

Comunicado Técnico 202

ISSN 0102-0110
Novembro, 2016
Brasília, DF

Foto: Vera Tavares de Campos Carneiro



Transferibilidade de *Primers* Microssatélites Desenhados de Sequências Expressas de *Brachiaria brizantha* para *B. decumbens* e *B. humidicola*

Gláucia Salles Cortopassi Buso¹
Nayara Carvalho²
Paulo Henrique dos Santos Leite³
Felipe Mont'Alvão Canela⁴
Juciane Souza⁵
Diva Maria de Alencar Dusi⁶
Roberto Coiti Togawa⁷
Zilneide Pedrosa de Souza Amaral⁸
Lucimara Chiari⁹
Vera Tavares de Campos Carneiro¹⁰

Introdução

Braquiárias são gramíneas nativas da África que foram introduzidas no Brasil como forrageiras com grande adaptabilidade, sobretudo na região centro-norte. O gênero *Brachiaria* pertence à família *Poaceae*, tribo *Paniceae*, e compreende aproximadamente 100 espécies. As espécies *B. brizantha*, *B. humidicola* e *B. decumbens*, entre outras, são bastante utilizadas na América tropical e subtropical (KELLER-GREIN et al., 1996) e fazem parte do Programa de Melhoramento da Embrapa Gado de Corte.

Existe a necessidade de se desenvolver métodos que acelerem a capacidade analítica dos estudos genéticos de *Brachiaria* que lidam com estimativas de diversidade genética, genética de populações e mapeamento genético. Sequências Simples

Repetidas (SSR), ou microssatélites, são marcadores genéticos poderosos para uma análise genômica detalhada. Eles são baseados em PCR, têm herança codominante, são altamente multialélicos e podem ser semiautomatizados em ensaios com multiplexes para alta produção de dados. Um conjunto de *primers* SSR foi desenvolvido recentemente a partir de sequências de *B. brizantha* (*Brachiaria brizantha* ovaries + LCM no <http://lbi.cenargen.embrapa.br/brachiaria>) - Projeto Embrapa SEG "Genômica funcional e controle genético da reprodução sexual e apomítica de plantas com perspectivas biotecnológicas" (BUSO et al., 2015).

Para algumas espécies dentro do mesmo gênero, a taxa de transferência de marcadores tem sido elevada devido à conservação de sítios de microssatélites entre espécies relacionadas (SCOTT et al., 2003). É possível que isto seja verdadeiro

¹ Doutora em Ciências Biológicas, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Estagiária, graduanda da Universidade de Brasília.

³ Estagiário, graduando da Universidade de Brasília.

⁴ Estagiário, graduando da Universidade de Brasília.

⁵ Estagiária, graduanda do UniCEUB – Centro Universitário de Brasília, DF.

⁶ Doutora em Ciências Biológicas, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁷ Doutor em Bioinformática Estrutural, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁸ Gestora ambiental, técnica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁹ Doutora em Genética e Melhoramento, secretária-executiva do CTI da Embrapa Gado de Corte.

¹⁰ Doutora em Biologia Celular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

também para algumas espécies de *Brachiaria*. Considerando o alto custo para o desenvolvimento destes marcadores, a estratégia de análise de transferibilidade de microssatélites de uma espécie para outra é bastante oportuna.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi otimizar a temperatura de anelamento de *primers* SSR desenvolvidos para a espécie *B. brizantha* e analisar a transferibilidade deles para *B. decumbens* e *B. humidicola*.

Material e Métodos

Os acessos utilizados foram provenientes da Embrapa Gado de Corte e consistiram em quatro acessos de *B. brizantha* do Banco Ativo de Germoplasma de *Brachiaria*, quatro genótipos de população segregante de *B. humidicola* e quatro de *B. decumbens*. O DNA foi extraído seguindo o protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998).

Os 145 *primers* analisados foram desenhados a partir de sequências disponíveis no banco de sequências expressas de *B. brizantha* do Projeto Embrapa SEG "Genômica funcional e controle genético da reprodução sexual e apomítica de plantas com perspectivas biotecnológicas", que, após mineração, agrupamento e redução da redundância, resultaram em 315 *primers* SSR EST ("Expressed Sequence Tags") (BUSO et al, 2015).

