

São Carlos/ Dezembro, 2023

Identificação de mistura varietal em sementes de feijão-guandu com marcadores morfológicos e moleculares

Isabela dos Santos Begnami⁽¹⁾, Wilson Malagó Júnior⁽²⁾, Rodolfo Godoy⁽³⁾, Frederico de Pina Matta⁽³⁾ e Bianca Baccili Zanotto Vigna⁽³⁾

⁽¹⁾ Bolsista PIBIC CNPq, Embrapa Pecúária Sudeste, São Carlos, SP, ⁽²⁾ Analista, Embrapa Pecúária Sudeste, São Carlos, SP, ⁽³⁾ Pesquisadores, Embrapa Pecúária Sudeste, São Carlos, SP.

Resumo – Dentre os materiais promissores do programa de melhoramento de feijão-guandu da Embrapa Pecúária Sudeste, foi identificada uma linhagem resistente aos nematóides *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus zae* e *Pratylenchus brachyurus*. Entretanto, durante o processo de sua multiplicação a campo, com base no único lote de sementes disponível, foi observada uma variação fenotípica entre as plantas. Sendo assim, esse material genético promissor poderia estar perdido, havendo a necessidade de reiniciar todo o processo de avaliações e seleções. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi diagnosticar as possíveis origens desse problema e purificar o lote. Amostras de DNA das plantas a campo foram comparadas, com base em marcadores microsatélites, às de outras seis linhagens que apresentam características morfológicas semelhantes. Foram utilizadas amostras de DNA de cada linhagem, obtidas em anos anteriores e armazenadas como backup de segurança para esse tipo de identificação. Foram realizadas as análises de similaridade genética, identificação clonal putativa e estrutura populacional. Identificou-se um provável erro de rotulagem entre linhagens com códigos semelhantes e que teria ocasionado a mistura de sementes. Com base nos marcadores morfológicos e moleculares, 42,8% das plantas foram eliminadas, mantendo as plantas que correspondiam à linhagem promissora. Esse processo foi repetido em ambiente protegido para manter a pureza genética e assegurar a identidade genética da linhagem, sendo confirmada, após novos testes, sua resistência genética aos nematóides.

Termos para indexação: *Cajanus cajan*, linhagem pura, microsatélite, qualidade genética.

Screening of varietal mixture in pigeonpea seed lot through morphological and molecular markers

Abstract – A nematode-resistant line was identified in the promising materials of the pigeonpea breeding program at Embrapa Pecúária Sudeste, exhibiting resistance to *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus zae*, and *Pratylenchus brachyurus*. However, phenotypic variation was observed between plants during the field multiplication process based on

Embrapa Pecúária Sudeste

Rod. Wasghinton Luiz, km 234
13560-970, São Carlos, SP
Fone: (16) 34115600
www.embrapa.br/pecuaria-sudeste
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente
André Luis Monteiro Novo
Secretário-executivo
Luiz Francisco Zafalon
Membros
Gisele Rosso, Mara Angélica Pedrochi, Maria Cristina Campanelli Brito, Silvia Helena Picirillo Sanchezl

Revisão de texto

Gisele Rosso
Normalização bibliográfica
Mara Angélica Pedrochi (CRB-8/6556)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio
Diagramação
Maria Cristina Campanelli Brito

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

the only seed lot available. This promising genetic material could be lost, requiring the entire evaluation and selection process to restart. Therefore, the objective of this study was to diagnose the possible causes of this problem and to purify the seed lot. DNA samples from field-grown plants were compared with those from six other lines with similar morphological characteristics, using microsatellite markers. DNA samples corresponding to each line obtained in previous years and stored as a security backup for this type of identification were also used. Genetic similarity, putative clonal identification, and population structure analyses were performed. A probable labeling error was identified between lines with similar codes, resulting in the mixing of seeds. Based on morphological and molecular markers, 42.8% of the plants were eliminated, and only those matching promising lines were retained. This process was repeated in a protected environment to maintain genetic purity and ensure the genetic identity of the line, and its genetic resistance to nematodes was confirmed after new tests.

