

Marcadores moleculares para detecção de variabilidade genética em variedades de palma forrageira

Molecular markers for the detection of genetic variability in cactus forage

Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão^{1*}, Kátia Fernanda Rito²,
Djalma dos Santos Cordeiro³, Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva^{1,5},
Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra¹, Márcia Vanusa da Silva⁴

¹Laboratório de Genômica, Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), Av. General San Martin, 1371, Bongi, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil

³Estação Experimental de Arcoverde, Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), Arcoverde, PE, Brasil

⁴Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil

⁵Bolsista de Pós-doutorado PNPD/CAPES/FINEP

*autor correspondente

✉ adalia.mergulhao@ipa.br

RESUMO: A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) constitui um dos suportes básicos de subsistência da pecuária leiteira, sobretudo em zonas áridas e semiáridas. O cultivo dessa planta é reconhecido dentro de programas de pesquisa para o desenvolvimento da agricultura sustentável no Nordeste. Nessa espécie botânica, a análise da variabilidade genética é de grande importância na conservação e caracterização de germoplasma, para agrupar o material e permitir um manejo e o uso adequado das coleções. Este trabalho teve como objetivo caracterizar geneticamente, por meio de marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) a variabilidade entre cinco variedades de *O. ficus-indica* que se destacam quanto as características agronômicas, visando obter informações que auxiliem futuros programas de melhoramento com essa cultura. Dos 20 *primers* utilizados, cinco *primers* de ISSR e seis de RAPD foram selecionados por apresentarem melhores padrões polimórficos. Os dendogramas formados com base nos dois marcadores utilizados agruparam as variedades de palma em quatro subgrupos. Os resultados revelaram alta similaridade genética entre as variedades avaliadas, porém algumas diferenças foram evidenciadas. A variedade Chili Fruit ficou isolada em um subgrupo; as variedades Copena F1 e Clone IPA 20 foram agrupadas juntas assim como as variedades Copena VI e Redonda. Esses resultados são preliminares e análises posteriores com maior número de *primers* dos marcadores utilizados, poderão ser úteis no estudo da diversidade genética entre as variedades de palmas forrageiras avaliadas nesse estudo. O conhecimento da distribuição da variabilidade genética entre as palmas associado ao estudo de genótipos promissores com base em caracteres morfológicos, permitirá aos melhoristas um ganho genético mais rápido para esta forrageira, além da possibilidade da utilização desses marcadores como descritores moleculares.

PALAVRAS-CHAVE: Diversidade genética, *Opuntia ficus-indica*, melhoramento vegetal, ISSR, RAPD.

ABSTRACT: The cactus forage (*Opuntia ficus-indica*) is one of the basic sub-existence supports in dairy farming, mainly in the arid and semiarid regions. The culture of this plant is acknowledged within research programs for the development of sustainable agriculture in the northeast region of Brazil. The analysis of genetic variability is of great importance in the conservation and characterization of germoplasm in order to group the material and allow for a more adequate management of the collections. This work aims at genetically characterize, by means of ISSR and RAPD molecular markers, the variability in five varieties of *O. ficus-indica*, which stand out for their agronomic characteristics, in order to obtain information which will aid future improvement programs of this culture. Out of the 20 primers used, five ISSR and six RAPD primers were selected because they present better polyphormic patterns. The dendrograms, which were formed based on the two markers used, grouped the cacti varieties into four subgroups. Results revealed high genetic similarity between the varieties assessed; however, some differences were made evident. The Chili Fruit variety was isolated in one subgroup; varieties Copena F1 and Clone IPA 20 were grouped together, as well as varieties Copena VI and Redonda. These results are still preliminary and further analysis with larger amount of primers of the used markers may be useful in the study of the genetic diversity among the varieties of cactus forage assessed in this study. The knowledge of the distribution of the genetic variability among the cacti together with the study of promising genotypes based on morphologic characters, will allow for improvers to have faster genetic gain for this forage, besides the possibility of using these markers as molecular descriptors.

KEYWORDS: Genetic diversity, *Opuntia ficus-indica*, plant improvement, ISSR, RAPD.

Introdução

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) é um vegetal xerófilo muito utilizado no nordeste brasileiro, principalmente como alimento para bovinos. Além disso, constitui um dos suportes básicos de subsistência da pecuária leiteira, sobretudo em zonas áridas e semiáridas. É considerado um alimento energético suculento de grande importância para os rebanhos, notadamente nos períodos de secas prolongadas, pois, além de fornecer um alimento verde, supre grande parte das necessidades de água dos animais na época de escassez, pois contém cerca de 90% de água (SANTOS et al., 1997). Além disto, é rica em mucilagem, apresenta elevado coeficiente de digestibilidade da matéria seca e alta produtividade (COSTA; MENDONÇA; CALAZANS, 1973).