Para a otimização da temperatura de anelamento e verificação da transferibilidade de *primers* SSRs desenvolvidos para *B. brizantha* para *B. decumbens* e *B. humidicola*, 145 pares de *primers* foram testados com temperaturas de anelamento que variaram entre 50°C e 60°C com intervalos de 02 graus centígrados. As reações de amplificação do DNA foram realizadas via PCR ("Polymerase Chain Reaction"), em termocicladores, utilizando-se 5 minutos a 94°C para desnaturação, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50-60°C (temperatura de anelamento), 1 minuto a 72 graus, e uma etapa de extensão final 7 minutos a 72°C. Para cada reação de amplificação, foram utilizados 3,0 µL de DNA a 3,0 ng/µL; 1,9 µL de água milli-Q; 1,30 µL Tampão 10X para Taq DNA polimerase contendo 50 mM de MgCl₂; 1,3 µL de dNTP 2,5 mM; 1,3 µL de BSA 2,5 mM; 4,0 µL de *primer* 0,9 µM e 1U de enzima Taq DNA polimerase, totalizando 13 µL de

reação. A visualização da amplificação foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 5% corado com nitrato de prata (AgNO₃) e revelado com carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃). A análise foi realizada por comparação dos fragmentos com Ladder 10 Kb, e os locos foram classificados como amplificados ou não e a melhor temperatura de anelamento foi identificada.

Resultados e Discussão

Após o teste das temperaturas de anelamento para um total de 145 pares de *primers* SSR, verificou-se que elas variaram de 52 a 60°C, conforme listado na Tabela 1. Dez pares de *primers* não amplificaram nenhum fragmento em nenhuma das temperaturas testadas. A proporção de locos amplificados foi maior em *B. brizantha*, conforme esperado, que apresentou 91,72% de locos amplificados, e a transferibilidade para *B. decumbens* foi de 76,55% e para *B. humidicola* foi de 49% dentre os pares de *primers* testados (Figura 2).

Tabela 1. Denominação do marcador, repetição do microssatélite, temperatura de anelamento (T.A. °C) de 145 pares de *primers* microssatélites desenhados para *Brachiaria brizantha* e amplificados em *B. decumbens* e *B. humidicola*.

Marcador	Repetição	T.A. (°C)			Marcador	Repetição	T.A. (°C)		
		<i>B. brizantha</i>	<i>B. decumbens</i>	<i>B. humidicola</i>			<i>B. brizantha</i>	<i>B. decumbens</i>	<i>B. humidicola</i>
BbBR03	(AG)11	n.a.	n.a.	n.a.	BbBR 198	(TGC)7	56	54	54
BbBR17	(AT)8	54	n.a.	n.a.	BbBR 199	(TGC)7	55	52	n.a.
BbBR22	(AT)9	54	52	56	BbBR 200	(CAG)10	57	52	52
BbBR23	(GA)11	54	52	n.a.	BbBR 201	(GCA)7	58	56	57
BbBR24	(AG)16	56	n.a.	n.a.	BbBR 202	(CTG)7	57	52	n.a.
BbBR 25	(GA)8	n.a.	n.a.	n.a.	BbBR 203	(CCT)6	54	52	n.a.
BbBR 27	(GA)21	58	n.a.	n.a.	BbBR205	(CAG)8	56	52	56
BbBR 31	(GA)9	59	52	54	BbBR206	(GAG)7	58	n.a.	54
BbBR 33	(GA)9	59	56	56	BbBR207	(AGG)8	57	56	54
BbBR 34	(CT)9	59	52	n.a.	BbBR 208	(GAG)6	55	56	54
BbBR 35	(CT)12	59	n.a.	52	BbBR 209	(GGA)6	54	56	n.a.
BbBR 39	(TC)9	n.a.	n.a.	n.a.	BbBR 210	(TCC)7	57	52	n.a.
BbBR 42	(CT)10	59	56	52	BbBR 211	(CTT)7	55	54	56
BbBR 43	(TC)11	56	56	56	BbBR 212	(GGA)6	56	52	52
BbBR 52	(GT)7(TT)G)5	56	54	n.a.	BbBR 213	(CTC)7	55	52	52
BbBR 53	(GT)8	56	58	n.a.	BbBR 214	(AGC)6	57	56	52
BbBR 55	(GT)8	56	n.a.	52	BbBR 215	(GCT)6	55	56	56
BbBR 56	(TG)8	57	52	n.a.	BbBR 216	(GCT)6	57	56	n.a.
BbBR 57	(CATC)6	57	56	52	BbBR 217	(CTG)7	56	56	n.a.
BbBR 59	(TG)10	58	56	n.a.	BbBR 219	(TGC)7	57	56	58
BbBR 60	(GT)8	58	n.a.	n.a.	BbBR 220	(CAG)7	58	56	57
BbBR 61	(CA)11	55	n.a.	n.a.	BbBR 221	(GAG)6	54	56	52
BbBR 63	(AC)9	57	52	n.a.	BbBR 222	(TCC)6(TTCC)3	54	56	52
BbBR 75	(GA)11	60	56	57	BbBR 223	(GAG)6	57	56	56
BbBR 77	(CG)7(TG)3	57	56	n.a.	BbBR 224	(GTA)8	56	56	n.a.
BbBR 81	(AAC)7	52	52	n.a.	BbBR 225	(GCT)7	56	n.a.	n.a.
BbBR 87	(AAG)7	57	56	57	BbBR 226	(GCT)6	58	56	n.a.
BbBR 89	(GGT)7	58	56	54	BbBR 227	(AGC)6	56	56	n.a.
BbBR 92	(GTCC)6	59	56	54	BbBR228	(AGC)6	56	56	56
BbBR 93	(GT)10	52	n.a.	n.a.	BbBR 229	(CAG)6	56	56	58
BbBR 98	(AC)9	58	52	n.a.	BbBR 230	(TGC)6	57	n.a.	n.a.
BbBR 100	(TG)8	n.a.	n.a.	n.a.	BbBR 231	(GCT)7	56	56	58
BbBR 102	(CA)10	56	n.a.	n.a.	BbBR 232	(GCT)6	56	58	n.a.
BbBR 104	(AC)9	57	52	n.a.	BbBR 233	(GTA)7	55	56	58
BbBR 108	(AC)8	60	56	n.a.	BbBR 234	(GTA)7	57	56	58
BbBR 110	(CT)9	57	56	n.a.	BbBR 235	(TGA)7	57	56	54
BbBR 114	(AAG)7	59	56	58	BbBR 236	(TCA)8	58	56	52
BbBR 115	(TC)8	56	52	56	BbBR 237	(TGA)7	56	56	52
BbBR 120	(CA)11	52	52	n.a.	BbBR 238	(TGA)7	56	56	n.a.

