

SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE *Panicum maximum* Jacq., DETERMINADA POR MARCADORES RAPD

Ana Lúcia Variani Bonato¹, Liana Jank¹, Rosângela Maria Simeão Resende¹, Cacilda Borges do Valle¹, Gisele Leguizamon²

Palavras-Chave: Forrageira, germoplasma, marcadores moleculares, melhoramento genético.

INTRODUÇÃO

As pastagens de gramíneas são a base da produção de carne e leite no Brasil tropical. Dentre elas, forrageiras do gênero *Panicum maximum* Jacq. ocupam posição de destaque por serem capins de elevada produção e qualidade, de fácil propagação por sementes e altamente palatável ao gado. Desde 1984, a Embrapa Gado de Corte vem desenvolvendo trabalhos de seleção e melhoramento da espécie, tendo lançado três cultivares no mercado até o momento, com grande aceitação pelos pecuaristas.

A partir da coleção introduzida de mais de 400 acessos apomíticos da espécie, vários foram selecionados por suas características agrônomicas e morfológicas, e são considerados promissores. Entre esses, 25 foram avaliados em 7 regiões do país em uma rede nacional de ensaios (Savidan et al., 1990).

Atualmente várias técnicas que geram marcadores moleculares estão disponíveis e estão sendo empregadas para a caracterização de germoplasma, assim como na localização de regiões do genoma ligados a características de interesse agrônomico. Entre elas, o RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) apresenta como vantagens a rapidez e simplicidade, necessidade de pequena quantidade de DNA e custo comparativamente menor ao de outras técnicas moleculares (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

No caso de forrageiras, os marcadores utilizados para quantificar a diversidade genética até pouco tempo eram descritores morfológicos, que são influenciados por fatores ambientais e por isso nem sempre expressam uma característica genética. Além disso, são muito trabalhosos e precisam da planta adulta para serem aplicados. Por isso, há necessidade de buscar marcadores moleculares nestas espécies para, aliados à identificação de acessos superiores do ponto de vista agrônomico, tornarem a seleção de progenitores e de híbridos nos programas de melhoramento genético mais eficiente. O objetivo deste estudo foi caracterizar, através de marcadores RAPD, acessos de *Panicum maximum*, previamente selecionados por características de valor agrônomico, com vistas a determinar a similaridade genética existente entre eles.

¹Pesquisadores da Embrapa Gado de Corte, CP 154, 79002-970, Campo Grande, MS-
analidia@cnpqg.embrapa.br

²Laboratorista da Embrapa Gado de Corte

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e cinco acessos de *Panicum maximum* foram incluídos nesse trabalho realizado na Embrapa Gado de Corte, localizada em Campo Grande, MS. Destes, vinte e quatro acessos eram integrantes da I Rede Nacional de *P. maximum* (Savidan et al., 1990), e um acesso (G24) foi incluído por ser distinto dos demais (folhas curtas e estolonífero) (Jank et al., 1997).

A metodologia utilizada para extração de DNA, a partir de tecido foliar, baseou-se na descrita por Saghai-Maroo (1984) com modificações. A quantificação da concentração do DNA extraído foi através de estimativa visual em gel de agarose 0,8%. Realizou-se uma seleção prévia a partir de 85 "primers" decâmeros de seqüência arbitrária e foram selecionados 19 pelo polimorfismo observado para a amplificação dos marcadores RAPD (Tabela 1). Foram preparadas amostras de 25 µl de volume final contendo: 5 ng/µl de DNA; 1X tampão; 2,0 mM Mg; 0,2 mM de dNTPs; 10,0 ng/µl do "primer" e 1 U de Taq polimerase. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador seguindo a programação: 30 ciclos de 1 min. a 92°C; 1 min. a 35°C e 2 min. a 72°C. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TBE (tris-borato-EDTA) e documentados por sistema fotográfico.