O cultivo dessa planta é reconhecido dentro de programas de pesquisa para o desenvolvimento da agricultura sustentável no Nordeste. A análise da variabilidade genética é de grande importância na conservação e caracterização de germoplasma, para agrupar o material e permitir um manejo e uso mais adequado das coleções. A adoção de novas tecnologias na área da biologia molecular, como o uso de marcadores moleculares para a determinação de polimorfismo genético são ferramentas valiosas em programas de melhoramento vegetal. Diversas técnicas de biologia molecular podem ser atualmente utilizadas em estudos de genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996) ou, como ferramentas valiosas, em programas de melhoramento vegetal (PATERSON, 1996). Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares, os quais estão disponíveis para a detecção de variabilidade genética ao nível de sequência de DNA, ou seja, para determinação de polimorfismo genético. Além disso, podem auxiliar na avaliação da redundância e deficiências das coleções de germoplasma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Existe a dificuldade para identificação de uma cultivar, e atualmente é possível a marcação dos diferentes alelos com um marcador molecular, como o *Random Amplified Polymorphic DNA*-RAPD e o *Inter Simple Sequence Repeat*-ISSR, que têm sido usados com sucesso em vários trabalhos (YOUNG et al., 1998; WOLFE, 2005; SOUZA et al., 2008).

O Programa de Melhoramento de palma forrageira do Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA, Pernambuco, Brasil vem desenvolvendo pesquisas com esta cultura desde 1958 (SANTOS et al., 1997), com o intuito de atender às necessidades alimentares dos rebanhos, nos períodos de secas prolongadas. Atualmente, se faz necessária a utilização da biotecnologia, como ferramenta para o programa de melhoramento da palma do IPA, em andamento, a fim de acelerar os resultados. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar geneticamente, por meio de marcadores moleculares do tipo ISSR, em comparação com o do tipo RAPD a variabilidade entre cinco variedades de *O. ficus-indica*, visando obter informações que auxiliem futuros programas de melhoramento dessa cultura.

Material e Métodos

Foi extraído o DNA de cinco variedades (*Opuntia ficus-indica*) de palma forrageira: Chili Fruit, Copena F1, Copena VI, Clone IPA 20 e Redonda, que se destacam quanto a características agrônomicas no Programa de Melhoramento do IPA. Os cladódios das variedades de palma foram submetidos a um processo de assepsia pela imersão em álcool etílico 70% (v/v), durante 1 a 3 minutos. Em seguida, foram tratados em solução de hipoclorito de sódio 2%, por 10 minutos, e, finalmente, lavados por três vezes em água destilada estéril. A extração do DNA genômico foi realizada usando-se o kit de extração de DNA de tecido e sangue da QIAGEN, de acordo com as recomendações do fabricante. Depois da extração, a qualidade e a quantidade do DNA foram visualizadas em gel de agarose a 0,8%, corado com Sybr Gold (Invitrogen), usando-se o marcador de massa molecular (Invitrogen) e visualizado em transluminador UV.

A reação de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase-PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 5 pmol de cada *primer*, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.2 mM de cada dNTP, 1 unidade de taq polymerase (Invitrogen) e 2 µL do DNA molde (20 - 40 ng). Dos 20 *primers* utilizados, cinco *primers* de ISSR: UBC 01, UBC 02, UBC 857, UBC 808 e UBC 810 (Tabela 1) e seis de RAPD: OP 06, OPG 07, OPG 10, OPC 11, OPS 03 e OPG 19 (Tabela 2) foram selecionados por serem mais polimórficos. O ciclo de amplificação testado foi realizado em um termociclador MJ *Research* PCT-100 (Perkin Elmer) com as seguintes temperaturas para o ISSR: 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturação do DNA); 45 segundos a 52 °C (pareamento do *primer* ao DNA molde) e 2 minutos a 72 °C (extensão dos *primers*) seguidos de 5 minutos a 72 °C (extensão final dos fragmentos). Para o

Tabela 1. Sequência dos *primers* de ISSR utilizados na amplificação do DNA das palmas.

<i>Primers</i> ISSR	Sequência (5'-3')
UBC 01	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC 02	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT

Tabela 2. Sequência dos *primers* de RAPD utilizados na amplificação do DNA das palmas.