Marcador	Repetição	T.A. (°C)			Marcador	Repetição	T.A. (°C)		
		<i>B. brizantha</i>	<i>B. decumbens</i>	<i>B. humidicola</i>			<i>B. brizantha</i>	<i>B. decumbens</i>	<i>B. humidicola</i>
BbBR 124	(TGT)7	n.a.	n.a.	n.a.	BbBR 239	(GGC)6	57	52	n.a.
BbBR 125	(ATT)7	58	56	n.a.	BbBR 240	(GCG)6	55	56	n.a.
BbBR128	(ATT)8	57	52	n.a.	BbBR 241	(CGG)6	54	n.a.	58
BbBR149	(GGT)7	56	52	58	BbBR 242	(GCC)6	n.a.	n.a.	n.a.
BbBR157	(GAC)7	60	52	52	BbBR 243	(GCT)6	56	56	52
BbBR167	(TCT)14	60	52	n.a.	BbBR 247	(CTTT)6	58	56	58
BbBR169	(TCT)8	58	n.a.	52	BbBR 251	(CCG)6	n.a.	n.a.	n.a.
BbBR170	(TTC)6	59	56	56	BbBR 252	(CGC)6	n.a.	n.a.	n.a.
BbBR171	(TTC)6	60	54	58	BbBR 253	(CCG)6	58	56	58
BbBR172	(CTT)9	58	52	n.a.	BbBR254	(GCG)6	55	52	n.a.
BbBR173	(CTT)7	58	n.a.	58	BbBR255	(GCT)6	n.a.	n.a.	n.a.
BbBR174	(CTT)7	58	n.a.	56	BbBR256	(GTTT)6	55	56	n.a.
BbBR175	(AAG)6	n.a.	n.a.	n.a.	BbBR 257	(TTTG)7	58	58	n.a.
BbBR176	(TTC)6	56	n.a.	n.a.	BbBR 258	(AAAG)8	56	56	n.a.
BbBR177	(TGG)6	56	52	56	BbBR 260	(CTTT)6	55	56	57
BbBR178	(TGG)6	56	52	n.a.	BbBR 265	(CA)11	55	56	58
BbBR179	(TGG)7	55	56	56	BbBR 266	(CA)7	55	56	n.a.
BbBR180	(AGA)6	56	52	n.a.	BbBR 268	(CCT)6	n.a.	n.a.	n.a.
BbBR181	(AGA)6	52	56	57	BbBR 269	(TCA)6	54	56	n.a.
BbBR182	(AAT)7	52	52	n.a.	BbBR 271	(ATAC)6	57	56	n.a.
BbBR183	(CAC)6	56	56	58	BbBR 273	(ATAC)6	58	56	58
BbBR184	(CAC)6	56	n.a.	n.a.	BbBR 275	(CTGA)6	58	56	n.a.
BbBR 185	(GTG)6	56	56	56	BbBR 278	(CT)7	59	56	n.a.
BbBR 186	(ACC)6	52	52	56	BbBR 279	(TCT)6	57	56	58
BbBR 187	(ACC)6	59	56	n.a.	BbBR 280	(TGA)7	57	56	58
BbBR 189	(ACT)6	55	n.a.	n.a.	BbBR 285	(CT)12	59	56	n.a.
BbBR 190	(TGA)7	57	n.a.	56	BbBR 287	(GCA)6	56	56	n.a.
BbBR 191	(AGT)6	58	n.a.	56	BbBR 288	(GTG)6	57	56	52
BbBR 192	(GTA)8	60	56	n.a.	BbBR 289	(CCT)6	57	56	52
BbBR 193	(CGA)8	52	56	56	BbBR 291	(TATT)6	56	56	52
BbBR 194	(CTG)8	55	52	n.a.	BbBR 292	(TGA)6	57	56	52
BbBR 195	(CAG)10	57	56	56	BbBR 294	(AATG)7	57	56	n.a.
BbBR 196	(CAG)8	54	52	54	BbBR 295	(CTGA)6	n.a.	n.a.	n.a.
BbBR 197	(TGC)7	58	56	54					