Index terms: *Cajanus cajan*, pure line, microsatellite, genetic quality.

Introdução

O feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Huth) é uma importante leguminosa cultivada para vários propósitos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo rico em proteínas, minerais e vitaminas (Varshney et al., 2012). Suas sementes podem ser utilizadas para consumo humano, sendo a principal fonte de proteína para mais de um bilhão de pessoas, além de ser uma cultura que permite a subsistência de agricultores de baixa renda (Varshney et al., 2012). Suas folhas, vagens e sementes também podem ser utilizadas para alimentação animal (Singh et al., 2012). Além disso, a espécie apresenta vigoroso e profundo sistema radicular, o que permite uma maior resistência ao déficit hídrico, contribuindo para uma produção satisfatória durante a seca e penetrar camadas subsuperficiais adensadas do solo, possibilitando a sua utilização como biodescompactador (Seifert; Thiago, 1983; Rodrigues et al., 2004; Souza et al., 2007; Godoy et al., 2009). Somadas a estas características, apresenta a capacidade de interação com bactérias fixadoras de nitrogênio, as quais possibilitam trazer grandes benefícios ao sistema de produção por meio da recuperação sustentável de pastagens degradadas, que causam graves prejuízos econômicos, ambientais e sociais

(Oliveira, 2007; Oliveira et al., 2015). São estimados que mais de 50% das áreas de pastagens do Brasil apresentam algum grau de degradação (PROJETO, 2023), o que torna sua recuperação estratégica para o país.

Os esforços para o avanço do melhoramento genético do feijão guandu vêm tendo considerável sucesso. Na Índia, por exemplo, mais de 140 cultivares foram desenvolvidas nas últimas cinco décadas (Bohra et al., 2020). No Brasil, existem 14 cultivares registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2023).

O sistema reprodutivo da espécie é considerado misto, visto que sua polinização cruzada pode variar de 0 a 60%, o que permite o desenvolvimento de linhagens puras e também de híbridos (Sultana; Saxena, 2019). Para manter a pureza das sementes das linhagens são necessários cuidados especiais que promovam a autopolinização, como a distância de isolamento, áreas à prova de insetos, o uso de *roguing* e operações de beneficiamento de sementes (Venkata et al., 2019).

Uma nova cultivar deve apresentar descritores morfológicos conhecidos, ser distinguível de outras cultivares, homogênea quanto às suas características em cada ciclo reprodutivo e estável quanto à repetição das mesmas características ao longo de gerações sucessivas (Brasil, 1997).

Uma linhagem promissora proveniente do programa de melhoramento genético de guandu da Embrapa Pecuária Sudeste tem como principal característica a resistência aos nematóides *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus zaei* e *Pratylenchus brachyurus*. Entretanto, em 2019, foi identificada uma variação fenotípica entre as plantas no campo de multiplicação de sementes genéticas dessa linhagem. As plantas apresentaram características morfológicas e de sementes semelhantes entre si, exceto pela cor das vagens, pois enquanto a linhagem promissora possui vagens rajadas, foram observadas plantas do lote com vagens verdes lisas. Essa multiplicação de sementes foi realizada a partir de uma amostra do último lote de sementes genéticas disponível, o qual era considerado, até então, como a linhagem pura original. A dúvida era se esse lote se tratava de uma mistura mecânica de diferentes materiais ou se era proveniente de cruzamentos. Neste último caso, todo o processo de avaliação e seleção deveria ser repetido, acarretando em grande atraso e prejuízo ao programa de melhoramento.

A mistura varietal é uma característica que pode existir em um lote de sementes contaminado por outros materiais genéticos e que causa perda

de pureza, a qual pode ser avaliada por meio de marcadores morfológicos e moleculares (Schuster et al., 2004). Testes de pureza podem ser feitos exclusivamente por aspectos morfológicos como o 'Grow Out Test' para arroz (Kumar et al., 2015), que depende do crescimento das plantas ou da qualidade física das sementes (Frandoloso et al., 2015). Em casos de grande semelhança morfológica entre materiais genéticos distintos, os marcadores moleculares são considerados uma ótima ferramenta para diferenciação e identificação genética.

