

Ratv

Marcadores RAPD e ISSR Utilizados na Avaliação da Divergência Genética entre Acessos de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.)

Roberta Samara Nunes de Lima¹¹, Rogério Figueiredo Daher², Leandro Simões Azeredo Gonçalves³, Tatiane da Costa Barbé⁴, Drieli Aparecida Rossi⁵, Francisco José da Silva Léo⁶

Resumo

Este trabalho teve como objetivos caracterizar e estimar a divergência genética entre 46 acessos de capim-elefante com diferentes adaptações edafoclimáticas, usando marcadores RAPD e ISSR; e avaliar, de forma comparativa, a consistência das informações obtidas com o emprego destes marcadores. Um total de 26 e 25 primers RAPD e ISSR, respectivamente, foi utilizado, sendo que o marcador RAPD produziu 185 bandas, das quais 133 foram polimórficas (71.89%) com uma média de 5.11 bandas polimórficas por primer. Os 25 iniciadores ISSR produziram 216 bandas, sendo 164 polimórficas (75.93%) com uma média de 6.56 bandas polimórficas por primer. A correlação entre as distâncias genéticas obtidas pelos marcadores RAPD e ISSR foi de 0.76 com significância de $p < 0.001$ pelo teste de Mantel, indicando que houve associação entre os resultados obtidos por estes dois marcadores. Pelo agrupamento UPGMA, considerando o ponto de mudança abrupta, foram formados cinco e seis grupos para os dados oriundos dos marcadores RAPD e ISSR, respectivamente. Ambos os marcadores proporcionaram grupos parcialmente concordantes, indicando que estas técnicas podem fornecer informações consistentes e, por conseguinte, serem de interesse para uso em estudos de diversidade genética entre acessos.

Introdução

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), originário da África Ocidental, é considerado uma das principais forrageiras nos trópicos e subtropicais, devido à elevada produção, boa qualidade forrageira e versatilidade de aplicação (Daher et al., 2002). Essa gramínea é uma alotetraplóide ($2n = 4x = 28$) de polinização livre e o número de cultivares e a diversidade genética que surgem devido aos cruzamentos naturais são elevados (Bhandari et al., 2006). Nesse sentido, a conservação desses materiais em bancos de germoplasma é de fundamental importância para o melhoramento genético e para a segurança em relação às ameaças imprevisíveis na produção agrícola, tais como epifitas e mudanças climáticas.

Nesse contexto, bancos ativos de germoplasma de capim-elefante são mantidos em vários países do mundo como África do Sul, Brasil, Porto Rico, Estados Unidos da América, Austrália, China, Paquistão e Índia (Bhandari et al., 2006). Contudo, os acessos mantidos em bancos de germoplasma precisam ser caracterizados e avaliados, pois além de proporcionar melhor conhecimento do germoplasma disponível, essencial para seu uso mais intenso em etapas subsequentes, a caracterização e a avaliação permitem a identificação de acessos duplicados, o estabelecimento de coleções nucleares e a identificação dos modos de reprodução

¹Doutoranda em Produção Vegetal pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP 28013-602. E-mail: roberta_biol@hotmail.com

²D.Sc. - Professor Associado UENF – CCTA – LEAG. E-mail: rogdaher@uenf.br

³D.Sc. - Genética e Melhoramento de Plantas. E-mail: lsagrural@yahoo.com.br

⁴Doutoranda em Produção Vegetal pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP 28013-602. E-mail: tatianebarbe@yahoo.com.br

⁵Doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP 28013-602. E-mail: drielirossi@hotmail.com

⁶D.Sc. - Pesquisador Embrapa – CNPGL. Email: ledo@cnppl.embrapa.br

SP 5395
P. 170

predominante nos acessos, bem como da ocorrência ou não de variabilidade intrínseca em acessos individuais.

O presente trabalho teve como objetivos: i) caracterizar e estimar a divergência genética entre 46 acessos de capim-elefante oriundos de seis países, incluindo formas adaptativas a condições edafoclimáticas da América Central e do Sul, usando os marcadores RAPD e ISSR; e ii) avaliar, de forma comparativa, a consistência das informações obtidas com o emprego dos marcadores RAPD e ISSR.

