



Variabilidade genética de acessos de guandu (*Cajanus cajan*) do programa de melhoramento genético realizado na Embrapa Cerrados com base em marcadores RAPD

Fábio Gelape Faleiro^{1*}, Renato Fernando Amabile¹, Francisco Duarte Fernandes¹, Graciele Bellon¹, Keize Pereira Junqueira¹, Rodolfo Godoy²

¹Embrapa Cerrados, Caixa Postal 08223, 73310-970, Planaltina, DF, * e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

²Embrapa Pecuária Sudeste, Caixa Postal 339, 13560-970, São Carlos, SP³

Resumo: Acessos de guandu (*Cajanus cajan*) têm sido selecionados para uso em sistemas de integração lavoura-pecuária e para a recuperação de pastagens degradada. Neste trabalho, a variabilidade genética de uma coleção de 13 acessos selecionados pelo programa de melhoramento genético realizado na Embrapa Cerrados foi analisada com base em marcadores moleculares RAPD. O DNA genômico de cada acesso foi extraído e 12 primers decâmeros [OPD (4, 10), OPE (11, 18), OPF (5, 10, 12,14), OPG (4, 8, 13, 15)] 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 um total de 155 marcadores, sendo que 82 (52,9%) deles foram polimórficos. As distâncias genéticas entre os 13 acessos variaram entre 0,019 e 0,256. A menor distância genética foi obtida entre os acessos 46-2 e 46-3 e a maior entre os acessos 40-1 e 57-4. Os marcadores moleculares demonstraram a maior base genética da coleção analisada neste trabalho em relação a outras coleções, o que é importante para aumentar a chance de sucesso na seleção em futuras atividades do melhoramento genético.

Palavras-chave: leguminosa forrageira, coleção de trabalho

Genetic variability of pigeon pea (*Cajanus cajan*) accessions from breeding program realized at Embrapa Cerrados using RAPD markers

Abstract: Pigeon pea (*Cajanus cajan*) accessions have been selected to use in crop-livestock integrated systems and to reclaim pasture degraded. In this work, the genetic variability of a collection with 13 accessions selected in Embrapa Cerrados breeding program was analyzed using RAPD molecular markers. Genomic DNA sample of each accession was extracted and 12 decamer primers [OPD (4, 10), OPE (11, 18), OPF (5, 10, 12,14), OPG (4, 8, 13, 15)] were utilized to obtain RAPD molecular markers. These markers, transformed into a binary matrix data, were used to estimate genetic distances among accessions and to perform cluster analysis. A total of 155 molecular markers were obtained and 82 (52,9%) of them were polymorphic. The genetic distances among the 13 accessions ranged from 0.0190 and 0.256. The lower genetic distance was verified between the accessions 46-2 e 46-3 and the largest between the accessions 40-1 e 57-4. The molecular markers showed the largest genetic variability of the collection analysed in this work when compared with others collections. This genetic base is important to increase the selection efficiency in future genetic breeding activities.

Keywords: forage leguminosae, subset collection

Introdução

Considerando o potencial do guandu como leguminosa forrageira, a Embrapa têm caracterizado coleções e selecionado acessos com características agrônomicas desejáveis como a alta produção e qualidade de forragem e baixo teor de taninos (Godoy, 1995). 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 potencial do guandu em sistemas de integração lavoura-pecuária e para recuperação de pastagens ainda não foi adequadamente estudado. Considerando o potencial do guandu, a análise da variabilidade genética dentro da espécie é de grande importância. Utilizando marcadores moleculares, Faleiro et al. (2005, 2006) analisaram coleções de acessos selecionados na Embrapa Cerrados e Pecuária Sudeste. Os marcadores moleculares demonstraram uma baixa variabilidade genética das coleções de trabalho de guandu e a necessidade de ampliar a base genética para aumentar a chance de sucesso na

seleção e no melhoramento genético para condições específicas de integração lavoura-pecuária e de recuperação de pastagens degradadas.

