

Diversidade genética molecular entre cultivares e híbridos de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum*

Molecular genetic diversity among cultivars and hybrids of *Brachiaria* spp. and *Panicum maximum*

Mariana Castro da Costa Almeida^I Lucimara Chiari^{II*} Liana Jank^{II}
Cacilda Borges do Valle^{II}

RESUMO

A utilização de marcadores moleculares pode servir para direcionar cruzamentos, confirmar novos híbridos e identificar genótipos para fins comerciais. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade genética entre cultivares e híbridos de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum* usando marcadores moleculares do tipo RAPD (Polimorfismos de DNA amplificados ao acaso). Foram 22 genótipos analisados com 10 primers, os quais amplificaram 178 fragmentos polimórficos de DNA, que foram usados para estimar a similaridade genética por meio do coeficiente de Jaccard. Os valores de similaridade obtidos variaram de 0,066 a 0,841. A estrutura genética entre todos os genótipos estudados foi estimada pelo método UPGMA (Método de agrupamento com médias aritméticas não ponderadas), revelando três grupos distintos com altos valores de bootstrap (>89%). Os resultados demonstraram que a técnica RAPD oferece uma maneira rápida, relativamente barata e útil para a caracterização da diversidade genética entre as diferentes cultivares e híbridos de *Brachiaria* spp. e *P. maximum* analisados.

Palavras-chave: *Brachiaria* spp., forrageiras, marcadores moleculares, *Panicum maximum*, RAPD.

ABSTRACT

The use of molecular markers may serve to direct crossings, confirm new hybrids and identify new genotypes for commercial purposes. In that context, this research aimed to analyze the genetic diversity among cultivars and hybrids of *Brachiaria* spp. and *P. maximum* using molecular markers of the type RAPD (Random amplified polymorphic DNA). It was analyzed 22 genotypes with 10 primers, which amplified 178 DNA polymorphic fragments, which were used to estimate the similarity using Jaccard coefficient. The values of similarity

ranged from 0.066 to 0.841. The genetic structure among genotypes was estimated by UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetical average) and revealed three distinct groups with high bootstrap values (>89%). The results showed that the RAPD is a fast, relatively inexpensive and useful technique for genetic divergence characterization between different cultivars and hybrids of *Brachiaria* spp. and *P. maximum*.

Key words: *Brachiaria* spp., forages, molecular markers, *Panicum maximum*, RAPD.

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking mundial de exportações de carne bovina e detém o maior rebanho comercial de bovinos do mundo (ANUALPEC, 2008). A criação animal em pasto é, sem dúvida, uma das maiores responsáveis pelo sucesso atingido no setor, pois promoveu um diferencial qualitativo para a carne brasileira no mercado internacional, principalmente em função de barreiras sanitárias (como, por exemplo, a Encefalopatia Espongiforme Bovina - BSE).

Estima-se que a área coberta por pastagens no Brasil alcance cerca de 170 milhões de hectares, dos quais 135 milhões são de pastagens cultivadas, principalmente gramíneas dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum* (DIAS-FILHO & ANDRADE, 2005). Apesar da incontestável importância dessas gramíneas forrageiras tropicais para a sustentabilidade da pecuária

^IUniversidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande, MS, Brasil.

^{II}Embrapa Gado de Corte, BR 262 km 4, CP 154, 79002-970, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: lchiari@cnpgc.embrapa.br.

*Autor para correspondência.

bovina nacional, há poucas cultivares disponíveis no mercado, as quais cobrem extensas áreas e formam uma espécie de “monocultivo”. Desse modo, problemas como o aparecimento de pragas ou doenças podem colocar em risco todo o sistema de produção, como ocorreu com a síndrome da morte do capim braquiarião (*B. brizantha* cv. ‘Marandu’) na Amazônia Legal, em 2006.

O programa de melhoramento genético de gramíneas forrageiras dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum* da Embrapa Gado de Corte vem trabalhando no desenvolvimento de cultivares forrageiras, visando à redução da vulnerabilidade dos sistemas de produção de gado pela liberação de variedades de *Brachiaria* e *Panicum maximum* que apresentem boa produtividade e alto desempenho animal, minimizando também a necessidade de abertura de novas áreas de cultivo.

