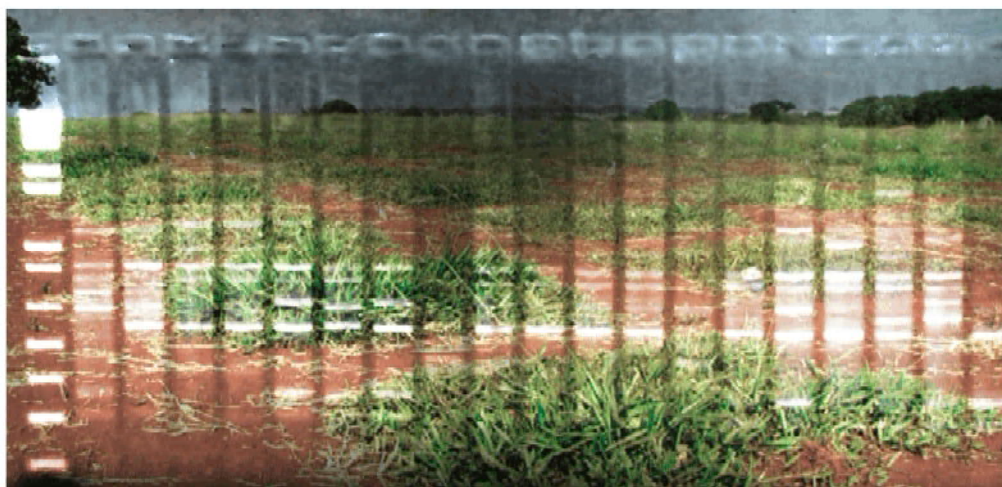


**Uso de Marcadores RAPD na
Identificação de Híbridos de
*Brachiaria humidicola***



ISSN 1983-9715

Setembro, 2008

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 23

Uso de Marcadores RAPD na Identificação de Híbridos de *Brachiaria humidicola*

*Gislayne de Araujo Bitencourt
Lucimara Chiari
Cacilda Borges do Valle
Leonardo Rippel Salgado
Gisele Olivas C. Leguizamon*

Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Rodovia BR 262, Km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS

Caixa Postal 154

Fone: (67) 3368 2083

Fax: (67) 3368 2180

<http://www.cnpqc.embrapa.br>

E-mail: publicacoes@cnpqc.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Cleber Oliveira Soares*

Secretário-Executivo: *Grácia Maria Soares Rosinha*

Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima, Geraldo Augusto de Melo Filho, Grácia Maria Soares Rosinha, Lúcia Gatto, Manuel Antônio Chagas Jacinto, Elane de Souza Salles, Ténisson Waldow de Souza, Wilson W. Koller*

Supervisão editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisão de texto: *Lúcia Helena Paula do Canto*

Normalização bibliográfica: *Elane de Souza Salles*

Editoração eletrônica e Tratamento de ilustrações: *Ecila Carolina N. Z. Lima*

Foto da capa: *Arquivo Embrapa Gado de Corte*

1ª edição

1ª impressão (2008): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Corte.

Uso de marcadores RAPD na identificação de híbridos de *Brachiaria humidicola* / Gislayne de Araujo Bitencourt... [et al.]. -- Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2008.

16 p. ; 21 cm. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-9715 ; 23).

Autores: Gislayne de Araujo Bitencourt; Lucimara Chiari; Cacilda Borges do Valle; Leonardo Rippel Salgado; Gisele Olivas C. Leguizámon

1. Pastagem. 2. Melhoramento genético vegetal. 3. Gramínea forrageira. 4. *Brachiaria humidicola*. 5. Híbrido. 6. Marcador molecular. 7. RAPD. I. Bitencourt, Gislayne de Araujo. II. Chiari, Lucimara. III. Valle, Cacilda Borges do. IV. Salgado, Leonardo Rippel; V. Leguizámon, Gisele Olivas C. VI. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). VII. Série.

CDD 636.2 (21.ed.)