Neste sentido, foram selecionados 13 acessos dentro do programa de melhoramento genético realizado na Embrapa Cerrados. Neste trabalho, objetivou-se analisar a base genética desses acessos com base em marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Material e Métodos

Os materiais genéticos analisados no presente trabalho foram 13 acessos selecionados com base em características morfológicas e desempenho agrônomico 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 μ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50mM, MgCl₂ 3 mM, 100 μ M de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μ M de um *prime* (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 12 *primers* decâmeros: [OPD (4, 10), OPE (11, 18), OPF (5, 10, 12,14), OPG (4, 8, 13, 15)]. 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 μ l 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 dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com o auxílio do Programa SAS (SAS Institute, 1989) e Statistica (Statsoft Inc., 1999).

Resultados e Discussão

Foram obtidos e analisados 155 marcadores RAPD com a utilização dos 12 *primers* decâmeros, perfazendo uma média de 12,9 marcadores por *primer*. Esta média foi superior às obtidas nas duas coleções analisadas por Faleiro et al (2005, 2006) de 8,7 e 7,0 marcadores por *primer*, respectivamente. Esta maior média de marcadores por *primer* indica um maior número de locos e em consequência uma maior base genética. Dos 155 marcadores, 82 (52,9%) foram polimórficos. A porcentagem de marcadores polimórficos da coleção analisada neste trabalho foi superior a das coleções analisadas em 2005 e 2006 de 28,2% e de 19,4% respectivamente. Como relatado por Faleiro et al. (2005, 2006), a baixa variabilidade das coleções de guandu pode ser devida ao estreitamento da base genética da coleção de trabalho devido à pré-seleção dos acessos com base em características agrônomicas, principalmente relacionadas à produção de matéria seca.

As distâncias genéticas entre os 13 acessos de guandu variaram entre 0,019 e 0,256 (Tabela 1). A menor distância genética foi obtida entre os acessos 46-2 e 46-3. Estes dois acessos pertencem à mesma procedência. A análise de dispersão gráfica realizada com base nas distâncias genéticas evidencia uma tendência de agrupamento dos materiais de mesma procedência (Figura 1). Esta mesma análise demonstra a existência de acessos muito próximos geneticamente, o que deve ser levado em consideração na seleção e caracterização agrônomicas desses acessos, no sentido de reduzir custos experimentais e evitar desnecessário trabalho de avaliação. A maior distância genética foi verificada entre os acessos 40-1 e 57-4 de 0,256. Esta distância genética é muito superior às maiores distâncias genéticas verificadas nas coleções analisadas em 2005 e 2006 de 0,076 e 0,052, respectivamente.

Tabela 1 Matriz de distâncias entre 13 acessos de guandu, calculadas com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei & Li, utilizando-se 155 marcadores RAPD.

Acessos	40-1	40-2	46-1	46-2	46-3	46-4	54-1	54-2	57-3	57-4	120-1	120-2	120-3
1 40-1	0,000	0,169	0,183	0,190	0,192	0,192	0,204	0,254	0,250	0,256	0,248	0,249	0,249
2 40-2	0,169	0,000	0,096	0,101	0,111	0,109	0,132	0,163	0,168	0,171	0,155	0,174	0,135
3 46-1	0,183	0,096	0,000	0,038	0,061	0,063	0,072	0,112	0,111	0,138	0,114	0,122	0,148
4 46-2	0,190	0,101	0,038	0,000	0,019	0,034	0,043	0,090	0,091	0,117	0,084	0,101	0,118
5 46-3	0,192	0,111	0,061	0,019	0,000	0,023	0,033	0,091	0,077	0,091	0,069	0,092	0,102
6 46-4	0,192	0,109	0,063	0,034	0,023	0,000	0,034	0,065	0,073	0,098	0,075	0,082	0,117
7 54-1	0,204	0,132	0,072	0,043	0,033	0,034	0,000	0,057	0,048	0,067	0,040	0,055	0,091
8 54-2	0,254	0,163	0,112	0,090	0,091	0,065	0,057	0,000	0,024	0,055	0,064	0,046	0,107
9 57-3	0,250	0,168	0,111	0,091	0,077	0,073	0,048	0,024	0,000	0,050	0,036	0,051	0,087
10 57-4	0,256	0,171	0,138	0,117	0,091	0,098	0,067	0,055	0,050	0,000	0,033	0,058	0,076
11 120-1	0,248	0,155	0,114	0,084	0,069	0,075	0,040	0,064	0,036	0,033	0,000	0,033	0,052
12 120-2	0,249	0,174	0,122	0,101	0,092	0,082	0,055	0,046	0,051	0,058	0,033	0,000	0,076
13 120-3	0,249	0,135	0,148	0,118	0,102	0,117	0,091	0,107	0,087	0,076	0,052	0,076	0,000