Pela observação das bandas polimórficas nos géis obtidos, foram computadas a presença ou ausência de bandas para obtenção do índice de similaridade genética através do método de Jaccard. A partir da matriz com os índices obtidos foi feita a análise de agrupamento pelo método UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por RAPD com 19 "primers" gerou 79 bandas polimórficas possíveis de serem analisadas com segurança para todos os genótipos deste estudo, ou seja, uma média de, aproximadamente, 4,1 bandas por "primer". Embora, hoje em dia existam várias técnicas moleculares à disposição, o RAPD é uma técnica fácil de ser implementada e adequada para o estudo preliminar de espécies das quais não se tem informações a este nível. Além disso, outras vantagens destes marcadores sobre outros métodos são: a possibilidade de utilização e seleção de um conjunto de "primers" em relativamente pouco tempo, não requerem clonagem nem hibridações (Williams et al., 1990); necessitam pequena quantidade de DNA (Edwards et al., 1991) e não requerem o sequenciamento prévio da amostra a ser amplificada. Outra vantagem listada por Ferreira e Grattapaglia (1996) é o baixo custo por unidade de dado gerado.

A partir desses dados de presença e ausência de bandas foram estimados os coeficientes de similaridade entre os acessos. O coeficiente médio foi 0,39 denotando uma alta variabilidade genética entre os acessos, mesmo sendo de uma mesma espécie. Em um trabalho similar com outra gramínea forrageira, realizado com acessos de diferentes espécies de *Brachiaria* em fase de avaliação em rede obteve-se um coeficiente médio de 0,49, também refletindo alta variabilidade entre os genótipos avaliados (Bonato et al., 2002). No presente trabalho, observou-se, também, uma variação mínima de 0,15 entre os acessos T77 e T46 e máxima de 0,97 entre os T84 e K214. Observando-se o agrupamento dos acessos, representado por um dendrograma (Figura 1), verificou-se que os acessos distribuíram-se em vários "clusters" com diferentes níveis de variabilidade. As cultivares já lançadas comercialmente (Tanzânia, Mombaça e Massai) também alocaram-se em diferentes "clusters".

Morfologicamente, os acessos T60, T77, T110, KK10 e Massai são de porte baixo com longas folhas finas. Os acessos T74, T91, T95, T97, KK33 e Tanzânia-1 são de porte médio com folhas de largura média, enquanto que os demais acessos e o Mombaça são de porte alto com folhas largas. Os marcadores RAPD utilizados no presente trabalho agrupou os acessos de morfologia semelhantes. Os acessos de porte baixo apresentaram similaridades genéticas alta, sendo os acessos T60 e T110 muito próximos, bem como os acessos T91 e T95, e o T77 e o Massai (Tabela 2). O G24 se distingue desses acessos por apresentar folhas curtas e estolões, porém também apresenta porte baixo e folhas finas (Jank et al., 1997).

Era esperado que o acesso T97 mostrasse semelhança genética com os acessos T91 e T95, uma vez que sua semelhança de porte e outras características morfológicas são altas. Entretanto, ele mostrou maior proximidade com o Tanzânia-1 e outros acessos de porte médio a alto (Tabela 2).

Os acessos K191, K193 e o Mombaça (número ORSTOM K190A) foram coletados próximos um do outro, e mostraram ser geneticamente próximos neste trabalho (Tabela 2). O acesso KK33 se distingue dos demais acessos de porte médio a alto, por apresentar uma densa pubescência nas folhas.

CONCLUSÕES

Marcadores RAPD foram eficientes em discriminar acessos e detectar similaridades em *Panicum maximum* permitindo expandir este estudo para o germoplasma de interesse no melhoramento genético – progenitores e híbridos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONATO, A.L.V., VALLE, C.B., PENTEADO, M.I., JANK, L., LEGUIZAMON, G.O.C. (2002) Determinação da diversidade genética por meio de marcadores moleculares em acessos de *Brachiaria* spp. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 39, Recife, PE, CD-Rom.

EDWARDS, K.C., JOHNSTONE, C., THOMPSON, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis **Nucleic Acids Research**. 19: 1349.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. (1996) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília, EMBRAPA-CENARGEN, pp.220 (EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20).

