

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

# ***Documentos 199***

## **I Workshop sobre Tolerância a Estresses Abióticos**

**18 a 19 de junho de 2013 - Campo Grande – MS**

### **Comitê Técnico-Científico:**

Cacilda Borges do Valle

Geovani Ferreira Alves

Letícia Jungmann Cançado

Liana Jank

Lucimara Chiari

Lucinete Colombo

Sanzio Carvalho Lima Barrios

Ulisses José de Figueiredo

Embrapa Gado de Corte

Brasília, DF

2013

# Diversidade Genética entre Acessos de Camaratuba (*Cratylia argentea* (Desv.) Kuntze) com Marcadores ISSR

Gizele de Andrade Luz<sup>1</sup>

Karina de Sousa Leite<sup>2</sup>

Sulimary Oliveira Gomes<sup>3</sup>

Raimundo Bezerra de Araujo Neto<sup>4</sup>

Maria do Socorro Cortez Bona do Nascimento<sup>5</sup>

Paulo Sarmanho da Costa Lima<sup>6</sup>

## Abstract

*The low rates rainfall with irregular distribution in semiarid cause hydric deficit and high evapotranspiration in period of drought disadvantaging the availability of forage in the period. Among strategies used for elevate the availability of forage in the dry period, is the use of species resistant to drought. Among the leguminous, the Camaratuba is promising due to their high productive, high nutritional value, resistance to drought and adaptation to arid soils. The objective of the study was the molecular characterization of 13 accessions of Camaratuba from the native forage germplasm bank of Embrapa Mid-North. Were selected 15 primers to accessions the DNA genomic of the accessions. Was constructed a binary matrix from which analysis were performed to estimate the similarities of access. The similarity coefficient ranged from 0,49 to 0,73. The accession of the germplasm bank show considerable variability with potential parents for genetic breeding.*

<sup>1</sup> Estudante de Graduação do curso de Biologia da Universidade Estadual do Piauí, gyz\_luz@hotmail.com

<sup>2</sup> Graduada em Biomedicina pela Faculdade Aliança, karinasousaleite@gmail.com

<sup>3</sup> Mestre em Agronomia pela Universidade Federal do Piauí, sgomes\_pi@hotmail.com

<sup>4</sup> Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, raimundo.bezerra@embrapa.br

<sup>5</sup> Pesquisadora da Embrapa Meio-Norte, msbn13@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Paulo.costa-lima@embrapa.br

## Introdução

No semiárido brasileiro os índices pluviométricos são baixos e mal distribuídos. Isso faz com que ocorra uma baixa disponibilidade de forragem de qualidade no período de estiagem por causa do déficit hídrico e evapotranspiração elevada, sendo necessária a suplementação alimentar para obtenção de níveis aceitáveis de desempenho animal (Andrade et al., 2010). Existem diversas estratégias para elevar a oferta de forragem no período seco, entre as quais se destaca a utilização de espécies resistentes à seca e bem ajustadas às variações climáticas do ambiente.

Entre as leguminosas, a Camaratuba (*Cratylia argentea* (Desv.) Kuntze) é promissora por sua adaptação a solos ácidos, tolerância à seca, alto teor de proteína, alta retenção de folhas verdes e capacidade de germinar durante o período seco (Lascano et al., 2002). Essa leguminosa arbustiva da família Fabaceae está geograficamente distribuída na América do Sul, com ocorrência no Brasil, Bolívia, Argentina e Peru (Argel; Lascano, 1998).

Os fatores limitantes da produção animal como estresses bióticos e abióticos podem ser superados pelo melhoramento genético de forrageiras, especialmente em busca de proteína a baixo custo. No melhoramento genético é essencial o conhecimento da diversidade genética, uma vez que esta orienta a formação de uma coleção de trabalho a partir da identificação de grupos heteróticos e a seleção de genitores mais divergentes para cruzamento (Bonato et al, 2006).

Nos estudos da diversidade genética os marcadores moleculares são amplamente utilizados por mostrarem diferenças no DNA e não sofrerem influência do ambiente. Entre os marcadores baseados em PCR (Polimerase Chain Reaction), o marcador dominante ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) é uma técnica simples, rápida, eficiente e reprodutível que amplifica segmentos de DNA presentes entre duas regiões microsatélites idênticas orientadas em direções opostas (Reddy; Sarla;

Siddiq, 2002). Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade molecular de 13 acessos de Camaratuba do Banco de Germoplasma de Forrageiras Nativas da Embrapa Meio-Norte.

## Material e Métodos

Foram coletadas folhas jovens de 13 acessos de Camaratuba oriundos do Banco de Germoplasma de forrageiras nativas da Embrapa Meio-Norte, em Teresina-PI. O DNA genômico foi extraído a partir de 0,1 g de folhas de cada acesso com o kit Qiagen de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O DNA foi quantificado em gel de agarose (0,8%) com TBE 0,5x e corado com GelRed™, comparando-o ao DNA  $\lambda$  na concentração de 100 ng.