<i>Primers</i> RAPD	Sequência (5'-3')
OP 06	TCG CCC CAT T
OPG 07	GAA CCT GCG G
OPG 10	AGG GCC GTC T
OPC 11	AAA GCT GCG G
OPS 03	CAG AGG TCC C
OPG 19	GTC AGG GGC A

RAPD, utilizaram-se as seguintes temperaturas: 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturação do DNA); 1 minuto a 40 °C (pareamento do *primer* ao DNA molde) e 1 minuto a 72 °C (extensão dos *primers*), seguidos de 5 minutos a 72 °C (extensão final dos fragmentos). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (tris, ácido bórico e EDTA) em corrente elétrica de 100 V, por aproximadamente 2 horas, corados em Sybr Gold e visualizados em um transluminador UV. O polimorfismo foi analisado como presença (1) e ausência (0) em função das bandas detectadas no gel e os programas FreeTree v.0.9.1.50 e TreeView v.1.6.6 foram utilizados para a construção dos dendogramas. A matriz de similaridade genética foi calculada utilizando-se o índice de similaridade de Jaccard. O dendograma foi construído usando-se o algoritmo *Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean-UPGMA* considerando-se a matriz de similaridade (análise de agrupamento).

Resultados e Discussão

Os *primers* utilizados na análise com os marcadores ISSR e RAPD apresentaram diferenças quanto à qualidade dos produtos amplificados e reprodutibilidade nas reações. Utilizado com sucesso em vários trabalhos, o RAPD e ISSR possibilitam a marcação de diferentes alelos com um marcador molecular (ADAM-BLONDON et al., 1994; YOUNG et al., 1998).

Foram selecionados cinco *primers* de ISSR e seis *primers* de RAPD por serem os mais polimórficos (Tabelas 1 e 2). As amplificações foram testadas utilizando-se diferentes amostras de DNA isoladas, independentemente de todas as variedades de palma amplificada em reações independentes. De acordo com Colombo et al. (1998), 7 a 30 *primers*, que produzem uma média de 50 a 200 fragmentos, são suficientes para estimar relações genéticas dentro e entre as espécies. Segundo Alves et al. (2009), verificou-se que, em clones de palma o *primer* UBC 857, gerou-se o menor número de fragmentos amplificados. Resultado semelhante também foi observado no presente trabalho. Entre os *primers* de ISSR utilizados, o UBC 808 (Figura 1) gerou maior número de *amplicons* com maior polimorfismo, produzindo padrões distintos entre os acessos de palma estudados. O menor número de *amplicons* foi gerado pelos *primers* UBC 01 e UBC 857 (Figura 2). Foram produzidos 110 *amplicons* polimórficos, média de 10 por *primer*, e os tamanhos desses *amplicons* variaram entre 200 a 3000 pares de bases. O número e o tamanho de fragmentos amplificados normalmente são determinados pela espécie, pelo *primer* utilizado e pelas condições de amplificações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Segundo Alves et al. (2009), foi verificado em palma que os *primers* ISSR que geraram a maior parte do polimorfismo continham repetições de GA e AC. O que vem justificar maior polimorfismo, nos acessos de palma, utilizando-se o ISSR UBC 808 no presente trabalho. De acordo com Wang et al. (1998), *primers* com as repetições AG, GA, CT, AC, CA geralmente são mais

polimórficos que os *primers* com di, tri ou tetra nucleotídeos repetidos.

Com relação aos *primers* de RAPD utilizados, OP 06 (Figura 3) apresentou maior número de *amplicons* polimórficos quando comparado com os demais *primers* (OPG 07, OPG



Figura 1. Padrão de amplificação obtido pelo ISSR-PCR, utilizando-se os *primers* UBC 808 e UBC 810 em gel de agarose (1,5%). M - Marcador de massa molecular (1 kb ladder); A - Chili Fruit; B - Copena F1; C - Copena VI; D - Clone IPA-20; E - Redonda.