Material e Métodos

Foram utilizados 46 clones de capim-elefante. O DNA total celular foi extraído das folhas jovens utilizando kit comercial (Plant Genomic DNA[®]). Após a extração DNA, foi realizada a quantificação do DNA em géis de agarose a 1.0%.

Para a obtenção de fragmentos de RAPD e ISSR, inicialmente procedeu-se à seleção dos primers, tendo sido selecionados 26 e 25 primers, respectivamente. A reação de amplificação foram realizadas segundo protocolo proposto por Williams et al. (1990), com algumas modificações, para um volume final de 20 µL, sendo que a reação conteve a seguinte concentração: 2 µL de tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCL em 8.4), 2 µL de 25 mM MgCl₂, 1.6 µL de 2mM dNTPs, 1 µL de DMSO (Dimethyl Sulfoxide), 1.8 µL de 0.5 mM de primer, 0.12 µL de 5U de Taq DNA polimerase e 2 µL de 5 ng DNA genômico. O volume final foi completo com água ultrapura. As reações de PCR para o marcador RAPD foram conduzidas da seguinte forma: 4 min a 94°C, seguindo por 45 ciclos (94°C por 1 min, 35°C por 1min e 72°C por 3 min), e uma extensão final a 72°C por 7 min. Em relação ao marcador ISSR, as reações de PCR seguiram a rotina: 3 min a 94°C, seguindo por 42 ciclos [94°C por 1 min, 30-57°C por 1min (dependendo do iniciador utilizado) e 72°C por 3 min], e uma extensão final a 72°C por 7 min.

Para a análise dos marcadores RAPD e ISSR, os géis revelados foram visualizados e, posteriormente, interpretados por presença e ausência de bandas, gerando-se uma matriz binária. Para estimar as distâncias genéticas entre os genótipos foi utilizado o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. Posteriormente, foi realizada a correlação de Pearson, utilizando o teste de Mantel (10,000 permutações), entre as matrizes de distâncias dos marcadores RAPD e ISSR. A representação simplificada das distâncias genéticas entre os acessos foi obtida pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) e representados por meio de dendrograma. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa computacional R (<http://www.r-project.org>).

Resultado e Discussão

Pela análise RAPD, os 26 primers utilizados produziram 185 bandas. Destas, 133 foram polimórficas (71.89%) e 52 monomórficas (28.11%). O número de bandas polimórficas variou de 2 a 8, o que ocorreu com os primers OPC04 e OPAA20, respectivamente. Os acessos BGCE09 (Vruckona) e BGCE30 (Elefante de Pinda) foram os mais distantes, geneticamente, com o valor de 0.47, enquanto BGCE34 (IAC-Campinas) e BGCE44 (Vruckonal) foram os mais próximos (0.11).

Por um corte realizado à distância de 0.31, considerando-se o ponto de mudança mais abrupto no dendrograma, houve a formação de cinco grupos (Figura 1a). Os grupos I e II reuniram 71.74% dos acessos, sendo que o grupo I foi composto por 17 acessos, enquanto o grupo II, por 16 acessos. Os grupos III, IV e V foram formados por 1, 2 e 10 acessos, respectivamente. Os acessos BGCE9, BGCE34 e BGCE15 (Vrukwona, IAC-Campinas e Capim Cana d' África, respectivamente) alocados no grupo II também foram alocados em um mesmo grupo nos trabalhos de Passos et al. (2005) e Pereira et al. (2008). Os acessos BGCE10 e BGCE11 (Napier e Mineiro, respectivamente) ficaram reunidos no grupo I, o que também ocorreu com os resultados obtidos por Daher et al. (1997) utilizando padrões enzimáticos; e Shimoya et al. (2002) utilizando descritores morfoagronômicos.

