

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS DE *Cratylia argentea* BASEADA EM MARCADORES ISSRs.

Pricila Palla Costa¹, Philipe Ribeiro Furtado de Mendonça², Marco Antônio Machado³, Antônio Vander Pereira³, Ana Luisa Sousa Azevedo³, Cristina Maria Pinto de Paula¹, Robert Domingues⁴, Maurício Marini Köpp² e Francisco José da Silva Lédo³

Resumo

A leguminosa *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze possui grande potencial forrageiro devido, principalmente, a sua capacidade de persistência sob longos períodos de seca. Este trabalho teve o objetivo de analisar a dissimilaridade genética de 29 genótipos de *Cratylia argentea*. O estudo foi realizado na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG, no período de 2008 a 2009. O DNA genômico dos genótipos foi acessado com 14 *primers* ISSRs para obtenção dos marcadores moleculares. Através dos marcadores encontrados foi construída uma matriz binária a partir da qual foram realizadas as análises de agrupamento e estimada as distâncias genéticas dentro e entre os genótipos. Foram obtidos 81 marcadores, dos quais 70 (86,4%) foram polimórficos. As distâncias genéticas variaram de 0,0719 (entre 019 e 167) a 0,1626 (entre 647 e Costa Rica). Os resultados obtidos mostram a existência de grande variabilidade genética entre os genótipos avaliados.

Introdução

Cratylia argentea (Desvaux) O. Kuntze é uma leguminosa arbustiva nativa da América do sul que tem sido destacada pela suas qualidades como forrageira. É uma planta perene de notável resistência durante a seca, sendo uma das poucas que permanece com altas proporções de folhas verdes antes de iniciar o período das chuvas (XAVIER; CARVALHO; BOTREL, 1990).

As plantas arbustivas em geral, são capazes de oferecer maior biomassa que as herbáceas, são mais tolerantes ao manejo inadequado, possuem boa capacidade de rebrotar, e oferecer forragem de qualidade mesmo sob períodos de secas prolongadas, além disso, são consideradas de uso múltiplo ou multipropósito, pois também servem de cercas vivas, fonte de lenha, auxiliam no controle da erosão, contribui na fixação e ciclagem do N, e dão aporte de matéria orgânica ao solo (PIZARRO, 2005).

A baixa disponibilidade e qualidade de forragem na época seca são fatores limitantes para produção de carne e leite, sendo necessário ao produtor o uso de leguminosas arbustivas como fonte protéica, para suplementar gramíneas de baixa qualidade (LASCANO, 1995). Assim *C. argentea* que é capaz de produzir grandes quantidades de forragem rica em proteína (XAVIER; CARVALHO; BOTREL, 1990) pode se tornar uma boa opção para o uso consorciado.

Existem diversos trabalhos a respeito das vantagens agrônômicas de *C. argentea*, porém, faltam estudos sobre a variabilidade genética dessa forrageira, que poderia facilitar a identificação dos cruzamentos que, teoricamente, irão apresentar maior efeito heterótico na progênie e maior probabilidade de recuperação de genótipos superiores nas gerações segregantes.

Vários marcadores são conhecidos, entre eles, o ISSR tem mostrado a reprodução de marcas altamente confiáveis. Considerado de boa reprodutibilidade e altamente informativo, o ISSR é uma técnica rápida e de fácil manipulação e que tem a reprodutibilidade semelhante à dos microssatélite provavelmente devido ao longo comprimento de seus *primers* (BORNET; BRANCHARD, 2001). Além disso, características como o baixo custo de desenvolvimento, procedimentos laboratoriais relativamente simples e que podem ser transferidos a outras espécies de plantas, e a não necessidade de informação prévia da sequência de DNA, tem ampliado o uso de ISSR para estudos de Diversidade genética (BARTH; MELCHINGER; LUBERSTEDT, 2002).

¹ Estudantes do curso de Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Campus Estrela Sul: Av. Luz Interior nº 345, Bairro Estrela Sul, Juiz de Fora, MG. CEP 36033-240. E-mail: pricilapalla@hotmail.com

² Estudante de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

³ Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Bairro Dom Bosco, Juiz de Fora, MG. CEP 36038-330. E-mail: machado@cnpq.embrapa.br

⁴ Bolsista da Embrapa Gado de Leite.

Apoio financeiro: CNPq, FAPEMIG e UNIPASTO.

Assim, este trabalho teve como objetivo estimar a variabilidade genética entre os 29 acessos de *C. argentea*, e contribuir com informações sobre a base genética desta planta através do uso de marcadores ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*).

