

EFEITO DO CULTIVO MINIATURIZADO *IN VITRO* NA ESTABILIDADE GENÔMICA EM ACESSOS DE CAPIM-ELEFANTE

Robert Domingues¹; Leônidas Paixão Passos²; Maria Coletta Vidigal²; Antonio Vander Pereira²; Marco Antonio Machado².

1 – Estudante do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora e estagiário na Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, MG do Laboratório de Genética Molecular;

2 – Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, MG;

Palavras Chave: variação somaclonal, *Pennisetum purpureum*, RAPD.

INTRODUÇÃO

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é uma gramínea de alto potencial de produção de matéria seca, se adapta muito bem às condições de clima e solo de praticamente todo o Brasil (Deresz e Mozzer, 1997; Deresz, 1999), apresenta ampla variabilidade genética e é considerado uma das forrageiras mais importantes e difundidas no país. Com o objetivo de evitar a perda de genótipos e disponibilizar material para o melhoramento e produção clonal, a Embrapa Gado de Leite (CNPGL) vem mantendo um Banco Ativo de Germoplasma (BAGs) *in vitro* de capim-elefante.

Um dos maiores problemas associados à cultura de tecidos miniaturizados *in vitro*, quando utilizada para reprodução clonal ou conservação de germoplasma, é a possibilidade de indução de variabilidade genética e fenotípica, denominada variação somaclonal (Larkin e Scowcroft 1981).

Vários tipos de mutações têm sido descritos em variantes somaclonais, incluindo mutações pontuais, duplicação de genes, rearranjos cromossômicos e alterações do número cromossômico (Kaepler et al. 2000, Peschke e Phillips 1992, Phillips et al. 1994). Movimentação de transposons e modificação do padrão de metilação do DNA (Koukalova et al. 2005, Kubis et al. 2003, Smulders et al. 1995), possivelmente através da ação de *small interfering* RNAs (Lippman et al. 2003), também têm sido descritos como potencial mecanismo causador de alguma variação somaclonal.

Uma vez que o BAG *in vitro* de capim-elefante visa a conservação genotípica e fenotípica dos diversos cultivares, torna-se fundamental a análise da ocorrência de tal conservação. Técnicas moleculares são poderosas e valiosas ferramentas usadas em análises de fidelidade genética de plantas propagadas *in vitro* (Martins et al. 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade genômica de clones de capim elefante regenerados *in vitro* a partir da técnica de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal:

Vinte e quatro cultivares, listados na Tabela 1, foram analisados neste estudo. Foram coletados tecidos foliares de exemplares da casa de vegetação e de clones miniaturizados do Laboratório de Fisiologia Vegetal, ambos situados na CNPGL.

Extração de DNA

O tecido foliar coletado foi congelado e estocado em nitrogênio líquido até a extração do DNA genômico, sendo esta de acordo com Grattapaglia e Sederoff 1994. A qualidade e concentração do DNA foram avaliadas por espectrofotometria (GeneQuant Pro RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

Amplificação por RAPD:

Inicialmente, utilizando duas das amostras extraídas, 200 primers decâmeros da Operon Technologies Inc. foram testados para triar quais destes produziriam marcadores de RAPD de boa resolução e repetibilidade.

As amplificações por RAPD foram realizadas de acordo com Williams et al. (1990) no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com programa contendo 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, seguido de 45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 36°C e 2 minutos a 72°C, e, por fim, 10 minutos a 72°C para amplificação final. O volume total de cada reação foi de 25ul, contendo 10mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.4 µM primer, 0.1 mM de cada dNTP, 1 unidade de Taq DNA polymerase, e 45 ng de DNA genômico.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose de concentração de 1.5%, corados com brometo de etídio e fotodocumentados sobre luz UV.

Análise dos dados:

Somente os marcadores RAPD de boa intensidade foram analisados, e, para estes, os indivíduos foram classificados como: sem fragmento (0) ou com fragmento (1). A similaridade genética foi calculada usando o índice de similaridade Dice (Sneath e Sokal 1973).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 38 primers de RAPD (Tabela 2) usados nesta análise totalizaram 112 bandas nítidas distintas, variando de 300bp (no primer OPB17) a 3200bp (OPA07). Destas, 18 foram monomórficas para as 48 amostras. O número de tipos de bandas por primer variou de 1 banda nos primers OPB03, OPB10, OPC11 e OBJ08 a 7 nos primers OPC15 e OPI16. O fato de apenas

bandas de boa intensidade serem consideradas para presente estudo, aumenta a confiabilidade do mesmo por proporcionar maior repetibilidade da técnica (Figura 1). Os valores de similaridade genética entre as duplas (Tabela 1) variou de 0,64 a 1,00 tendo média de 92,04.