O objetivo do trabalho foi diagnosticar as possíveis origens desse problema, identificando se as plantas observadas são parte de uma população segregante, oriundas de cruzamentos indesejados por insetos ocorridos a campo durante a multiplicação anterior, ou se trata de uma mistura mecânica entre diferentes materiais genéticos.

Material e métodos

Linhagens estudadas

Além da linhagem promissora g66-95, outras seis linhagens de feijão guandu (g6-95, g10-94, g48-95, g59-95, g123-99 e g167-97) da Embrapa Pecuária Sudeste foram selecionadas para a análise devido à semelhança de coloração de suas sementes e algumas características morfológicas de suas plantas e, no caso da linhagem g6-95, pela semelhança no nome (Tabela 1). Amostras de DNA das mesmas linhagens, obtidas em 2008, foram utilizadas como material de referência (Sousa et al., 2011), para evitar a análise de uma amostra atual, com a existência de uma possível mistura varietal. Os DNAs foram obtidos das folhas destas linhagens, que estavam conservadas a -20 °C em tubo falcon, liofilizadas e guardadas desde a sua coleta. Como o programa trabalha com linhagens, todas as gerações de autofecundação e de multiplicação de sementes são realizadas em isolamento físico (telados mantidos fechados para impedir a entrada de polinizadores) ou espacial (a campo em áreas isoladas de guandu para impedir polinização cruzada).

Caracterização molecular

Folhas jovens de todas as plantas da mistura varietal foram coletadas e, em conjunto com as amostras das linhagens, tiveram seu DNA genômico total extraído pelo método CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio). A concentração de DNA foi

determinada com o Espectrofotômetro NanoDrop ND1000 e a qualidade das amostras foi avaliada aplicando 1 µg de DNA em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para possibilitar a visualização em luz UV com o Molecular Imager Gel Doc XR+ Imaging System (Bio-Rad).

Treze marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR) foram selecionados a partir de Sousa et al. (2011, Tabela 2). A amplificação e a genotipagem foram também realizadas de acordo com esse trabalho prévio.

Identificação da possível origem dos contaminantes

Para tentar identificar a potencial origem dos contaminantes da mistura, 24 plantas com vagens rajadas e 24 plantas com vagens verdes lisas foram analisadas com 13 marcadores SSR, juntamente com as linhagens selecionadas (54 amostras no total). Isso para garantir a observação de uma possível variação entre as plantas com o mesmo padrão de vagem. Foram identificados os clones putativos, ou seja, indivíduos com perfil alélico idêntico, a partir de uma análise de genótipos multilocos repetidos utilizando o software GenAEx 6.503 (Peakall; Smouse, 2012).

A similaridade genética entre as 48 amostras e as linhagens selecionadas foi estimada usando o coeficiente de Jaccard, baseado na presença ou ausência dos alelos organizados em uma matriz binária, e um dendrograma foi gerado com o método UPGMA (do inglês Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), ambos a partir do software NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 2000). Nessa análise, amostras da linhagem g66-95, obtidas em 2008, foram incluídas em duplicata.

O programa Structure 2.3.4 (Hubisz et al., 2009) foi utilizado para identificar a estrutura populacional das amostras baseada nas estatísticas Bayesianas. Já o modelo 'admixture' foi escolhido para considerar a possibilidade de cruzamento entre as amostras. O período de 'burn-in' foi fixado em 500.000 e o MCMC (Cadeia de Markov Monte Carlo) em 1.000.000 para que os resultados obtidos sejam consistentes. Os valores de K variaram de 1 a 6 e foram estimados de acordo com o número de grupos identificados no dendrograma UPGMA, com 10 corridas independentes para cada K. O Structure Harvester (Earl; Vonholdt, 2012) foi usado para aferir o melhor K baseado em Evanno; Regnaut; Goudet (2005). Por fim, o *Pophelper* (Francis, 2017) foi escolhido para gerar um gráfico de barras para melhor visualização e customização dos resultados a partir dos dados obtidos pelo Structure. As cores foram editadas no programa CorelDraw.

Tabela 1. Características das linhagens de feijão-guandu avaliadas nesse trabalho.

