



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

Identificação de cultivares por microssatélites – aplicação à ervilha proteagínosa

Carlos Gaspar dos Reis
e Graça Diogo

Castelo Branco, 29 Junho 2011



PROGRAMA
COOPERAÇÃO TRANSFRONTEIRA
ESPAÑA – PORTUGAL
COOPERAÇÃO TRANSFRONTEIRA
2007 – 2013

União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro





Sumário

1. Introdução
2. Objectivos
3. Material e métodos
4. Resultados
5. Conclusões





1. Introdução

A identificação de cultivares e a estimação da variabilidade genética são aspectos importantes na protecção de direitos de autor e em programas de melhoramento.

Uma nova variedade cultivada terá de ser (EC 2100/94):

- i) Distinta de outras cultivares;
- ii) Apresentar homogeneidade;
- iii) Apresentar estabilidade.

Os marcadores moleculares podem ser um complemento importante na distinção de cultivares , já que:

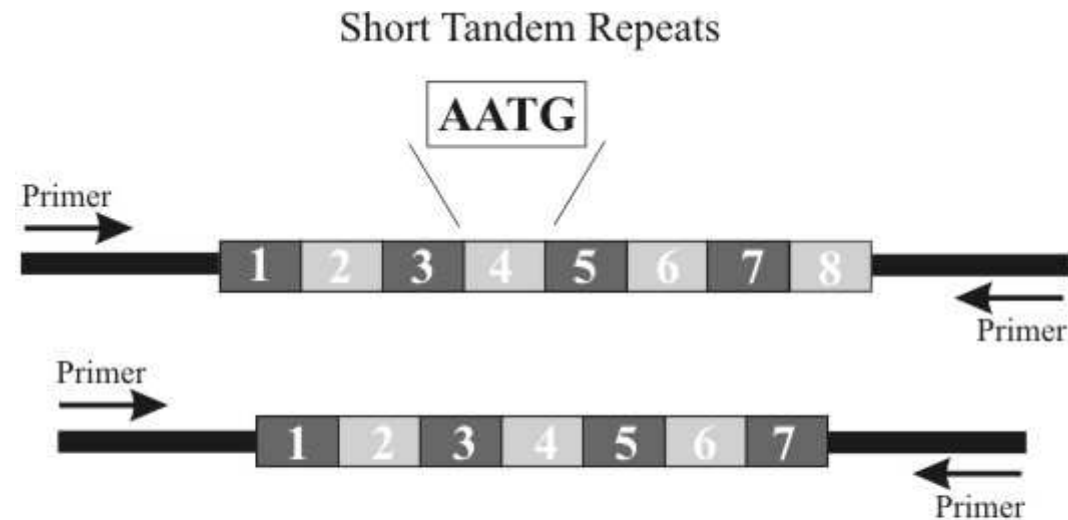
- i) Existem em elevado número; ii) não são influenciados pelo ambiente;
- iii) permitem uma análise relativamente rápida e reprodutível.





Os microssatélites são também designados por STRs (Short Tandem Repeats) ou por SSRs (Simple Sequence Repeats)

São marcadores moleculares muito polimórficos decorrente das altas taxas de mutação.



