

# POLIMORFISMO MOLECULAR EM AVEIAS FORRAGEIRAS POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Data de aceite: 01/08/2024

### **Sandra Patussi Brammer**

Pesquisadora – área de Biotecnologia,  
Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária – Embrapa Trigo  
Passo Fundo – RS  
<http://lattes.cnpq.br/0831352052358625>

### **Bianca Oliveira Machado**

Doutoranda do Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia, Universidade  
de Passo Fundo – RS  
<http://lattes.cnpq.br/3538179788911170>

### **Luiza Elodi Greiner Brum**

Graduanda em Engenharia Ambiental,  
Universidade de Passo Fundo – RS  
<http://lattes.cnpq.br/7214617972647548>

**RESUMO:** As espécies de aveias forrageiras, *Avena sativa* (hexaploide  $2n=2X=42$ ), *A. strigosa* e *A. brevis* (diploides  $2n=2x=14$ ), são excelentes para o consumo animal com elevada qualidade nutricional e boa adaptabilidade a solos pouco férteis. Apresentam produção de pastagens no período de maior déficit de forrageiras no Sul do Brasil e na América Latina como as áreas temperadas da Argentina, Uruguai e Chile, além das áreas de maior altitude na Bolívia, Equador e Peru. O objetivo do estudo foi verificar o polimorfismo molecular

entre as diferentes cultivares utilizando-se marcadores microsatélites, uma vez que acessam as informações diretamente no DNA e têm sido usados como apoio aos programas de melhoramento genético. Foram analisadas as cultivares de *A. sativa* Fundacep FAPA 43, Fronteira, URS Flete, FAPA2; *A. strigosa* GMX Bagual, GMX Picasso, Agro Quarai, IPR Cabocla, Agro Esteio e *A. brevis*, Centauro, Madrugada, testando-se 50 microsatélites específicos para o gênero *Avena*. Destes, 38 apresentaram amplificação, sendo que 18 (47%) foram polimórficos, 16 (42%) monomórficos e 4 (11%) não amplificaram fragmentos. Nesses 18 primers, foram identificados, no total, 29 alelos com variação do tamanho dos fragmentos entre 100 a 350 pares de base. As frequências alélicas variaram de 0,72 a 0,59 entre as cultivares de *A. sativa*; de 0,79 a 0,41 para *A. strigosa* e 0,48 e 0,45 para *A. brevis*. Considerando o Coeficiente do Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC), a média dos valores foi de 0,47, representando uma estratégia útil para determinar a dissimilaridade e o polimorfismo molecular entre as cultivares analisadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Avena strigosa*. *Avena brevis*. *Avena sativa*. Melhoramento genético. SSR.

## MOLECULAR POLYMORPHISM IN FORAGE OAT THROUGH MICROSATELLITE MARKERS

**ABSTRACT:** The forage oat species, *Avena sativa* (hexaploid  $2n=2X=42$ ), *A. strigosa* and *A. brevis* (diploid  $2n=2x=14$ ), are excellent for animal consumption presenting high nutritional quality and good adaptability to infertile soils. They present pasture production in the period of greatest forage deficit in southern Brazil and in Latin America regions such as the temperate areas of Argentina, Uruguay and Chile, in addition to the higher altitude areas in Bolivia, Ecuador and Peru. The objective of the study was to verify the molecular polymorphism between different cultivars using microsatellite markers, since they access information directly in the DNA and have been used to support genetic breeding programs. The cultivars *A. sativa* Fundacep FAPA 43, Fronteira, URS Flete, FAPA2; *A. strigosa* GMX Bagual, GMX Picasso, Agro Quarai, IPR Cabocla, Agro Esteio and *A. brevis*, Centauro, Madrugada were analysed, testing 50 specific microsatellites for the genus *Avena*. Of these, 38 showed amplification, 18 (47%) were polymorphic, 16 (42%) were monomorphic and 4 (11%) did not amplify fragments. Eleven alleles were identified, with two or three alleles per locus, and fragment sizes ranging from 100 to 350 bases pairs. Considering the Polymorphism Information Content (PIC) coefficient, the mean value was 0.47, representing a useful strategy to determine the dissimilarity and molecular polymorphism between the analyzed cultivars.