© Embrapa Gado de Corte 2007

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	7
Introdução	8
Material e Métodos	10
Material Vegetal: coleta, extração e quantificação de DNA	10
Reações de RAPD	10
Identificação dos híbridos	11
Resultados e Discussão	11
Conclusões	13
Agradecimentos	14
Referências	14

Uso de Marcadores RAPD na Identificação de Híbridos de *Brachiaria humidicola*

*Gislayne de Araujo Bitencourt*¹

*Lucimara Chiari*²

*Cacilda Borges do Valle*³

*Leonardo Rippel Salgado*⁴

*Gisele Olivas C. Leguizamon*⁵

Resumo

Brachiaria humidicola é uma importante gramínea forrageira tropical de origem africana, tolerante a solos maldrenados ou temporariamente alagados. No Brasil, somente três cultivares foram registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e destas, apenas duas estão disponíveis no mercado, o que demanda o desenvolvimento de novas cultivares. O programa de melhoramento da Embrapa Gado de Corte baseia-se em cruzamentos e seleção de genótipos mais produtivos. Recentemente, foi identificado um acesso sexual e tetraplóide natural (H31) no banco de germoplasma dessa espécie, que permitiu a realização de cruzamentos controlados com *Brachiaria humidicola* cv. BRS Tupi, gerando uma população única em todo o mundo tropical. O objetivo deste trabalho foi a identificação segura e precoce de híbridos dessa população

¹ Bióloga pela Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (Uniderp), bolsista PIBIC-CNPq na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, gislayne@cnpqc.embrapa.br

² Bióloga, D.Sc. em Genética e Melhoramento Vegetal, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, lchiari@cnpqc.embrapa.br

³ Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Genética e Melhoramento Vegetal, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, cacilda@cnpqc.embrapa.br

⁴ Biólogo, Mestrando em Biotecnologia na Universidade Estadual de Londrina (UEM), leorippel@cnpqc.embrapa.br

⁵ Bióloga, Técnica de Laboratório da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, gisele@cnpqc.embrapa.br

usando marcadores RAPD. Dez *primers* que amplificaram 31 bandas informativas, exclusivas do genitor paterno, foram usados para analisar as 347 plantas dessa população. Por esses marcadores RAPD, 286 plantas foram confirmadas como híbridas e 61 foram não híbridas, que podem resultar de autopolinização da planta sexual. A identificação precoce de híbridos torna o programa de melhoramento mais eficiente, reduzindo o tempo e o trabalho necessários para o desenvolvimento de novas cultivares.

Termos para indexação: braquiária, fecundação cruzada, marcadores moleculares, melhoramento genético.

Use of Molecular Markers to Identification of Hybrids from *Brachiaria humidicola*

Abstract

Brachiaria humidicola is an important tropical forage grass of African origin. It is tolerant to poorly drained soils or short-term flooding. In Brazil, only three cultivars were registered in the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, of which only two are available in the market, thus the large demand for news cultivars. The genetic improvement program of Embrapa Beef Cattle is based upon crossing and selection of more productive accessions or genotypes. Recently, a sexual and natural tetraploid accession was identified in the germplasm bank of this species, which enabled hybridization with *Brachiaria humidicola* cv. BRS Tupi generating a unique population in all tropical world. The objective of this work was the reliable and early identification of hybrids in this population using RAPD marker. Ten primers which produced 31 informative bands, exclusively present in the apomictic genitor, were used for analyses of the 347 plants in this population. With those RAPD markers, 286 plants were confirmed as hybrids and 61 non-hybrids, which probably resulted from self-pollination of the sexual plant. The early identification of hybrids makes the breeding program more efficient and correct, reducing the time and labor necessary for the development of news cultivars.

Index terms: *brachiariagrass, crosses fertilization, molecular markers, genetic improvement.*

Introdução

O potencial forrageiro de gramíneas africanas do gênero *Brachiaria* tem sido reconhecido há décadas, tanto em regiões tropicais como subtropicais de ambos os hemisférios (RENVOIZE et al., 1996).

Essa incontestável importância contrasta com o pequeno número de cultivares comercialmente disponíveis. Especialmente crítico, é o caso de *Brachiaria humidicola*, com apenas três cultivares registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SERVIÇO NACIONAL DE PROTEÇÃO DE CULTIVARES, 2007), uma delas, a cultivar BRS Tupi, com lançamento previsto para 2009. Por esse motivo, é alta a demanda no desenvolvimento de novas cultivares visando à diversificação local, regional e nacional.

Brachiaria humidicola é uma espécie comercialmente importante, por ser mais tolerante a solos úmidos ou temporariamente úmidos e desenvolve-se bem em solos com baixa fertilidade e alto grau de erosão (KICHEL et al., 2000).

