalizadas). Ao analisar a coleção de germoplasma e as populações naturais separadamente, os acessos da coleção de germoplasma apresentaram um total de 129 marcadores (87,75% do total de marcas analisadas), enquanto nas populações naturalizadas foi observado 127 marcadores (86,4%). A Figura 3 apresenta a distribuição dos marcadores e a interação entre a coleção de germoplasma e as populações naturalizadas.



**Figura 3:** Representação dos marcadores encontrados na coleção de germoplasma, populações naturalizadas e sua interação.

Considerando a análise descritiva do total de marcas amplificadas, foi possível observar uma média de 51,7% locos polimórficos para todos os genótipos analisados, variando de 76,9% na coleção de germoplasma (grupo A) a 12,9% em Anagé. A combinação dos iniciadores cb2 (NBsf1+As2) e cb4 (S1+As3) geraram o menor (6) e o maior (23) número de

marcas dentro da coleção, respectivamente. Foi possível observar a existência de 12 marcadores raros (ocorrendo em menos de 5% do total de genótipos) e cinco exclusivos para os acessos das regiões A e D da coleção de germoplasma e nos genótipos oriundos das regiões de Caculé e Urandi. Analisando o total de marcas raras e exclusivas de cada combinação de marcadores RGAs, os pares de marcadores cb5 (NBSf1 + NBrS1), mostraram a maior quantidade de marcadores raros; já as combinações cb2(NBSf1+ s2) e cb4(S1+As3) as maiores quantidades de marcadores exclusivos (Tabela 3).

**Tabela 3:** Análise descritiva a partir de 10 combinações de iniciadores RGAs e 192 genótipos de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC.

Grupos	Subgrupos e Marcadores	Marcas geradas (Combinações RGAs)										He	PIC	%P
		Cb1	Cb2	Cb3	Cb4	Cb5	Cb6	Cb7	Cb8	Cb9	Cb10			
G 1	A	12	4	15	18*	9	8	14	15	7	12	0,22	0,18	76,87
	B	10	4	14	15	11	7	11	10	7	11	0,16	0,14	67,35
	C	11	6	13	19	8	8	15	13	6	11	0,26	0,21	73,47
	D	10	4	14	20*	6	8	17*	10	6	11	0,25	0,20	68,71
	E	11	6	11	19	8	8	13	10	6	10	0,18	0,15	69,39
	F	5	4	14	13	8	8	13	7	5	11	0,16	0,13	59,86
	Média	9,8	4,7	13,5	16,5	8,3	7,8	13,2	10,8	6,2	11,0	0,20	0,17	69,3
	Total	13	6	15	23	11	8	17	16	7	13			
	M. R	2	2	0	0	3	0	1	2	1	1			
	M. Ex	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0			
G 2	Caculé	9	6*	14	16	7	8	19	18	11	14	0,32	0,25	63,95
	Urandi	10	7*	15	13	5	5	20	18	11	14	0,23	0,18	57,14
	Ibiassucê	6	4	15	2	7	7	15	15	8	14	0,20	0,16	55,1
	Guanambi	2	2	1	2	2	2	5	2	4	11	0,07	0,06	19,05
	M. Pedra	5	2	11	2	2	2	2	2	3	13	0,07	0,05	21,09
	Itambé	3	2	2	2	2	2	2	10	2	14	0,09	0,07	27,21
	Anagé	2	1	2	2	2	2	2	2	2	13	0,05	0,04	12,93
	Média	5,3	2,2	8,6	5,6	3,9	4,0	9,3	9,6	5,9	13,3	0,15	0,12	36,6
	Total	10	8	15	16	7	8	20	18	11	14			
	M. R	1	1	0	5	2	1	0	0	1	0			
M. Ex	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0				
Total	Média	7,4	3,5	10,8	9,5	5,9	5,8	10,9	10,2	6,0	12,2	0,17	0,14	51,7
	M. R	2	2	0	1	2	0	2	2	1	0			
	M. Ex	0	2	0	2	0	0	1	0	0	0			
	G1xG2	14	9	16	23	11	9	21	18	11	15			

G 1: Coleção de acessos IF Baiano; G 2: Populações Naturalizadas; Cb: Combinação; M. R: Marcadores raros; M. Ex: Marcadores exclusivos; \*Marcadores exclusivos; %P: Porcentagem de Polimorfismo; PIC: Conteúdo de Informação Polimórfica; He: Heterozigidade Esperada.