Os marcadores moleculares têm sido utilizados extensivamente como ferramenta para conservação de recursos genéticos vegetais e para fornecer informações para o melhoramento das plantas (ROUT & MOHAPATRA, 2006). Dentre essas técnicas, o RAPD (Polimorfismos de DNA amplificados ao acaso) (WILLIAMS et al., 1990), que utiliza um *primer* de sequência arbitrária para amplificar simultaneamente

fragmentos de DNA, tem sido uma das mais utilizadas para estudos de diversidade genética em genomas anônimos (DIAS et al., 2004).

Considerando a importância dessas gramíneas forrageiras tropicais e as poucas informações genético-moleculares disponíveis na literatura, objetivou-se neste trabalho estimar a diversidade genética nas principais cultivares e em acessos e híbridos elite do programa de melhoramento genético da Embrapa Gado de Corte, usando marcadores moleculares do tipo RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados neste trabalho 22 genótipos incluindo cultivares, acessos e híbridos de *Brachiaria* e *P. maximum* pertencentes ao banco de germoplasma e ao programa de melhoramento genético da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS (Tabela 1).

O DNA foi extraído de folhas jovens e frescas pelo método CTAB modificado para espécies de *Brachiaria* e *Panicum* (BONATO et al., 2002). As reações de polimerase em cadeia (PCR) foram feitas em 20 µL contendo 1x tampão de PCR, 3mM MgCl₂, 100mM de cada dNTPs, 0,4mM de *primer*, 30ng de DNA genômico e uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Dez *primers* randômicos foram usados. Foi utilizado um termociclador PTC-100 (MJ Research) programado para 40 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 35°C, 2min a 72°C, com uma desnaturação inicial de 5min a 94°C e uma extensão final de 7min a 72°C.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% contendo 0,5mg mL⁻¹ de brometo de etídio para coloração do DNA. A eletroforese foi realizada com tampão TBE 1x (90mM Tris-HBO₃, 2mM EDTA, pH 8.0) a 100 Volts por três horas. O gel foi fotografado sob luz UV em sistema digital L.Pix Image (Loccus Biotechnology).

O escore dos fragmentos de RAPD foi feito considerando os dados como marcadores binários, presença “1” e ausência “0” do marcador. Cada fragmento foi considerado um alelo de um loco. A similaridade genética foi estimada através do coeficiente de Jaccard. A análise de agrupamento foi feita pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-group Method with Arithmetical Average*) e, como suporte estatístico para os resultados, foi utilizada a análise de *bootstrap* com 10.000 interações. Essas análises foram realizadas pelo programa GENES (CRUZ, 2001), versão 2008.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 10 *primers* de RAPD usados amplificaram bem em todos os genótipos,

Tabela 1 - Lista dos 22 genótipos mostrando o nome da cultivar ou o número de identificação (para acessos e híbridos) e sua respectiva espécie, na Embrapa Gado de Corte.

Nº	Genótipos	Espécie
1	‘Basilisk’	<i>Brachiaria decumbens</i>
2	‘Marandu’	<i>Brachiaria brizantha</i>
3	‘Xaraés’	<i>Brachiaria brizantha</i>
4	‘BRS Piatã’	<i>Brachiaria brizantha</i>
5	B140 (acesso)	<i>Brachiaria brizantha</i>
6	HBCG331 (híbrido)	<i>B. brizantha</i> x <i>B. ruziziensis</i>
7	HBCG336 (híbrido)	<i>B. brizantha</i> x <i>B. ruziziensis</i>
8	‘Llanero’	<i>Brachiaria humidicola</i>
9	‘Tully’	<i>Brachiaria humidicola</i>
10	‘BRS Tupi’	<i>Brachiaria humidicola</i>
11	HH3 (híbrido)	<i>Brachiaria humidicola</i>
12	HH146 (híbrido)	<i>Brachiaria humidicola</i>
13	HH216 (híbrido)	<i>Brachiaria humidicola</i>
14	HH350 (híbrido)	<i>Brachiaria humidicola</i>
15	‘Massai’	<i>Panicum maximum</i>
16	‘Tanzânia’	<i>Panicum maximum</i>
17	‘Mombaça’	<i>Panicum maximum</i> .
18	‘Milênio’	<i>Panicum maximum</i>
19	PM46 (híbrido)	<i>Panicum maximum</i>
20	PM47 (híbrido)	<i>Panicum maximum</i>
21	PM45 (híbrido)	<i>Panicum maximum</i>
22	PM44 (híbrido)	<i>Panicum maximum</i>