Dentro do programa de melhoramento genético de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte, uma atenção especial vem sendo atribuída a essa espécie, após a descoberta de um acesso sexual obrigatório que é tetraplóide natural em seu germoplasma (BOLDRINI et al., 2006). Essa descoberta abriu a possibilidade de realização de cruzamentos intra-específicos que originaram uma população inédita em todo o mundo tropical. Essa população é resultado do cruzamento entre a cultivar BRS Tupi e este acesso sexual, denominado H31.

Um entrave na evolução desse processo é a dificuldade de identificação segura e precoce dos híbridos dessa população, uma vez que não se faz emasculação prévia ao cruzamento e, portanto, algumas plantas da progênie podem ser fruto de autofecundação na planta sexual.

Quando os pais são fenotipicamente distintos, como nos cruzamentos interespecíficos, aparentemente os descritores morfológicos são suficientes na identificação dos híbridos, embora só possam ser aplicados na planta adulta. Mas quando os pais são fenotipicamente semelhantes, como nos cruzamentos intra-específicos, há problemas para a correta identificação dos híbridos usando apenas esses descritores. Nesse sentido, os marcadores moleculares têm sido considerados ferramentas poderosas para a identificação segura e precoce de híbridos (BASTIANEL et al., 2006; SILVA et al., 2005). Além de acessarem diretamente o genótipo da planta e não sofrerem influência do ambiente, eles podem ser analisados a partir de amostras de qualquer parte da planta e em qualquer estágio de desenvolvimento, acelerando o processo de obtenção de novas cultivares e reduzindo os custos e a mão-de-obra necessários, caso todas as plantas tivessem que ser levadas ao campo e analisadas por meio de descritores morfológicos.

Dentre os marcadores moleculares, destaca-se o Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) por ser um marcador de baixo custo, fácil execução e utilização, necessita de pequenas quantidades de DNA e, principalmente, por que podem ser utilizados sem o conhecimento prévio do genoma do organismo que se deseja estudar (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de RAPD baseia-se na utilização de um único oligonucleotídeo decâmero de seqüência arbitrária (*primer* randômico) que amplifica fragmentos de DNA pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). Os polimorfismos são identificados pela presença de um fragmento específico de DNA amplificado em um determinado genoma, comparado à ausência do mesmo fragmento de outro genoma; logo, são marcadores dominantes (WILLIAMS et al., 1990).

A identificação de híbridos via marcadores RAPD é feita com base em bandas informativas, que estão presentes no genitor paterno e ausentes no materno. Na verdade, cada banda informativa funciona como um gene marcador comumente utilizado pelos melhoristas (BORÉM, 1997).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo identificar as plantas híbridas resultantes do cruzamento intra-específico entre a cultivar BRS Tupi e H31 de uma população de 347 plantas, por meio de marcadores RAPD.

Material e Métodos

Material Vegetal: coleta, extração e quantificação de DNA

Foram analisados os genitores, cv. BRS Tupi e acesso sexual H31, e as 347 plantas da progênie resultante do cruzamento entre eles. Essas 349 plantas estão mantidas no campo experimental da Embrapa Gado de Corte, no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Dessas plantas foram coletadas folhas jovens (folhas do segundo nó) e o DNA extraído seguindo a metodologia de Bonato et al. (2002).

Os DNAs extraídos foram quantificados em géis de agarose 0,8%, pré-corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), por comparação da intensidade e tamanho das bandas de DNA obtidas com padrões de concentrações conhecidas (100 ng/µL e 300 ng/µL) do lambda DNA (Invitrogen). O tampão utilizado para o preparo do gel e eletroforese foi o TBE 1X (Tris 0,89 M; borato 0,89 M e EDTA 0,08 M).

Reações de RAPD

As reações de amplificação foram feitas em volume final de 25 µL, contendo 0,4 mM *primer*; 0,2 mM dNTPs (Invitrogen); 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 1X tampão da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen). Foi utilizado o termociclador PTC 100 (MJ Research), programado para: 94°C por cinco minutos; seguido de 40 ciclos de 94°C por um minuto, 35°C por um minuto e 72°C por dois minutos; e uma extensão final a 72°C por sete minutos.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 1,5%, pré-corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL), utilizando o tampão TBE 1X. Após a eletroforese, os géis foram fotografados sob luz

ultravioleta em sistema digital L-PIX (Loccus Biotecnologia) e, após, foram utilizados nas análises para identificação dos híbridos.

Identificação dos híbridos

A identificação dos híbridos foi feita diretamente pela análise visual das bandas informativas (presentes no genitor masculino e ausentes no feminino), nos géis fotografados. Foi considerada híbrida a planta que apresentou pelo menos três bandas informativas amplificadas por um ou mais primers.