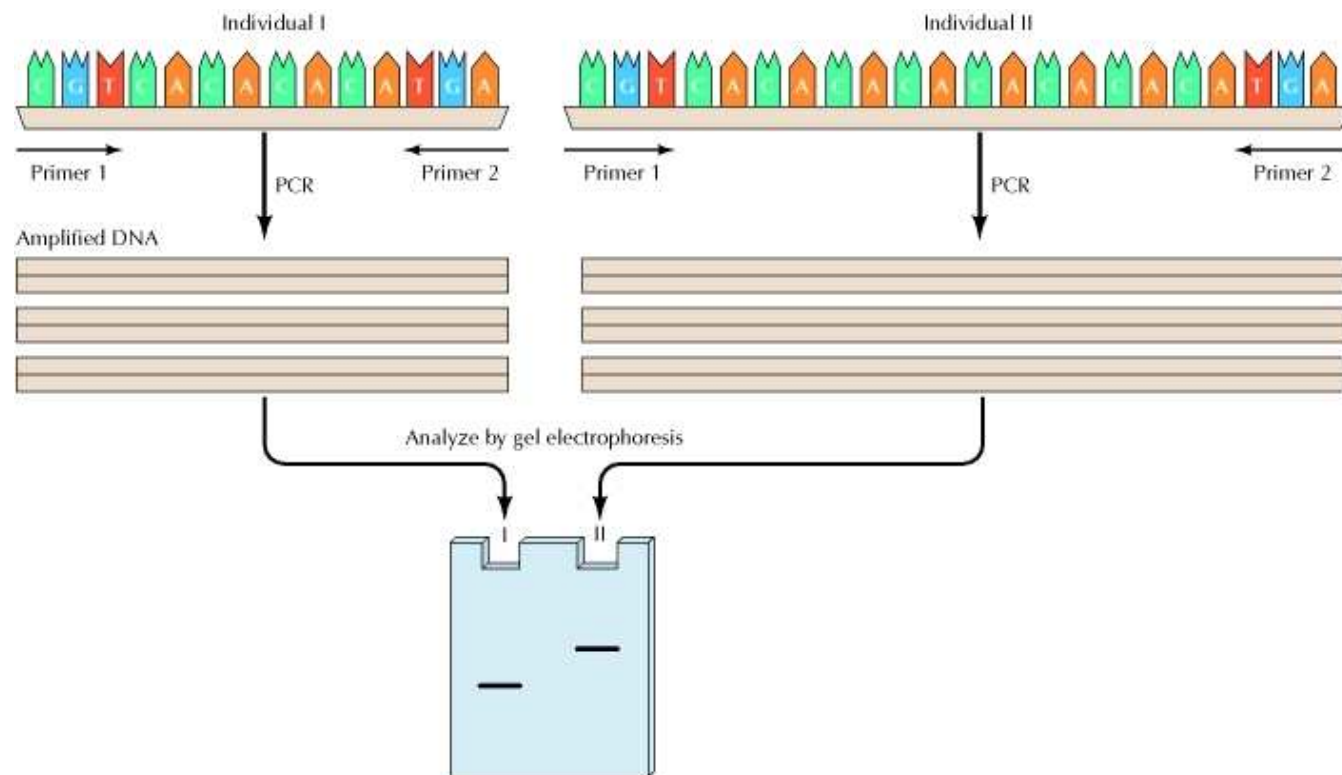
The flanking regions where PCR primers bind are constant

Homozygote = both alleles are the same length

Heterozygote = alleles differ and can be resolved from one another



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária



Objectivo

Identificação de 20 cultivares de ervilha proteagínosa, inscritas no catálogo comunitário de variedades, por marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSRs)



2. Material e métodos

- 20 cultivares de ervilha proteagínosa
- Extracção DNA: DNeasy Plant Mini kit (Qiagen)
- 7 marcadores SSRs foram estudados para detectar polimorfismos
- Mistura PCR:
 - 20 – 40 ng DNA
 - 2 uM de cada Primer (F e R)
 - 0,2 mM dNTPs
 - 0,6 U Taq polimerase
 - 1,5 mM MgCl₂
 - Tampão 1x
 - Volume final de reacção: 15 ul



Cultivares de ervilha proteaginososa estudadas.

	Cultivar	Registo	País de admissão oficial e nº de responsável pela conservação	Ciclo
1	CLEOPATRA	Comunitário	DE 7627	Primavera
2	ALHAMBRA	Comunitário	ES 225	Outono
3	ENDURO	Comunitário	FR 8444	Outono
4	GUIFREDO	Comunitário	IT 332	Outono
5	ISARD	Comunitário	FR 9504	Outono
6	CARTOUCHE	Comunitário	FR 9295, UK 182	Outono
7	CHEROKEE	Comunitário	FR 11553	Outono
8	IDEAL	Comunitário	ES 2041	Intermédio
9	AUDIT	Comunitário	FR 13262	Intermédio
10	CORRENT	Comunitário	IT 2	Intermédio
11	JAMES	Comunitário	FR 9295	Intermédio
12	GREGOR	Comunitário	DE 147, FR 9295, UK 6136	Primavera
13	ONIX	Comunitário	FR 9295	Primavera
14	ALEZAN	Comunitário	FR 8174	Primavera
15	LIVIA	Comunitário	FR 8451	Primavera
16	LUMINA	Comunitário	FR 13262	Primavera
17	GUIFILO	Comunitário	ES 9	Primavera
18	ARTHUR	Comunitário	FR 11539	Primavera
19	PIXEL	Comunitário	PT 2	Outono
20	GRISEL	Comunitário	PT 2	Outono





