



IV WORKSHOP DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE LEITE

Juiz de Fora, Minas Gerais | 24 de Julho de 2009



Variabilidade genética em *Cratylia argentea* usando marcadores *moleculares 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 Köpp³ e Francisco José da Silva Lédo³

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: pallapc@gmail.com, cris0283@hotmail.com

² Estudante de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: philiperfm@gmail.com

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@cnppl.embrapa.br, avanderp@cnppl.embrapa.br, azevedo@cnppl.embrapa.br, ledo@cnppl.embrapa.br

⁴ Bolsista da Embrapa Gado de Leite. Email: robertdomingues@yahoo.com.br.

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 acessos 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 acessos foi investigado 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 média (DGMs) dentro e entre os acessos. Foram obtidos 81 marcadores, dos quais 70 (86,4%) foram polimórficos. A menor distância intra-acesso foi de 0,0597 (acesso 7) e a maior foi de 0,1841 (acesso 18), enquanto as distâncias genéticas entre acessos variaram de 0,0719 (entre acessos 2 e 7) a 0,1626 (entre acessos 18 e 29), não foram verificados indivíduos clones (DGM=0). Os resultados obtidos mostram a existência de grande variabilidade genética entre os genótipos avaliados.

Palavras-chave: *Cratylia argentea*, diversidade genética, forrageira leguminosa, marcador molecular, polimorfismo

Genetic variability in *Cratylia argentea* using ISSR molecular markers

Abstract: The legume *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze has great forage potential, primarily due to its ability to persist under long periods of drought. This study aimed to examine the genetic dissimilarity of 29 accessions of *Cratylia argentea*. The study was conducted at Embrapa Dairy Cattle, in Juiz de Fora - MG, in the period 2008 to 2009. The genomic DNA of accessions was investigated with 14 *primers* ISSRs for obtaining molecular markers. Through the markers found was built a binary matrix, made the analysis of group and was estimated the average genetic distances (DGMs) within and among accessions. 81 markers were obtained, of which 70 (86.4%) were polymorphic. The lowest intra-access distance was 0,0597 (access 7) and the higher was 0,1841 (access 18), while the genetic distances between accessions ranged from 0.0719 (between access 2 and 7) to 0.1626 (between access 18 and 29), were not verified clones individuals (DGM = 0). The results show the existence of high genetic variability between genotypes.

Keywords: *Cratylia argentea*, genetic diversity, forage legume, molecular markers, polymorphism

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 e 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, auxiliam no controle da erosão, contribui na fixação e ciclagem do N, e dão aporte de matéria orgânica ao solo.

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 e 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. 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 das sequências de DNA, tem ampliado o uso de ISSR para estudos de diversidade genética (BARTH, MELCHINGER, e LUBERSTEDT, 2002). Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a variabilidade genética entre 29 acessos de *Cratylia argentea* da coleção da Embrapa Gado de Leite através da utilização de marcadores moleculares ISSR, e assim oferecer informações de base genética contribuindo para futuros trabalhos de pesquisa com esta espécie.

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: 0,5 μ M 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 μ L.

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. O Programa NTSys Pc 2.1m também foi usado para realizar a construção do dendrograma usando como método de agrupamento a ligação média entre grupos (UPGMA-*Unweighted pair-group method with arithmetic mean*) e a consistência do dendrograma gerado foi avaliada pela correlação entre a matriz de dissimilaridade e a matriz co-fenética (SOKAL e 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 germoplasma de *Cratylia*. A menor porcentagem de bandas polimórficas dentro do acesso, ocorreu no acesso 7 (24,19%), e a maior no acesso 18 (63,93%) (Tabela 1).

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 acessos de *Cratylia*, verificou-se que os dois mais próximos foram os acessos 2 e 7 (0,0719), enquanto os mais distantes foram 18 e 29 (0,1626). Estes resultados demonstram que entre os acessos não existe grandes distâncias genéticas o que condiz com o esperado já que este material é oriundo de uma região formada por planaltos, com ausência de barreiras geográficas significativas e condições edafoclimáticas parecidas, que podem ter favorecido o fluxo gênico entre essas plantas.

Já na análise individualizada, verificou-se que o acesso 7 possui menor variabilidade genética (0,0597) e 18 a maior variabilidade (0,1841). Em alguns casos a DGM intra-acesso foi superior a DGM inter-acesso sugerindo a troca de material genético entre diferentes genótipos o que poderia ser ocasionada por ação de polinizadores.

Através do dendrograma (figura 1) 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 21 acessos os e os outros 8 grupos com apenas um indivíduo cada. O resultado da análise de correlação cofenética 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 acesso com o acesso 18 é altamente recomendado, pois este está altamente distante dos demais. O cruzamento entre o acesso 18 com o grupo formado pelos 21 acessos deve ser priorizado, pois aumenta ainda mais a distância entre os genótipos envolvidos possibilitando maior probabilidade de ganho genético na progênie.