Foram selecionados 15 iniciadores desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da British Columbia University: UBC 808, UBC 810, UBC 811, UBC 812, UBC 818, UBC 827, UBC 830, UBC 834, UBC 835, UBC 836, UBC 840, UBC 842, UBC 848, UBC 878 e UBC 886. As amostras de DNA foram amplificadas via PCR. Cada reação continha: 1x de tampão [10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>] (Biolabs), 1 mM de dNTP, 0,3  $\mu$ M de iniciador, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Biolabs), 0,5  $\mu$ L de DNA genômico (7 ng/ $\mu$ L) e água de MiliQ em um volume final de 10  $\mu$ L.

As ampliações foram realizadas em termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 1 ciclo inicial de desnaturação de 1,30 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 40 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos com a Ta do respectivo iniciador para anelamento, 2 minutos a 72°C para extensão e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose (1,5%) conduzido a 110 V por 6 horas, corados com GelRed™ e fotodocumentados sob luz ultravioleta.

Foi construída uma matriz para os fragmentos amplificados codificados em sistema binário, atribuindo-se (1) para presença e (0) para ausên-

cia de bandas. Para cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard, coeficiente de correlação cofenético ( $r$ ) e índice de confiabilidade de bootstrap foi usado o programa Past v.1.34 (HAMMER et al., 2001). A análise de agrupamento foi realizada pelo método de ligação média entre grupos (UPGMA).

## Resultados e Discussão

Com as amplificações dos 15 iniciadores obteve-se 313 marcadores dos quais 247 (78,21%) foram polimórficos. O número de loci amplificados variou entre sete (UBC 808) e 33 (UBC 834 e 838) com média de 20,87 loci por iniciador, enquanto o tamanho das bandas variou entre 280 e 3.000 pares de bases (Figura 1).

A matriz de similaridade variando entre 0,49 a 0,73 (Tabela 1) demonstrou a existência de variabilidade na espécie, apresentando acessos promissores para utilização em futuros programas de melhoramento. A maior similaridade está entre os acessos C12 e C13 e a menor entre os acessos C6 e C9. O reconhecimento de indivíduos com variabilidade genética otimiza a seleção de genitores para cruzamentos, uma vez que, o cruzamento entre os mais divergentes deve gerar maior segregação (Franco; Cassini; Oliveira, 2001). A Camaratuba por ser alóga-ma permite a recombinação do material genético de diferentes plantas resultando numa maior variabilidade. Portanto, há boas possibilidades de se obter combinações de genes incomuns e favoráveis nos cruzamentos entre C6 e C9, C1 e C6, C3 e C6, entre outros.

A análise de agrupamento baseada na matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard cuja média foi de 0,59 revelou as relações genéticas entre os genótipos permitindo a identificação de quatro grupos (Figura 2). Os grupos um, dois e quatro foram formados por um único acesso indicando que há variabilidade a ser explorada enquanto o grupo dois por dez deles. O grupo dois indica que ocorre um fluxo mais intenso de genes entre essas plantas provavelmente por se encontrarem mais próximas provocando maiores similaridades. O cálculo da correlação cofenética entre a matriz de dados originais e a matriz gerada pelo

dendrograma foi de 0,87 indicando que não há distorções significativas e que o dendrograma representa a matriz de dados originais.

O Banco de Germoplasma de Forrageiras Nativas apresenta uma variabilidade considerável entre os acessos de Camaratuba. Sendo importante sua conservação para utilização em futuros programas de melhoramento, visando ganhos genéticos. E assim, suprir a necessidade da agropecuária por novas cultivares que sejam bem adaptadas às variações climáticas do ambiente.

## Agradecimentos

PAC/Embrapa pelo suporte financeiro.

## Referências

- ARGEL, P. J. & LASCANO, C. E. *Cratylia argentea*: una nueva leguminosa arbustiva para suelos ácidos en zonas subhúmedas tropicales. **Pasturas tropicales**, v.20, n.1, p.37-43, 1998.
- ANDRADE, A. P.; COSTA, R. G.; SANTOS, E. M.; SILVA, D. S. Produção animal no semiárido: o desafio de disponibilizar forragem em quantidade e com qualidade, na estação seca. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.4, n.4, p.01-14, 2010.
- BONATO, A. L. V.; CALVO, E. S.; GERALDI, I. O.; ARIAS, C. A. A. Genetic similarity among soybean (*Glycine max* (L) Merrill) cultivars released in Brazil using AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.4, p.692-704, 2006.
- FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; TSAI, S. M. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p.381-385, 1997.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v.4, issue 1, art.4, 9pp. 2001.
- LASCANO, C.; RINCÓN-CORPOICA, A.; PLAZAS, C.; AVILA, P.; BUENO-CORPOICA, G.; ARGEL, P. **Veranera (*Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze): leguminosa arbustiva de usos múltiples para zonas con períodos prolongados de sequía em Colombia**. Centro

Internacional de Agricultura Tropical, 2002.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, v.128, p.9-17, 2002.

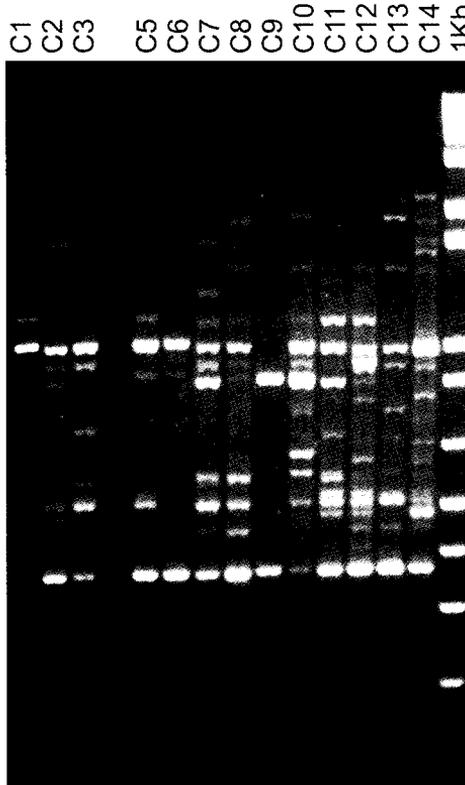


Figura 1. Produtos amplificados com o iniciador 827.

Tabela 1 - Similaridades genéticas entre os acessos de Camaratuba pelo coeficiente de Jaccard.

	C1	C2	C3	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14
C1	1												
C2	0,57	1											
C3	0,70	0,57	1										
C5	0,65	0,62	0,60	1									
C6	0,50	0,55	0,52	0,58	1								
C7	0,57	0,59	0,59	0,63	0,53	1							
C8	0,60	0,58	0,59	0,68	0,56	0,72	1						
C9	0,55	0,53	0,57	0,57	0,49	0,58	0,58	1					
C10	0,58	0,54	0,60	0,63	0,52	0,57	0,60	0,59	1				
C11	0,61	0,53	0,62	0,65	0,56	0,58	0,64	0,57	0,66	1			
C12	0,59	0,53	0,59	0,61	0,53	0,58	0,57	0,56	0,65	0,61	1		
C13	0,57	0,53	0,57	0,61	0,53	0,57	0,57	0,54	0,65	0,63	0,73	1	
C14	0,60	0,60	0,59	0,64	0,57	0,63	0,62	0,54	0,65	0,68	0,66	0,62	1

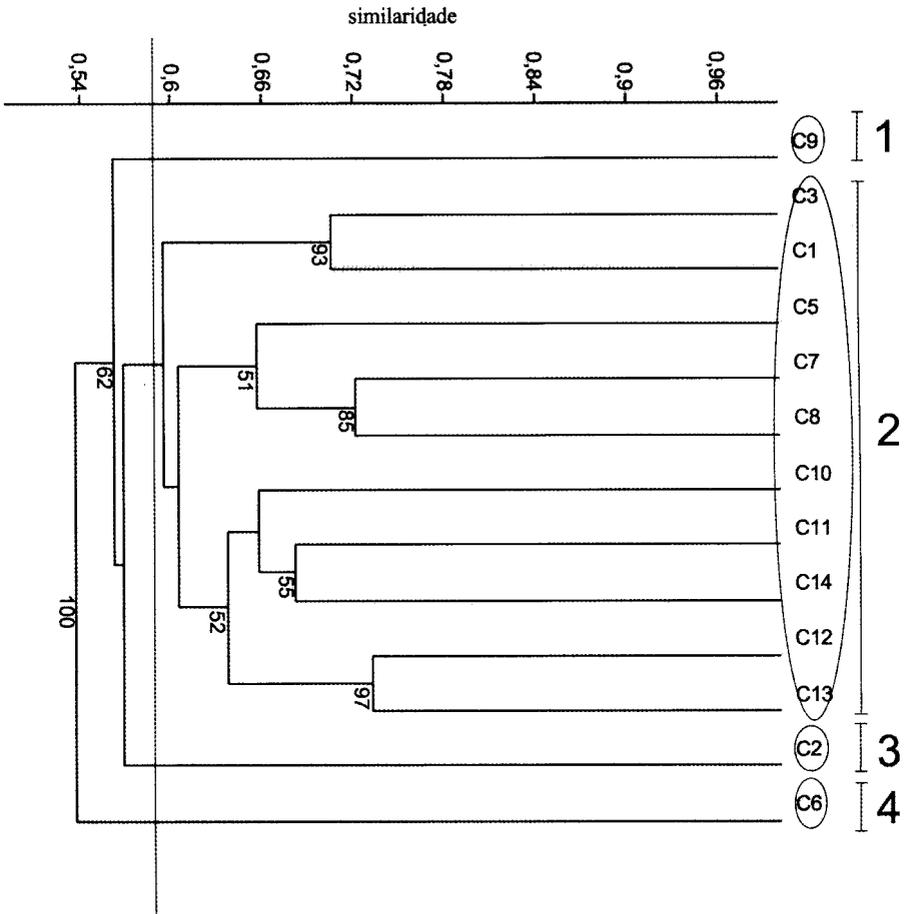


Figura 2. Agrupamento dos 13 acessos de Camaratuba pelo método UPGMA.