Pela análise dos marcadores ISSR, os 25 primers utilizados produziram 216 bandas nitidamente visualizadas nos géis. Destas, 164 foram polimórficas (75.93%) e 52 monomórficas (24.07%). O iniciador (AG)8CTA foi o mais informativo, proporcionando a amplificação de 11 fragmentos, enquanto (GT)6CC foi o que revelou o menor quantitativo de fragmentos polimórficos, ao todo apenas dois. BGCE12 (Africano) e BGCE30 (Elefante de Pinda) exibiram o maior valor para a distância genética (0.48) para o marcador ISSR. Esses mesmos acessos apresentaram uma distância genética de 0.38 para a técnica RAPD, enquanto BGCE09 e BGCE30, os mais divergentes para estes marcadores, revelaram distância genética (0.43) pelos marcadores ISSR, confirmando o elevado distanciamento genético entre esses acessos. Os acessos BGCE04 (Merkeron Comum de Pinda) e BGCE05 (Merkeron Comum) foram os mais similares, com uma distância genética de 0.06. Os mesmos apresentaram uma distância de 0.15 pelo marcador RAPD, enquanto BGCE34 e BGCE44, os mais similares pela técnica RAPD, revelaram uma distância genética de 0.17, confirmando a proximidade genética entre os mesmos.