Loci estudados e respectivos primers

<i>Locus</i>	<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<i>Annealing Temp (°C)</i>	<i>Banda referência Pb</i>
A9	GTGCAGAAGCATTGTTTCAGAT	CCCACATATATTTGGTTGGTCA	56	359
AA205	TACGCAATCATAGAGTTTGGAA	AATCAAGTCAATGAAACAAGCA	51	235
AA355	AGAAAAATTCTAGCATGATACTG	GGAAATATAACCTCAATAACACA	51	180
AB25	TTTTCACTCAAACACTCGGCT	GATGCCATTGCTGAAGGAGATT	51	162
AB53	CGTCGTTGTTGCCGGTAG	AAACACGTCATCTCGACCTGC	51	120
AD61	CTCATTCAATGATGATAATCCTA	ATGAGGTACTTGTGTGAGATAAA	51	138
AD270	CTCATCTGATGCGTTGGATTAG	AGGTTGGATTTGTTGTTTGTG	51	290





- Amplificação PCR – programa de termociclador

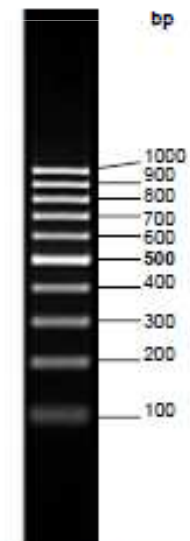
Passo	Temperatura (°C)	Duração (min)
1	95	10
2	95	0,5
3	51*	0,5
4	72	0,5
5	72	5
6	4	-----

35 ciclos



**Annealing temp.*
ajustada em função
do *locus* estudado

- Separação dos produtos amplificados por electroforese em gel de agarose MS-8 a 3,5% (w/v) em tampão TBE 1x, 90V/h. Coloração com EtBr.
- Quantificação aproximada das bandas tendo por base marcador 100 bp da Biotools



100 bp DNA Ladder





- Análise dados:

Registo de presença/ ausência de bandas e construção de tabela com código binário;

Para cada *locus*, cálculo do valor PIC (*Polymorphic Information Content*)
 $PIC = 1 - \sum p_i^2$ sendo p_i a frequência do alelo *ith* para o indivíduo *p*;

Processamento dos dados: software estatístico NTSYS-pc, vs. 2.21k;