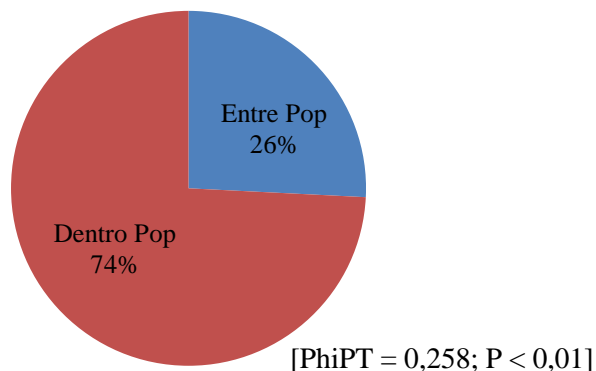
A Tabela 3 também apresenta os índices de heterozigidade esperada (*He*), considerando o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para todos os genótipos analisados e grupos individuais. A *He* média para todas as amostras analisadas foi de 0,17, variando para os

grupos de acessos da coleção de germoplasma (0,20) e para as populações naturais (0,15), que apresentou uma diversidade genética baixa, com  $H_e$  menor que 0,10 em diferentes regiões amostradas. Os acessos das regiões F e B apresentaram os menores índices de  $H_e$  considerando a coleção de germoplasma (0,16) e os acessos da região C a maior (0,26). Para as populações de ambiente natural os índices variaram nas regiões de Anagé (0,05) e Caculé (0,32).

O PIC médio foi estimado em 0,14 e de maneira geral, indicou a que as regiões genômicas avaliadas mostram-se pouco informativas, com exceção aos genótipos de Caculé, que apresentaram índices considerados informativos (0,25). Esse resultado está de acordo Botstein et al. (1980), em que reportaram que os índices abaixo de 0,25 são considerados poucos informativos; entre 0,25 e 0,50, informativos; e acima de 0,50 muito informativos, onde considera-se 0,50 o valor máximo alcançado em marcadores com herança alélica dominante, como os RGAs (Chesnokov; Artemyeva, 2015). Em estudos anteriores de caracterização e seleção de marcadores RGAs, observou-se médias de 67,3% de polimorfismo 0,21 de  $H_e$  e 0,17 de PIC para 12 combinações de RGAs utilizadas nesse estudo (Santos et al. (2021b). Embora não existam registros na literatura de caracterização genética de algaroba com marcadores RGAs, seus índices médios de  $H_e$  se assemelham a valores observados em marcadores dominantes, tais como RAPD ( $H_e$  médio = 0,21) (Hamza, 2010) e para marcadores moleculares ISSR aplicados em espécies do gênero, como *Prosopis cineraria* (L.) com  $H_e$  média de 0,31 (Sharma et al., 2011). Dessa forma, esse é um importante registro para a compreensão da dinâmica relativa ao comportamento da diversidade genética de regiões RGA para o gênero *Prosopis*, com efeito ao potencial de adaptabilidade em ambiente natural, como espécie invasora ou como uso estratégico no manejo em áreas degradadas de interesse comercial (Wang et al., 2017; Zhang et al., 2018; Agbagwa et al., 2018; Reddy et al., 2019).

Ao estimar a diferenciação genética inter e intrapopulacional, para os marcadores RGA, por meio da análise de variância molecular, observou-se que 26% da variação genética ocorre entre populações (PhiPT médio em 0,25) e 74% representa as diferenças dentro as populações (Figura 4).

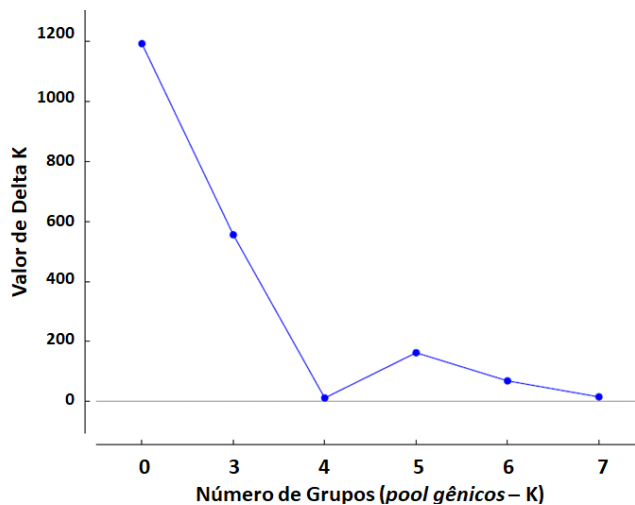
### Porcentagens de Variância Molecular



**Figura 4:** Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro da coleção de germoplasma do IF baiano e populações naturalizadas.

