



## **ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE “BRACHIARIA HUMIDICOLA” UTILIZANDO MARCADORES RAPD(1)**

LUCIMARA CHIARI(2), LEONARDO RIPPEL SALGADO(3), CACILDA BORGES DO VALLE(4), LETÍCIA JUNGSMANN CANÇADO(4), JOÃO VICTOR RODRIGUES DO VALLE(3), GISELE OLIVAS DE CAMPOS LEGUIZÁMON(5)

(1)Agências financiadoras: CNPq, Embrapa Gado de Corte, Fundect e UNIPASTO.

(2)Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional/CNPq da Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR262 Km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970, Campo Grande, MS. E-mail: lchiari@cnpgc.embrapa.br

(3)Estagiário da Embrapa Gado de Corte e Estudante de graduação em Ciências Biológicas na Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP). Centro de Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, Rua Alexandre Herculano, 1400, Parque dos Poderes, Cep: 79037-280, Campus III, Campo Grande – MS.

(4)Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte.

(5)Técnica de laboratório da Embrapa Gado de Corte.

### **RESUMO**

Marcadores RAPD foram utilizados para estimar a variabilidade genética em 58 acessos de “Brachiaria humidicola” do Banco de Germoplasma da Embrapa Gado de Corte. Foi realizada a descrição do padrão de bandas, o cálculo da similaridade genética utilizando o coeficiente de Dice e a análise de agrupamento pelos métodos de Tocher e UPGMA. Um total de 100 bandas foi obtido com o uso de 10 iniciadores randômicos, e 99% das bandas foram polimórficas. A similaridade genética variou de 0,14 a 0,97, sugerindo alta variabilidade genética neste grupo de acessos. Os resultados das análises de agrupamento pelos métodos de Tocher e UPGMA, foram muito similares e não mostraram relação com o local de origem dos acessos na África. No entanto, houve uma tendência em agrupar os acessos pelo nível de ploidia. O único acesso sexual tetraplóide estudado, BH30, ficou agrupado com a maioria dos acessos apomíticos tetraplóides por ambos os métodos. Estes resultados associados aos conhecimentos da biologia e agronomia de “B. humidicola” subsidiarão o melhoramento genético da espécie com o objetivo de desenvolver novas variedades com adaptações a diferentes regiões e ecossistemas brasileiros.

### **PALAVRAS-CHAVE**

agrupamento, marcadores moleculares, melhoramento genético vegetal, polimorfismo genético, similaridade genética, poliploidia.

## **ESTIMATION OF GENETIC VARIABILITY IN “BRACHIARIA HUMIDICOLA” ACCESSIONS USING RAPD MARKERS(1)**

### **ABSTRACT**

Random amplified polymorphic DNA markers were used to estimate the genetic variability in 58 accessions of “Brachiaria humidicola” from the Germplasm Bank at Embrapa Beef Cattle. A description of band patterns, calculation of genetic similarity by the Dice index and cluster analysis by Tocher and UPGMA methods were done. A total of 100 bands were generated with the use of 10 random primers,

and 99% of the bands were polymorphic. The genetic similarity ranged from 0.14 to 0.97, indicating a high genetic variability for the set of accession. Cluster analysis by Tocher and UPGMA methods were similar and did not show relation with the site of origin of the accessions in Africa. However, showed a tendency to cluster the accessions by ploidy level. The only sexual tetraploid accession studied, BH30, was grouped with the majority of the tetraploid and apomitic accessions by both methods. These results together with the biology and agronomy of "B. humidicola", will subsidize the breeding program of this species for the development of new varieties with adaptation to different Brazilian regions and ecosystems.

## **KEYWORDS**

clusters, molecular markers, plant breeding, polymorphism, genetic similarities, polyploidy.

## **INTRODUÇÃO**

A utilização de recursos genéticos nativos e/ou exóticos, estratégica no desenvolvimento de novas variedades de forrageiras, depende tanto da identificação de acessos superiores do ponto de vista agrônomo quanto da variabilidade genética para sua utilização em programas de melhoramento.

O conhecimento da variabilidade genética disponível no banco de germoplasma é extremamente relevante para o planejamento de cruzamentos divergentes bem como para orientar novas coletas ou intercâmbio de germoplasma para características de interesse específicas.