Vários estudos têm visado explicar o porquê da ocorrência de variação somaclonal e da diferença entre as taxas de variação. Hashmi et al. (1997), Hammerschlag (2000) e Al-Zahim et al. (1999) encontraram evidências de que a frequência de variação somaclonal é genótipo dependente. Estudos de mutações qualitativas em cultura de tecidos indicam que as mutações acumulam sequencialmente com o tempo de cultura (Fukui, 1983; Zehr *et al.*, 1987). Vendrame et al. (1999) analisaram a variação somaclonal em embriões de *Carya illinoensis* usando marcadores AFLP e concluíram que a variação genética em uma cultura *in vitro* pode ser afetada mais pelo genótipo que pelo período de cultura. Diversos autores, assim como Hofmann et al. (2004) também explicam as diferentes taxas de variação como dependente do tipo de regeneração bem como do tipo de tratamento utilizado no estabelecimento da planta *in vitro*.

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar a variação encontrada dentro dos diferentes cultivares neste trabalho. Uma é a de que assim como encontrado por Al-Zahim et al. (1999) em estudos com diferentes cultivares de alho, a taxa de variação somaclonal seria cultivar dependente. Outra hipótese é a de que o tempo de cultura e/ou o tipo de tratamento seriam, também, responsáveis por tal variação, já que estes cultivares apresentam diferenças consideráveis para tais fatores.

Há ainda a possibilidade de que, principalmente para os cultivares “Napier S.E.A.”, “Roxo Botucatu”, “HV 290 23AxElefante B”, “Mineirão IPEACO” e “Australiano”, que apresentaram menor índice de similaridade genética, alguns dos exemplares de cada dupla (proveniente da casa de vegetação ou miniaturizado) esteja com erro de identificação não sendo representante do cultivar indicado.

Como continuidade deste trabalho, estão previstas as análises estatísticas da variabilidade encontrada comparando-as com o histórico da micropropagação das amostras estudadas, com o objetivo de tentar explicar a instabilidade genômica encontrada. Outro passo a ser realizado é a extração de DNA dos cultivares localizados em Conorel Pacheco – MG, e comparar por RAPD com os exemplares utilizados neste estudo para verificar se realmente ocorreu algum erro na identificação das amostras.

É altamente desejável o uso de outras estratégias para o monitoramento da estabilidade genética, incluindo análises citogenéticas e detecção de possíveis mudanças no padrão de metilação de DNA, como por exemplo usando MSAP (methylation sensitive amplified polymorphism).

CONCLUSÃO

O tratamento realizado na miniaturização das amostras utilizadas para o presente trabalho não foi totalmente adequado, visto a ocorrência de instabilidade genômica significativa na maioria das amostras.