independentemente da espécie. Nas espécies do gênero *Brachiaria*, foram amplificados 152 fragmentos de RAPD, enquanto em *P. maximum* foram amplificados 113. As análises foram feitas utilizando os dados de todos os genótipos, gerando um total de 182 fragmentos de DNA amplificados, dos quais apenas quatro (2,2%) foram não-informativos (monomórficos) e 178 foram informativos (polimórficos). Em média, cada *primer* gerou 17,8 fragmentos polimórficos. Os *primers* OPE03, OPAB01 e OP93 foram os que mais se destacaram, pois amplificaram mais de 20 fragmentos de DNA polimórficos cada, enquanto os *primers* OPP14, OPM05 e OPAL03 amplificaram 13, 14 e 14 fragmentos polimórficos, respectivamente (Tabela 2).

AMBIEL et al. (2008) obtiveram uma média de 10,2 fragmentos polimórficos por *primer* de RAPD estudando a variabilidade genética em acessos e cultivares comerciais de quatro espécies de *Brachiaria* (*B. arrecta*, *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*) e duas cultivares de *P. maximum* (Mombaça e Tanzânia).

Pela análise do perfil eletroforético gerado pelo *primer* OP93, foi possível discriminar todas as cultivares estudadas, mostrando a eficiência dessa técnica na detecção de polimorfismos nessas espécies forrageiras (Figura 1). Entre os genótipos de *Brachiaria*, os perfis mais similares foram os da cultivar BRS Tupi de *B. humidicola* e seus híbridos HH3, HH146, HH216, HH350. Entre os genótipos de *P. maximum* analisados, a cultivar Massai foi a que apresentou o perfil mais distinto dos demais. Essa cultivar é um híbrido interespecífico espontâneo entre *P. maximum* e *P. infestum* (EMBRAPA GADO DE CORTE, 2001).

Tabela 2 - Lista dos 10 *primers* utilizados com suas respectivas sequências de bases, número de fragmentos amplificados e número de fragmentos polimórficos obtidos para os 22 genótipos.

Primer	Sequência de bases	Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos
OP81	GGA GCG TAC T	20	20
OP93	GTG CCG CAC T	22	22
OP95	GTG ACC AGA G	19	19
OPA20	GTT GCG ATC C	18	18
OPAB01	CCG TCG GTA G	22	21
OPAL03	CCC ACC CTT G	14	14
OPBA2	TGC TCG GCT C	18	17
OPE03	CCA GAT GCA C	20	20
OPM05	GGG AAC GTG T	16	14
OPP14	CCA GCC GAA C	13	13
		182	178

Entre os genótipos de *Brachiaria* avaliados, a similaridade genética variou de 0,07 a 0,84, denotando uma alta variabilidade genética. Os genótipos mais similares foram os híbridos HH3 e HH146, obtidos do cruzamento entre a cultivar 'BRS Tupi' (apomítica) e a planta H31 (sexual) do germoplasma da Embrapa Gado de Corte. Os genótipos menos similares foram o acesso B140 de *B. brizantha* e o híbrido HH216 de *B. humidicola*.

Para os genótipos de *P. maximum*, a amplitude de variação nos coeficientes de similaridade foi um pouco menor, 0,21 a 0,71. Os genótipos mais similares foram as cultivares 'Mombaça' e 'Tanzânia' e os menos similares foram o híbrido PM46 e a cultivar 'Massai'.

Alta variabilidade genética entre acessos e cultivares destes dois gêneros aqui estudados foi previamente reportada por outros autores. CHIARI et al. (2008) encontraram uma variação de 0,49 a 0,87 entre os coeficientes de similaridade genética obtidos para 14 genótipos de quatro espécies de *Brachiaria*, que incluíram as cultivares 'Marandu', 'BRS Piatã', 'Basilisk' e 'BRS Tupi'. Esse estudo foi realizado usando 396 marcadores RAPD obtidos pela análise de 47 *primers*.

