

CIRCULAR TÉCNICA

n. 391 - novembro 2023

ISSN 0103-4413

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Departamento de Informação Tecnológica
Av. José Cândido da Silveira, 1647 - União - 31170-495
Belo Horizonte - MG - www.epamig.br - Tel. (31) 3489-5000



AGRICULTURA,
PECUÁRIA E
ABASTECIMENTO



MINAS
GERAIS

GOVERNO
DIFERENTE.
ESTADO
EFICIENTE.

Uso de marcadores moleculares para a detecção de variabilidade genética em variedades de palma forrageira¹

Luciana Cardoso Nogueira Londe²

Débora Ferreira de Souza³

Joana D'Ark Nunes da Silva Lima⁴

Izabela Cristina Pires Gomes⁵

Emerson Brito Ribeiro⁶

Demerson Arruda Sanglard⁷

Mickaelly Jordanya Guimarães Silva⁸

Joseane Faria da Silva Souza⁹

INTRODUÇÃO

As regiões áridas e semiáridas são caracterizadas por longos períodos de estiagem, com estação seca bem definida ao longo dos anos. Em razão destas eventualidades, a produção de forragem por meio de culturas tradicionalmente perenes fica comprometida diante das condições climáticas atuais. Neste sentido, a palma forrageira (*Opuntia* spp. e *Nopalea* sp.) desempenha papel preponderante mediante cenário sazonal de produção de forragem para os rebanhos bovinos, sobretudo, em regiões como o Norte de Minas Gerais, onde a água é o fator limitante na atividade agropecuária.

Os Programas de Melhoramento Genético da palma forrageira deparam-se com algumas dificulda-

des intrínsecas da planta, dentre as quais se destacam a apomixia e a longa fase juvenil das sementes (Mondragón Jacobo, 2002). Considerando o longo tempo para obtenção de mudas, tem-se destacado a opção da multiplicação em cultivo in vitro. A possibilidade de obter mudas em condições controladas e reprodutíveis torna a micropropagação a melhor alternativa para conseguir material vegetal com alta capacidade produtiva e qualidade fitossanitária garantida (Scheidt, 2008).

O processo de seleção em Programas de Melhoramento ocorre por meio do conhecimento da divergência genética existente entre os indivíduos. A quantificação da divergência pode ser feita por meio dos marcadores moleculares (Vieira *et al.*, 2005).

¹Circular técnica produzida pela EPAMIG Norte - CEGR, (38) 3834-1760, cegr@epamig.br.

²Bióloga, D.Sc., Pesq. EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, luciana@epamig.br.

³Graduanda Agronomia UNIMONTES, Campus Janaúba, Bolsista PIBIC FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Janaúba, MG, fdesouza@gmail.com.

⁴Graduanda Agronomia UNIMONTES, Campus Janaúba, Bolsista CNPq/EPAMIG Norte - CEGR, Janaúba, MG, joanadark93_@hotmail.com.

⁵Engenheira-agrônoma, M.Sc., Bolsista BDCT&I Nível III FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, belapgomes@yahoo.com.br.

⁶Técnico Química EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, emersondireito1@hotmail.com.

⁷Engenheiro-agrônomo, D.Sc., Prof. Associado UFMG - ICA, Montes Claros, MG, demerson.ufmg@gmail.com.

⁸Engenheira-agrônoma, Bolsista BDCT&I Nível IV FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, mickaellyagronomia@gmail.com.

⁹Bióloga, Bolsista BDCT&I Nível IV FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, joseanefariasilva@yahoo.com.br.

Esta Circular Técnica tem como objetivo estimar a variabilidade genética de 21 clones de palma forrageira e caracterizá-las entre clones distintos, em função das características moleculares obtidas via marcadores de DNA.

CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido nas instalações da EPAMIG Norte - Campo Experimental do Gorutuba (CEGR), Nova Porteirinha, MG (Fig. 1).