**KEYWORDS:** *Avena strigosa*. *Avena brevis*. *Avena sativa*. Genetic breeding. SSR.

### INTRODUÇÃO

As aveias forrageiras são compostas principalmente pelas espécies diploides ( $2n=2x=14$ ) *Avena strigosa* e *A. brevis*, comumente designadas pelos produtores como “aveia-preta”, além de algumas variedades de *A. sativa* (hexaploide:  $2n=6x=42$ ). Essas espécies são de ciclo anual e de estação fria, sendo que *A. strigosa* é considerada a espécie mais rústica dentro do gênero *Avena* (BONFANTE et al., 2021). Apresentam como características principais a boa adaptabilidade a solos pouco férteis e grande capacidade de perfilhamento, sendo consideradas espécies forrageiras de elevada qualidade nutricional aos animais (FONTANELI et al., 2012). Essas espécies possuem significância econômica na América do Sul e na Austrália, regiões nas quais o forrageamento dos animais e a conservação de solos são de extrema importância. Na América do Sul, *A. strigosa* é utilizada especialmente como cobertura de inverno em áreas temperadas da Argentina e do Uruguai, na área temperada do Chile, e nas áreas de maior altitude na Bolívia, Equador e Peru (CHINI, 2017). No Brasil, é largamente empregada na produção de pastagens no período de maior déficit de forrageiras no Sul do Brasil. Também tem sido empregada no sistema de plantio direto, onde controla a erosão, produz grande quantidade de matéria seca e realiza um expressivo controle de plantas daninhas, em virtude do efeito alelopático determinado pela cobertura morta (CARVALHO, 1998). Apresentam, ainda, produção considerável de biomassa em comparação com outras culturas de cobertura não leguminosas ou leguminosas (THOMAS, 2007).

O conhecimento das diferenças genéticas dentro ou entre grupos de genótipos é um importante parâmetro para o melhoramento de uma espécie. De acordo com CHINI (2017), tais informações são importantes para a elucidação da variabilidade existente entre os materiais e a caracterização de genótipos, o que requer a escolha de variáveis que identifiquem as diferenças e que permitam a seleção dos materiais. Já que a caracterização de linhagens, cultivares ou espécies é a base para a seleção de formas parentais apropriadas para o desenvolvimento dos cruzamentos (CIEPLAK et al., 2021).

Inúmeras são as pesquisas visando elucidar a origem e evolução das espécies do gênero *Avena*, principalmente comparando-se as análises citogenéticas, tais como a estrutura dos cariótipos, os padrões de bandas cromossômicas, o comportamento meiótico nos híbridos interespecíficos, com as análises moleculares, via diferentes marcadores moleculares (NIKOLOUDAKIS et al., 2008; OKOŃ; KOWALCZYK, 2012; FU, 2018; PODYMA et al., 2019) De acordo com Mondini et al. (2009), os marcadores moleculares que acessam as informações diretamente no DNA, apresentam diversas vantagens, pois são estáveis e detectáveis em todos os tecidos, independentemente do crescimento, diferenciação, desenvolvimento ou estado de defesa da célula, além de não ter a interação com efeitos ambientais, pleiotrópicos e epistáticos.

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites, também chamados de SSR (*Simple Sequence Repeats*) têm sido escolhidos com grande frequência em diversas pesquisas que empregam análises de similaridade/diversidade genética. Os microssatélites são repetições em tandem de unidades de DNA de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, flanqueadas por sequências únicas no genoma, mas encontradas mais abundantemente no genoma de uma espécie (YU et al., 2017). Esses marcadores possuem excelentes vantagens comparados com os demais, pois são abundantes, fáceis de automatizar, codominantes, universais, robustos, confiáveis, reprodutíveis e de elevado polimorfismo (GROVER; SHARMA, 2016).

Em espécies vegetais e especialmente em aveia, tanto as hexaploides quanto as diploides, os marcadores de DNA são usados para estimar a similaridade e distância genética, selecionar e identificar formas desejáveis, avaliar os genótipos parentais e a eficiência dos cruzamentos, determinar a pureza das sementes e identificar os genes que determinam características funcionais importantes e aumentar a densidade de mapas genéticos (CIEPLAK et al., 2021).

A partir disso, objetivou-se verificar o polimorfismo molecular em cultivares de aveias forrageiras, utilizando marcadores moleculares microssatélites, como apoio aos programas de melhoramento genético.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliadas as seguintes cultivares de aveias forrageiras e disponibilizadas pela Embrapa Trigo: *Avena sativa* Fundacep FAPA 43, Fronteira, URS Flete e FAPA2; *A. strigosa* GMX Bagual, GMX Picasso, Agro Quarai, IPR Cabocla e Agro Esteio e *A. brevis* Centauro e Madrugada. Os 50 microssatélites testados foram descritos por LI et al. (2000).

### Germinação de sementes de aveias forrageiras

As sementes foram, inicialmente, imersas em hipoclorito de sódio (2%) e agitadas durante cinco minutos, seguido da substituição para água destilada também por cinco minutos, repetindo o processo com água destilada três vezes para a completa lavagem. Após, foram colocadas para germinar em papel germitest, sendo mantidas em câmara de crescimento a 23 °C por seis dias ou até o crescimento adequado das plântulas e realização da extração de DNA.

### Extração de DNA

A extração de DNA foi baseada em Doyle & Doyle (1987) e realizada em folhas de plântulas, as quais foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido. Para a extração, utilizou-se 700 µL de tampão CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) pré-aquecido e adicionado às amostras. Estas foram incubadas a 65 °C em banho-maria por 60 minutos, invertendo os tubos a cada 10 min, seguidas de resfriamento em temperatura ambiente por cinco minutos. Após, foram utilizados 450 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), invertido por 10 minutos, seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. Para precipitar o DNA, foi retirado o sobrenadante (aproximadamente 700 µL) para novos tubos e adicionados 550 µL de isopropanol, incubando-se por no mínimo 30 min a -20 °C. O sobrenadante foi retirado e o pellet formado lavado com 600 µL de etanol 96% deixando secar em temperatura ambiente. Para a ressuspensão do pellet, foi utilizado o tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) 100 µL e adicionado 0,3 µL de RNase (10 mg/mL), misturando-se e incubando-se por uma hora a 37 °C. As amostras foram quantificadas, diluídas e armazenadas a -20 °C, até o momento do uso. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro e também em gel de agarose.