Material e Métodos

Neste trabalho foram utilizados 29 genótipos de *C. argentea* da coleção de *Cratylia* da Embrapa Gado de Leite (Tabela 1). Foram avaliadas cinco plantas de cada genótipo, totalizando assim 145 indivíduos (cinco indivíduos por genótipo). Folhas das regiões meristemáticas foram colhidas e o DNA genômico foi extraído baseado no protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1995) com modificações. As amostras de DNA foram amplificadas via PCR para obtenção de marcadores ISSRs.

Cada reação continha: 0,5µM do *primer*; 100mM Tris-HCl (pH 8,4); 500mM KCl; 1,5 ou 2,0mM MgCl₂ (dependendo do *primer*); 0,15mM dNTP; 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 30ng de DNA genômico em um volume final de 25 µL.

Foram utilizados 14 *primers* desenvolvidos pelo laboratório de Biotecnologia da British Columbia University (UBC-815, UBC-818, UBC-820, UBC-823, UBC-824, UBC-827, UBC-830, UBC-835, UBC-841, UBC-844, UBC-848, UBC-851, UBC-857, UBC-859). As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) sob a seguinte condição: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguido por 45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 50°C, 2 minutos a 72°C, e por fim 7 minutos a 72°C para extensão final.

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% a aproximadamente 120 volts durante 5 horas. A coloração do gel foi feita por imersão em solução de brometo de etídeo (3mg/mL) durante 30 minutos. Em seguida os géis corados foram fotografados sob luz ultravioleta usando o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene) que permite a visualização dos fragmentos. O tamanho dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação com o marcador molecular de 200pb (Promega).

O scoring dos marcadores foi realizado utilizando o programa RFLPscan, sendo que apenas os fragmentos de boa resolução (intensidade e nível de amplificação) foram levados em consideração. Foi construída uma matriz binária, a partir da qual foi estimada as distâncias genéticas média (DGMs) entre os genótipos com base no complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li (NEI e LI, 1979) utilizando-se o Programa Genes (CRUZ, 2006). O Programa NTSys Pc 2.1m (ROHLF, 2000) também foi usado para realizar a construção do dendograma usando como método de agrupamento a ligação média entre grupos (UPGMA-*Unweighted pair-group method with arithmetic mean*) e a consistência do dendograma gerado foi avaliada pela correlação entre a matriz de dissimilaridade e a matriz co-fenética (SOKAL; ROHLF, 1962).

Resultados e Discussão

Foram encontrados 81 marcadores ISSR com a utilização de 14 *primers*, tendo em média seis marcadores por *primer*. Apesar da média ser relativamente baixa, deve-se ressaltar que foram analisadas somente bandas altamente confiáveis. Do total de 81 marcadores, 70 (86,4%) foram polimórficos mostrando que existe uma alta variabilidade genética no banco de germoplasma de *Cratylia*. A menor porcentagem de bandas polimórficas dentro do genótipo, ocorreu no genótipo BRA 167 (24,19%), e a maior BRA 647 (63,93%).

A distância genética de Nei e Li varia de 0 a 1 e quanto mais próxima de 1 for a estimativa entre dois genótipos mais distantes geneticamente eles serão. Ao analisar os 29 genótipos de *Cratylia*, verificou-se que os dois mais próximos foram BRA 019 e BRA 167 (0,0719), enquanto os mais distantes foram BRA 647 e Costa Rica (0,1626). Já na análise do genótipo individualizado, verificou-se que BRA 167 possui menor variabilidade genética (0,0597) e BRA 647 a maior variabilidade (0,1841).

Através do dendograma podem ser visualizadas as distâncias relativas entre o grupo de genótipos utilizados no estudo. A linha vertical representa a média das distâncias entre os genótipos. Pode ser identificados a formação de nove grupos, sendo um grande grupo constituído de 11 genótipos e os outros 8 grupos com apenas um indivíduo. O resultado da análise de correlação co-fenética demonstrou

uma associação de 90% entre as distâncias obtidas pelo coeficiente de *Nei e Li* (matriz de dissimilaridade) e as representadas no dendrograma (matriz cofenética).

A utilização de genótipos de elevada divergência genética em cruzamentos é uma estratégia muito empregada pelos programas de melhoramento a fim de obter maior vigor híbrido ou heterose. Neste sentido, a recomendação de cruzamentos deve priorizar a utilização de genótipos ou grupo de genótipos de maior distância genética possível. Com base nos resultados observados no dendrograma, pode ser constatado que o cruzamento de qualquer genótipo com o com o genótipo 18 é altamente recomendado, pois este genótipo está altamente distante dos demais. O cruzamento entre o genótipo 18 com o grupo formado pelos 11 genótipos deve ser priorizado pois aumenta ainda mais a distância entre os genótipos envolvidos possibilitando maior probabilidade de ganho genético na progênie.

