

**Anais da 8ª Jornada Científica  
Embrapa São Carlos**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Instrumentação  
Embrapa Pecuária Sudeste  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Documentos 61***

## **Anais da 8ª Jornada Científica Embrapa São Carlos**

*Wilson Tadeu Lopes da Silva*

*José Manoel Marconcini*

*Maria Alice Martins*

*Lucimara Aparecida Forato*

*Paulino Ribeiro Villas Boas*

*Editores Técnicos*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Instrumentação**

Rua XV de Novembro, 1452

Caixa Postal 741

CEP 13560-970 - São Carlos-SP

Fone: (16) 2107 2800, Fax: (16) 2107 2902

www.embrapa.br/instrumentação

E-mail: www.embrapa.br/fale-conosco

**Comitê de Publicações da Unidade**

**Presidente**

Wilson Tadeu Lopes da Silva

**Membros**

Maria Alice Martins

Cíntia Cabral da Costa

Elaine Cristina Paris

Cristiane Sanchez Farinas

Paulo Renato Orlandi Lasso

Valéria de Fátima Cardoso

**Revisor editorial:** Valéria de Fátima Cardoso

**Capa:** Leonardo Abbt e Paloma Bâzan

**Editoração eletrônica:** Editora Cubo

**1ª edição**

1ª impressão (2016): tiragem 300

As opiniões, conceitos, afirmações e conteúdo desta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados internacionais de catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Instrumentação**

---

J82a Jornada científica Embrapa – São Carlos, SP,

Anais / editores técnicos, Wilson Tadeu Lopes da Silva, João de Mendonça Naime, Maria Alice Martins, Lucimara Aparecida Forato, Paulino Ribeiro Villas Boas – São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação: Embrapa Pecuária Sudeste, 2016.

126 p. – (Embrapa Instrumentação. Documentos, ISSN 1518-7179; 61).

1. Jornada científica – Evento. I. Silva, Wilson Tadeu Lopes da. II. Naime, João de Mendonça. III. Martins, Maria Alice. IV. Forato, Lucimara Aparecida. V. Villas Boas, Paulino Ribeiro. VI. Título. VII. Série.

CDD 21 ED 500

# Seleção de marcadores microssatélites e otimização de protocolo de amplificação em alfafa

*Renato Maldigamm Scorsolini Marchini<sup>1</sup>*  
*Reinaldo de Paula Ferreira<sup>2</sup>*  
*Bianca Baccili Zanotto Vigna<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Aluno de graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP. Bolsista Embrapa, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP; renato.scorsolini@hotmail.com;

<sup>2</sup>Pesquisadores da Embrapa Sudeste, São Carlos, SP

Dentre as forrageiras de maior potencial para a intensificação da produção de leite destaca-se a alfafa (*Medicago sativa* L.), uma leguminosa perene e autotetraplóide ( $2x=4x=32$ ). A alfafa não é tão cultivada no Brasil quanto em países de clima temperado como Canadá, Argentina e Estados Unidos, porém, programas de melhoramento genético vem trabalhando em conjunto no intuito de desenvolver novas cultivares mais adaptadas às condições edafoclimáticas dos trópicos. A alfafa apresenta alto valor nutritivo, produção de forragem tenra e de boa palatabilidade aos animais, além de realizar fixação biológica de nitrogênio. O objetivo deste trabalho consistiu em selecionar *primers* de marcadores moleculares do tipo microssatélites e otimizar o protocolo de amplificação por reação da polimerase em cadeia dos mesmos, visando a caracterização molecular de 77 genótipos de alfafa. Estes indivíduos são oriundos da Argentina e compõem a coleção de trabalho do programa de melhoramento genético de alfafa da Embrapa Pecuária Sudeste. A partir de levantamento na literatura foram selecionados 29 marcadores do tipo microssatélite, de acordo com os critérios: (1) estar ligado a QTLs relacionados à produção, altura da planta, capacidade de rebrota, persistência e produção de biomassa; (2) ter fragmento amplificado com tamanho entre 100 e 300 pares de bases; (3) apresentar bom perfil de amplificação em gel de poliacrilamida. Foi realizado um levantamento em literatura dos protocolos de amplificação de marcadores microssatélites em alfafa, a partir do qual foi realizada a padronização das condições de amplificação por reação em cadeia da polimerase. Para a otimização das reações, cada marcador selecionado foi testado em oito genótipos com uma temperatura de anelamento de 60°C, e aqueles que não amplificaram, foram avaliados a 55°C. O protocolo de reação da polimerase em cadeia que obteve sucesso na amplificação da maioria dos marcadores foi 10 ul de "5x PCR reaction buffer" e 1,25 U de enzima Taq, ambos Promega, dNTP 10 mM, 10 pmol/ul de cada *primer*, 30 ng de DNA, com volume final de 20ul. As condições de amplificação definidas foram: 94°C por quatro minutos, 35 ciclos de 94°C por um minuto, X°C por um minuto e 72°C por um minuto, com uma extensão final de sete minutos a 72°C, sendo X a temperatura específica de anelamento. Os marcadores al372288, al373004, aw686836 e aw695900 obtiveram bom perfil de amplificação à uma temperatura de 60°C, e os marcadores bg645450, MTR58, B21E13, MTIC247, MTIC451, MTLEC2A, AFct32, AFca11, aw01, mtic188 e MTIC189 à uma temperatura de 55°C, apresentando fragmentos em gel de agarose de acordo com o tamanho esperado. Os demais marcadores serão testados em gradiente de temperatura para determinar a melhor temperatura de anelamento na amplificação ou em reações do tipo touchdown. Esta otimização de amplificação dos locos visa a genotipagem de 78 genótipos de alfafa com os marcadores selecionados e a estimativa da diversidade genética existente entre os acessos, os quais, juntamente com os dados agromorfológicos, direcionarão os cruzamentos inter e intrapopulacionais entre os materiais.

**Apoio financeiro:** Embrapa

**Área:** Biotecnologia e Recursos Genéticos

**Palavras-chave:** *Medicago sativa*, SSR, diversidade genética, marcador molecular