### Amplificação de DNA via PCR utilizando marcadores microssatélites (SSR)

Para a reação da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram adicionados os seguintes componentes: DNAs, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para *Avena*, DNTPs (nucleotídeos livres), enzima Taq DNA polimerase, tampão PCR, MgCl<sub>2</sub> e água ultra reativa (MiliQ). A quantidade e concentração dos reagentes utilizados estão

descritos na Tabela 1. As reações foram conduzidas em termociclador GeneAmp Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems - ABI) utilizando-se a seguinte programação básica: um ciclo a 94°C por 3min; 5 ciclos de 94°C por 1min, 60°C por 1min (decrecendo 1°C por ciclo até 55°C), 72°C por 1min; 30 ciclos de 94°C por 1min, 55°C por 1min, 72°C por 1min; e um ciclo de 72°C por 10min. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 2% e visualizados em fotodocumentador digital GelDoc XR+ (Bio-Rad). O marcador ladder utilizado foi o de 100pb. Para cada conjunto de *primers* (Tabela 2) também foram observadas as temperaturas de anelamento de acordo com as especificações de LI et al. (2000). Entretanto, embora a reação da PCR foi seguida pelo protocolo básico, descrito anteriormente, ajustes para alguns primers foram feitos considerando a etapa de anelamento.

| Componentes do PCR     | Concentração inicial | Concentração final | Volume por reação (15uL) | Volume do mix (13) reações |
|------------------------|----------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------|
| Água ultra reativa     | -                    | -                  | 6,8                      | 88,4                       |
| Tampão Buffer (X)      | 10                   | 1                  | 1,5                      | 19,5                       |
| MgCl <sub>2</sub> (mM) | 50                   | 2,5                | 0,75                     | 9,75                       |
| DNTP (mM)              | 10                   | 1                  | 1,5                      | 19,5                       |
| Primer F+R* (uM)       | 10                   | 0,2                | 0,3                      | 3,9                        |
| Taq polimerase (U/uL)  | 5                    | 0,75               | 0,15                     | 1,95                       |
| DNA (ng)               | 25                   | 100                | 4                        | 4                          |

\* F e R – *primers Forward e Reverse*, respectivamente.

Tabela 1 - Componentes e condições ideais para a reação da PCR utilizada para análise do polimorfismo molecular em cultivares de aveias forrageiras.

| Primer | Sequência do primer               | Motivo de repetição                        | Tamanho (pb) | TA* (°C) |
|--------|-----------------------------------|--|--------------|----------|
| AM1    | 5'GGA TCC TCC ACG CTG TTG A       | (AG) <sub>21</sub><br>(CAGAG) <sub>6</sub> | 204          | 46       |
|        | 5'CTC ATC CGT ATG GGC TTT A       |  |              |          |
| AM2    | 5'TGA ATT CGT GGC ATA GTC ACA AGA | (AG) <sub>24</sub>                         | 144          | 49       |
|        | 5'AAG GAG GGC ATA GGG AGG TAT TT  |  |              |          |
| AM3    | 5'CTG GTC ATC CTC GCC GTT CA      | (AG) <sub>35</sub>                         | 280          | 51       |
|        | 5'CAT TTA GCC AGG TTG CCA GGT C   |  |              |          |
| AM4    | 5'GGT AAG GTT TCG AAG AGC AAA G   | (AG) <sub>34</sub>                         | 166          | 48       |
|        | 5'GGG CTA TAT CCA TCC CTC AC      |  |              |          |
| AM5    | 5'TTG TCA GCG AAA TAA GCA GAG A   | (AG) <sub>27</sub>                         | 172          | 46       |
|        | 5'GAA TTC GTG ACC AGC AAC AG      |  |              |          |
| AM6    | 5'AAT GAA GAA ACG GGT GAG GAA GTG | (AG) <sub>20</sub>                         | 209          | 52       |
|        | 5'CCA GCC CAG TAG TTA GCC CAT CT  |  |              |          |