"Brachiaria humidicola" é uma espécie comercialmente importante e que está num grupo taxonômico distinto das demais espécies de "Brachiaria" utilizadas em pastagens. A Embrapa Gado de Corte dispõe de um banco de germoplasma com 58 acessos dessa espécie coletados originalmente em diferentes localidades da África. Esses acessos exibem baixa variabilidade fenotípica, e pela caracterização citogenética e embriológica realizada detectou-se diferentes níveis de ploidia, e prevalência da apomixia. Apenas um acesso tetraplóide sexual foi identificado, restringindo assim a possibilidade de hibridação entre os materiais disponíveis (Valle & Glienke, 1991).

O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade genética e a distância genética dos 58 acessos de "B. humidicola" utilizando a técnica de RAPD, visando auxiliar o programa de melhoramento dessa espécie em andamento nesse centro de pesquisa.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Cinquenta e oito acessos de "B. humidicola" do banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul, foram utilizados neste estudo. Para preservar informações do programa de melhoramento em andamento nessa instituição os acessos foram identificados por BH seguidos de números de 1 a 58.

O DNA desses acessos foi extraído segundo metodologia descrita por Bonato et al. (2002), utilizando o seguinte tampão de extração: CTAB 2%; NaCl 1,4 M; 2-b-mercaptoetanol 0,2%; EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; PVP 40 1%.

As concentrações dos DNAs extraídos foram estimadas após eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL), por comparação das bandas obtidas com padrões do DNA lambda (Invitrogen) de concentrações conhecidas (100 ng/mL, 300 ng/mL, 500 ng/mL).

As reações de amplificação foram feitas em volume final de 25 mL, contendo: 0,4 mM iniciador; 0,2 mM dNTPs (Invitrogen); 1,0 unit de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl e 30 ng de DNA. Seguiram-se 40 ciclos de amplificação: 94°C por 1 min, 40°C por 1,5 min e 72°C por 2 min, seguido de uma extensão final a 72°C, 7 min. Foi utilizado o termociclador PTC 100 (MJ Research).

Inicialmente cinco acessos de "B. humidicola" foram analisados com 36 iniciadores sintetizados pela Invitrogen, dos quais 10 foram selecionados para as análises dos 58 acessos: AB03, BB01, C02, E02, I14, L07, M02, M05, N01, Q06, todos com conteúdo GC entre 60-70% e que geraram bandas

(fragmentos de DNA amplificados) nítidas e reproduzíveis.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, já corado com brometo de etídio (0,5 mg/mL), e visualizados em transiluminador sob luz UV.

Os perfis de RAPD de cada acesso foram analisados pela presença “1” ou ausência “0” de bandas para cada iniciador. Em seguida, esses dados foram usados para construção de uma matriz de similaridade genética, com auxílio do programa GENES para Windows (Cruz, 1997), versão 2005, onde foi utilizado o coeficiente de similaridade de Dice (S). A partir do complemento aritmético dos valores de similaridade (1-S) fez-se as análises de agrupamento pelos métodos UPGMA (“Unweighted Pair-group Method with Arithmetical Average”) e Tocher.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 58 acessos de “*B. humidicola*” tiveram seus DNAs extraídos e amplificados com os 10 iniciadores previamente selecionados, os quais geraram um total de 100 bandas, perfazendo uma média de 10 bandas por iniciador. Este valor foi similar aos resultados descritos para outras espécies de gramíneas, Dong et al. (2003) em “*Vetiveria zizanioides*” obtiveram média de 12,2 bandas por iniciador e Chandra et al. (2004) em “*Dichanthium annulatum*” obtiveram média de 7,8 bandas por iniciador, em estudos de variabilidade genética utilizando RAPD.

A Figura 1 representa um perfil de RAPD obtido com o iniciador Q06 para os 58 acessos de “*B. humidicola*”, na qual observa-se um padrão de bandas nítidas de fácil avaliação.

A similaridade genética (S) variou de 0,14 a 0,97, denotando uma significativa variabilidade genética entre os acessos deste germoplasma, apesar da grande similaridade morfológica. Os acessos mais similares geneticamente foram BH40 e BH41 (97%) e os mais divergentes geneticamente foram BH19 e BH39 (14%).

Outros trabalhos, que avaliaram a variabilidade genética utilizando RAPD em gramíneas, tiveram resultados similares, Dong et al. (2003) em “*Vetiveria zizanioides*” obtiveram valores de similaridade genética que variaram de 0,541 a 0,995 e Chandra et al. (2004) em “*Dichanthium annulatum*”, de 0,38 a 0,98.