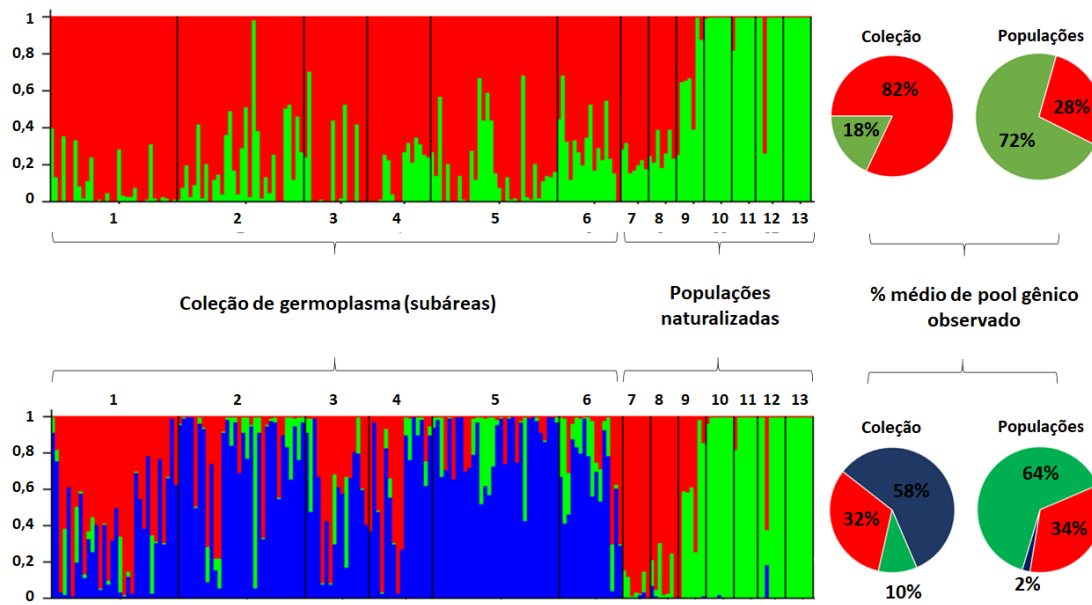
De acordo Hartl; Clark (2010), resultados que apresentam valores de  $\Phi_{iPT} \geq 0,25$  indicam uma grande diferenciação entre subpopulações, entre 0,15 e 0,25 diferenciação moderada e abaixo de 0,05 uma diferenciação insignificante. Em estudos com marcadores RAPD com *P. juliflora* a diferenciação genética observada foi maior em comparação a este estudo, com  $\Phi_{iPT}$  médio de 0,32 (Hamza, 2010).

A análise Bayesiana identificou a estrutura genética mais provável em dois agrupamentos correspondentes à dois *pools* gênicos, com possibilidade de sub-estrutura genética em três, considerando os scores mais elevados. O modelo de Evanno; Regnaut; Goudet (2005), estimou o valor de  $\Delta K$  médio de 1200 para  $K=2$  e  $\Delta K$  médio de 580 para  $K=3$ , sendo estes os modelos mais prováveis existentes para as 192 amostras analisadas de *P. juliflora* (Figura 5).



**Figura 5:** Estimativa de estrutura genética (*pool* gênicos – K2 e K3- mais prováveis) com base em análises Bayesianas, adotando método descrito por Evanno; Regnaut; Goudet (2005).