|      |                                   |  |     |    |
|------|-----------------------------------|--|-----|----|
| AM7  | 5'GTG AGC GCC GAA TAC ATA         | (AG) <sub>21</sub>   | 156 | 48 |
|      | 5'TTG GCT AGC TGC TTG AAA CT      |  |     |    |
| AM8  | 5'CAA GGC ATG GAA AGA AGT AAG AT  | (AG) <sub>15</sub>   | 254 | 47 |
|      | 5'TCG AAG CAA CAA ATG GTC ACA C   |  |     |    |
| AM9  | 5'CAA AGC ATT GGG CCC TTG T       | (AG) <sub>19</sub>   | 217 | 48 |
|      | 5'GGC TTT GGG ACC TCC TTT CC      |  |     |    |
| AM10 | 5'AAA ATC GGG GAA GGA AAC C       | (AG) <sub>20</sub>   | 186 | 46 |
|      | 5'GAA GGC AAA ATA CAT GGA GTC AC  |  |     |    |
| AM11 | 5'TCG TGG CAG AGA ATC AAA GAC AC  | (AG) <sub>12</sub><br>(AAAG) <sub>3</sub>                                  | 225 | 49 |
|      | 5'TGG GTG GAG GCA AAA ACA AAA C   |  |     |    |
| AM12 | 5'TGC TGA AGT GAA CAA TCG C       | (AG) <sub>20</sub>   | 310 | 44 |
|      | 5'CCT TCT CCA ACA ACT CTA C       |  |     |    |
| AM13 | 5'CGG CGT GAT TTG GGG AAG AAG     | (AG) <sub>15</sub>   | 201 | 54 |
|      | 5'CTA GTA ACG GCC GCC AGT GTG CTG |  |     |    |
| AM14 | 5'GTG GTG GGC ACG GTA TCA         | (AC) <sub>21</sub>   | 133 | 48 |
|      | 5'TGG GTG GCG AAG CGA ATC         |  |     |    |
| AM15 | 5'GTG ACC GTA AAC GAT AAC AAC     | (AC) <sub>14</sub>   | 229 | 47 |
|      | 5'AAG CAA GAC GCG AGA GTA GG      |  |     |    |
| AM16 | 5'CGG GTT GGC ATC GAC TAT         | (AG) <sub>4</sub><br>(AC) <sub>16</sub>                                    | 114 | 44 |
|      | 5'TGA CCA GGC TCT AAC ACA         |  |     |    |
| AM17 | 5'CGA GAT TTC GGT GTA GAC         | (AC) <sub>13</sub>   | 250 | 44 |
|      | 5'CCG GGA ATT AAC GGA GTC         |  |     |    |
| AM18 | 5'CAA TGT CGT CGG TGT GAG TTT     | (AC) <sub>14</sub>   | 270 | 47 |
|      | 5'TAC GAG TGT GGC ACG AGC         |  |     |    |
| AM19 | 5'ATA GAA CGG CAT GAT AAC GAA ATA | (AC) <sub>3</sub> (AC) <sub>6</sub><br>(AC) <sub>5</sub> (AC) <sub>7</sub> | 251 | 48 |
|      | 5'GCG CGA CAA CAG GAC CTT C       |  |     |    |
| AM20 | 5'TGT CGA TTT CTT TAG GGC AGC ACT | (TG) <sub>10</sub> (CG) <sub>5</sub>                                       | 258 | 50 |
|      | 5'TCG CGA GAA AGA TGG AAA GGA GA  |  |     |    |
| AM21 | 5'ACG TTG GTC TCG GGT TGG         | (AT) <sub>5</sub> (AC) <sub>5</sub><br>(AC) <sub>5</sub>                   | 210 | 46 |
|      | 5'AAA TCC TTG ACT TCG CTC TGA     |  |     |    |
| AM22 | 5'ATT GTA TTT GTA GCC CCA GTT C   | (AC) <sub>22</sub>   | 138 | 46 |
|      | 5'AAG AGC GAC CCA GTT GTA TG      |  |     |    |
| AM23 | 5'TCT TTA AGG ATT TGG GTG GAG     | (AC) <sub>19</sub>   | 247 | 45 |
|      | 5'AAT CTT CGA GGG TGA GTT TCT     |  |     |    |
| AM24 | 5'GTT ATT GAT TTC CTG ATG TAG AGA | (AAG) <sub>5</sub> (TCA) <sub>5</sub>                                      | 170 | 45 |
|      | 5'AGA GCC AAG AAA GCA ACT G       |  |     |    |
| AM25 | 5'AGC CTG GAC ATG TAA TCT GGT     | (AC) <sub>8</sub> (AC) <sub>4</sub><br>(CT) <sub>4</sub>                   | 229 | 47 |
|      | 5'AGC CCT GGT CTT CTT CAA CA      |  |     |    |
| AM26 | 5'ATA AAG GGG GCA TTG GAT T       | (AAG) <sub>14</sub>  | 224 | 41 |
|      | 5'AAC ATA TTG GGC ATT CAC AT      |  |     |    |