BONATO et al. (2003) utilizaram 79 marcadores RAPD polimórficos para estimar a variabilidade genética em 24 genótipos de *P. maximum*, incluindo as cultivares 'Massai', 'Mombaça' e 'Tanzânia', e obtiveram valores de similaridade que variaram de 0,15 a 0,97.

AMBIEL et al. (2008) usaram 10 *primers* de RAPD, que amplificaram 102 marcadores, para estabelecer o agrupamento entre 40 genótipos de *Brachiaria*, incluindo as cultivares 'Marandu' e 'Xaraés'; e dois genótipos de *P. maximum*, cultivares 'Tanzânia' e 'Mombaça'. Os coeficientes de similaridade genética variaram de 0,24 a 0,83, sendo que 'Tanzânia' e 'Mombaça' foram os genótipos mais similares.

Com relação aos híbridos avaliados neste estudo, aqueles resultantes de cruzamentos interespecíficos, *B. brizantha* x *B. ruziziensis*, eles apresentaram menor coeficiente de similaridade genética (0,69) comparando aos híbridos intraespecíficos de *B. humidicola*, nos quais a similaridade variou de 0,70 a 0,84. Todos os híbridos de *B. humidicola* analisados foram obtidos do mesmo cruzamento entre a cultivar 'BRS Tupi' e a planta sexual H31, logo, são irmãos-completos, diferentemente dos híbridos interespecíficos.

Entre os híbridos intraespecíficos de *P. maximum*, o coeficiente de similaridade genética variou de 0,38 a 0,64, denotando maior variabilidade genética

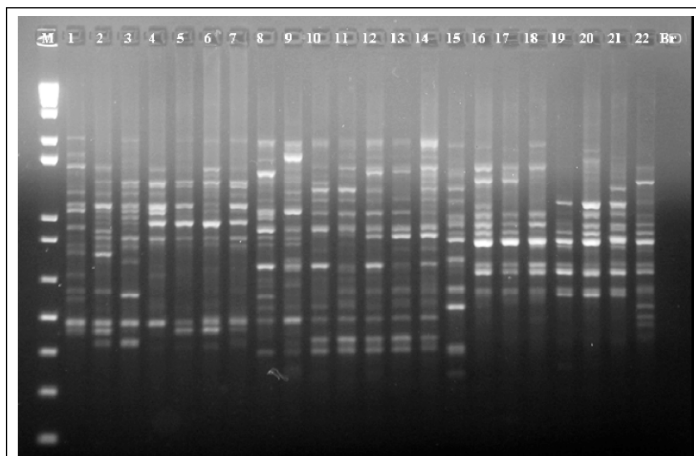


Figura 1 - Perfil de amplificação com o primer OP93 para os 22 genótipos de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum* em gel de agarose 1,5%. M = 1kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen). Colunas: 1 = cultivar 'Basilisk', 2 = cultivar 'Marandu', 3 = cultivar 'Xaraés', 4 = cultivar 'Piatã', 5 = acesso B140, 6 = híbrido HBCG331 (*B. brizantha* x *B. ruziziensis*), 7 = híbrido HBCG336 (*B. brizantha* x *B. ruziziensis*), 8 = cultivar 'Llanero', 9 = cultivar 'Tully', 10 = cultivar 'BRS Tupi'. Colunas 11 a 14 = híbridos de *B. humidicola* (HH3, HH146, HH216 e HH350). Colunas: 15 = cultivar 'Massai', 16 = cultivar 'Tanzânia', 17 = cultivar 'Mombaça', 18 = cultivar 'Milênio'. Colunas 19 a 22 = híbridos de *P. maximum* (PM46, PM47, PM45 e PM44). Br = controle negativo.

que entre os híbridos de *Brachiaria*. Os híbridos mais similares foram o PM45 e PM47, ambos originados do mesmo parental materno, portanto, meio-irmãos; e os mais divergentes foram PM45 e PM44, obtidos de diferentes parentais.

Em outras espécies do gênero *Panicum*, marcadores RAPD também foram utilizados para estudos de variabilidade genética. M'RIBU e HILU (1994) estimaram valores de similaridade que variaram de 0,60 a 1,0, utilizando o coeficiente de Dice. GUNTER et al. (1996) avaliaram 14 populações de *P. virgatum* e as similaridades entre elas, obtidas pelo coeficiente de Dice, variaram de 0,53 a 0,78. Nesses dois trabalhos, a variabilidade genética foi menor que a descrita aqui para *P. maximum*.