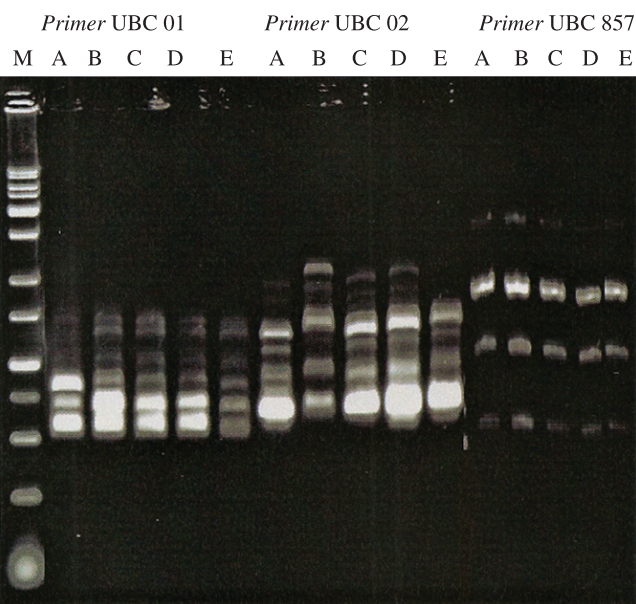


Figura 2. Padrão de amplificação obtido pelo ISSR-PCR, utilizando-se os *primers* UBC 01, UBC 02 e UBC 857 em gel de agarose (1,5%). M - Marcador de massa molecular (1 kb ladder); A - Chili Fruit; B - Copena F1; C - Copena VI; D - Clone IPA-20; E - Redonda.

19, OPG 10, OPC 11 e OPS 03) (Figuras 3 e 4). Arnholdt-Schmitt et al. (2001) verificaram em palma forrageira diferenças distintas nos padrões de RAPD em oito clones testados, das bandas detectadas; 75 foram polimórficas, o que permitiu a identificação de uma única cultivar. Wang et al. (1998) compararam os dados morfológicos e fisiológicos através dos

marcadores RAPD em acessos do gênero *Opuntia*. Os autores observaram que $\frac{3}{4}$ dos fragmentos foram polimórficos nos oito clones testados, além disso, os oito acessos podem ser distinguidos só pelo seu bandeamento de DNA. Isso demonstra a utilidade da análise molecular para identificar cultivares no gênero *Opuntia*. Na África do Sul, estudos preliminares desenvolvidos por Potgieter e Carstens (1996), empregando 6 *primers* de RAPD, produziram perfis de bandas específicas para 18 acessos de palmas.

Os dendrogramas, formados com base nos dois marcadores utilizados, agruparam as variedades de palma em quatro subgrupos (Figuras 5 e 6). Os resultados revelaram alta similaridade genética entre as variedades avaliadas, porém algumas diferenças foram evidenciadas. A variedade Chili Fruit ficou isolada em um subgrupo; as variedades Copena F1 e Clone IPA 20 foram agrupadas juntas, assim como as variedades Copena VI e Redonda. As variedades Chili Fruit, Copena F1 e Copena VI pertencem à coleção do IPA e foram originalmente introduzidas. A variedade Clone IPA 20 foi desenvolvida pelo Programa de Melhoramento do IPA, a partir da variedade Gigante. Com relação à variedade Redonda, é um material genético tradicional e vem sendo utilizado em Programas de Melhoramento, juntamente com a variedade Gigante. Esses resultados são preliminares e análises posteriores, com maior número de *primers* dos marcadores utilizados, poderão ser úteis no estudo da diversidade genética entre as variedades de palmas forrageiras avaliadas nesse estudo e utilizadas no programa de melhoramento do IPA. A identificação de padrões de DNA representa uma ferramenta importante para a caracterização

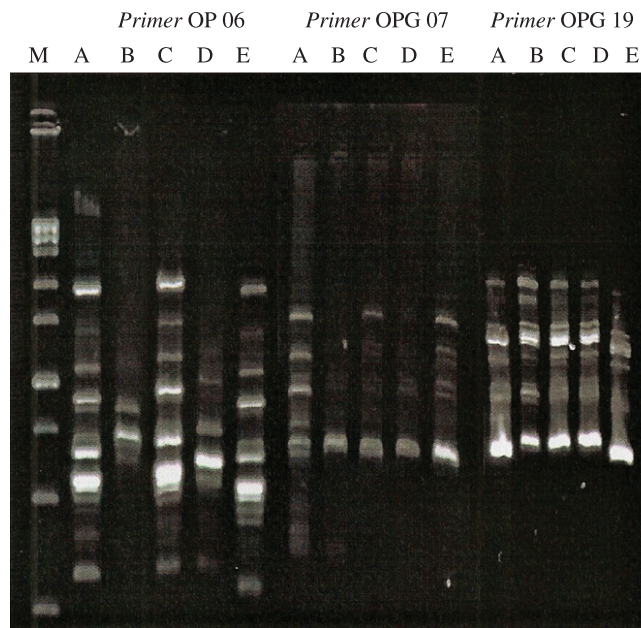


Figura 3. Padrão de amplificação obtido pelo RAPD-PCR, utilizando-se os *primers* OP 06, OPG 07 e OPG 19 em gel de agarose (1,5%). M - Marcador de massa molecular (1 kb ladder); A - Chili Fruit; B - Copena F1; C - Copena VI; D - Clone IPA-20; E - Redonda.