|      |                                   |                     |     |    |
|------|-----------------------------------|---------------------|-----|----|
| AM27 | 5'CAA AGG CCA AAT GGT GAG         | (AAG) <sub>10</sub> | 161 | 45 |
|      | 5'CCG CAA AGT CAT ATG GAG CAT     |                     |     |    |
| AM28 | 5'GAC CTC TTG AGT AAG CAA CG      | (GAA) <sub>8</sub>  | 135 | 46 |
|      | 5'TGG TCT TCC TAT CCA CAA TG      |                     |     |    |
| AM29 | 5'TCC CGC AAA ATC ATC ACG A       | (GAA) <sub>9</sub>  | 143 | 43 |
|      | 5'AAG GGA GCA TTG GTT TTG TT      |                     |     |    |
| AM30 | 5'TGA AGA TAG CCA TGA GGA AC      | (GAA) <sub>14</sub> | 203 | 43 |
|      | 5'GTG CAA ATT GAG TTT CAC G       |                     |     |    |
| AM31 | 5'GCA AAG GCC ATA TGG TGA GAA     | (GAA) <sub>23</sub> | 186 | 47 |
|      | 5'CAT AGG TTT GCC ATT CGT GGT     |                     |     |    |
| AM32 | 5'AGT GAA GGC GAT GGC GAA         | (GAA) <sub>19</sub> | 295 | 47 |
|      | 5'GGA TAA TGC ACC CGA GTT GC      |                     |     |    |
| AM33 | 5'GCA AAG GTT AAA TGG TGA GA      | (GAA) <sub>15</sub> | 246 | 43 |
|      | 5'GCC AAC ATA TTG TGC ATA CA      |                     |     |    |
| AM34 | 5'GAG TAA GCA AAG GTC AAA TG      | (GAA) <sub>10</sub> | 181 | 44 |
|      | 5'GTT AGC ACT TCC CAC AAA ATC A   |                     |     |    |
| AM35 | 5'CGT GAC CTT TAT ATC ACC ACT     | (GAA) <sub>14</sub> | 216 | 47 |
|      | 5'GTG GCT CGT GAT ATT GGC AC      |                     |     |    |
| AM36 | 5'CTT CCC GCA AAG TTA TCA T       | (GAA) <sub>9</sub>  | 142 | 43 |
|      | 5'AGG GGC ATT GGC TTT GTC         |                     |     |    |
| AM37 | 5'CTT CCA CAA GGC AAC GAG TC      | (GAA) <sub>9</sub>  | 213 | 47 |
|      | 5'GGT TAG CAC TTC CCG CAA A       |                     |     |    |
| AM38 | 5'TGA TGA CCT CTT GAG TAA GCA     | (GAA) <sub>9</sub>  | 178 | 45 |
|      | 5'TGC CTT TCG TGG ACT TAC TA      |                     |     |    |
| AM39 | 5'TTG GGC ATG CCC TTG TT          | (GAA) <sub>8</sub>  | 238 | 43 |
|      | 5'GCC TTG GAG AGT AAA TTC TC      |                     |     |    |
| AM40 | 5'CTC TGG GGG TGG TAG TTC CT      | (GAA) <sub>7</sub>  | 249 | 49 |
|      | 5'GAA AGA CAG GCC TCC ACA AAT     |                     |     |    |
| AM41 | 5'CCA AAG GAA ACA AGT CAA TAG     | (GAA) <sub>10</sub> | 205 | 42 |
|      | 5'TTC CCG CAA AGT CAT CAT         |                     |     |    |
| AM42 | 5'GCT TCC CGC AAA TCA TCA T       | (GAA) <sub>16</sub> | 193 | 45 |
|      | 5'GAG TAA GCA AAG GCC AAA AAG T   |                     |     |    |
| AM43 | 5'AGC CCC TAC AAA GCC ATC A       | (GAA) <sub>17</sub> | 162 | 46 |
|      | 5'CAA GCA AAG GAC GAA CAA TAG     |                     |     |    |
| AM44 | 5'CGT TGG CCC CTT TTT TCA GTG     | (GAA) <sub>11</sub> | 174 | 49 |
|      | 5'AGG GGC ATT GGC TTT GTC C       |                     |     |    |
| AM45 | 5'AGG GAA AAA CAA AAC GTG AGA GTA | (AC) <sub>9</sub>   | 191 | 47 |
|      | 5'ATG CAA CAG ATA GAC AAG GGA TTA |                     |     |    |
| AM46 | 5'TTG GCA AGG CGA GGT CT          | (AC) <sub>9</sub>   | 105 | 46 |
|      | 5'CCA AAA GGC TAC AAC ATC ACA C   |                     |     |    |

|      |                                   |   |     |    |
|------|-----------------------------------|---|-----|----|
| AM47 | 5'GCA CCG GTT AAA AAG GAG TCA G   | (AC) <sub>14</sub>                        | 274 | 50 |
|      | 5'TTT CTT CTT ACC CAC CCA CCA C   |   |     |    |
| AM50 | 5'CTT GAG CGC TAG ATG GTT CC      | (AT) <sub>6</sub> (AC) <sub>5</sub>       | 273 | 47 |
|      | 5'CTC TGT TAC TCA AGT GTT TCA ATA |   |     |    |
| AM58 | 5'GTT TAG ATG GGG GTG GCT TAG     | (CT) <sub>5</sub> (AC) <sub>3</sub>       | 215 | 45 |
|      | 5'TTT CTT GTT CTT TGG ATT TTA TTT |   |     |    |
| AM61 | 5'TCG GAG CCG GTA TGG AAG C       | (TTTC) <sub>4</sub><br>(CCT) <sub>6</sub> | 206 | 51 |
|      | 5'GGT GGC AAG GGG TGT ATG AG      |   |     |    |

\*TA – Temperatura de anelamento. Fonte: LI et al. (2000)

Tabela 2 - Descrição dos 50 *primers* microsatélites testados e específicos para Avena, sequência, motivo de repetição, tamanho do fragmento amplificado (pb) e temperatura de anelamento (TA) em °C.