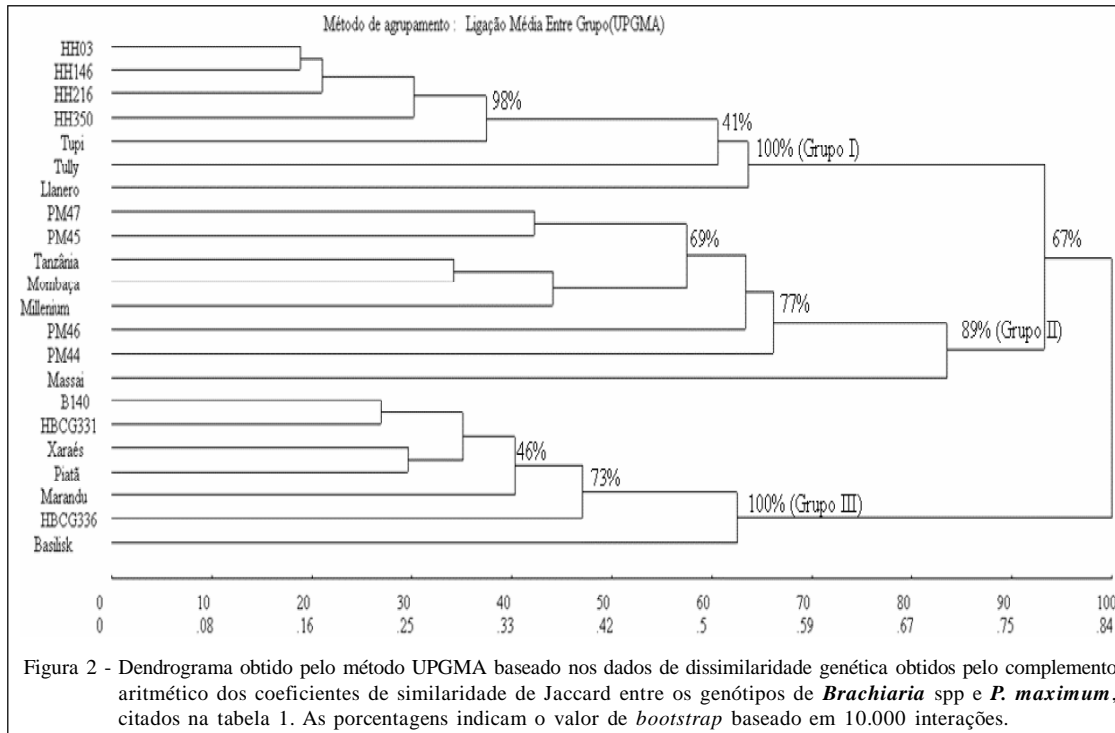
No dendrograma obtido pelo método UPGMA, três grupos podem ser destacados: Grupo I, que compreende todos os genótipos de *B. humidicola*; Grupo II, com todos os genótipos de *P. maximum*; Grupo III, contendo os genótipos de *B. brizantha* mais a cultivar *B. decumbens* cv. 'Basilisk'. A análise de *bootstrap* revelou uma consistência de 100%, 89% e 100%, respectivamente, para esses grupos (Figura 2).

Um subgrupo distinto pode ser encontrado dentro do Grupo I, que compreende a cultivar 'BRS Tupi' e os híbridos HH3, HH146, HH216 e HH350, suportado por um alto valor de consistência (98%).

Este resultado concorda com os dados de parentesco desses genótipos, pois todos os híbridos são irmãos completos originados do cruzamento entre a cultivar 'BRS Tupi' e a planta sexual H31.

Dentro do Grupo II, um subgrupo consistente a um nível de 82% se destaca, contendo os híbridos PM46, PM47 e PM45 e as cultivares 'Tanzânia', 'Mombaça' e 'Milênio'. Se o híbrido PM44 for incluído, esse valor de confiabilidade cai para 77%. Os híbridos PM46 e PM47 são irmãos-completos e têm o mesmo parental materno do PM45 sendo, portanto, meio-irmãos desse último. Já o híbrido PM44, originou-se de parentais diferentes dos demais, justificando este resultado. Como já foi mencionado, a cultivar 'Massai' que é a mais divergente dos demais genótipos é um híbrido interespecífico espontâneo.