Os primers utilizados nas análises dos híbridos foram selecionados do trabalho de Rocha et al. (2006), que testaram 50 primers em acessos de *Brachiaria* incluindo a cv. BRS Tupi e o acesso sexual H31. Só foram considerados primers que amplificaram banda com alta nitidez e reprodutibilidade.

Resultados e Discussão

A metodologia de identificação de híbridos por meio de bandas de RAPD presentes no genitor masculino e ausentes no feminino foi proposta por Alzate-Marín et al. (1996) para confirmar com sucesso a fecundação cruzada entre cultivares de feijão e soja. Outros trabalhos também utilizaram esses marcadores na identificação de híbridos (OLIVEIRA et al., 2002; BASTIANEL et al., 2006).

Segundo Faleiro et al. (2003), o uso de um ou dois *primers* com pelo menos uma banda informativa é suficiente para confirmar ou não a ocorrência da fecundação cruzada em plantas. Neste trabalho, quando uma planta da progênie apresentou três bandas informativas, ela foi retirada das análises e considerada híbrida, o que reduziu os custos e o tempo das análises.

Dez *primers* foram selecionados para as análises dos híbridos, que juntos amplificavam 31 bandas informativas, nítidas e reproduzíveis. Pode-se destacar o *primer* AB01 que amplificou seis bandas informativas, seguido dos *primers* P14 e AK19, que amplificaram, cada um, cinco bandas informativas (Tabela 1).

Tabela 1. Seqüência de nucleotídeos dos *primers* de RAPD selecionados para a identificação de híbridos do cruzamento intra-específico entre a cultivar *B. humidicola* cv. BRS Tupi e o acesso sexual H31 com o número de bandas informativas amplificadas.

<i>Primer</i>	Seqüência de nucleotídeo	Nº de bandas informativas	<i>Primer</i>	Seqüência de nucleotídeo	Nº de bandas informativas
P14	CCA GCC GAA C	5	AC17	CCT GGA GCT T	2
81	GGA GCG TAC T	3	AD01	CAA AGG CCG G	3
AB01	CCG TCG GTA G	6	AK04	AGG GTC GGT C	2
BA02	TGC TCG GCT C	1	AK19	TCG CAG CGA G	5
AB02	GGA AAC CCC T	1	AL03	CCC ACC CTT G	3

O grande número de bandas informativas detectado entre os genitores é uma evidência da diversidade genética entre eles. Esse resultado concorda com Chiari et al. (2006) que estudaram a variabilidade genética, usando marcadores RAPD, em 58 acessos do germoplasma de *B. humidicola* da Embrapa Gado de Corte, e encontraram uma baixa similaridade genética para esses dois acessos (cv. BRS Tupi e H31), sendo o valor obtido pelo coeficiente de Dice de 0,31.

A Fig. 1 mostra três bandas informativas, amplificadas com o *primer* 81, que foram utilizadas para confirmação da fecundação cruzada em 17 plantas da progênie de *B. humidicola*. Os genitores foram incluídos nessa e nas demais análises, para o reconhecimento das bandas informativas e para dar mais confiabilidade aos resultados, visto que o maior problema da utilização de marcadores RAPD está na presença de bandas ambíguas, que ora amplificam, ora não.

Após a análise dos géis obtidos com os dez *primers* selecionados, 286 plantas foram identificadas como híbridas e 61 podem ser oriundas de autofecundação na planta-mãe, pois não apresentaram nenhuma banda informativa, revelando que tal evento pode ocorrer em cruzamentos controlados em *B. humidicola*, com uma freqüência aproximada de 18%.

