

# VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE TRIGO COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES RAPD

Walter O. Ribeiro Júnior<sup>1,2</sup>, Fábio G. Faleiro<sup>2\*</sup>, Graciele Bellon<sup>3</sup>, Ana M. Costa<sup>2</sup>,  
 Maria Cristina R. Cordeiro<sup>2</sup>, Júlio C. Albrecht<sup>2</sup>, Ricardo L. de Castro<sup>4</sup>,  
 Sandra P. Brammer<sup>1</sup>, Márcio Soesilva<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> Embrapa Trigo, Caixa Postal 451, Passo Fundo, RS, CEP 99000-1-970.\*

<sup>2</sup> Embrapa Cerrados, Caixa Postal 08223, Planaltina, DF, CEP 73310-970.

e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

<sup>3</sup> Estagiária da Embrapa Cerrados e estudante de pós-graduação na Universidade de Brasília, Brasília, DF.

<sup>4</sup> FEPAGRO, Vacaria, RS

Apoio financeiro: CNPq.

## INTRODUÇÃO

O cultivo do trigo no Brasil tem ocorrido tradicionalmente em áreas maiores, no Sul do país. No Brasil Central, entretanto, tem se cultivado nos períodos de inverno e safrinha, embora a área seja limitada. Como a base genética do melhoramento de trigo no país é estreita, tem se incluído nos blocos de cruzamento para a região Centro-Oeste, materiais de origem diversa, baseado principalmente em características morfológicas, agrônomicas e genealógicas, critérios estes que não garantem maior variabilidade genética e nesse sentido, a utilização de marcadores moleculares como critério adicional de seleção poderia aumentar esta variabilidade.

A introdução de espécies afins nos cruzamentos aumentaria a variabilidade genética no programa de melhoramento, mas diminuiriam a performance agrônômica dos sintéticos obtidos. Sendo assim, antes de introduzir espécies afins, seria conveniente, uma caracterização genética inicial dos genótipos que comumente compõem o bloco de cruzamento.

Além do aumento da variabilidade genética, este polimorfismo obtido pelos marcadores moleculares, auxiliaria na recuperação das características do parental recorrente em retrocruzamentos ou na seleção assistida para características de interesse econômico.

Neste trabalho, objetivou-se caracterizar geneticamente linhas puras de trigo comumente utilizadas no bloco de cruzamento para a região Centro Oeste, com base em marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 28 acessos de trigo em avaliação pelo programa de melhoramento genético realizado na Embrapa Cerrados e Embrapa Trigo (Tabela 1). Um acesso de cevada foi utilizado como out group. Folhas em estágio intermediário de maturação de cada material genético foram coletadas e o DNA genômico foi extraído a partir do método CTAB, com modificações [1].

Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 100 µM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um "primer" (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Foram utilizados os seguintes primers decâmeros: Utilizou-se 12 primers decâmeros OPD-04, OPD-08, OPD-16, OPE-18, OPG-19, OPG-17, OPH-12 e OPH-17.

As ampliações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Após os 40 ciclos, será feita uma etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C, e finalmente, a temperatura será reduzida para 4 °C. Após a amplificação, adicionou-se a cada amostra, 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em

tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes acessos de trigo, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando-se o Programa Genes [2]. A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se o método do UPGMA (Unweighted pair-group arithmetic average) como critério de agrupamento, e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS [3] e Statistica [4].

Tabela 1. Acessos de trigo comumente utilizadas no bloco de cruzamento para a região Centro Oeste avaliados no presente trabalho.

Nº	Acesso	Nº	Acesso
1	Buck Brasil	15	PF 973047
2	BR 18	16	Taurum
3	IPF 82280	17	BR33
4	OCEPar 14	18	Aliança
5	PF 990606	19	BH 1146
6	PF 999270A	20	OMB.21
7	Onix	21	Babax # 2
8	BRS 209	22	IPF 77777
9	CD104	23	IAPAR 17
10	IPR 85	24	CD 108
11	BRS 207	25	CD111
12	Embrapa 22	26	PF01 3355
13	Embrapa 42	27	IAC SM RG
14	PF 813	28	Prointa Federal

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os oito iniciadores decâmeros foram multialélicos, isto é, geraram um total de 82 marcadores de RAPD, perfazendo uma média de 10,25 marcadores por iniciador sendo uma ferramenta, portanto, bastante informativa. Do total dos marcadores, 73 (ou 89%) foram polimórficos, (Tabela 2).

