

# Diversidade genética entre genótipos de *Brachiaria ruziziensis* utilizando marcadores ISSR

Rafaella Gevegy Negrão, Ana Luisa Sousa Azevedo, Pricila Palla Costa, Marco Antônio Machado, Antônio Vander Pereira, Cristina Maria Pinto de Paula, Francisco José da Silva Lédo, Fausto de Souza Sobrinho

## Resumo

As gramíneas do gênero *Brachiaria* correspondem hoje a 80% das áreas cultivadas no Brasil. Porém são poucas as informações disponíveis sobre o gênero para programas de melhoramento. Esse trabalho teve como objetivo estimar a variabilidade genética existente entre genótipos de *Brachiaria ruziziensis* com o uso de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). O estudo foi realizado na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG, no período de 2009 a 2010. Foram utilizados 12 *primers* ISSR para a obtenção dos marcadores moleculares. Utilizando os marcadores identificados foi construída uma matriz binária a partir da qual foram feitas as análises de agrupamento e estimadas as distâncias genéticas médias entre os genótipos. Foram identificadas 89 bandas, sendo todas polimórficas e as distâncias genéticas variaram de 0,02 a 1. Os resultados obtidos mostram a existência de grande variabilidade genética entre os genótipos avaliados.

**Palavras-chave:** melhoramento de forrageiras, variabilidade genética, braquiária.

## Genetic diversity among genotypes of *Brachiaria ruziziensis* using ISSR

### Abstract

The grasses of *Brachiaria* represent 80% of cultivated areas in Brazil. However, little information is available for breeding programs. This study aimed to estimate the genetic variability among 93 genotypes of *Brachiaria ruziziensis* using ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). The study was conducted at Embrapa Dairy Cattle, in Juiz de Fora, MG, between 2009 and 2010. 12 ISSR primers were used to obtain molecular markers. Using identified markers it was constructed a binary matrix from which were made cluster analysis and estimated the genetic distance between genotypes. We identified 89 bands, all were polymorphic and the genetic distances range from 0.02 to 1. The results showed that there is great genetic variability among samples

**Keywords:** forage breeding, Genetic variability, ISSR markers, braquiária

### Introdução

A partir de 1960, principalmente durante as décadas de 1970 e 1980, as áreas de pastagens nativas passaram a ser substituídas por pastagens cultivadas, em especial por plantas do gênero *Brachiaria* (MARTHA JÚNIOR e CORSI, 2001). De um total de 180 milhões de hectares ocupados com pastagens no país, estima-se hoje que as cultivadas respondam por 105 milhões de hectares e destes 80% correspondem às gramíneas do gênero *Brachiaria* (PEREIRA, 1998; DUSI, 2001). Apesar da importância das braquiárias para a pecuária nacional, a quantidade de informações disponíveis é reduzida, especialmente para o melhoramento genético. A introdução de variabilidade genética em espécies cultivadas se deu com a realização de alguns poucos cruzamentos, com a introdução de materiais e a recombinação genética que possa ter ocorrido durante os 50 anos que as braquiárias estão no Brasil. Além do mais, a ocorrência de apomixia na maioria das espécies dificulta a

recombinação dos materiais genéticos, reduzindo a variabilidade e aumentando os riscos para os agricultores devido à vulnerabilidade genética.

A caracterização da diversidade genética é um pré-requisito para explorar os recursos genéticos no melhoramento de plantas sendo um fator crítico que contribui para a biodiversidade. O conhecimento da diversidade genética é indispensável nos programas de melhoramento de plantas cultivadas principalmente no desenvolvimento de híbridos comerciais e podem ser avaliados utilizando várias ferramentas incluindo marcadores de DNA (KAPILA et al., 2008).

A Embrapa Gado de Leite desenvolve trabalhos relacionados ao melhoramento de *Brachiaria ruziziensis* utilizando ferramentas do melhoramento convencional. A inclusão de ferramentas moleculares auxiliará na obtenção de resultados mais precisos e mais rápidos. Os resultados obtidos nesse trabalho serão utilizados para o acompanhamento da variabilidade genética presente no material sob avaliação e também para direcionar cruzamentos entre genótipos divergentes, o que é muito interessante nos programas de melhoramento.