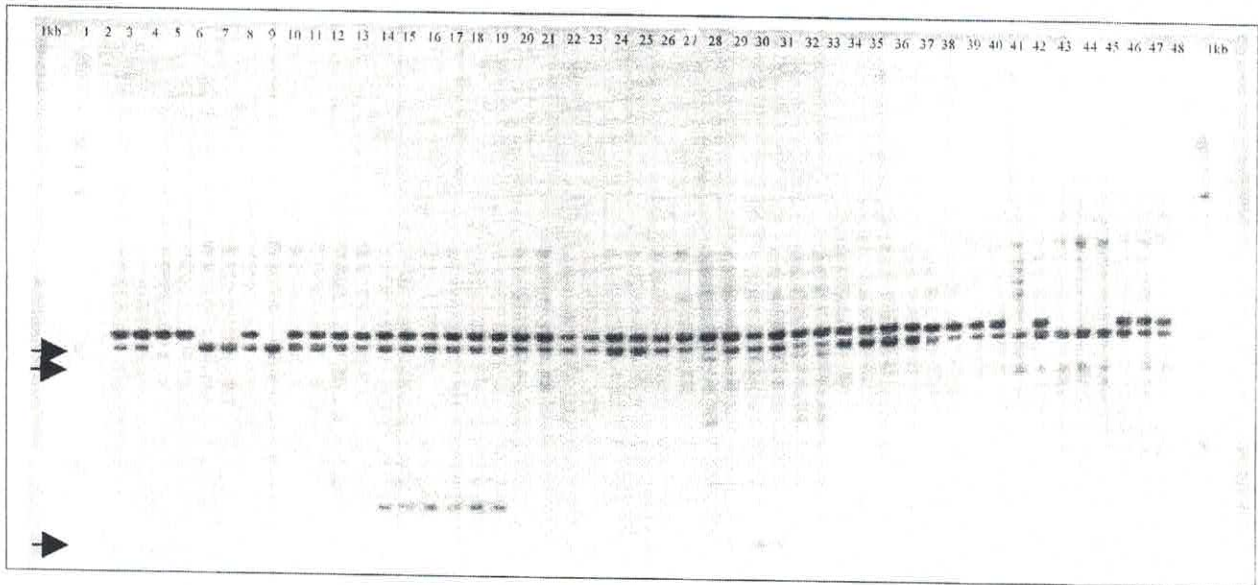


Figura 1: Padrão de amplificação de cultivares de capim-elefante por RAPD. Primer OPB12. Somente bandas de DNA mais intensas foram analisadas (setas).

Tabela 1: Relação dos cultivares e dos índices de similaridade encontrados

Cultivar	Índice de similaridade
01 AD IRI	0,97
07 AD IRI	0,97
Australiano	0,85
Cameroon-Piracicaba	1,00
Cuba-115	0,99
Cuba-116	0,88
Guacu	0,96
Guaçu/I.Z. 2	0,98
HV 290 23A x Elefante B	0,82
King Grass	0,94
Kizozi	0,95
Mercker x 23A	0,97
Mineirao IPEACO	0,78
Mineiro	0,99
Napier S.E.A.	0,64
Napier x 239 DA-2	0,97
Napier x 23A	0,93
P241 Piracicaba	0,99
Pusa Gigante Napier	0,93
Roxo	0,90
Roxo Botucatu	0,94
Taiwan A-148	0,96
Três Rios	0,97
Vruckwona Africano	0,83

Tabela 2: Relação dos 38 primers utilizados

Primers	
Kit	A01, A02, A05, A09, A15, A17,
OPA	A19
Kit	
OPB	B03, B10, B12, B17, B18, B19
Kit	C03, C05, C08, C11, C15, C17,
OPC	C20
Kit	
OPD	D09, D18, D19
Kit	
OPE	E01, E05
Kit	
OPF	F05, F08
Kit	
OPG	G02, G07, G09, G14, G15
Kit	
OPI	I09, I16
Kit	
OPJ	J05, J06, J08, J14