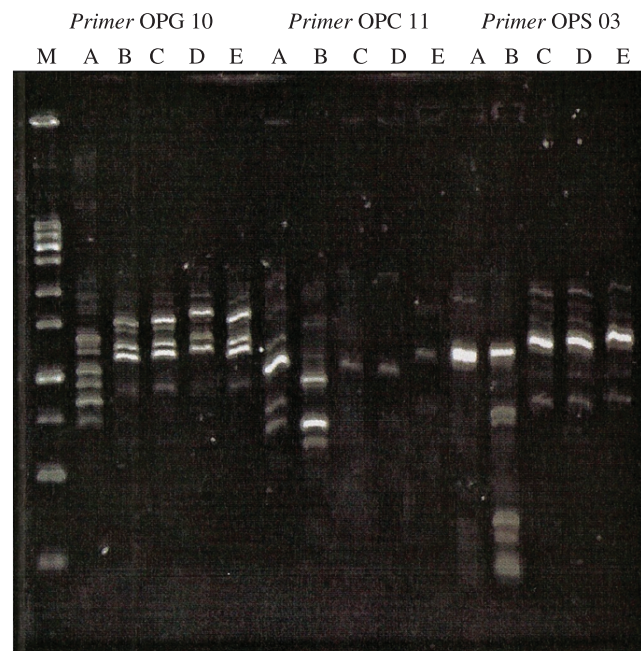


Figura 4. Padrão de amplificação obtido pelo RAPD-PCR, utilizando-se os *primers* OPG 10, OPC 11 e OPS 03 em gel de agarose (1,5%). M - Marcador de massa molecular (1 kb ladder); A - Chili Fruit; B - Copena F1; C - Copena VI; D - Clone IPA-20; E - Redonda.

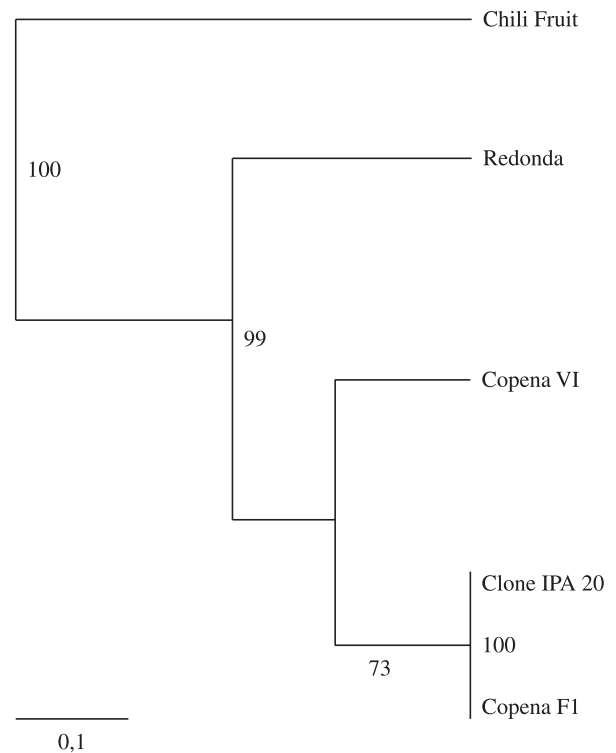


Figura 5. Dendrograma obtido a partir da análise de ISSR, utilizando-se o índice de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento de ligação por média (UPGMA), mostrando a divergência genética entre as cinco variedades de palma forrageira.