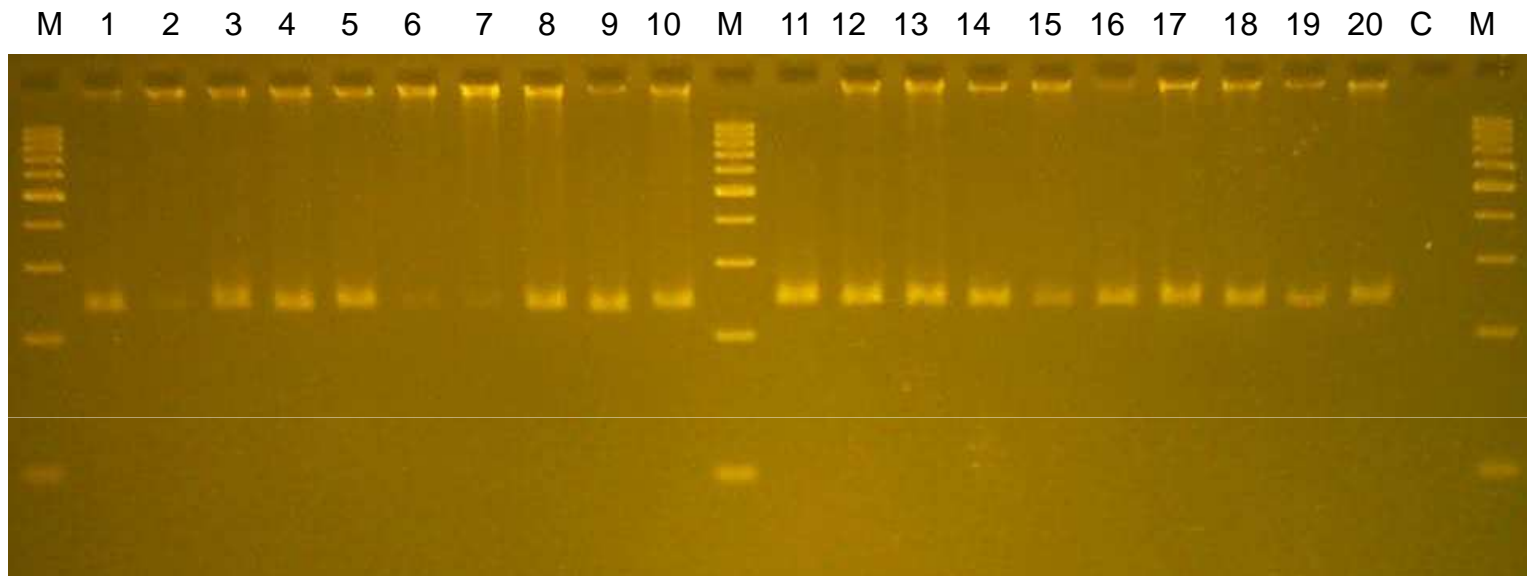
Utilização do módulo SIMQUAL com coeficiente de similaridade de Jaccard, seguido de análise de cluster UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean).



3. Resultados e discussão

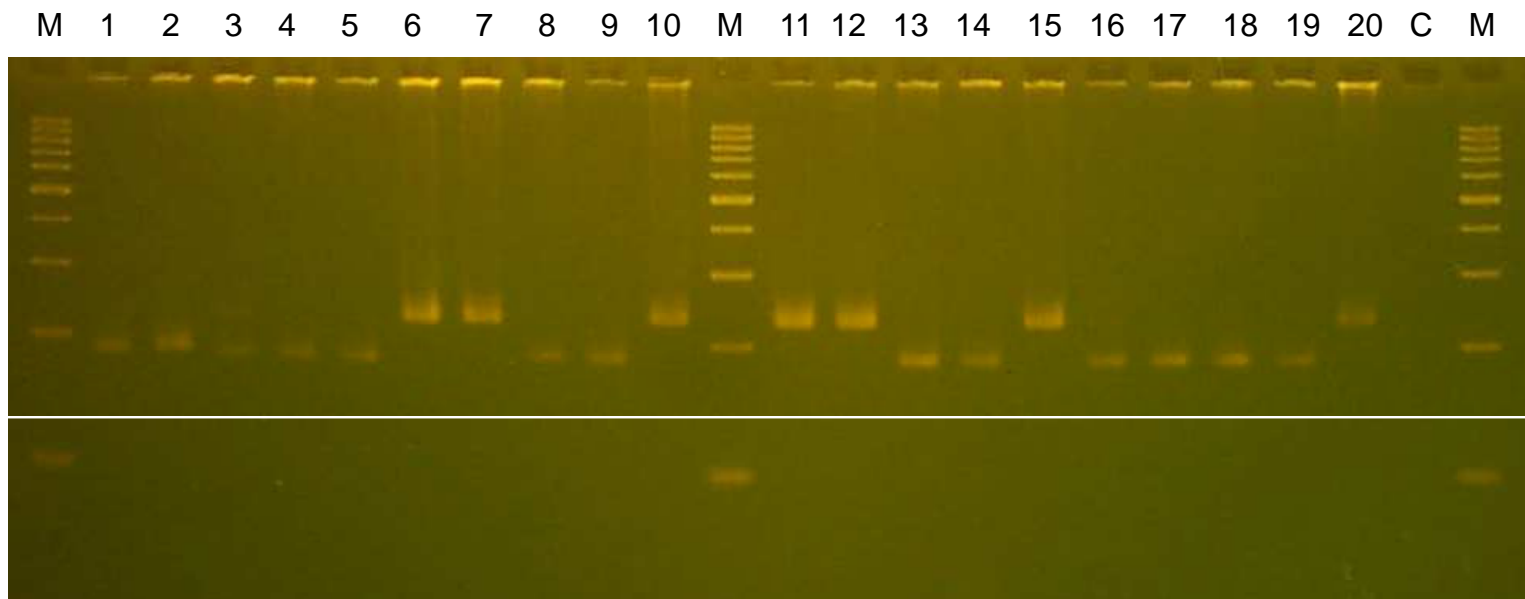
Locus	Primer F	Primer R	Nº de alelos	PIC
A9	GTGCAGAAGCATTGTTTCAGAT	CCCACATATATTTGGTTGGTCA	2	0,42
AA205	TACGCAATCATAGAGTTTGAA	AATCAAGTCAATGAAACAAGCA	1	0
AA355	AGAAAAATTCTAGCATGATACTG	GGAAATATAACCTCAATAACACA	4	0,46
AB25	TTTTCACTCAAAACACTCGGCT	GATGCCATTGCTGAAGGAGATT	2	0,46
AB53	CGTCGTTGTTGCCGGTAG	AAACACGTCATCTCGACCTGC	5	0,58
AD61	CTCATTCAATGATGATAATCCTA	ATGAGGTACTTGTGTGAGATAAA	3	0,56
AD270	CTCATCTGATGCGTTGGATTAG	AGGTTGGATTTGTTGTTTGTG	3	0,52
<i>total</i>			20	