O histograma ilustra o nível de estrutura genética, com a identidade mais provável de cada genótipo analisado ao seu *pool* gênico respectivo. Devido às duas possibilidades de modelos populacionais estimadas no modelo Evanno; Regnaut; Goudet (2005), o histograma apresenta a correlação de frequências genéticas para ambas, sendo considerando K=2 na parte superior e K=3 na parte inferior (Figura 6). O comportamento do coeficiente de associação (Q), para os acessos da coleção de germoplasma mostra uma identidade homogênea para um dos *pools* gênicos, representado na cor vermelha, considerando K= 2, com a identidade estimada em 82% para o respectivo *pool* gênico. No entanto, as populações naturais revelam uma maior identidade com um *pool* gênico distinto, representado pela cor verde, estimado em 72%. Isso evidencia uma diferenciação genética nos genótipos de origem de ambientes naturais e em coleções gerenciadas, com reflexos ligados à curta história evolutiva de introdução de *P. juliflora* em ambiente natural, bem como na construção da coleção de germoplasma presentes no IF baiano.



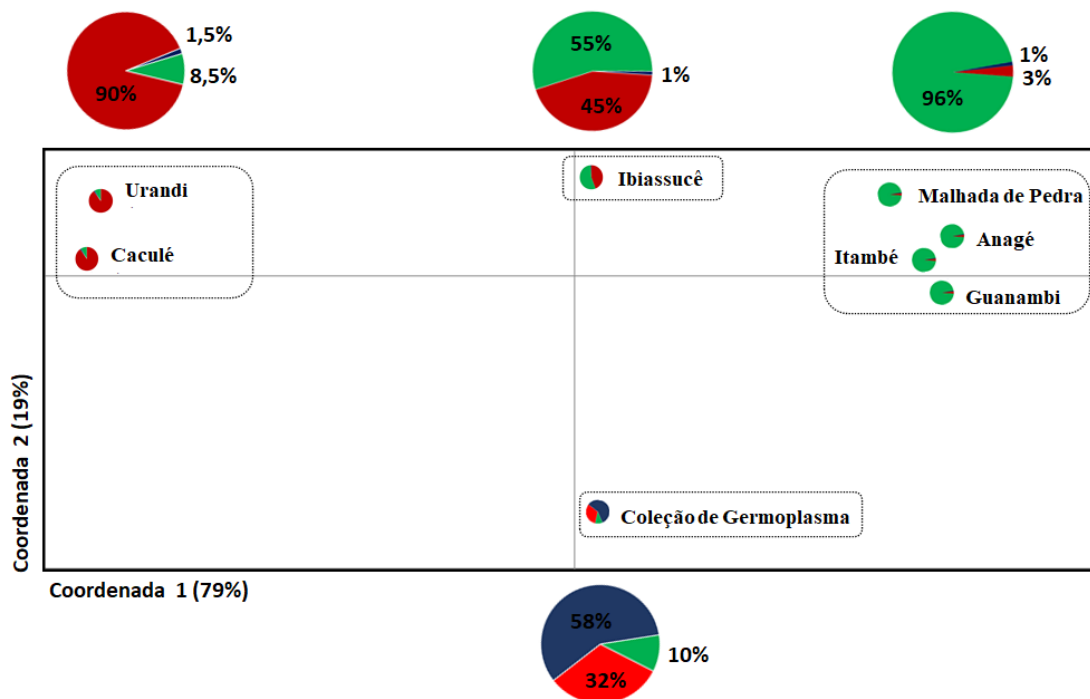
**Figura 6:** Estrutura genética observada em 192 acessos de *Prosopis juliflora* (144 acessos presentes em coleção de germoplasma e 48 acessos em populações naturalizadas).

Cada coluna do histograma representa um acesso e as cores representam a composição de cada *pool* gênico, sendo considerado dois (parte superior) e três (parte inferior) *pools* gênicos. Números de 1 a 6 correspondem aos bancos A à F; e de 7 a 13 as populações amostradas nas regiões: Caculé, Urandi, Ibiassucê, Guanambi, M. Pedra, Itambé e Anajé. Os gráficos de pizza representam o percentual médio de cada *pool* gênico nos acessos da coleção de germoplasma e nas populações naturalizadas.

Considerando o modelo de subestrutura genética em três *pools* gênicos ( $K=3$ ), é possível verificar que as frequências alélicas nas coleções de germoplasma abrigam variações que mostram uma maior tendência à heterogeneidade genética para a mistura entre *pools* gênicos representados pela cor vermelha (32%), azul (58%) e verde (10%), que podem estar associados à diversidade genética acessada pelo conjunto de marcadores RGAs para esses acessos. Contudo, as frequências gênicas mostraram pouca mistura em populações naturais, evidenciando que a variabilidade genética existente entre a coleção de germoplasma e os acessos dos oito ambientes da mesorregião centro-sul baiano, são distintas de acordo os *pools* gênicos obtidos (Figura 6).