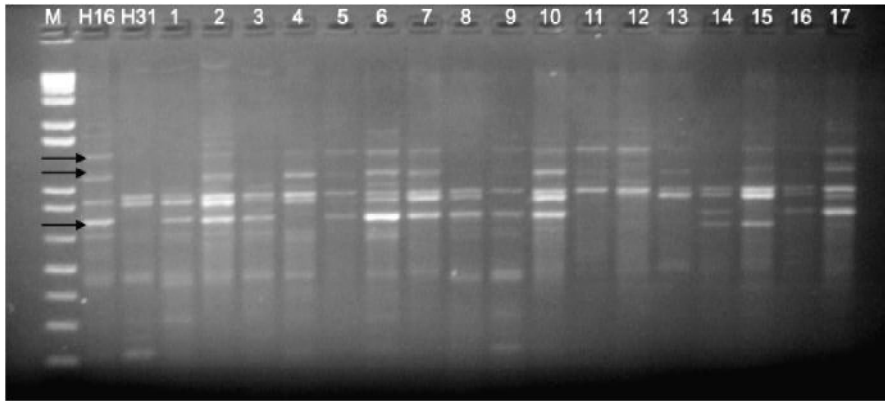


Fig. 1. Perfil de RAPD obtido com o *primer* 81 para os genitores, H16 (cv. BRS Tupi) e H31, e para 17 plantas da população resultante do cruzamento entre eles. M é o marcador de peso molecular 1kb *plus* DNA *ladder* (Invitrogen). As setas apontam as três bandas informativas utilizadas na identificação dos híbridos.

As plantas determinadas como produto de autofecundação serão descartadas das posteriores avaliações agronômicas, enquanto os híbridos seguem no programa e serão avaliados quanto ao modo de reprodução. Híbridos apomícticos podem ser selecionados visando ao lançamento de novas cultivares e híbridos sexuais podem ser utilizados em novos cruzamentos se apresentarem boa *performance* agronômica.

Conclusões

A caracterização molecular da população resultante do cruzamento intra-específico entre a cultivar *B. humidicola* cv. BRS Tupi e o acesso H31, realizada com dez *primers* de RAPD, permitiu a identificação segura e precoce de 286 híbridos, agilizando todo o programa de melhoramento. Além disso, as bandas informativas identificadas neste trabalho serão bastante úteis na identificação de novos híbridos originados do cruzamento entre esses mesmos parentais.

Agradecimentos

À Embrapa Gado de Corte, pela possibilidade de desenvolvimento deste trabalho; ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa PIBIC/CNPq concedida à primeira autora; à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect) e à Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais (Unipasto), pelo auxílio financeiro. E especialmente à equipe do laboratório de Citogenética e Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte.

Referências

- ALZATE-MARÍN, A. L.; BAIA, G. S.; MARTINS FILHO, S.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; SEDIYAMA, C. S.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. Use of RAPD-PCR to identify true hybrid plant from crosses between closely related progenitors. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.4, p. 621-623, 1996.
- BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A. C. de; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor 'Murcott' avaliada por AFLP e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 5, p. 779-784, Maio, 2006.
- BOLDRINI, K. R.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 85, n. 3, p. 225-228, Dec., 2006.
- BONATO, A. L. V.; VALLE, C. B. do; JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; LEGUIZAMON, G. O. de C. 2002. **Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum maximum***. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 79).
- BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 547 p.

- CHIARI, L.; SALGADO, L. R.; VALLE, C. B.; JUNGSMANN, L.; VALLE, J. V. R.; LEGUIZAMON, G. O. C. Estimativa da variabilidade genética em acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando marcadores RAPD. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Produção animal em biomas tropicais: anais**. João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia: UFPB, 2006. 4 p.
- FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotrópica**, Ilhéus, v. 15, n. 1, p. 41 – 46, Abr., 2003.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p. il. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20).
- KICHEL, A. N.; MIRANDA, C. H. B.; TAMBOSI, S. A. Produção de bovinos de corte com a integração agricultura x pecuária. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS: TEMAS EM EVIDÊNCIAS, 1., 2000, Lavras. **Temas em evidência**. Lavras: UFLA, 2000. p. 51-68.
- OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MACHADO, M. A. Diversidade genética entre híbridos de tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 4, p. 479-484, Abr., 2002.
- RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W., MAASS, B. L., VALLE, B. C. (Ed.) **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT; Brasília, DF: EMBRAPA-CNPQC, 1996. 288 p. (CIAT. Publication, 259).
- ROCHA, M. da; SALGADO, L. R.; VALLE, C. B. do; DOURADO, D.; CHIARI, L. **Caracterização molecular de acessos de *Brachiaria* spp. usando RAPD**. 2006. 23 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, Campo Grande, MS.
- SERVIÇO NACIONAL DE PROTEÇÃO DE CULTIVARES (Brasil). **Registro nacional de cultivares – inclusões**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/cultivares/snpc_6_48.htm#4> Acesso em: 21 out. 2007.

SILVA, M. P.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; PEREIRA, M. G.; RODRIGUES, R.; DAHER, R. F.; POSSE, S. C. P. Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 3, p. 531-539, 2005.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. L.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov., 1990.

Embrapa

Gado de Corte

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**

CGPE 7729