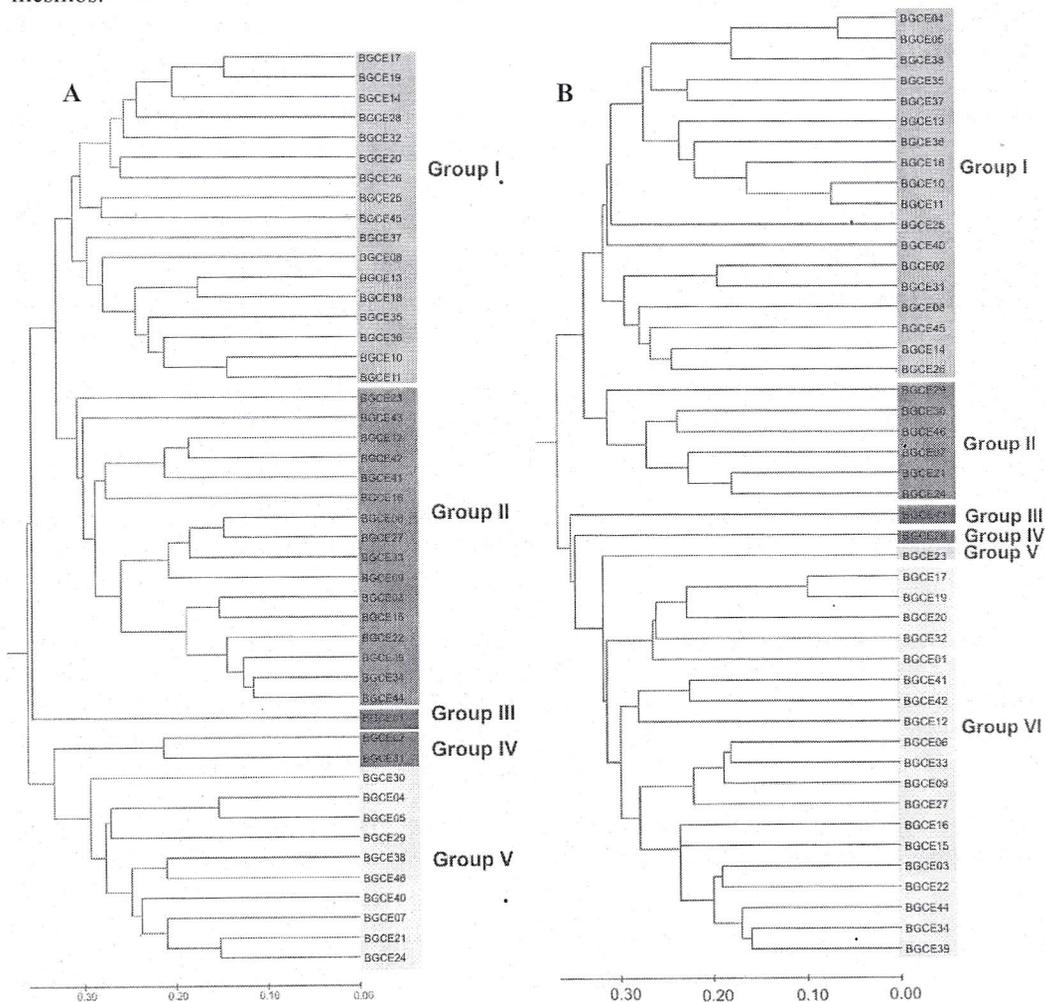


Figura 1 – Dendrograma da divergência genética entre 46 acessos de capim-elefante usando o coeficiente de Jaccard baseado no algoritmo UPGMA dos dados de RAPD (A) e ISSR (B).

Com base em um corte realizado na distância de 0.31, considerando-se o ponto de mudança mais abrupta no dendrograma, ocorreu a formação de seis grupos. Os grupos I e VI reuniram 80.43% dos acessos, sendo o grupo I constituído por 18 acessos, enquanto o grupo VI,

por 19 acessos. Os grupos II, III, IV e V foram formados por 6, 1, 1 e 1 acessos, respectivamente. A reunião dos acessos BGCE09, BGCE34 e BGCE15 em um mesmo grupo (grupo VI), bem como de BGCE10 e BGCE11, neste caso, no grupo I, ratificam os resultados obtidos pelo marcador RAPD, o que é um indício da validade do uso de ambas as técnicas para os acessos estudados.

A estimativa de correlação entre as distâncias genéticas obtidas pelos marcadores RAPD e ISSR foi de 0.76, com probabilidade $p < 0.001$ pelo teste de Mantel (10,000 permutações), indicando que existe um padrão de associação entre os resultados obtidos por estes dois procedimentos analíticos na discriminação dos acessos.

Pela análise de agrupamento UPGMA verifica-se a associação entre ambos os marcadores aqui avaliados. Dos 17 acessos do grupo I reunidos com base nas marcas RAPD, 12 foram alocados no grupo I (BGCE08, BGCE10, BGCE11, BGCE13, BGCE14, BGCE18, BGCE25, BGCE26, BGCE35, BGCE36, BGCE37 e BGCE45) e 5 no grupo VI (BGCE17, BGCE19, BGCE20, BGCE28 e BGCE32) dos marcadores ISSR. Além disso, no grupo II do marcador RAPD, constituído por 16 acessos, 14 acessos foram alocados no grupo VI (BGCE03, BGCE06, BGCE09, BGCE12, BGCE15, BGCE16, BGCE22, BGCE27, BGCE33, BGCE34, BGCE39, BGCE41, BGCE42 e BGCE44) com base nas marcas ISSR. Isto indica que ambas as técnicas podem fornecer informações consistentes na análise da diversidade em acessos de capim-elefante de distintas origens com diferentes adaptações edafoclimáticas.

Referências

Bhandari AP, Sukanya DH and Ramesh CR. (2006). Application of isozyme data in fingerprinting napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) for germplasm management. **Genetics Resources and Crop Evolution** 53: 253-264.

Daher RF, Moraes CF, Pereira AV, Cruz CD and Xavier DF. (1997). Diversidade morfológica e isozimática em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Revista Brasileira de Zootecnia** 26: 255-264.

Daher RF, Pereira MG, Pereira AV and Amaral Júnior AT. (2002). Genetic divergence among Elephantgrass cultivars accessed by RAPD markers in composit samples. **Scientia Agricola** 59: 623-627.

Passos LP, Machado MA, Vidigal MC and Campos AL. (2005). Molecular characterization of elephantgrass accessions through RAPD markers. **Ciência e Agrotecnologia** 29: 568-574.
Pereira AV, Machado MA, Campos AL, Ledo FJS, Azevedo ALS and Nascimento CS. (2008). Diversidade genética entre acessos de capim-elefante obtida com marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Zootecnia** 7: 1216-1221.

Shimoya A, Cruz CD, Ferreira RP, Pereira AV and Carneiro PCS. (2002). Divergência genética entre acessos de um banco de germoplasma de capim-elefante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37: 971-980.

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, et al. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Reserch** 18: 6531-6535.