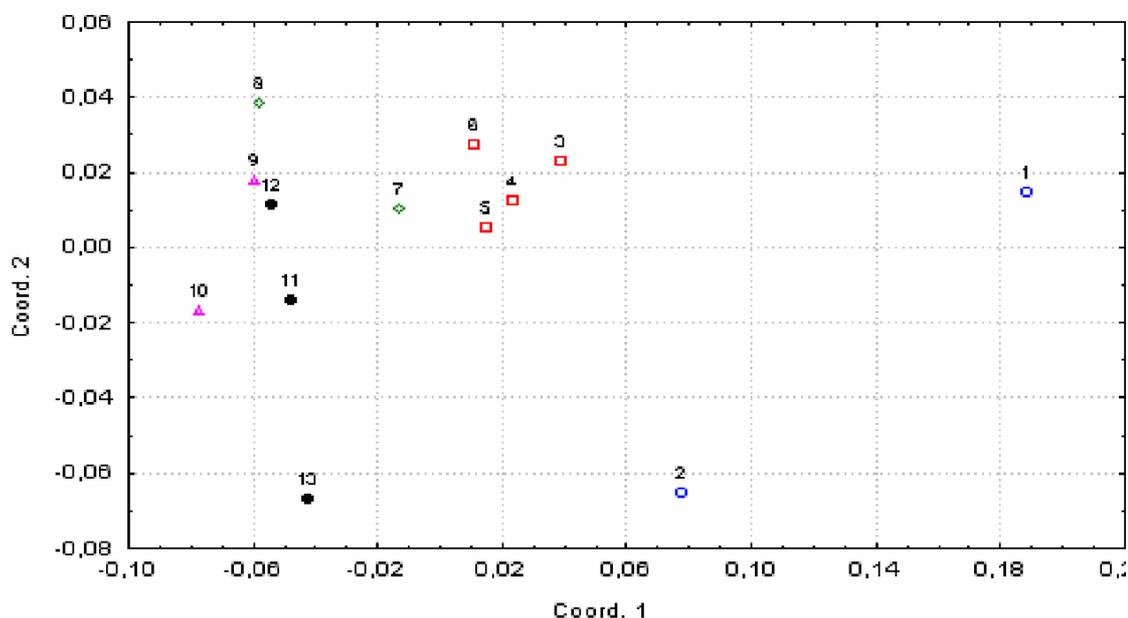


Figura 1 Análise de dispersão de 13 acessos de guandu com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 155 marcadores RAPD. Os números dos acessos são os mesmos da Tabela 1.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos, verifica-se a maior base genética da coleção dos 13 acessos de guandu selecionados dentro do programa de melhoramento genético da Embrapa Cerrados em relação a outras coleções de trabalho. Esta maior base genética será importante para selecionar acessos visando a versatilidade e o uso múltiplo do guandu em sistemas de integração lavoura-pecuária (descompactação do solo e adubo verde) e na composição e recuperação de pastagens degradadas.

Literatura citada

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, 2003. (Comunicado Técnico N°92) 6p.

FALEIRO, F.G.; FERNANDES, F.D.; AMABILE, R.F. et al. Variabilidade genética de uma coleção de trabalho de guandu (*Cajanus cajan*) com base em marcadores moleculares. In: REUNIÃO ANUAL DA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia [2005] (CD-ROM).

FALEIRO , F. G.; FERNANDES, F. D.; BARCELLOS, A. de O. et al. Análise da variabilidade genética molecular de uma coleção de trabalho de guandu (*Cajanus cajan*) como apoio na seleção de acessos para testes agronômicos em sistemas de integração lavoura-pecuária e recuperação de pastagens degradadas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa : Sociedade Brasileira de Zootecnia [2006] (CD-ROM).

GODOY, R.; BATISTA, L.A.R.; NEGREIROS, G.F. Avaliação agronômica de guandu forrageiro (“*Cajanus cajan*” (L.) Millsp.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 23, p. 730-742, 1995.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT user’s guide. Version 6**, 4 ed. SAS Institute, North Caroline, Cary. 1989.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows [Computer program manual]** Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.