O acesso BH30, único com modo de reprodução sexuada, foi geneticamente mais similar ao acesso BH31 (0,78) e mais divergente do acesso BH53 (0,41). Estes dados, aliados a informações já existentes sobre a citogenética e caracterização agrônômica, serão de suma importância no programa de melhoramento recém iniciado dessa espécie, especialmente na escolha dos genitores para hibridação e obtenção de novas variedades.

Os valores de dissimilaridade genética (1-S) foram utilizados para as análises de agrupamento pelos métodos de Tocher e UPGMA. O primeiro classificou os 58 acessos em 4 grupos distintos, sendo um grande grupo com 42 acessos, incluindo o BH30 (sexual) e três outros menores, um com 4 acessos e dois grupos com apenas um acesso cada (Tabela 1).

A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética os dados de dissimilaridade genética foram utilizados para a construção de um dendrograma pelo método UPGMA (Figura 2). Dois grupos podem ser facilmente distinguidos pela análise do dendrograma; o primeiro grupo corresponde ao grupo I da tabela de Tocher, exceto pelo acesso BH08 e o segundo grupo corresponde ao grupo II, exceto pelo acesso BH38.

Em ambos os métodos de agrupamento utilizados, a formação dos grupos parece não estar relacionada ao local de origem dos acessos, os quais não foram mencionados neste estudo, mas foram considerados nas análises.

Ainda observando o dendrograma, o grupo I pode ser subdividido em pelo menos três subgrupos (Ia, Ib e Ic). No subgrupo “Ia” foram agrupados a maioria dos acessos tetraplóides, incluindo o único acesso sexual (BH30), e a maioria dos hexaplóides. Os sete acessos comerciais estudados, cinco deles hexaplóides e um tetraplóide (BH48), ficaram agrupados no subgrupo “Ib”. O subgrupo “Ic” foi formado por dois acessos tetraplóides, BH08 e BH19. Já, o grupo II foi formado por cinco acessos, dos quais

três são pentaplóides, um é tetraplóide BH38 e o acesso BH13 ainda não foi determinado o nível de ploidia. Os dados sobre o nível de ploidia do material estudado foram obtidos de Penteado et al. (2000) e Pagliarini et al. (dados não publicados).

Esses resultados aliados aos conhecimentos de citogenética e caracterização morfológica de *B. humidicola* serão de suma importância no programa de melhoramento recém iniciado dessa espécie especialmente na escolha dos genitores para hibridação e obtenção de novas variedades com adaptações a diferentes regiões e ecossistemas brasileiros.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados indicam uma alta variabilidade genética entre os 58 acessos de "*B. humidicola*", fazendo deste um germoplasma valioso para o melhoramento e seleção de novas cultivares, justificando sua manutenção.

A distribuição dos 58 acessos de "*B. humidicola*" nos diferentes grupos formados tanto pelo método UPGMA quanto pelo método de Tocher foi independente do local de origem dos mesmos na África.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. BONATO, A.L.V.; VALLE, C.B.; JANK, L. et al. "Extração de DNA genômico de "*Brachiaria*" e "*Panicum maximum*". Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 78)
2. CHANDRA, A., SAXENA, R., ROY, A.K. et al. Estimation of genetic variation in "*Dichanthium annulatum*" genotypes by the RAPD technique. "*Tropical Grasslands*", v.38, n.4, p.245-258, 2004.
3. CRUZ, C.D. "Programa genes - aplicativo computacional em genética e estatística". Viçosa: Editora UFV, 1997. 442p.
4. DONG, Z.; XIE, X.; LU, X. et al. Study on the genetic diversity of vetiver grass ("*Vetiveria zizanioides*"). In. Xu L.Y. (Ed.) "*Vetiver and water - an eco-technology for water quality improvement, land stabilization, and environmental enhancement*". Guangzhou: Chinese Academy of Sciences, 2003. p.524-531.
5. PENTEADO, M.I.O.; SANTOS, A.C.M.; RODRIGUES, I.F.; VALLE, C.B.; SEIXAS, M.C.; ESTEVES, A. "Determinação de ploidia e avaliação de quantidade total em diferentes espécies do gênero "*Brachiaria*". Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. 32 p. (Embrapa Gado de Corte. Boletim de Pesquisa, 11).
6. VALLE, C.B.; GLIENKE, C. New sexual accessions in *Brachiaria*. "*Apomixis Newsletter*", v.3, p.11-13, 1991.