



47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Salvador, BA – UFBA, 27 a 30 de julho de 2010

Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia Brasileira de Vanguarda



**Transferência de marcadores microssatélites entre *Pennisetum glaucum* e *Pennisetum purpureum***

Pricila Palla Costa<sup>1</sup>, Rafaella Gevegy Negrão<sup>2</sup>, Marco Antônio Machado<sup>3</sup>, Antônio Vander Pereira<sup>3</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>3</sup>, Mauricio Marini Kopp<sup>3</sup>, Ana Luisa Souza Azevedo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de Apoio Técnico da Embrapa Gado de Leite. e-mail: [pallapc@gmail.com](mailto:pallapc@gmail.com)

<sup>2</sup>Graduanda do curso de Ciências Biológicas do CES/JF/ Juiz de Fora, MG. Bolsista da Fapemig. e-mail: [rafa\\_negrão@hotmail.com](mailto:rafa_negrão@hotmail.com)

<sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite

**Resumo:** A transferência de marcadores microssatélites entre espécies próximas já foi relatada em diversos estudos. É uma estratégia simples para identificar marcadores moleculares em espécies pouco estudadas do ponto de vista molecular. Essa estratégia de transferência de marcadores foi utilizada nesse estudo para identificar microssatélites em capim-elefante partindo de informações de milho disponíveis na literatura. Foram testados 54 microssatélites já caracterizados em milho e 30 (55,5%) microssatélites apresentaram ótimo padrão de amplificação em capim-elefante. Todos os marcadores foram polimórficos, ou seja, poderão ser utilizados para estimar a diversidade genética existente no banco de germoplasma de capim-elefante da Embrapa Gado de Leite. A formação de um painel de marcadores microssatélites em capim-elefante será útil não apenas para os estudos de diversidade, mas poderão auxiliar na caracterização molecular de acessos, na identificação de genes de interesse econômico entre outros.

**Palavras-chave:** forrageira, marcador molecular, *Pennisetum purpureum*, SSR

**Transfer of microsatellite markers between *Pennisetum glaucum* e *Pennisetum purpureum***

**Abstract:** The transfer of microsatellite markers across closely related species has been reported in several studies. It is a simple approach to identify molecular markers in species of little studied at the molecular level. This strategy of cross-species amplification used in this study aimed to identify microsatellites in elephantgrass basis of information from millet available in the literature. We evaluated a set of 54 microsatellite already developed in millet and 30 (55,5%) microsatellites were amplified in elephantgrass. All markers were polymorphic so it can be used to estimate the genetic diversity in the germplasm collection of elephantgrass from Embrapa Dairy Cattle. The formation of a panel of microsatellite markers in Elephantgrass, not only useful for studies of diversity, but may assist in molecular characterization of accessions, to identify genes of economic interest among others.

**Keywords:** forage, molecular marker, *Pennisetum purpureum*, SSR

**Introdução**

*Pennisetum purpureum*, conhecido como capim-elefante é uma forrageira amplamente cultivada no Brasil, reconhecida pelo seu potencial produtivo, boa palatabilidade, vigor e perenidade, que estimulam seu cultivo e o interesse de seu melhoramento genético (Sobrinho *et al.*, 2005).

A Embrapa Gado de Leite desenvolve, há mais de uma década, um programa de melhoramento genético do capim-elefante. Este programa explora a variabilidade genética existente no Banco Ativo de Germoplasma do Capim-Elefante (BAGCE). O banco possui mais de 120 acessos, sendo constituído por clones, populações, cultivares melhoradas, híbridos interspecíficos (triplóides e hexaplóides) resultantes do cruzamento entre *P. purpureum* x *P. glaucum* e algumas espécies selvagens de *Pennisetum*, coletadas no Brasil. Esse banco de germoplasma já foi caracterizado por alguns descritores morfológicos, químicos e citogenéticos, porém, falta uma descrição molecular detalhada para caracterizar a diversidade genética presente no BAGCE. Resultados preliminares indicam a existência de acessos idênticos, do ponto de vista molecular, caracterizados como acessos distintos (Pereira *et al.*, 2008). O estudo da diversidade genética do banco de germoplasma é fundamental para auxiliar no programa de melhoramento, pois, o conhecimento da diversidade existente pode auxiliar na seleção de indivíduos contrastantes visando à realização de cruzamentos direcionados.



47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de  
Zootecnia  
Salvador, BA – UFBA, 27 a 30 de julho de 2010  
*Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia  
Brasileira de Vanguarda*



O tipo de marcador molecular mais utilizado para estudos de diversidade molecular são os marcadores microsatélites. Este marcador está distribuído ao longo de todo o genoma e tem como principal característica ser altamente polimórfico. Até o momento não existem marcadores microsatélites descritos na literatura para capim-elefante, dessa forma, torna-se necessário a identificação dos mesmos. Esse processo pode ser realizado a partir de informações já disponíveis para espécies próximas, como é o caso dos marcadores microsatélites identificados em milho. Segundo Peakall *et al.*, (1998), ao contrário do que ocorre nas espécies animais, a utilização de marcadores microsatélites entre espécies vegetais é um pouco mais restrita, sendo que os melhores resultados são encontrados entre espécies do mesmo gênero ou entre espécies de gêneros bastante semelhantes. Peakall *et al.*, (1998) observaram um aproveitamento de 65% dos marcadores quando utilizaram microsatélites entre diferentes espécies do mesmo gênero, porém esse aproveitamento caiu para 13% quando foram realizadas análises entre espécies de gêneros diferentes. A formação de um painel de marcadores microsatélites será útil não apenas para os estudos de diversidade, mas poderão auxiliar na caracterização molecular de acessos, na identificação de genes de interesse econômico entre outros. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo identificar marcadores microsatélites em *P. purpureum* utilizando marcadores previamente descritos em *P. glaucum*.