Figura 1 - Banco Ativo de Germoplasma (BAG) na EPAMIG Norte - Campo Experimental do Gorutuba, Nova Porteirinha, MG



Débora Ferreira de Souza

O DNA da palma forrageira foi extraído de cladódios jovens, coletados na EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG (Quadro 1). Os cladódios das variedades de palma forrageira foram submetidos a um processo de assepsia, imersos em álcool 70%, de 1 a 3 minutos. Em seguida, foram tratados com uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 2%, durante 10 minutos, e finalmente lavado por três vezes em água ultrapura.

Utilizou-se o método de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) de acordo com a metodologia de Doyle e Doyle (1990). Para verificação da qualidade do DNA foi utilizado um gel de agarose 0,8% corado em solução de brometo de etídeo a 2 mg/mL e visualizado em transiluminador ultravioleta (UV). A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm. A partir de então foi realizada a diluição, padronizando todas as amostras a 10 ng de DNA/ μ L.

As amostras foram submetidas às reações de amplificação compostas das seguintes concentrações finais: cloreto de potássio (KCl) 50 mM; Tris (hidroximetil)-aminometano – Tris hydrochloride (Tris-HCl) 10 mM (pH 8,3); cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 2,5 mM; 2,5 mM de nucleosídeo trifosfato – dinucleotídeo triphosphates (dNTPs); 0,4 mM do primer; 25 ng de DNA/ μ L genômico; 1,0 unidade de Taq DNA poli-

Quadro 1 - Material genético proveniente do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) instalado no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da EPAMIG Norte - Campo Experimental do Gorutuba, Nova Porteirinha, MG

Ordem	Genótipo	Nome científico
1	IPA 100001	<i>Opuntia ficus-indica</i>
2	IPA 100002	<i>Opuntia spp.</i>
3	IPA 100003	<i>Nopalea cochenillifera</i>
4	IPA 100004	<i>Opuntia ficus-indica</i>
5	IPA 100407	<i>Opuntia ficus-indica</i>
6	IPA 100408	<i>Opuntia ficus-indica</i>
7	IPA 100412	<i>Opuntia ficus-indica</i>
8	IPA 100413	<i>Opuntia ficus-indica</i>
9	IPA 100414	<i>Opuntia ficus-indica</i>
10	IPA 200001	<i>Nopalea cochenillifera</i>
11	IPA 200002	<i>Opuntia ficus-indica</i>
12	IPA 200008	<i>Opuntia atropes</i> Rose
13	IPA 200016	<i>Opuntia stricta</i> Haw
14	IPA 200021	<i>Nopalea cochenillifera</i>
15	IPA 200149	<i>Opuntia larrevi</i> F.A.C. Weber
16	IPA 200173	<i>Opuntia ficus-indica</i>
17	IPA 200174	<i>Opuntia undulata</i> Griffiths
18	IPA 200175	<i>Opuntia ficus-indica</i>
19	IPA 200177	<i>Opuntia ficus-indica</i>
20	IPA 200183	<i>Opuntia ficus-indica</i>
21	IPA 200209	<i>Opuntia ficus-indica</i>

Fonte: Elaboração da autora Débora Ferreira de Souza.

Nota: 21 clones, 2 gêneros e 7 espécies.

merase (Sinapse) e água ultrapura para completar o volume final. As amplificações foram efetuadas em termociclador Techne, modelo TC-412, empregando-se um programa sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos; seguido de 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, temperatura de anelamento de 50 °C durante 30 segundos para cada primer e extensão a 72 °C por 90 segundos; ao final desses, um ciclo final de extensão de 72 °C por 4 minutos, seguido de um ciclo a 4 °C até a retirada das amostras do termociclador.