SAGHAI-MAROOF M.A., SLOMAN K.M., JORGENSEN R.A., ALLARD R.W. (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of National Academy of Science of USA**. 81: 8014-8018.

SAVIDAN, Y.H., JANK, L., COSTA, J.C.G. **Registro de 25 acessos selecionados de *Panicum maximum***. Campo Grande, EMBRAPA-CNPGC, 1990. 68p. il. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos 44).

WILLIAMS, J.K.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. 18: 6531 - 6535.

Tabela 1. Seqüência de nucleotídeos dos "primers" utilizados na análise de RAPD.

Código	Seqüência das bases
2	5'-GGGAACGTGT-3'
3	5'-CAAACGTGGG-3'
9	5'-CCTTGACGCA-3'
12	5'-ACAACGGGG-3'
21	5'-CCCAGTCACT-3'
28	5'-AAGGCTCGAC-3'
31	5'-AAGGGCGAGT-3'
32	5'-GGCACGCGTT-3'
52	5'-AAGTGCACGG-3'
81	5'-GGAGCGTACT-3'
93	5'-GTGCCGCACT-3'
95	5'-GTGACCAGAG-3'
P-14	5'-CCAGCCGAAC-3'
Q-20	5'-TCGCCCAGTC-3'
Z-10	5'-CCGACAAACC-3'
AD-01	5'-CAAAGGGCGG-3'
AD-02	5'-CTGAACCGCT-3'
AF-02	5'-CAGCCGAGAA-3'
BA-02	5'-TGCTCGGCTC-3'

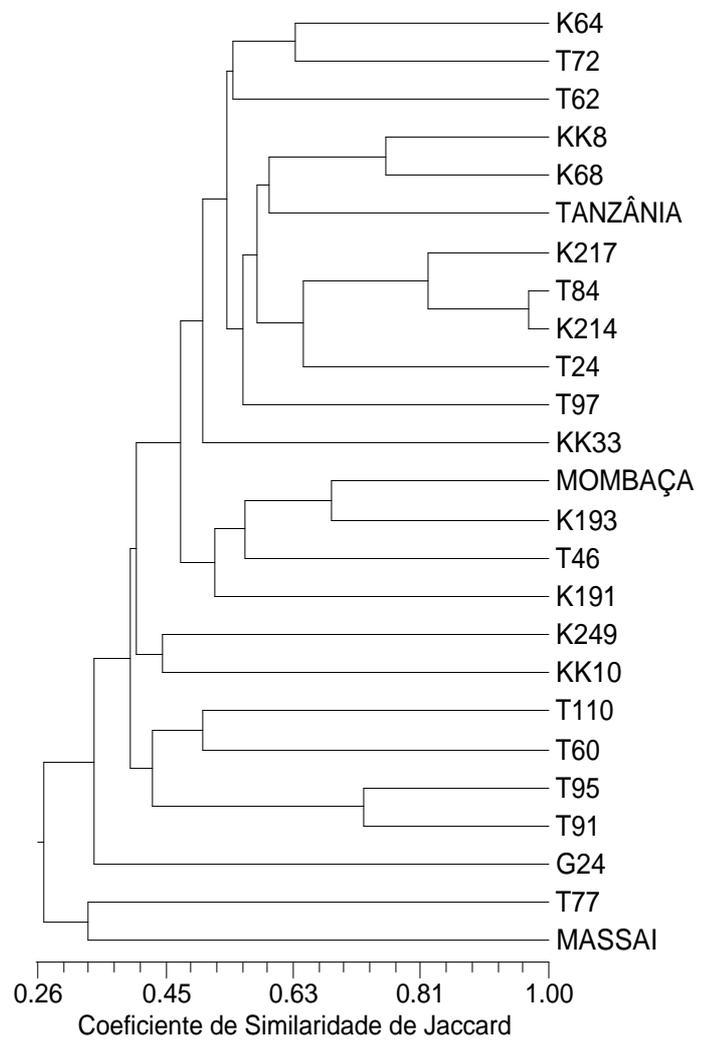


Figura 1. Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade genética obtidos por marcadores RAPD entre acessos de *Panicum maximum*.