Conclusões

Os marcadores moleculares ISSRs foram altamente eficientes para acessar a variabilidade genética entre e dentro dos genótipos visto o grande número de marcas encontradas e o alto polimorfismo reproduzido. Assim, foi possível demonstrar que o banco de germoplasma possui uma ampla base genética devido a grande variabilidade genética verificada.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CNPq, FAPEMIG e UNIPASTO pelo apoio financeiro ao projeto.

Referências

- BARTH, S.; MELCHINGER, A. E.; LUBBERSTEDT. 2002. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Henynh. Investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and Inter-simple sequence repeat (ISSR) markerers. *Molecular Ecology*, 11: 495-505.
- BORNET, B. e BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215, 2001.
- CRUZ, CD. 2006. *Programa Genes: biometria*. Viçosa: Imprensa Universitária, 480p
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 1995 2 ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN. 220p.
- LASCANO, C. E. 1995. Calidad Nutritiva y Utilización de *Cratylia argentea*. In: PIZARRO, E. A. e CORADIN, L. (Eds.). *Potencial del género Cratylia como leguminosa forrajera*. Memórias del taller de trabajo sobre *Cratylia* realizado el 19 y 20 de julio de 1995, Brasília, DF, Brasil. EMBRAPA, CENARGEN, CPAC, CIAT, 1995. p.83-97.
- NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United Stats of America*, v. 76, p 5269-5273, 1979.
- PIZARRO, E. A. 2005. *Espécies arbustivas, Gramíneas y Leguminosas para el trópico americano*. IX Seminario de Pastos y Forrajes. Curitiba, Paraná, UFPR, 2005. p.30-49.
- ROHLF, F.J. *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1*. 2000. New York: Exeter Software, 2000.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, Berlin, v.11, p.30-40, 1962.

XAVIER, D. F.; CARVALHO, M. M.; BOTREL, M. A. 1990. Curva de crescimento e acumulação de proteína bruta de leguminosa *Cratylia floribunda*. *Pasturas Tropicais*, vol.12 No.1. 35-38.

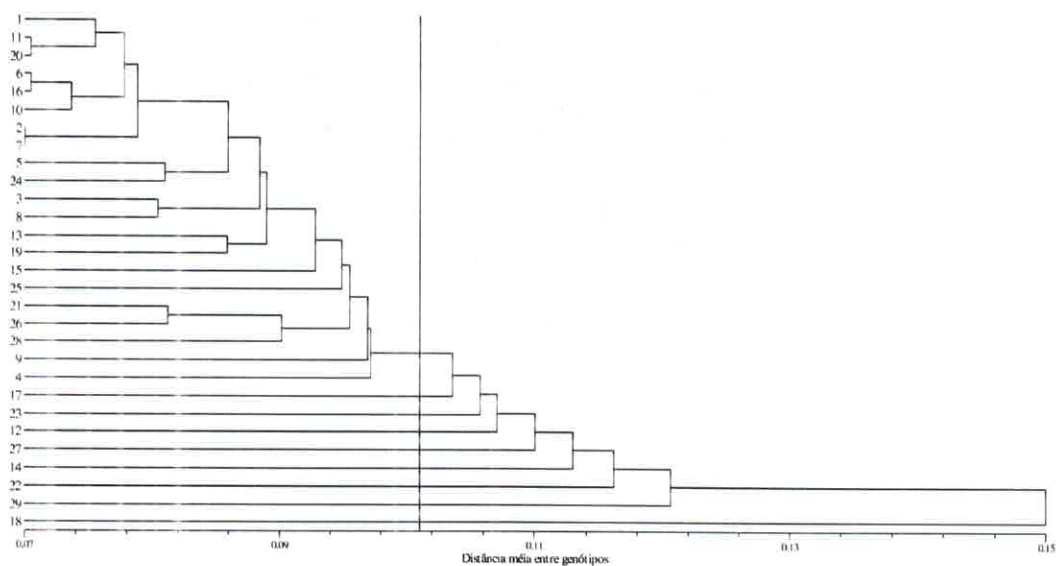


Figura 1. Análise de agrupamento dos 29 genótipos de *Cratylia argentea* baseado na matriz de distância genética média calculadas pelo método de agrupamento UPGMA.

Tabela 1. Código do banco de germoplasma dos 29 genótipos de *C. argentea*.

Número do genótipo	Cód	Número do genótipo	Cód
1	IMV 01	16	612
2	19	17	621
3	27	18	647
4	35	19	671
5	124	20	680
6	132	21	710
7	167	22	728
8	175	23	736
9	221	24	787
10	515	25	868
11	566	26	876
12	574	27	884
13	575	28	CNPGL
14	591	29	Costa Rica
15	604		

ANAIS do 5º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas



5º CBMP

10 a 13 de agosto de 2009
SESC - GUARAPARI-ES

*© melhoramento e os novos
cenários da agricultura.*

Documentos nº 011
ISSN 1518-4854