O modelo de estrutura genética Bayesiana existente entre os acessos de *P. juliflora* foi confirmado pela Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Os resultados da análise multivariada alocaram os agrupamentos constatando a similaridade genética e a sub-estrutura em três *pools* gênicos (Figura 6) entre os genótipos das regiões amostradas. Os gráficos

mostram o comportamento dos agrupamentos no plano bidimensional relativo ao local de amostragem e ao *pool* gênico correspondente (Figura 7).



Os gráficos representam o percentual médio de cada um dos três *pools* gênicos (representados pelas cores azul, vermelho e verde) estimado com base nas análises Bayesianas. A descrição da coleção e das populações naturalizadas estão padronizadas conforme descrito na metodologia.

**Figura 7:** Análise de coordenadas principais (PCoA) de sete populações naturalizadas e uma coleção de germoplasma de *Prosopis juliflora* caracterizados com marcadores análogos a genes de resistência (RGA).

Nos gráficos da figura 7 estão representados por cores diferentes o percentual médio de cada um dos três *pools* gênicos. O *pool* gênico vermelho prevaleceu nas populações naturalizadas de Urandi e Caculé (90% vermelho). No *pool* gênico verde, abrange as populações naturalizadas de Malhada de Pedra, Anagé, Itambé e Guanambi (96% verde), enquanto os acessos de Ibiassucê ficou em zona de transição, apresentando 55% do *pool* verde, 45% do *pool* vermelho e 1% do *pool* azul.

Com esses resultados, observou-se que existe uma tendência de diferenciação genética com subestrutura de três *pools* gênicos, todos representadas nas amostras analisadas, embora

considerando a subestrutura genética, o *pool* gênico azul foi menos representativo em populações naturais, mas observando à coleção de germoplasma *in vivo*, a subestrutura genética mostra uma mistura que evidencia a diferenciação entre locais amostrados, com presença de 58% do *pool* gênico azul, 32% do *pool* gênico vermelho e 10% do *pool* gênico verde, confirmando então a análise Bayesiana. Esse pode ser um reflexo da dinâmica da diversidade genética na coleção de germoplasma mantida *in vivo*, pois a algaroba é predominantemente alogama e polinizada por espécies de abelhas que podem restringir a polinização cruzada em longas distâncias, além da dispersão ser influenciada devido ao gerenciamento nas áreas (Felker, 1982; Lima, 1999; Kalisz; Vogler; Hanley, 2004).

Os RGAs são ferramentas moleculares, que geram informações podendo subsidiar programas de seleção e melhoramento genético, uma vez que este tipo de marcador molecular possui relação com regiões de resistência potencialmente expressas (Sekhwal et al., 2015). Embora ainda se faça necessária maiores estudos para relacionar genótipo com fenótipo, estes dados fornecem suporte para iniciar uma seleção de genótipos de maior interesse. Assim subsidiando estratégias aplicadas ao manejo em áreas com ocorrência da espécie, tendo em vista seu potencial adaptativo.

#### 5.4 CONCLUSÃO

Os marcadores RGAs mostraram-se ferramentas úteis para a caracterização genético-molecular de *P. juliflora*, permitindo estimar a estrutura genético-populacional da espécie em ao menos dois *pools* gênicos e subestrutura em três *pools* gênicos. Os resultados obtidos contribuem com o conhecimento genético-molecular de *P. juliflora*, o que pode auxiliar na compreensão do comportamento e adaptação da espécie em ambiente natural ou gerenciado, subsidiando informações para serem utilizadas em estratégias de manejo da espécie.