## Análise do polimorfismo molecular

Os fragmentos amplificados pelos marcadores e visualizados em gel de agarose, foram, inicialmente, compilados em planilhas Excel e classificados como presente (1) ou ausente (0). Essas análises da presença/ausência de alelos, obtidos a partir dos marcadores microsatélites, possibilitaram as análises do coeficiente do Conteúdo de Informações do Polimorfismo, conhecido pela sigla PIC (Polymorphism Information Content), o qual é obtido pela fórmula:  $PIC = 1 - \sum p_{ij}^2$ , onde  $p_{ij}^2$  é a frequência ao quadrado do alelo  $j$  para o locus  $i$ , cobrindo todos alelos por locus (NEI, 1973).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As numerosas análises de similaridade genética, entre diferentes espécies pertencentes ao gênero *Avena*, podem contribuir para explicar o processo de evolução dentro desse gênero, servindo, também, de apoio aos programas de melhoramento genético pelo desenvolvimento de uma determinada espécie (OKOŃ; KOWALCZYK, 2012).

No presente estudo, considerando as espécies *A. sativa*, *A. strigosa* e *A. brevis*, os *primers* demonstraram eficiência na detecção do polimorfismo molecular e, conseqüentemente, variabilidade genética entre as cultivares. Dos 50 *primers* testados, 38 foram considerados efetivos para a análise, ou seja, apresentaram amplificação de fragmentos. Destes, 18 (47%) apresentaram polimorfismo e 16 (42%) foram monomórficos. Além desses, 4 (11%) não amplificaram os fragmentos. A identificação dos *primers* que foram efetivos, sejam monomórficos ou polimórficos estão listados na Tabela 3.



| <b>Primers efetivos</b> |      | <b>Primers monomórficos</b> | <b>Primers polimórficos</b> |
|-------------------------|------|-----------------------------|-----------------------------|
| AM1                     | AM27 | AM6                         | AM1                         |
| AM2                     | AM28 | AM9                         | AM2                         |
| AM4                     | AM29 | AM19                        | AM4                         |
| AM5                     | AM30 | AM26                        | AM5                         |
| AM6                     | AM31 | AM27                        | AM7                         |
| AM7                     | AM33 | AM28                        | AM13                        |
| AM8                     | AM34 | AM29                        | AM14                        |
| AM9                     | AM36 | AM33                        | AM15                        |
| AM13                    | AM37 | AM34                        | AM20                        |
| AM14                    | AM38 | AM36                        | AM21                        |
| AM15                    | AM39 | AM37                        | AM22                        |
| AM17                    | AM40 | AM39                        | AM25                        |
| AM19                    | AM42 | AM40                        | AM30                        |
| AM20                    | AM43 | AM42                        | AM31                        |
| AM21                    | AM45 | AM45                        | AM43                        |
| AM22                    | AM47 | AM61                        | AM47                        |
| AM24                    | AM50 |                             | AM50                        |
| AM25                    | AM58 |                             | AM58                        |
| AM26                    | AM61 |                             |                             |

Tabela 3 - *Primers* efetivos com amplificação de fragmentos, monomórficos, polimórficos e que não amplificaram nenhum fragmento de um total de 50 *primers* testados na análise do polimorfismo molecular em cultivares de aveias forrageiras.

No estudo desenvolvido por Li et al. (2000), 62% dos microssatélites foram polimórficos com média de quatro alelos por locus nas espécies do gênero *Avena*; já nas cultivares de aveia, 36% dos microssatélites apresentaram polimorfismo com média de 3,4 alelos por locus. Entretanto, resultados publicados por Nersting et al. (2006) revelaram a amplificação de sete loci de microssatélites, sendo que seis desses loci de microssatélites foram polimórficos. Comparando-se os resultados desses últimos autores com o estudo em questão, dentre os sete loci que amplificaram, seis deles foram amplificados também no presente trabalho (AM1, AM2, AM25, AM31, AM38 e AM40). Entretanto, somente três loci apresentaram polimorfismo entre os genótipos (AM1, AM2 e AM25).

No total, foram identificados 29 alelos entre todas as cultivares com variação do tamanho dos fragmentos de 100 pares de base (pb) a 350 pb (Tabela 4) e com uma média de um a três alelos por conjunto de *primers*. Entretanto, considerando as cultivares dentro de cada espécie, pode-se observar que houve variação na frequência alélica, variando de 0,72 a 0,59 entre as cultivares de *A. sativa*; de 0,79 a 0,41 para *A. strigosa* e 0,48 e 0,45 para *A. brevis* (Tabela 4).

| <b>Cultivar</b>  | <b>Primers efetivos</b> | <b>Número de alelos</b> | <b>Frequência alélica</b> |
|------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Fundacep FAPA 43 | 16                      | 21                      | 0,72                      |
| Fronteira        | 13                      | 17                      | 0,59                      |
| URS Flete        | 17                      | 21                      | 0,72                      |
| FAPA2            | 17                      | 21                      | 0,72                      |
| GMX Bagual       | 18                      | 23                      | 0,79                      |
| GMX Picasso      | 13                      | 14                      | 0,48                      |
| Agro Quarai      | 13                      | 14                      | 0,48                      |
| IPR Cabocla      | 12                      | 12                      | 0,41                      |
| Agro Esteio      | 13                      | 14                      | 0,48                      |
| Centauro         | 13                      | 14                      | 0,48                      |
| Madrugada        | 12                      | 13                      | 0,45                      |

Tabela 4 - Primers efetivos, número de alelos e frequência alélica obtida para cada cultivar, considerando as espécies *Avena sativa*, *A. strigosa* e *A. brevis*.