Os produtos resultantes das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% e em tampão Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 1 vez por uma hora e corados em solução de brometo de etídeo a 0,05 mg/mL por um período de 15 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz UV e fotografados em sistema digital UVP® Life Science Software.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados para detecção de dissimilaridade genética em genótipos dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea* (Lyra *et al.*, 2015). É importante para esses estudos, principalmente por considerarem na estimativa de dissimilaridade genética, apenas a constituição genotípica e não a fenotípica, passível de influência do ambiente. Govindaraj, Vetriventhan e Srinivasan (2015) afirmam que, com o uso de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética, há garantia de rapidez e de qualidade dos dados gerados, sendo possível caracterizar um maior número de germoplasma com tempo e recursos limitados.

Com base na diversidade genética de genótipos de palma forrageira estimada por marcadores poliformismo de DNA de fragmentos aleatórios e amplificados – random rapid amplified polymorphic DNA (RAPD), pode-se verificar a formação de três populações distintas (Gráfico 1).

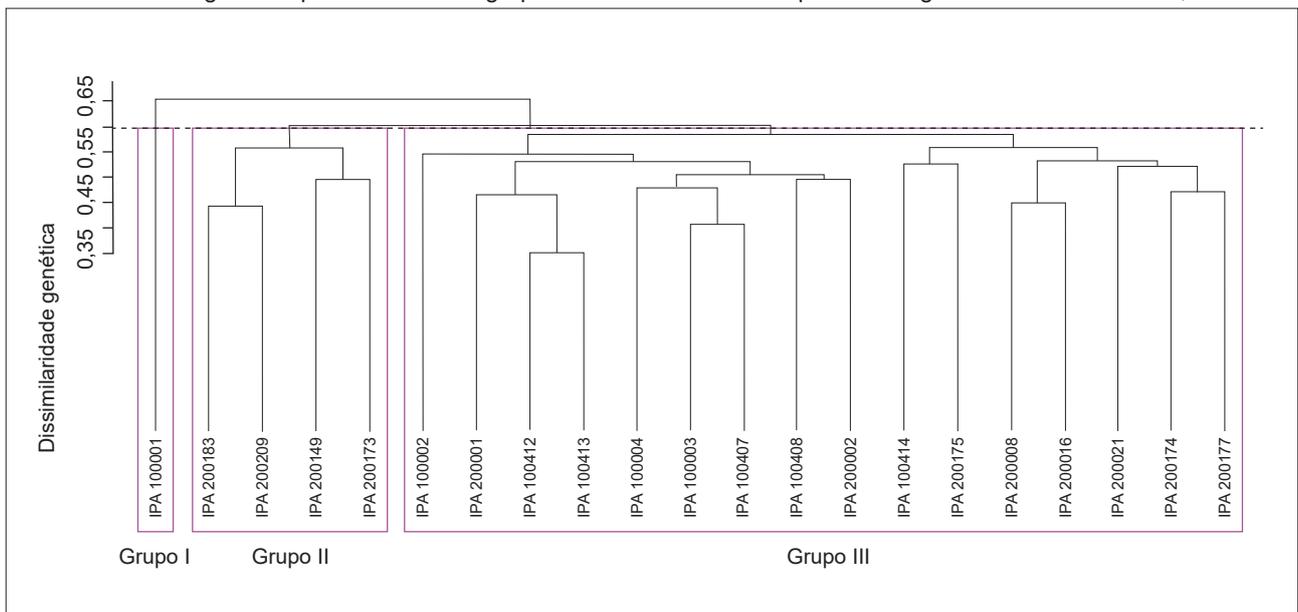
O grupo I é composto pelo genótipo *Opuntia ficus-indica* (IPA 100001), sendo esse o que possui maior dissimilaridade permanecendo isolado. Já nos grupos II e III é possível verificar maior similaridade.

No grupo II nos clones *Opuntia ficus-indica* (IPA 200183, IPA 200209, IPA 200173) e *Opuntia larreyi* F. A. C. Weber (IPA 200149), é possível detectar similaridade genética entre os clones de mesmo gênero, como IPA 200183 e IPA 200209, e clones com mesmo gênero e espécies diferentes, presentes nos clones IPA 200149 e IPA 200173.