Esse trabalho teve como objetivo estimar a variabilidade genética existente entre genótipos de *B. ruziziensis* pertencentes à população de melhoramento da Embrapa Gado de Leite e contribuir com informações sobre a base genética por meio do uso de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

## Material e Métodos

Foram avaliados 93 acessos de *Brachiaria ruziziensis* juntamente com seis grupos externos (*B. brizantha* cv. Marandu, *B. brizantha* cv. Xaraés, *B. decumbens*, *B. humidicola*, *B. spp.* e *Pennisetum glaucum* - milheto). Para extração de DNA, amostraram-se 300 mg de folhas jovens imersas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta. A extração do DNA foi realizada utilizando-se o procedimento do CTAB (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). A concentração e qualidade de cada amostra de DNA foi estimada utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific Inc., Wilmington, DE, EUA).

Foram utilizados 12 *primers* ISSR desenvolvidos pelo laboratório de Biotecnologia da British Columbia University (UBC-808, UBC-809, UBC-815, UBC-820, UBC-823, UBC-826, UBC-830, UBC-841, UBC-845, UBC-851, UBC-857, UBC-859). As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9.700 (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 etídio (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 foi estimado por comparação com o marcador molecular de 200 pb (Promega).

As bandas de DNA foram exportadas como 1 para presença e 0 para ausência da banda, gerando um arquivo de dados binários. Foi construída uma matriz binária, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas médias (DGMs) entre os genótipos com base no complemento aritmético do coeficiente de Jaccard. Os acessos foram agrupados pelo método UPGMA e as análises realizadas pelo programa Genes (CRUZ, 1997). A consistência da topologia do dendograma construído foi avaliada utilizando-se o método de *bootstrap* com 10.000 interações.