PIC - Polymorphic Information Content



Locus AA205.

M – Marcador 100 bp; C – Controle; 1 – Cleopatra; 2 – Alhambra; 3 – Enduro; 4 – Guifredo; 5 - Isard; 6- Cartouche; 7 - Cherokee ; 8 – Ideal; 9 – Audit; 10 – Corrent; 11 – James; 12 – Gregor; 13 – Onix; 14 – Alezan; 15 – Livia; 16 - Lumina; 17 – Guifilo; 18 – Arthur; 19 – Pixel; 20 – Grisel.



Locus AB25.

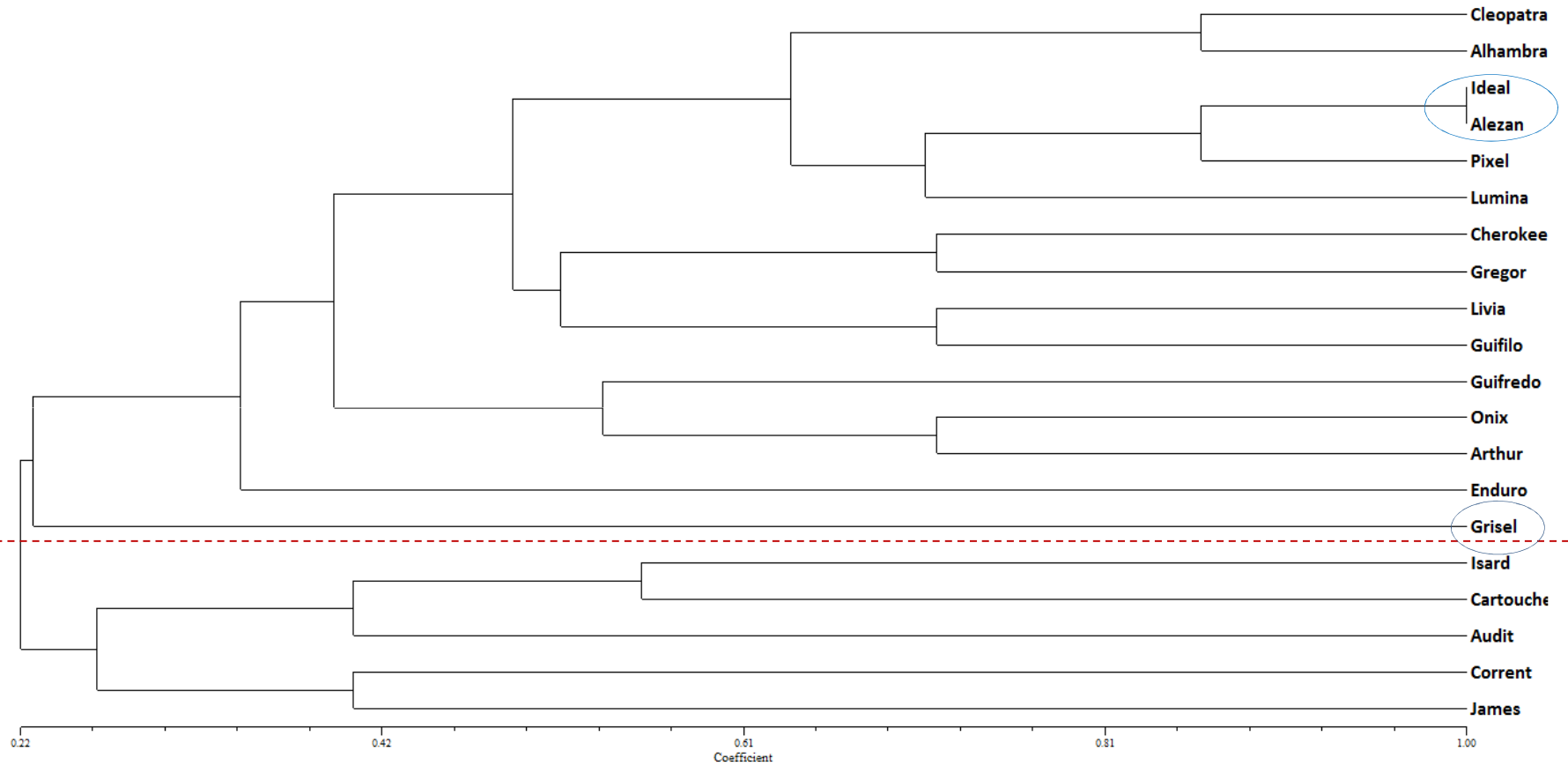
M – Marcador 100 bp; C – Controle; 1 – Cleopatra; 2 – Alhambra; 3 – Enduro; 4 – Guifredo; 5 - Isard; 6- Cartouche; 7 - Cherokee ; 8 – Ideal; 9 – Audit; 10 – Corrent; 11 – James; 12 – Gregor; 13 – Onix; 14 – Alezan; 15 – Livia; 16 - Lumina; 17 – Guifilo; 18 – Arthur; 19 – Pixel; 20 – Grisel.



Matriz binária relativa à presença/ausência de bandas nos *loci* estudados

Alelo	Cleopatra	Alhambra	Enduro	Guifredo	Isard	Cartouche	Cherokee	Ideal	Audit	Corrent	James	Gregor	Onix	Alezan	Livia	Lumina	Guifilo	Arthur	Pixel	Grisel
A9_2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
A9_1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0
AA355_4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AA355_3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AA355_2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AA355_1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB25_2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
AB25_1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
AB53_5	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
AB53_4	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB53_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB53_2	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ab53_1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1
AD61_3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
AD61_2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AD61_1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
AD270_3	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
AD270_2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
AD270_1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0





Dendrograma com relações genéticas existentes entre as 20 cultivares, construído por análise de *cluster* (UPGMA) com base nos coeficientes de similaridade de Jacard para 6 *loci*.



4. Conclusões

- Da análise combinada de seis *loci* polimórficos é possível distinguir quase todas as variedades cultivadas;
- Número total de alelos detectados: 20;
- *Loci* mais informativos: *AB53* e *AD61*;
- O dendrograma UPGMA revela dois grupos principais, um dos grupos engloba as cultivares Isard, Cartouche, Audit, Corrent e James, estando as restantes colocadas num segundo grupo;
- No segundo grupo, a cultivar Grisel (PT) aparece isolada, afastada geneticamente das restantes;
- Baixo número de *loci* heterozigóticos, consentâneo com a natureza autogâmica da espécie.





Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

Agradecimentos

O presente estudo foi realizado no âmbito do projecto 0186_AGROCELE_3_E, Programa Operacional de Cooperação transfronteiriça Espanha-Portugal (POCTEP), em colaboração com o Instituto Tecnológico Agrário de Castilla y León (ITACyL) e financiado pelo fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).



União Europeia
FEDER
Investimos no seu futuro