Esta alta média de marcadores por iniciador e a alta porcentagem de marcadores polimórficos dentro da espécie *Triticum aestivum* evidenciam alta variabilidade genética. Foram utilizados no presente trabalho tanto materiais desenvolvidos para o sequeiro quanto materiais desenvolvidos para a safrinha, no mesmo sítio, mas em diferentes épocas do ano. Este fato teoricamente colaborou para esta alta variabilidade genética, embora não formem

grupos distintos na análise de similaridade. Também colaborou para esta diversidade o fato de os genótipos originarem-se de diferentes programas de melhoramento como Embrapa, CIMMYT, IAC, IAPAR, uma Cooperativa e Empresas Privadas e o fato de não haver similaridades na genealogia dos materiais. As distâncias genéticas entre os 28 acessos de trigo variaram entre 0,053 e 0,389 (dados não apresentados), sendo que o acesso que mais diferenciou foi o Prointa Federal com uma distância média de 0,290 em relação aos demais acessos.

A partir da análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas, subdividiram-se os 28 acessos de trigo em, pelo menos 10 grupos de similaridade genética (Figura 1). As

distância entre os acessos e a distribuição dos mesmos nos grupos e a distribuição nos grupos de similaridade podem ser também observadas no gráfico de dispersão (Figura 2). O acesso de cevada, utilizado como outgroup, ficou bem distante dos acessos de trigo. Materiais desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisa se aproximaram em termos de similaridade genética, possivelmente, devido à utilização de genitores com background genético similar.

A principal informação gerada pelos marcadores moleculares é a alta variabilidade genética dos materiais analisados, respaldando a escolha desses materiais para a formação de blocos de cruzamentos dentro do programa de melhoramento genético do trigo.

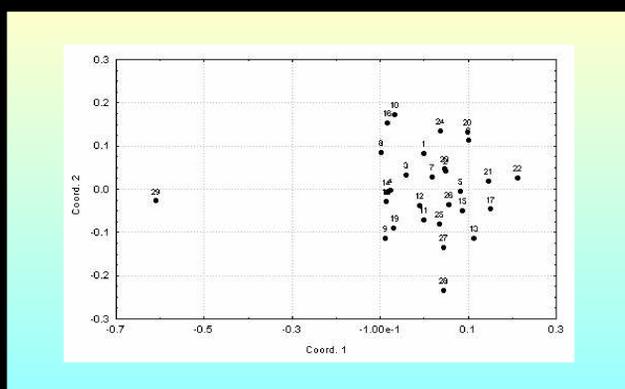


Figura 1. Análise de agrupamento de 28 acessos de trigo com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 82 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

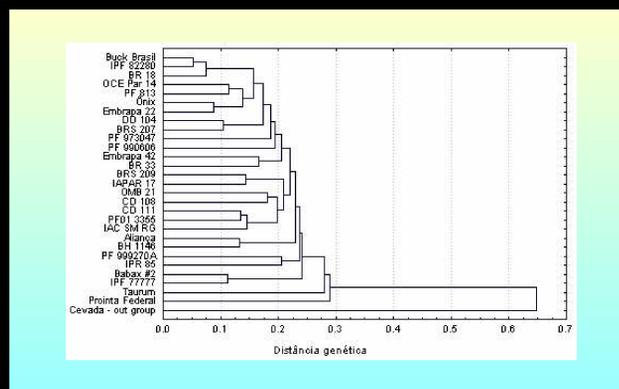


Figura 2. Dispersão gráfica de 28 acessos de trigo com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 82 marcadores RAPD.

## CONCLUSÃO

Considerando as informações dos acessos utilizados no bloco de cruzamento utilizado para a região Centro-Oeste, obtidas pelos marcadores moleculares com respeito às altas distâncias genéticas, pode-se esperar segregação transgressiva de genótipos obtidos de parte desses cruzamentos, sendo possível escolher entre estes materiais, um dialelo inicial para um programa de seleção recorrente com ampla variabilidade genética e conseqüente possibilidade de êxito.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Embrapa Cerrados pela estrutura de laboratório e à Embrapa Trigo por ter selecionado e fornecido materiais genéticos.

## REFERÊNCIAS

- [1] FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R., KARIA, C.T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. (Comunicado Técnico No.92) 6p.
- [2] CRUZ, C.D. 1997. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV, 648p.
- [3] SAS INSTITUTE INC. 1989. SAS/STAT user's guide. Version 6, 4 ed. SAS Institute, North Caroline, Cary, 1989.
- [4] STATSOFT INC. 1999. Statistica for Windows [Computer program manual] Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa.

Tabela 2. Primers utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas.

Primer	Seqüência 5' 3'	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
OPD-04	TCTGGTGAGG	4	1
OPD-08	GTGTGCCCA	4	2
OPD-16	AGGGCGTAAG	12	0
OPE-18	GGACTGCAGA	7	2
OPG-09	CTGACGTCAC	14	0
OPG-17	ACGACCGACA	4	2
OPH-12	ACGCGCATGT	10	2
OPH-17	CACTCTCCTC	18	0
<b>TOTAL</b>		<b>73</b>	<b>9</b>