O grupo III composto pelos genótipos *Opuntia spp.* (IPA 100002), *Nopalea cochenillifera* (IPA 200001, IPA 100003, IPA 200021), *Opuntia ficus-indica* (IPA 100412, IPA 100413, IPA 100004, IPA 100407, IPA100408, IPA 200002, IPA 100414, IPA 200175, IPA 200177), *Opuntia atropes* Rose (IPA 200008), *Opuntia stricta* Haw (IPA 200016) e *Opuntia undulata* Griffiths (IPA200174), que possuem maior variabilidade, observando clones de mesmo gênero como IPA 100412, IPA 100413, IPA 100408, IPA 100002, IPA 100414, IPA 200175, como também clones do mesmo gênero e espécies diferentes IPA 100002, IPA 200008, IPA 200016 e IPA 200174. Assim como, os genótipos de IPA200001, IPA 100003 e IPA 200021 que são de gênero distinto aos anteriores (*Nopalea cochenillifera*). Também é possível verificar, dissimilaridade entre os genótipos do mesmo gênero como IPA 100001, IPA 100002 e IPA 100004, exceto IPA 100002 que é de espécie diferente.

Portanto, é notável a capacidade de usar marcadores RAPD para detectar a variabilidade genética entre os genótipos avaliados nesse estudo. De acordo com a análise molecular de Lyra *et al.* (2015), observou-se que o fenótipo não é uma função linear do genótipo, a grande variação encontrada em espécies do gênero *Opuntia* deve-se principalmente a sua alta capacidade de hibridização interespecífica e intraespecífica, poliploidia, reprodução sexuada e alta taxa apomítica.

Gráfico 1 - Dendrograma representativo do agrupamento de 21 clones de palma forrageira – Nova Porteirinha, MG



Fonte: Elaboração da autora Débora Ferreira de Souza.

Nota: Resultado obtido pelo método de agrupamento hierárquico aglomerativo simples – unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação molecular por meio do marcador de DNA revelou uma variabilidade genética significativa entre os genótipos de palma forrageira.

REFERÊNCIAS

DOYLE J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1990.

GOVINDARAJ, M.; VETRIVENTHAN, M.; SRINIVASAN, M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. **Genetics Research International**, v.2, Mar. 2015. Article ID 431487.

LYRA, M.C.C.P. de *et al.* Molecular studies of forage prickly-pear cactus from the semiarid of Pernambuco State-Brazil. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v.3, n.2, p.1-5, Mar./Apr. 2015. Disponível em: https://jabonline.in/abstract.php?article_id=62&sts=2. Acesso em: 13 nov. 2023.

MONDRAGÓN JACOBO, C. Caracterización genética de una colección de nopal (*Opuntia* spp.) de la región centro de México. **Agricultura Técnica en México**, v.28, n.1, p.3-14, enero/jun. 2002. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/608/60828101.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2023.

SCHEIDT, G.N. **Desenvolvimento e validação de um biorreator do tipo imersão por bolhas para micropropagação de plantas**. 2008. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008. 89p. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/18771>. Acesso em: 20 jul. 2023.

VIEIRA, E.A. *et al.* Comparação entre medidas de distância genealógica, morfológica e molecular em aveia em experimentos com e sem a aplicação de fungicida. **Bragantia**, Campinas, v.64, n.1, p.51-60, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/brag/a/StTzsZ6ZYp8Csy9QK5DCnnh/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 13 nov. 2023.

Os nomes comerciais apresentados nesta Circular Técnica são citados apenas para conveniência do leitor, não havendo por parte da EPAMIG preferência por este ou aquele produto comercial.

Disponível em: <https://www.livrariaepamig.com.br/difusao-de-tecnologia/circular-tecnica/>
Departamento de Informação Tecnológica