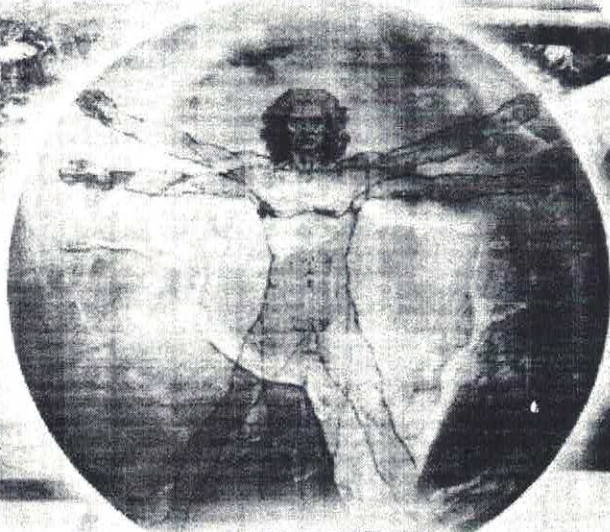
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-ZAHIM, M. A.; FORD-LLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports*, n. 18, 473–477, 1999.
- DERESZ, F. Capim-elefante manejado em sistema rotativo para produção de leite e carne. In: PASSOS, L.P.; MARTINS, C.E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A.V. (Ed.) *Biologia e manejo do capim-elefante*. Juiz de Fora: EMBRAPA, CNPGL, 131-160, 1999.
- DERESZ, F.; MOZZER, O.L. Produção de leite em pastagem de capim elefante. In: CARVALHO, M.M.; ALVIM, M.J.; XAVIER, D.F.; CARVALHO, L.A. (Ed.) *Capim-elefante: produção e utilização*. 2.ed. Juiz de Fora: EMBRAPA, CNPGL, 189-219, 1997.
- FUKUI, K. Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus. *Theoretical and Applied Genetics*, n. 65, 225–230, 1983.
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic Linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudotestcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, n. 137, 121–1137, 1994.
- HAMMERSCHLAG, F.A. . Resistant responses of peach somaclone 122-1 to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* and to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *HortScience*, n. 35, 141–143, 2000.
- HASHMI, G.; HUETTEL, R.; MEYER, R.; KRUSBERG, L.; HAMMERSCHLAG, F. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Reports*, n. 16, 624–627, 1997.
- HOFMANN, N. E.; RAJA, R.; NELSON, R.L.; KORBAN S.S. .Mutagenesis of Embryogenic Cultures of Soybean and Detecting Polymorphisms Using RAPD Markers. *Biologia Plantarum*, v. 48, n. 2, 173-177, 2004.
- KAEPPLER, S. M.; KAEPPLER, H. F.; RHEE, S. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, n. 43, 179–188, 2000.
- KOUKALOVA, B.; FOJTOVA, M.; LIM, YK.; FULNECEK, J.; LEITCH AR, KOVARIK, A. Dedifferentiation of tobacco cells is associated with ribosomal RNA gene hypomethylation, increased transcription, and chromatin alterations. *Plant Physiology*, n. 139, 275–286, 2005.
- KUBIS, S.E; CASTILHO, A. M. M. F., VERSHININ, A.V.; HESLOP-HARRISON, J.S. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology*, n. 52, 69–79, 2003.

- LARKIN, P.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, n. 60, 197–214, 1981.
- LIPPMAN, Z.; MAY, B.; YORDAN, C.; SINGER, T.; MARTIENSSEN, R. Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biology*, n. 1, 420–428, 2003.
- MARTINS, M.; SARMENTO, D.; OLIVEIRA, M. M. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports*, n. 23, 492–496, 2004.
- PESCHKE, V. M.; PHILLIPS, R.L. Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics*, n. 30, 41–75, 1992.
- PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, n. 91, 5222–5226, 1994.
- SMULDERS, M. J. M.; RUS-KORTEKAAS, W.; VOSMAN, B. Tissue culture induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants. *Theoretical and Applied Genetics*, n. 91, 1257–1264, 1995.
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R.R. *Numerical taxonomy. The principles and practices of numerical classification*. W.H. Freeman, San Francisco, USA, 1973.
- VENDRAME, W.A.; KOCHERT, G.; WETZSTEIN, H.Y. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant Cell Reports*, n. 18, 853–857, 1999.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, n. 18, 6531–6535, 1990.
- ZEHR, B. E.; WILLIAMS, M. E.; DUNCAN, R. D.; WIDHOLM, J.M. Somaclonal variation among the progeny of plants regenerated from callus cultures of seven inbred lines of maize. *Canadian Journal of Botany* n. 65, 491–499, 1987.

XXX SEMANA DE BIOLOGIA

O MUNDO SE TORNOU PEQUENO PARA VOCE



MAS VOCÊ NÃO É GRANDE PARA O MUNDO

- > XIII MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA
- > V FEIRA MUNICIPAL DE CIÊNCIAS
- > II MOSTRA DE PALEOBIODIVERSIDADE
- > MINI-CURSOS

> CICLO DE PALESTRAS:

- BIOCOMBUSTÍVEL
- DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
- FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL
- CONSERVAÇÃO ECOSISTEMAS
- AQUECIMENTO GLOBAL
- MODELO DE DESENVOLVIMENTO
- PROTOCOLO DE KYOTO

INSCRIÇÕES: a partir de 01 de outubro
no DA de Biologia ICB - UFJF

INFORMAÇÕES: semanabio2007@gmail.com
Tel.: 08297442 / 08148606 / 08364406 / 99462812