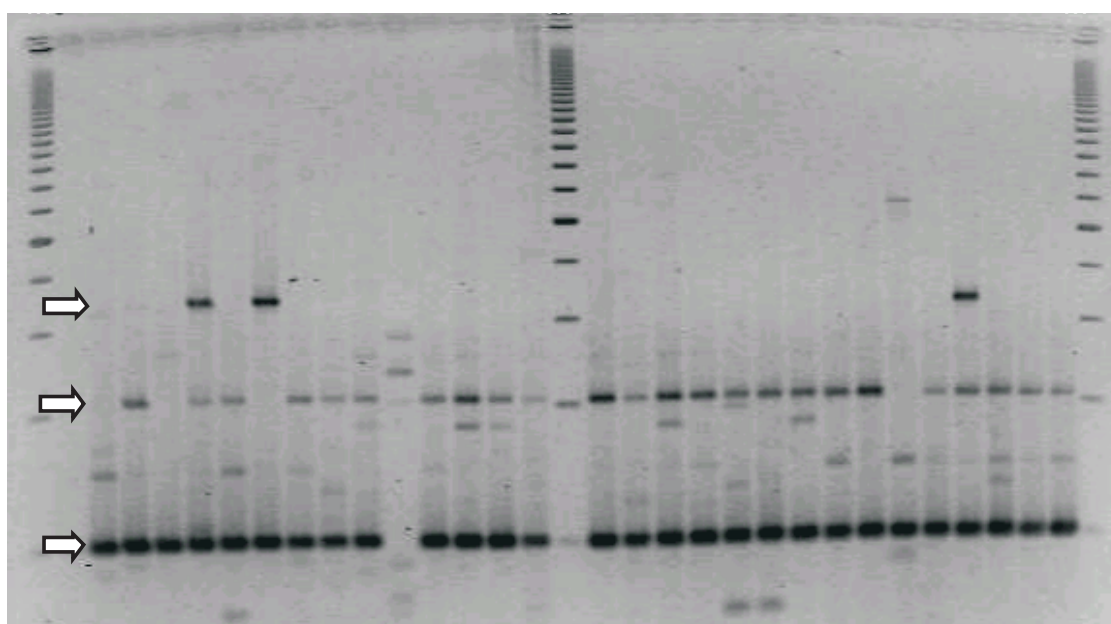
## Resultados e Discussão

Após a análise dos 12 marcadores ISSR foi possível identificar 89 bandas, uma média de 7,41 bandas por primer. O *primer* UBC-823 foi o que apresentou maior número de bandas (13) e o primer UBC-826 apresentou apenas duas bandas (Tabela 1). Somente as bandas altamente confiáveis foram levadas em consideração (Figura 1). Não foram identificadas bandas monomórficas, o que é um indicativo da alta variabilidade existente entre os genótipos avaliados. Foram identificadas 33 bandas únicas, sendo 15 em genótipos de *Brachiaria ruziziensis* (genótipos: 7, 8, 11, 27, 42, 57, 58, 97, 101 e 102) e as demais nos grupos externos.

O genótipo 42 apresentou seis bandas únicas o que evidencia sua alta divergência quando comparado aos demais. Além disso, essas bandas podem ser utilizadas como bandas diagnósticas, capazes de identificar o genótipo baseado apenas em caracteres moleculares.

**Tabela 1.** Número de bandas totais geradas para cada primer de ISSR utilizado para a amplificação do DNA de 93 genótipos de *Brachiaria ruziziensis* e seis grupos externos.

| Primer  | Número de bandas | Primer  | Número de bandas |
|---------|------------------|---------|------------------|
| UBC-808 | 12               | UBC-830 | 07               |
| UBC-809 | 06               | UBC-841 | 11               |
| UBC-815 | 09               | UBC-845 | 03               |
| UBC-820 | 12               | UBC-851 | 07               |
| UBC-823 | 13               | UBC-857 | 03               |
| UBC-826 | 02               | UBC-859 | 04               |



**Figura 1.** Padrões de ISSR de 30 genótipos de *Brachiaria ruziziensis* obtidos com o primer UBC-808. As setas indicam bandas confiáveis que foram consideradas como marcadores.

**Faixas:** M – marcador de 200 pb.

A maior distância genética média (DGM) encontrada foi entre o genótipo 1 e a *B. humidicola* (1,0). Porém, considerando-se apenas a população em estudo (*B. ruziziensis*), a maior DGM encontrada foi entre os genótipos 1 e 42 (0,89). Já a menor DGM foi encontrada entre os genótipos 17 e 21 (0,02). Esses resultados poderão ser utilizados na seleção de genótipos divergentes nos programas de melhoramento genético. 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 com maior distância genética possível.

A caracterização molecular dos genótipos em estudo será importante também para o monitoramento da variabilidade genética existente ao longo dos ciclos seletivos. Assim, será possível, por meio das estimativas de divergência genética com base em marcadores moleculares, determinar se a taxa de seleção está adequada, permitindo manter variabilidade suficiente para a seleção ao longo dos ciclos de melhoramento.

## Conclusões

Existe grande variabilidade genética entre os genótipos de *B. ruziziensis*.

Os marcadores moleculares ISSRs foram altamente eficientes para acessar a variabilidade genética existente dentro de *B. ruziziensis*, visto o grande número de marcas encontradas e o alto polimorfismo.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à CNPq, Fapemig e Unipasto pelo apoio financeiro ao projeto.

## Referências

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: Diversidade Genética. Viçosa: Imprensa Universitária, 278p. 2008.

DUSI, D. M. A. **Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf**. Tese de doutorado. Wageningen, 2001

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

KAPILA, R.K.; YADAV, R.S.; PLAHA, P.; RAI, K.N.; YADAV, O.P.; HASH, C.T.; HOWARTH, C.J. Genetic diversity among pearl millet maintainers using microsatellite markers. **Plant Breed.** 127: 33-37 2008

MARTHA JUNIOR, G. B.; CORSI, M. Pastagens no Brasil: situação atual e perspectivas. **Preços Agrícolas**, Piracicaba, 171, p. 3-6, 2001.

PEREIRA, A. V. **Melhoramento genético de plantas forrageiras**. In: Simpósio Sobre Atualização em Genética e Melhoramento de Plantas, 2., Lavras, Lavras: UFLA/FAEPE. p.135-162, 1998.