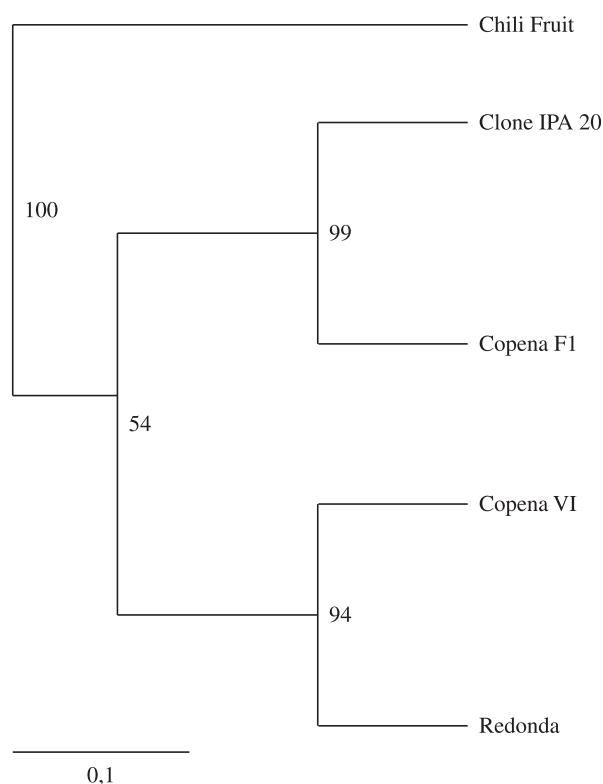


Figura 6. Dendrograma obtido a partir da análise de RAPD, utilizando-se o índice de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento de ligação por média (UPGMA), mostrando a divergência genética entre as cinco variedades de palma forrageira.

germoplasma e a determinação da identidade de variedades em melhoramento de plantas (REDDY; SARLA; SIDDIQ et al., 2002). O conhecimento da distribuição da variabilidade genética entre as variedades de palmas, associado ao estudo de genótipos promissores com base em caracteres morfológicos, permitirá aos melhoristas um ganho genético mais rápido para esta forrageira, além da possibilidade da utilização desses marcadores como descritores moleculares.

Conclusões

Os marcadores RAPD e ISSR utilizados permitem estudar a variabilidade genética entre as variedades de palmas forrageiras, apesar da baixa divergência genética detectada entre elas. Sugere-se utilização de maior número de *primers*, o que permitiria inferir, com maior precisão, a respeito da similaridade genética entre estes genótipos avaliados nesse estudo. Isto permitirá aos melhoristas a possibilidade de escolha de genitores, bem como a utilização desses marcadores como descritores moleculares.

Agradecimentos

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA, pela estrutura física e pelo suporte financeiro concedido.

Referências

- ADAM-BLONDON, A. et al. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to *are*, a simple dominant gene conferring resistance to *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of anthracnose in french bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 865-870, 1994. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01253998>
- ALVES, C. M. A. et al. Genetic diversity in cactus clones using ISSR markers. **Acta Horticulturae**, n. 811, 2009. Proceeding of the Sixth International Congress on Cactus Pear and Cochineal.
- ARNHOLD-SCHMITT, B. et al. Genome characterization of *Opuntia ficus-indica*: A simple and efficient micromethod. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, p. 57-65, 2001.
- COLOMBO, I. et al. cDNA cloning and *Escherichia coli* expression of UK114 tumor antigen. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1442, p. 49-59, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00120-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00120-1)
- COSTA, B. M. C.; MENDONÇA, C. A. G.; CALAZANS, J. A. M. **Forrageiras arbóreas e suculentas para a formação de pastagens**. Cruz das Almas: IPEAL, 1973. 24 p. (IPEAL, Circular, n. 34).
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220 p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- PATERSON, A. H. DNA Marker-assisted crop improvement. In: PATERSON, A.H.; AUSTIN: R. G. (Eds). **Biotechnology intelligence unit: genome mapping in plants**. Austin: Landes Bioscience Publishing, 1996. cap. 7, p. 71-83.
- POTGIETER, J. P.; CARSTENS, K. The cactus pear (*Opuntia* spp.): a matter of identity. In: INTERNATIONAL CACTUS PEAR CONGRESS, 4., 1996, Midrand, South Africa. **Proceeding...** Midrand, 1996.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020691618797>
- SANTOS, D. C. et al. **A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cochonillifera* Salm Dyck) em Pernambuco: cultivo e utilização**. Recife: IPA, 1997. 23 p. (IPA. Documentos, n. 25).
- SOUZA, G. A. S. et al. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2008000700008>
- WANG, X. et al. Comparison of RAPD marker patterns to morphological and physiological data in the classification of *Opuntia* accessions. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, v. 3, p. 3-14, 1998.
- WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods Enzimology**, v. 395, p. 134-144, 2005. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95009-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95009-X)
- YOUNG, R. A. et al. Marker-assisted dissection of oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, G2333. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, n. 1, p. 87-94, 1998. <http://dx.doi.org/10.1007/s001220050713>