No Grupo III, a cultivar 'Basilisk' de *B. decumbens* ficou agrupada com os genótipos de *B. brizantha*. No estudo de AMBIEL et al. (2008), a cultivar 'Basilisk' também foi agrupada com os acessos e cultivares de *B. brizantha*. Esses resultados corroboram as observações de REINVOIZE et al. (1996) de que a cultivar 'Basilisk', amplamente utilizada e comumente identificada como *B. decumbens* é na verdade uma *B. brizantha*. No entanto, um subgrupo contendo todos os genótipos de *B. brizantha* pode ser considerado com um valor de *bootstrap* de 73%, separando a cultivar 'Basilisk'.



CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que: 1) todos os genótipos estudados são molecularmente divergentes e que os marcadores RAPD utilizados podem auxiliar na identificação de cada genótipo; 2) existe diferença no grau de similaridade genética entre e dentro das quatro espécies estudadas, e esses dados podem orientar os melhoristas na tomada de decisão ao longo do programa de melhoramento genético dessas forrageiras; 3) o agrupamento dos genótipos corroborou os dados de pedigree existentes.

AGRADECIMENTOS

À assistente de laboratório Gisele Olivas de Campos Leguizamón, pelo auxílio prestado no desenvolvimento deste trabalho. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida à primeira autora e à Associação para Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais (UNIPASTO), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AMBIEL, A.C. et al. Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD. *Acta Scientiarum Agronomy*, v.30, n.4, p.457-464, 2008. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/5298/5298>>. Acesso em: 26 fev. 2010. doi: 10.4025/actasciagron.v30i4.5298.

ANUALPEC. *Anuário da pecuária brasileira*. São Paulo: IFNP, 2008. 380p.

BONATO, A.L.V. et al. **Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum maximum***. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 79). Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/index.php?pagina=publicacoes/cot/index.html>>. Acesso em: 26 fev. 2010.

BONATO, A.L.V. et al. Similaridade genética entre acessos de *Panicum maximum* Jacq. determinada por marcadores RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro, BA. *Anais...* Porto Seguro: SBMP, 2003. 6p. 1 CD-ROM.

CHIARI, L. et al. **Variabilidade genética em acessos e cultivares de quatro espécies de *Brachiaria* estimada por marcadores RAPD**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2008. 20p. (Embrapa Gado de Corte. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 24).

CRUZ, C.D. **Programa genes**: aplicativos computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. 648p.

DIAS, L.A.S. et al. A priori choice of hybrid parents in plants. *Genetics Molecular Research*, Ribeirão Preto, v.3, n.3, p.356-368, 2004. Disponível em: <http://www.funpecpr.com.br/gmr/year2004/vol3-3/gmr0087_full_text.htm>. Acesso em: 26 fev. 2010.

DIAS-FILHO, M.B.; ANDRADE, C.M.S. Pastagens no ecossistema do Trópico Úmido. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2005, Goiânia, GO. *Anais...* Goiânia: SBZ, 2005. p.95-104.

- EMBRAPA GADO DE CORTE. **Capim-massai (*Panicum maximum* cv. Massai): alternativa para diversificação de pastagens**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2001. 5p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 69). Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/index.php?pagina=publicacoes/cot/index.html>>. Acesso em: 26 fev. 2010.
- GUNTER, L.E. et al. Diversity of populations of switch grass based on RAPD markers. **Crop Science**, v.36, p.1017-1022, 1996.
- M'RIBU, H.K.; HILU, K.W. Detection of interspecific and intraspecific variation in *Panicum millets* through random amplified polymorphic DNA. **Theoretical Applied of Genetics**, v.88, p.412-416, 1994.
- RENVOIZE, S.A. et al. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J.W. et al. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: Embrapa/CIAT, 1996. p.1-15.
- ROUT, G.R.; MOHAPATRA, A. Use of molecular markers in ornamental plants: a critical reappraisal. **European Journal of Horticultural Science**, Stuttgart, v.71, n.2, p.53-68, 2006.
- WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.