Semelhantemente, FU et al. (2003) empregaram 30 marcadores SSR em 96 cultivares de aveias canadenses (*A. sativa*), cultivadas entre 1886 a 2001, visando acessar as mudanças da diversidade alélica por longos períodos de tempo. Um total de 62 alelos foram identificados a partir de 11 loci efetivos para muitas das variedades, sendo que 39 alelos foram detectados com frequência menor e igual a 0,15 e apenas dois alelos com frequência maior que 0,95. Destacam que diminuições significativas no número de alelos foram identificadas a partir de 1970 e também em alguns programas de melhoramentos específicos, indicando, ainda, a necessidade de atenção à conservação do germoplasma de aveia.

Outro exemplo pode ser verificado em CIEPLAK et al. (2021), que visaram determinar o nível de diversidade de variedades de *A. sativa* cultivadas atualmente na Europa Central. Entretanto, nesse estudo foram utilizados os marcadores ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) e SCoT (Start Codon Targeted Polymorphism), sendo que ambos também foram adequados e que os coeficientes calculados evidenciaram que as cultivares analisadas apresentavam alta similaridade genética, embora há distinção na condução dos programas de melhoramento genético empregados. Do mesmo modo, tais autores concluíram que é necessário expandir o pool genético de variedades de aveia e que a estreita variabilidade genética das variedades cultivadas é um problema muito sério para muitos cereais. Ressalta-se, contudo, que o nível de polimorfismo mais baixo para as cultivares revela um pool genético relativamente estreito, pois o melhoramento de uma cultura pode chegar a um ponto em que uma nova diversidade deve ser adicionada na população inicial para alcançar os objetivos propostos (NERSTING et al., 2006).

Considerando apenas os resultados obtidos dos *primers* polimórficos, foi determinado, no presente estudo, o Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC), que é

um indicador da capacidade informativa de um marcador em estudos genéticos. De acordo com a classificação de BOTSTEIN et al. (1980), marcadores com valor de PIC superiores a 0,50 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 medianamente informativos e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos. Dos *primers* efetivos, 9% foram considerados muito informativos, destacando-se o *primer* AM14 com valor de PIC igual a 0,73; 82% considerados medianamente informativos e 9% pouco informativos, sendo o *primer* AM41 com o menor valor de PIC (0,18) (Tabela 5). A média dos valores de PIC foi de 0,47.

| Marcador | Varição do tamanho de fragmentos (pb) | PIC  |
|----------|---------------------------------------|------|
| AM1      | 190-220                               | 0,43 |
| AM2      | 150-190                               | 0,49 |
| AM5      | 150-220                               | 0,42 |
| AM7      | 150-190                               | 0,48 |
| AM14     | 100-150                               | 0,73 |
| AM21     | 210-350                               | 0,50 |
| AM22     | 150-350                               | 0,50 |
| AM25     | 220-270                               | 0,46 |
| AM41     | 190-200                               | 0,18 |
| AM43     | 100-190                               | 0,43 |
| AM50     | 200-300                               | 0,50 |

Tabela 5 - Variação no tamanho dos fragmentos e PIC (*Polymorphism Information Content*) para marcadores microssatélites avaliados em cultivares de aveia forrageira.

Os dados obtidos corroboram com Li et al. (2000), no qual a variação de PIC foi de 0,28 a 0,79 com uma média de 0,57. Já dados publicados por MONTILLA-BASCÓN et al. (2013), através da análise da diversidade genética de uma coleção de aveia, incluindo variedades crioulas e cultivares, revelou elevada variabilidade entre os acessos, sendo mais evidente dentro da coleção de variedades de aveia em comparação com as cultivares. Para esses últimos autores, o PIC variou de 0,46 a 0,96 com média de 0,80, sendo que a maioria dos SSRs foram considerados marcadores informativos, indicando o potencial uso para identificação de genótipos. Da mesma forma, Nersting et al. (2006) verificaram, nas aveias estudadas, valores de PIC para seis loci de microssatélites, entre 0,49 e 0,88, indicando também um valor altamente informativo.