n.a. = não amplificou.

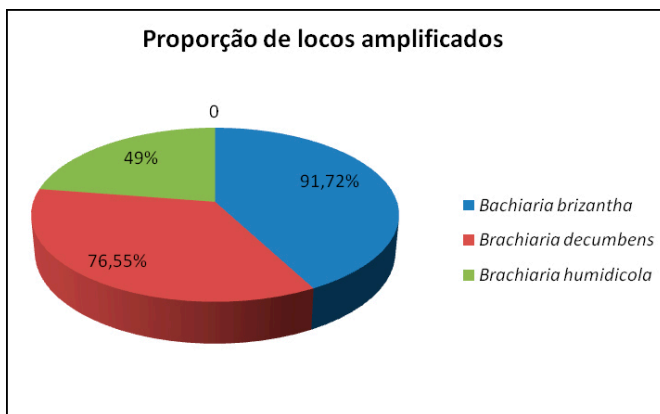


Figura 1. Proporção de pares de *primers* de *B. brizantha* que resultaram em fragmentos nítidos amplificados e, portanto, foram considerados transferidos para *B. decumbens* e *B. humidicola*.

Esta taxa de transferibilidade é maior do que a encontrada por Leite et al. (2007), que foi de 31,25% em um estudo de transferibilidade de *primers* desenhados para melão em abóbora e bucha vegetal. No entanto, para *B. decumbens* foi próxima à encontrada na transferibilidade de *Cucurbita pepo* para *C. argyrosperma* (85%) e *C. ficifolia* (80%) (PRIORI, 2011).

Conclusões

Estes resultados mostram a existência de genes ortólogos na conservação de marcadores microsatélites entre espécies do gênero *Brachiaria*, o que possibilita

sua utilização e reduz o custo necessário para o desenvolvimento de marcadores. Além disso, o conhecimento da transferibilidade de locos microsatélites entre espécies do gênero é importante, uma vez que os marcadores SSR com elevado conteúdo informativo possibilitam também estudos comparativos e integração de informações genômicas obtidas em cada uma das espécies analisadas.

Referências Bibliográficas

BUSO, G. S. C.; DUSI, D. M. A.; TOGAWA, R. C.; AMARAL, Z. P. de S.; CARNEIRO, V. T. C. **Identificação e caracterização de microsatélites e desenho de primers de sequências expressas de *Brachiaria brizantha***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015. 5 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 198).

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina – DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

KELLER-GREIN, G.; MAAS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections . In: MILES, J. W.; MASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.). ***Brachiaria*: biology, agronomy and improvement**, Cali: CIAT, 1996, p. 16-42.

LEITE, T. L.; MARCO, A. F.; TARCHETTI, B. D.; FERREIRA, M. A. J. F.; AMARAL, Z. P. de S.; BUSO, G. S. C. **Análise de transferibilidade de primers microsatélites de *Cucumis melo* para *Cucurbita moschata* e *Luffa cylindrica***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 10 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 203).

PRIORI, D. **Molecular characterization of genetic resources of *Cucurbita argyrosperma*, *Cucurbita ficifolia* and *Cucurbita pepo***. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

SCOTT, L. J.; SHEPHERD, M.; HENRY, R. J. Characterization of highly conserved microsatellite loci in *Araucaria cunninghamii* and related species. **Plant Systematics Evolution**, Jena, v. 236, p. 115-123, 2003.

Comunicado Técnico 202

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Endereço: Parque Estação Biológica (PqEB) - Avenida W5 Norte - Caixa Postal 02372 - Brasília, DF, Brasil
CEP: 70770-900
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
E-mail: sac@cenargen.embrapa.br
1ª edição
Publicação *online* (2016)

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato
Secretário-Executivo: Thales Lima Rocha
Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols, Lígia Sardinha Fortes, Lucas Machado de Souza, Márcio Martinello Sanches, Rosameres Rocha Galvão
Membros suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes, João Batista Tavares da Silva

Expediente

Normalização bibliográfica: Ana Flávia do N. Dias Côrtes
Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães
Tratamento das imagens: José Cesamildo Cruz Magalhães
Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães