



A PRODUÇÃO ANIMAL E O FOCO NO AGRONE

42ª Reunião Anual da SOCIEDADE BRASIELIRA DE ZOOT

25 a 28 de Julho de 2005 - Goiânia, Goiás

Voltar

VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA COLEÇÃO DE TRABALHO DE GUANDU ("CAJANUS CAJAN") COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES

FÁBIO GELAPE FALEIRO ¹, FRANCISCO DUARTE FERNANDES ², RENATO FERNANDO AMABILE ³, ALLAN KARDEC BRAGA RAMOS ⁴, CLÁUDIO TAKAO KARIA ⁵, GRACIELE BELLON ⁶, FERDINANDO BARBOSA ⁶, RONALDO PEREIRA ANDRADE ⁷, RODOLFO GODOY ⁸

¹ Pesquisador da Embrapa Cerrados, BR 020, Km18, Caixa Postal 08223, Planaltina, DF, CEP 73301-970. e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

² Pesquisador da Embrapa Cerrados. e-mail: duarte@cpac.embrapa.br

³ Pesquisador da Embrapa Cerrados. e-mail: amabile@cpac.embrapa.br

⁴ Pesquisador da Embrapa Cerrados. e-mail: allan@cpac.embrapa.br

⁵ Pesquisador da Embrapa Cerrados. e-mail: karia@cpac.embrapa.br

⁶ Estagiários da Embrapa Cerrados.

⁷ Pesquisador da Embrapa Cerrados. e-mail: ronaldo@cpac.embrapa.br

⁸ Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste. e-mail: godoy@cppse.embrapa.br

RESUMO Uma coleção de trabalho com 18 acessos de guandu (*Cajanus cajan*), sendo 3 cultivares testemunhas, vem sendo avaliada em ensaios de Rede Nacional quanto à produção e qualidade de forragem. Para complementar tal avaliação, marcadores moleculares RAPD foram utilizados para avaliar a diversidade genética da coleção. O DNA genômico de cada acesso foi extraído e 18 primers decâmeros [OPD (4, 7, 8, 16), OPE (11, 18, 20), OPF (4, 5, 10, 12, 14), OPG (4, 8, 9, 13, 17), OPH (12)] foram utilizados para a obtenção de marcadores moleculares RAPD. Os marcadores obtidos foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os acessos e realizadas análises de agrupamento. Foram obtidos 156 marcadores, sendo que apenas 28,2% dos mesmos foram polimórficos. As distâncias genéticas entre os 18 acessos variaram entre 0,007 e 0,076. O acesso que apresentou maior média de distâncias genéticas dentro da coleção de trabalho foi o Anão. Os marcadores moleculares demonstraram uma baixa variabilidade genética da coleção de trabalho de guandu e a presença de acessos muito próximos geneticamente. Os resultados obtidos evidenciaram a necessidade de ampliar a base genética da coleção de trabalho para aumentar a chance de sucesso na seleção e no melhoramento genético.

PALAVRAS-CHAVE germoplasma, coleção de trabalho, forragem, melhoramento genético, Leguminosa Forrageira

GENETIC VARIABILITY OF PIGEON PEA (CAJANUS CAJAN) SUBSET COLLECTION USING MOLECULAR MARKERS

ABSTRACT A subset collection with 18 pigeon pea (*Cajanus cajan*) accessions, including three commercial cultivars, is under evaluation in a National Trial Network. Forage production and quality are the main characteristics evaluated. RAPD molecular markers were used to evaluate the genetic variability in this subset collection, complementing agronomic evaluations. A DNA sample of each accession was extracted and amplified using 18 decamer primers [OPD (4, 7, 8, 16), OPE (11, 18, 20), OPF (4, 5, 10, 12, 14), OPG (4, 8, 9, 13, 17), OPH (12)] to obtain RAPD molecular markers. These markers were converted into a binary matrix data to estimate genetic distances among accessions to perform cluster analysis. 156 molecular markers were obtained and only 28.2% of them showed polymorphic patterns. The genetic distances among the 18 accessions ranged from 0.007 and 0.076. The "Anão" accession presented the largest genetic distance average. The molecular markers showed the low genetic variability of the pigeon pea subset collection. There are many accessions closely related genetically. These results stress out the need to enlarge the genetic basis of this subset collection in order to increase the selection efficiency in future genetic breeding activities.

KEYWORDS germplasm, subset collection, forage, breeding program, Forage Leguminosae

INTRODUÇÃO

O guandu (*Cajanus cajan*) é uma leguminosa tropical arbustiva, muito versátil, com usos múltiplos e muito promissora para a composição de pastagens, principalmente como fonte protéica na suplementação dos animais durante o período seco (Lourenço et al., 1994; Favoretto et al., 1995). Apesar do potencial, seu uso na alimentação animal ainda é bastante restrito. Tal restrição ocorre porque os cultivares existentes foram desenvolvidos para uso como plantas anuais na adubação verde, não apresentando muitas características desejáveis de plantas forrageiras (Godoy et al., 1994). Considerando o potencial do guandu como leguminosa forrageira, a Embrapa Pecuária Sudeste e Embrapa Cerrados têm caracterizado coleções e selecionado acessos com características agrônomicas desejáveis como a alta produção e qualidade de forragem e baixo teor de taninos. Os acessos selecionados estão sendo avaliados por uma rede de instituições visando a recomendação regionalizada dos melhores acessos e o estudo da interação genótipo x ambiente. O objetivo principal dos Ensaio em Rede é selecionar acessos de guandu com alto desempenho agrônomico e adaptativo e caracterizar o germoplasma para utilização em futuros programas de seleção e melhoramento genético. Para complementar as avaliações agrônomicas, objetivou-se, neste trabalho, utilizar marcadores moleculares RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") para avaliar a variabilidade genética de uma coleção de trabalho composta por 18 acessos de guandu.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais genéticos analisados no presente trabalho foram 18 acessos de guandu, sendo três cultivares (Fava Larga, Anão e Caqui) e 11 acessos pré-selecionados com base em características morfológicas e desempenho agrônomico na Embrapa Pecuária Sudeste e quatro na Embrapa Cerrados (Tabela 1). Folhas de cada acesso foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando o método do CTAB, com modificações (Faleiro et al., 2003). Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas pela técnica de 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, MgCl₂ 3 mM, 100

uM de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 uM de um "primer" (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Para obtenção dos marcadores RAPD foram utilizados 18 "primers" decâmeros: OPD (4, 7, 8, 16), OPE (11, 18, 20), OPF (4, 5, 10, 12, 14), OPG (4, 8, 9, 13, 17), OPH (12). As amplificações 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, foi feita uma etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C, e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 ul 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, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei & Li, utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar a análise de agrupamento por métodos hierárquicos com o auxílio do Programa Statistica (Statsoft Inc., 1999). O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 18 "primers" decâmeros geraram um total de 156 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 8,7 marcadores por primer. Dos 156 marcadores, apenas 44 (28,2%) foram polimórficos. Esta porcentagem de marcadores polimórficos é bem menor que as verificadas em coleções de trabalho de outras espécies de forrageiras avaliadas na Embrapa Cerrados como "*Stylosanthes guianensis*" (89,3%), "*Arachis pintoi*" (47,8%), "*Panicum maximum*" (84,8%) e "*Penisetum purpureum*" (66,7%). A baixa média de marcadores por primer e porcentagem de marcadores polimórficos evidenciam uma baixa variabilidade genética da coleção de trabalho analisada. Esta baixa variabilidade pode ser devida ao estreitamento da base genética da coleção de trabalho devido à pré-seleção dos acessos com base em características agronômicas, principalmente relacionadas à produção de matéria seca. As distâncias genéticas entre os 18 acessos de gandu variaram entre 0,004 e 0,076 com média de apenas 0,042 (Tabela 1). Esta distância média entre os acessos é bem menor que as verificadas em coleções de trabalho de "*Stylosanthes guianensis*" (0,332), "*Arachis pintoi*" (0,111), "*Panicum maximum*" (0,283) e "*Penisetum purpureum*" (0,139). As maiores distâncias genéticas foram obtidas entre os acessos Anão e g108-99 (0,076) e entre os acessos g54-escuro e g109-99 (0,074). Chama a atenção a pequena distância genética entre os acessos Fava Larga e Caqui (0,013). O acesso que apresentou maior média de distâncias genéticas dentro da coleção de trabalho foi o Anão. A análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas evidencia o estreitamento da base genética da coleção de trabalho analisada (Figura 1). Agrupamentos de acessos muito próximos geneticamente foram formados, como aqueles ilustrados em chaves na Figura 1. Os acessos pré-selecionados na Embrapa Cerrados ficaram todos no mesmo grupo. Com base em tais agrupamentos, a coleção de 18 acessos poderia ser reduzida para 8 acessos sem uma perda significativa da variabilidade genética.

CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares demonstraram uma baixa variabilidade genética da coleção de trabalho de guandu e a presença de acessos muito próximos geneticamente. Os resultados obtidos evidenciaram a necessidade de ampliar a base genética da coleção de trabalho para aumentar a chance de sucesso na seleção e no melhoramento genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CRUZ, C.D. . Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV, 1997. 442p.
2. FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R. et al. . Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003a. (Comunicado Técnico No.92) 6p.
3. FAVORETTO, V.; PAULA, G.H.; MALHEIROS, E.B. et al. . Produção e qualidade da forragem aproveitável de cultivares de guandu durante o período seco. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.30, p. 1009-1015, 1995.
4. GODOY, R.; BATISTA, L.A.R.; NEGREIROS, G.F. . Avaliação agrônômica de guandu forrageiro ("Cajanus cajan" (L.) Millsp.). Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 23, p. 730-742, 1995.
5. LOURENÇO, A.J.; MATSUI, E.; DELISTOIANOV, J. . Composição botânica da forragem disponível e da selecionada por bovinos em pastos de capim colônio consorciado com centrosema e, ou, galactia com ou sem acesso a banco de proteína de guandu. Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 23, p. 100-109, 1994.
6. 6. STATSOFT, INC. . STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.

TABELA 1. Matriz de distâncias genéticas entre os 18 acessos de guandu, calculadas com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando 156 marcadores RAPD.

| Acessos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 g8-95 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 g19m-95 | 0,028 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 g40-95 | 0,007 | 0,020 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 g40-clara* | 0,019 | 0,012 | 0,011 | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 g40-escura* | 0,015 | 0,032 | 0,011 | 0,015 | | | | | | | | | | | | | |
| 6 g54-clara* | 0,023 | 0,008 | 0,019 | 0,004 | 0,023 | | | | | | | | | | | | |
| 7 g54-escura* | 0,029 | 0,036 | 0,017 | 0,017 | 0,021 | 0,017 | | | | | | | | | | | |
| 8 g57-95 | 0,032 | 0,039 | 0,024 | 0,020 | 0,020 | 0,024 | 0,033 | | | | | | | | | | |
| 9 g108-99 | 0,060 | 0,056 | 0,052 | 0,049 | 0,052 | 0,053 | 0,050 | 0,065 | | | | | | | | | |
| 10 g109-99 | 0,062 | 0,051 | 0,059 | 0,051 | 0,059 | 0,048 | 0,074 | 0,063 | 0,044 | | | | | | | | |
| 11 g137-99 | 0,049 | 0,060 | 0,049 | 0,053 | 0,042 | 0,053 | 0,059 | 0,065 | 0,049 | 0,033 | | | | | | | |
| 12 g138-99 | 0,055 | 0,051 | 0,052 | 0,044 | 0,052 | 0,041 | 0,058 | 0,056 | 0,044 | 0,015 | 0,019 | | | | | | |
| 13 g142-95 | 0,048 | 0,043 | 0,044 | 0,037 | 0,044 | 0,030 | 0,041 | 0,048 | 0,044 | 0,044 | 0,041 | 0,029 | | | | | |
| 14 g149-99 | 0,049 | 0,040 | 0,041 | 0,038 | 0,041 | 0,038 | 0,046 | 0,045 | 0,045 | 0,052 | 0,053 | 0,048 | 0,041 | | | | |
| 15 g186-99 | 0,044 | 0,047 | 0,037 | 0,041 | 0,037 | 0,041 | 0,049 | 0,052 | 0,048 | 0,029 | 0,030 | 0,026 | 0,033 | 0,037 | | | |
| 16 Fava Larga | 0,046 | 0,049 | 0,042 | 0,034 | 0,042 | 0,035 | 0,043 | 0,046 | 0,053 | 0,061 | 0,054 | 0,049 | 0,034 | 0,050 | 0,045 | | |
| 17 Anão | 0,061 | 0,057 | 0,053 | 0,057 | 0,050 | 0,054 | 0,059 | 0,057 | 0,076 | 0,053 | 0,042 | 0,049 | 0,049 | 0,058 | 0,049 | 0,047 | |
| 18 Caqui | 0,049 | 0,053 | 0,041 | 0,037 | 0,037 | 0,041 | 0,037 | 0,040 | 0,045 | 0,053 | 0,046 | 0,037 | 0,033 | 0,041 | 0,037 | 0,013 | 0,042 |

* Acessos pré-selecionados na Embrapa Cerrados

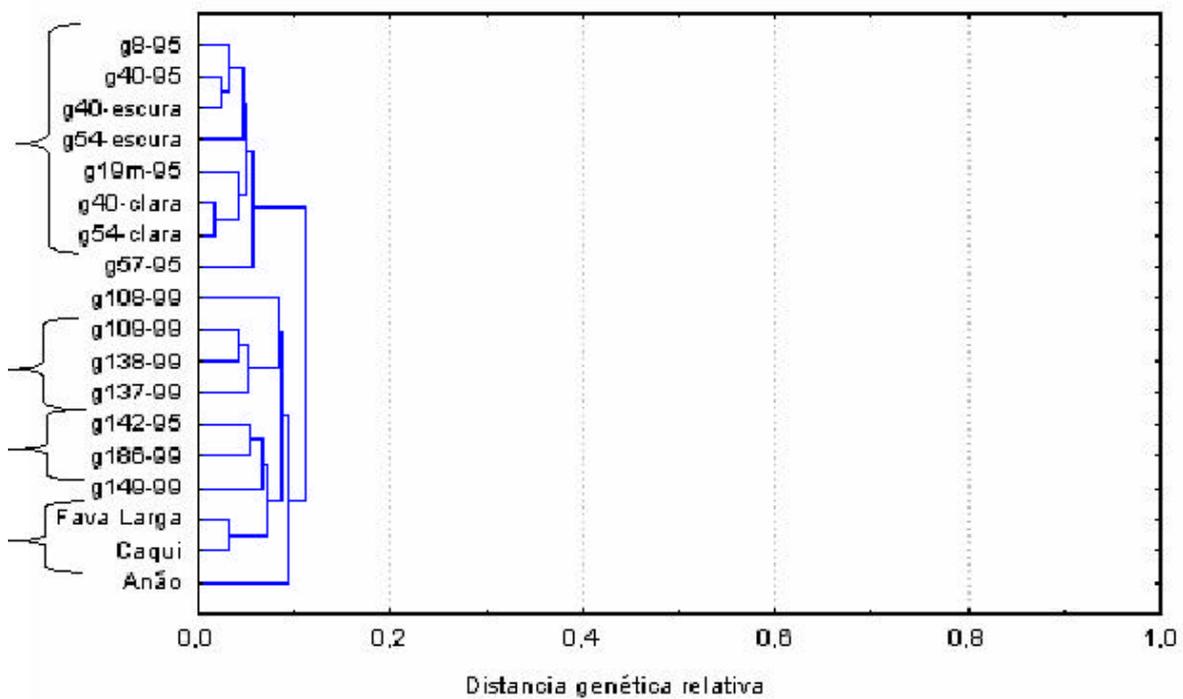


FIGURA 1. Análise de agrupamento de 18 acessos de guandu com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando 156 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. As chaves agrupam acessos extremamente próximos geneticamente.