Considerando a espécie *A. strigosa*, resultados interessantes foram evidenciados por Podyma et al. (2019) que avaliaram diferentes acessos mantidos no Banco de Germoplasma da Polônia (National Centre for Plant Genetic Resources/Radzików), mas oriundos de diferentes partes do mundo. Os resultados obtidos das fenotipagens (36 características), das isoenzimas (12 sistemas) e dos marcadores moleculares SRAP/

*Sequence-related amplified polymorphism* (8 pares de marcadores polimórficos), serviram para a compreensão da diversidade genética da espécie. Para essa última análise, um total de 589 fragmentos foram amplificados, variando de 50 bp a 828 bp e o PIC de 0,26 a 0,41. Os autores destacam que as análises conjuntas foram essenciais para a descrição mais confiável e completa desses recursos genéticos, o que devem resultar na melhor utilização em um programa de melhoramento genético. Considerando o presente estudo, em que empregou os marcadores microssatélites, os resultados tornam-se satisfatórios, representando excelente ferramenta molecular para diagnóstico do polimorfismo entre as cultivares de aveias forrageiras.

## CONCLUSÕES

Há variabilidade genética entre as cultivares de aveias forrageiras, evidenciada pelos marcadores microssatélites, o que representa uma estratégia útil para determinar a dissimilaridade e o polimorfismo molecular entre as cultivares analisadas. Portanto, esses estudos permitirão subsidiar o programa de melhoramento genético, principalmente na identificação de genótipos divergentes e similares, para posterior orientação em cruzamentos e seleção.

## REFERÊNCIAS

- BONFANTE, N. O.; BRAMMER, S. P.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; LÂNGARO, N. C. Biologia floral de cultivares de *Avena strigosa*. **Biotemas**, Florianópolis, v. 34, n. 2, p. 1-15, 2021.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; STOLNICK, M.; DAVIS, M. Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Cambridge, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.
- CARVALHO, F. I. F. Aveia na Agricultura Moderna. **Seed News**, v. 5, p. 16, 1998.
- CHINI, Sílvia Ortiz. **Variabilidade em germoplasma de aveia-preta quanto a caracteres relacionados à aptidão forrageira ou cobertura do solo**. 2017. 170 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2017.
- CIEPLAK, M.; OKOŃ, S.; WERWIŃSKA, K. Genetic similarity of *Avena sativa* L. varieties as an example of a narrow genetic pool of contemporary cereal species. *Plants*, [s.l.], v. 10, n. 7, p. 1424, 2021.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.
- FONTANELI, R. S.; SANTOS, H. P. dos; FONTANELI, R. S.; DE OLIVEIRA, J. T.; LEHMEN, R. I.; DREON, G. Gramíneas forrageiras anuais de inverno. In: FONTANELI, R. S.; SANTOS, H. P. dos; FONTANELI, R. S. **Forrageiras para integração lavoura-pecuária-floresta na região sul-brasileira**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2012.

FU, Y. B. Oat evolution revealed in the maternal lineages of 25 *Avena* species. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 4252, 2018.

FU, Y. B.; PETERSON, G. W.; SCOLES, G.; ROSSNAGEL, B.; SCHOEN, D. J.; RICHARDS, K. W. Allelic diversity changes in 96 canadian oat cultivars released from 1886 to 2001. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 1989–1995, 2003.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 36, n. 2, p. 290-302, 2016.

LI, C. D.; ROSSNAGEL, B. G.; SCOLES, G. J. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 8, p. 1259-1268, 2000.

MONDINI, L.; NOORANI, A.; PAGNOTTA, M. A. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. **Diversity**, [s.l.], v. 1, p. 19-35, 2009.

MONTILLA-BASCÓN, G.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; RISPAIL, N.; RUBIALES, D.; MUR, L.; LANGSON, T.; GRIFFITHS, I.; HOWARTH, C.; PRATS, E. Genetic diversity and population structure among oat cultivars and landraces. **Plant Molecular Biology Reporter**, [s.l.], v. 31, p. 1305-1314, 2013.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NERSTING, L. G.; ANDERSEN, S. B.; VON BOTHMER, R.; GULLORD, M.; JØRGENSEN, R. B. Morphological and molecular diversity of Nordic oat through one hundred years of breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 150, p. 327-337, 2006.

NIKOLOUDAKIS, N.; SKARACIS, G.; KATSIOTIS, A. Evolutionary insights inferred by molecular analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 and IGS *Avena* sp. sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s.l.], v. 46, p. 102–115, 2008.

OKOŃ, S.; KOWALCZYK, K. Description of DNA analysis techniques and their application in Oat (*Avena L.*) genome research. **Acta Agrobotanica**, [s.l.], v. 65, n. 1, p. 3-10, 2012.

PODYMA, W.; BOLC, P.; NOCEN, J.; PUCHTA, M.; WLODARCZYK, S.; LAPINSKI, B.; BOCZKOWSKA, M. A multilevel exploration of *Avena strigosa* diversity as a prelude to promote alternative crop. **BMC Plant Biology**, [s.l.], v. 19, n. 291, p. 1-19, 2019.

THOMAS, Antony. **Evaluation of black oat (*Avena strigosa* Schreb.) germplasm**. 2007. 143 f. (Master of Science) - Auburn University, Alabama/USA, 2007.

YU, J.; DOSSA, K.; WANG, L.; ZHANG, Y.; WEI, X.; LIAO, B.; ZHANG, X. PMDBase: a database for studying microsatellite DNA and marker development in plants. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 45, p. D1046-D1053, 2017.