Tabela 1 Número total de marcadores e porcentagem de bandas polimórficas (PPBP encontradas em cada acesso de *Cratylia*.

| nº do acesso | nº de marcadores | PPB | nº do acesso | nº de marcadores | PPB |
|--------------|------------------|-------|--------------|------------------|-------|
| 1 | 58 | 29,31 | 16 | 58 | 29,31 |
| 2 | 58 | 31,03 | 17 | 57 | 33,33 |
| 3 | 53 | 33,96 | 18 | 61 | 63,93 |
| 4 | 62 | 35,48 | 19 | 59 | 37,29 |
| 5 | 56 | 28,57 | 20 | 58 | 31,03 |
| 6 | 58 | 27,59 | 21 | 58 | 34,48 |
| 7 | 62 | 24,19 | 22 | 59 | 45,76 |
| 8 | 58 | 37,93 | 23 | 58 | 43,10 |
| 9 | 56 | 41,07 | 24 | 55 | 30,91 |
| 10 | 56 | 35,71 | 25 | 61 | 37,70 |
| 11 | 59 | 33,90 | 26 | 59 | 30,51 |
| 12 | 63 | 44,44 | 27 | 61 | 37,70 |
| 13 | 60 | 35,00 | 28 | 59 | 33,90 |
| 14 | 59 | 42,37 | 29 | 61 | 44,26 |
| 15 | 58 | 34,48 | | | |

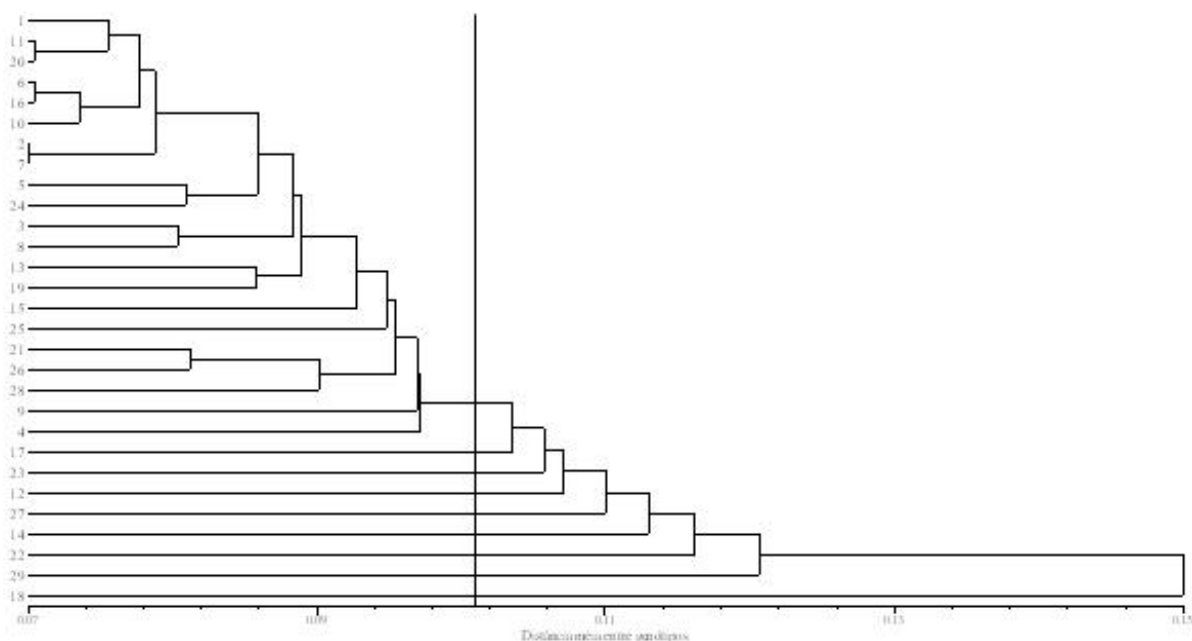


Figura 1 Análise de agrupamento dos 29 genótipos de *Cratylia argentea* baseado na matriz de distância genética média calculadas pelo método de agrupamento UPGMA.

Conclusões

Os marcadores moleculares ISSRs foram altamente eficientes para acessar a variabilidade genética entre e dentro dos acessos visto o grande número de marcas encontradas e o alto polimorfismo reproduzido.

A coleção possui uma base genética estreita mas com grande variabilidade genética verificada.

A pequena distância genética entre acessos pode ser reflexo da amostragem do germoplasma coletado e analisado.

O acesso 18 apresentou maior distância genética em relação aos demais acessos podendo ser empregado em cruzamento visando a ampliação da variabilidade genética.

Agradecimentos

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

Literatura citada

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) markers. *Molecular Ecology*, 11: 495-505.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 1995 2 ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN. 220pp

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 States of America*, v. 76, p 5269-5273, 1979.

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 Tropicales*, vol.12 No.1. 35-38.