#### Material e Métodos

Amostras de *Pennisetum purpureum* oriundos do BAGCE da Embrapa Gado de Leite foram utilizadas para identificação de marcadores microsatélites.

Foram avaliados sete acessos provenientes do BAGCE e uma amostra de milho. Para extração de DNA, amostraram-se 300 mg de folhas jovens expandidas. As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido e posteriormente em freezer -80°C. As amostras foram moídas utilizando-se grau com pistilo, na presença de nitrogênio líquido, e transferida para um tubo de 2 mL. A extração do DNA foi realizada utilizando-se o procedimento do CTAB (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Foram testados 54 primers SSRs (Simple Sequence Repeats) descritos previamente em milho. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% a aproximadamente 400 volts durante 5 horas. A coloração do gel foi feita por imersão em solução de nitrato de prata. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com os marcadores moleculares de 25 e 50pb (Promega).

#### Resultados e Discussão

Somente os primers que apresentaram bandas fortes e bem definidas, com tamanho variando entre 80 e 350 pares de bases, foram considerados. Além disso, todas as reações foram realizadas em duplicata aumentando assim a confiabilidade dos resultados. Entre os 54 primers de microsatélite testados, descritos inicialmente em *P. glaucum*, 30 (55,5%) tiveram um bom padrão de amplificação. Esses resultados demonstram que a utilização de marcadores já descritos previamente para espécies próximas é uma boa alternativa para identificação de microsatélites em espécies cujo conhecimento é inexistente. Segundo Peakall *et al.* (1998), a transferência de marcadores microsatélite entre espécies do mesmo gênero pode variar entre 50% a 100%.

O scoring das bandas produzidas foi dificultado pelo fato de que o capim-elefante é uma espécie tetraplóide, dessa forma é possível identificar até quatro bandas em um mesmo indivíduo. Para superar essa dificuldade, os estudos subsequentes que serão realizados para verificar a diversidade existente no BAGCE será realizada utilizando o seqüenciado automático de DNA MegaBACE 1000. Esse equipamento fará a separação dos fragmentos em capilares com um poder de discriminação de um par de bases. Além disso, todo o processo de análise será realizado por softwares que diminuem muito a chance de erros durante a determinação dos tamanhos dos fragmentos gerados. Apesar dessas dificuldades, foi possível verificar que todos os marcadores que amplificaram em capim-elefante foram polimórficos (Figura 1). Dessa forma, a utilização desses marcadores nos estudos de diversidade genética será muito útil e auxiliarão nas etapas futuras do programa de melhoramento de capim-elefante.

Esses resultados ainda poderão ser melhorados alterando as condições de PCR, tais como temperatura de anelamento, concentração de cloreto de magnésio entre outras. Essa etapa de otimização das condições da PCR já está em andamento no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado de



47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia  
Salvador, BA – UFBA, 27 a 30 de julho de 2010  
*Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia Brasileira de Vanguarda*



Leite. Espera-se aumentar a taxa de transferência entre marcadores para pelo menos 65%, visto que as espécies em questão são muito próximas.

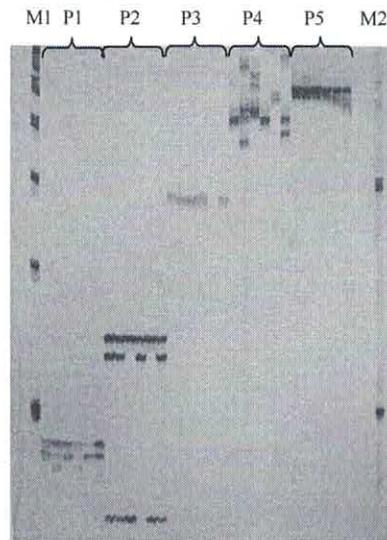


Figura 1: Gel de poliacrilamida contendo cinco marcadores microssatélites (P1 a P5) amplificados utilizando cinco acessos de capim-elefante e uma amostra de milheto. Faixas: M1 – marcador de 25 pb e M2 – marcador de 100 pb.

#### Conclusões

É possível identificar marcadores microssatélites para capim-elefante a partir de marcadores descritos previamente em milheto.

#### Agradecimentos

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

#### Literatura citada

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: DF, EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.
- PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W. et al. Cross-species amplification of soybean (*Glycine-Max*) simple sequence repeats (microsatellites) within the genus and other legume genera – implications for the transferability of microsatellites in plants. **Molecular Biology Evolution**, v.15, n.10, p.1275-1287, 1998.
- PEREIRA, A.V.; MACHADO, M.A.; AZEVEDO, A.L.S. et al. Diversidade genética entre acessos de capim-elefante obtida com marcadores moleculares. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.37, n.7, p.1216-1221, 2008.
- SOBRINHO, F.S.; PEREIRA, A.V.; LEDO, F.I.S.; et al. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milheto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.9, p.873-880, 2005.