## 5.5 REFERÊNCIAS

- Abbas, Ahmed M. et al. Predicting the spatial spread of invasive *Prosopis juliflora* (SW.) DC along environmental gradients in Gabel Elba National Park, Egypt. **Int. J. Sci. Eng. Res**, v. 7, p. 596-599, 2016.
- Alves, E.M.; Pedreira, M.S.; Pereira, M.L.A.; Almeida, P. J. P; Neto, J.G.; Freire, L.D.R. Farelo da vagem de algaroba associado a níveis de ureia na alimentação de ovinos: balanço de nitrogênio, N ureico no plasma e parâmetros ruminais. **Acta Scientiarum Animal Science**, v.34, n.3, p. 287-295, 2012.
- Borém, A.; Caixeta, E. T. Marcadores moleculares. 2ª Ed. UFV, Viçosa, 532 p., 2009.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, 32(3), 314. PMID: PMC1686077. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6247908>
- Chesnokov, Y. V.; Artemyeva, A. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. **Сельскохозяйственная биология**, n. 5 (eng), 2015.
- Cruz, C. D. (2013). Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 35(3), 271-276. DOI: 10.4025/actasciagron.v35i3.21251
- Climate-Data. Dados Climáticos para Cidades Mundiais. 2020. Disponível em: <https://pt.climate-data.org/americas-do-sul/brasil/bahia/itapetinga-1071/> Acesso em: 16 de jul. 2021.
- Earl DA, VonHoldt BM (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conserv. Genet. Resour.** 4: 359–361.
- EDRISI, Sheikh Adil; EL-KEBLAWY, Ali; ABHILASH, Purushothaman Chirakkuzhyil. Sustainability analysis of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC based restoration of degraded land in North India. **Land**, v. 9, n. 2, p. 59, 2020. DOI: 10.3390/land9020059
- Faleiro, F.G.; Amabile, R. F.; Cerqueira-Silva, C.B.M. (2018). Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento genético de plantas. **Embrapa Cerrados-Livro Técnico (INFOTECA-E)**, (p. 44-66). Planaltina, DF.
- Felker, P. 1982. Seleção de genótipos de *Prosopis* para uma produção de vagens e de combível de Madeira. Em: Simpósio Brasileiro sobre Algaroba, *Anais*. **EMPARNA**, Natal. 2: 7-24.

Hartl DL and CLARK AG. Princípios de genética de populações. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 659 p.

Hamza, N. B. Genetic variation within and among three invasive *Prosopis juliflora* (Leguminosae) populations in the River Nile State, Sudan. **International Journal of Genetics and Molecular Biology**, v. 2, n. 5, p. 92–100, 30 maio 2010.

Kalisz, S.; Vogler, D. W.; Hanley, K. M. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. **Nature**. London, v.430, p.884-887, 2004.

Lima, Paulo César Fernandes. **Recursos genéticos e avaliação do gênero *Prosopis* no Nordeste do Brasil**. In: QUEIROZ, MA de; GOEDERT, CO; RAMOS, SRR (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

Meira, M., Santos, L., Anjos, Q., Santos, B., Guimarães, L., & Cerqueira Silva, C. (2020). Caracterização molecular de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. por meio de marcadores moleculares e índices de similaridade genética. **Biotemas**, 33(1), 1-9. doi:<https://doi.org/10.5007/2175-7925.2020.e70282>

Nei, M. (1987). **Molecular evolutionary genetics**. Columbia university press.

Peakall R and Smouse PE. (2012) GenALEX 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research-na update. **Bioinformatics**. 28: 2537-2539.

Pereira, T.C.J.; Pereira, M.L.A.; Oliveira, C.A.S.; Argolo, L.S.; Silva, H.G.O.; Pedreira, M.S.; Almeida, P.J.P.; Santos, A.B. Mesquite pod meal in diets for lactating goats. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, n.2, p.102-108, 2013.

Pires, I.E.; Kageyama, P.Y, 1985. Caracterização da base genética de uma população de algaroba -*Prosopis juliflora* (SW) DC- existente na região de Soledade -PB. IPEF, v. 1, n. 30, p. 29-36, 1985.

Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

Ribaski, J, Drumond, MA, Oliveira, VR, Nascimento, CES. 2009. Algaroba (*Prosopis juliflora*): árvore de uso múltiplo para a região semiárida brasileira. Colombo, PR: **Embrapa Florestas**, Comunicado Técnico, 240p.

Rodrigues, L. C. et al. Conhecimento e uso da carnaúba e da algaroba em comunidades do Sertão do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Revista Árvore**, v. 37, n. 3, p. 451-457, 2013. DOI: 10.1590/s0100-67622013000300008.

Sharma, S. K. et al. Genetic diversity and gene flow estimation in *Prosopis cineraria* (L.) Druce: A key stone tree species of Indian Thar Desert. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 1, p. 9–13, 1 fev. 2011.

Santos, L. H. T., Dias, C. S., Lima, J. C., Meira, M. R., & Silva, C. B. M. C. Análise comparativa de protocolos para extração de DNA genômico em *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. **Biotemas**, 34(1), 2021a. DOI: 10.5007/2175-7925.2021.e76552

Santos, L. H. T., Dias, C. S., Silveira, L. A., Meira, M. R., dos Santos, E. S. L., & Cerqueira-Silva, C. B. M. Characterization and selection of markers associated with resistance analogous genes as input for genetic analysis of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. **Acta Scientiarum. Technology**, 43, e51983-e51983, 2021b. DOI: 10.4025/actascitechnol.v43i1.51983

Selvaraj, C.I; Babu, S.; Sankar, P.D.; Nagarajan, P.; Sabesan, M. Genome scanning for identification of resistance gene analogs (RGAs) in a highly durable blast resistance rice (*Oryza sativa* L.) cultivar, Moroberekan. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 34, p. 6418-6433, 2011.

Sekhwil, M. K. et al. Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 19248–19290, 14 ago. 2015.

Talpada P.M.; Pandya, P.R.; Pande, M.B. Technical Bulletin on Unconventional feed resources for livestock . Anand, India: Animal Nutrition Research Department, Anand Agricultural University; 2003.

Terra, Ana Beatriz C. et al. Leguminosas forrageiras na recuperação de pastagens no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 11-20, 2019. DOI:10.19084/rca.16016

Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, 19, n. 3, p. 395-420, 1965.

## VI CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no estudo, podem auxiliar no conhecimento genético-molecular em *Prosopis juliflora* (Sw.) Dc. Ao comparar diferentes protocolos de extração de DNA genômico podemos indicar o protocolo mais eficiente para ser utilizado na espécie e propor adaptações metodológicas que reduzem insumos nocivos à saúde humana e o custo do procedimento.

Os marcadores RGAs (*Resistance Gene Analogs*) são ferramentas que auxiliam estudos genético-molecular e sua caracterização e seleção possibilitaram indicar as combinações mais adequadas para subsidiar o estudo da diversidade genética nas populações de *P. juliflora*.

O estudo de diversidade genética contribuiu com o conhecimento da diversidade e a estruturação de populações de *P. juliflora*, referentes às populações naturalizadas da mesorregião centro sul baiano e a coleção de germoplasma pertencentes ao IF Baiano, campus Itapetinga. As análises da diversidade e estruturação genética forneceram informações práticas, que podem ser utilizadas no estabelecimento de estratégias de conservação e melhoramento genético.

## VII ANEXOS

Manuscrito publicado na revista *Biotemas*

<http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2020.e70282>

Biotemas, 33 (1): 1-9, março de 2020  
ISSNe 2175-7925

<http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2020.e70282>

### **Caracterização molecular de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. por meio de marcadores moleculares e índices de similaridade genética**

Submetido em 27/11/2019

Aceito para publicação em 05/02/2020

Resumo: Algaroba, *Prosopis juliflora* (SW) DC., é uma espécie arbórea adaptada no Brasil com valor alimentício animal e ambiental para reflorestamento. Porém pouco se sabe sobre sua diversidade genético-molecular. Portanto objetivou-se estudar diferentes índices de similaridade a partir de caracterizações genéticas da algaroba obtidas por meio dos marcadores ISSR e RGA em indivíduos naturalizados no sudoeste da Bahia. Folhas jovens de 36 indivíduos foram coletadas no município de Itapetinga, Bahia. O DNA foi extraído pelo método SDS 10% e quantificado pela razão de absorbância A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> e A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> nm. Dez pares de RGA e 23 iniciadores ISSR foram utilizados para a reação de PCR, cujas reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% por 2 h. O resultado da genotipagem (matriz binária) foi utilizado para cálculo dos índices de similaridade de Jaccard, Simple Matching e Sorensen Dice. Por fim, foram realizados os agrupamentos UPGMA, otimização de Tocher e PCA. Foram observados 205 e 68 marcas polimórficas, com heterozigosidade esperada de 0,28 e 0,21; informação polimórfica de 91,71% e 0,17% e distância genética de 8,0 e 8,53 para ISSR e RGA, respectivamente. Essas informações contribuem para o entendimento da distribuição e adaptação da espécie em áreas reflorestadas.

Palavras-chave: Algaroba; Coeficientes de similaridade; Diversidade; Recurso genético