Linhagem	Ref.	Semente				Vagem			
		Padrão de cor	Cor básica	Cor secundária	Cor ao redor do hilo	Formato	Cor imatura	Cor madura	Critério de seleção
Godoy et al. 2003*		liso	grupo marrom avermelhado 200D	-	grupo marrom avermelhado 200D	quadrada	verde	palha com pontos pretos próximo à linha de sutura e pequenas manchas violetas	altas chances de erro de rotulagem, semente marrom e cor de vagem imatura lisa
		pintado	grupo marrom avermelhado 200D	marrom claro (grupo amarelo-laranja 22C)	grupo marrom avermelhado 200D	quadrada	roxo escuro com listras verdes	palha com listras roxas	cor de vagem imatura rajada e semente marrom e laranja
		pintado	marrom claro (grupo amarelo-laranja 22C)	grupo marrom avermelhado 200D	grupo marrom avermelhado 200D	alongada	verde com listras violeta escuro	marrom com listras violeta	cor de vagem imatura rajada e semente marrom e laranja
Provazi et al. 2007**		manchada	grupo laranja acinzentado 164 ^a	grupo laranja acinzentado 166A	grupo branco 155A	quadrada	grupo verde 143C com listras grupo verde 143A	grupo amarelo acinzentado 161A com pontos grupo marrom 200A	cor de vagem imatura rajada e semente laranja
		manchada	grupo laranja acinzentado 173C	grupo laranja acinzentado 174C	grupo branco 155B	quadrada	grupo verde amarelo 146C com listras grupo roxo acinzentadas 187A	grupo amarelo acinzentado 161A com listras grupo laranja acinzentado 176A	cor de vagem imatura rajada e semente laranja
		manchada	grupo laranja acinzentado 166 ^a	grupo laranja acinzentado 166D	grupo branco 155D	redonda	grupo verde amarelo 144A	grupo laranja acinzentado 199C	cor de vagem imatura lisa e semente laranja
		manchada e pintada	grupo laranja acinzentado N167C	grupo laranja acinzentado 166B	grupo branco 155C	redonda	grupo verde amarelo 144A	grupo laranja acinzentado 164A	cor de vagem imatura lisa e semente laranja

* coloração das sementes baseada em Wilson (1938 citado por Godoy et al., 2003).

** cores baseadas em RHS (2001 apud Provazi et al., 2007).

Tabela 2. Descrição dos marcadores microssatélites e parâmetros calculados baseado na mistura varietal das plantas e linhagens avaliadas.

GenBank Acesso nº	Referência	Motivo	Tamanho do Fragmento (pb)	Alelos por loco	Alelos por individuo	Polimorfismo (S/N)
CZ445540	Odeny et al. (2007)	(GGT)4	218-221	2	2	N
AJ306901	Burns et al. (2001)	(CA)10	209-211	2	1-2	S
AJ312887	Burns et al. (2001)	(CA)21	166-172	4	1-2	S
AJ312894	Burns et al. (2001)	(CT)22	169-184	4	1-2	S
CZ682017	Burns et al. (2001)	(CA)15	249-261	2	1	S
CZ681930	Odeny et al. (2007)	(TC)8	170	1	1	N
CZ445531	Odeny et al. (2007)	(TA)11	265	1	1	N
AJ312892	Burns et al. (2001)	(CT)16	168-178	3	1-2	S
AJ312893	Burns et al. (2001)	(CT)10	136-150	2	1-2	S

Confirmação da identidade das plantas produtoras de sementes

Foram obtidas 308 plantas no total, as quais tiveram folhas jovens coletadas e DNA extraído. A partir de marcadores morfológicos, como coloração das flores e das vagens (Tabela 1), as plantas que diferiam da descrição original da linhagem g66-95 foram eliminadas. Nesta fenotipagem foram observadas a morfologia da planta e a cor das flores, vagens e das sementes de cada planta ao longo de seu desenvolvimento.

Dos 13 marcadores testados inicialmente, quatro foram selecionados por diferenciarem as linhagens g6-95 e g66-95 e avaliados nesta etapa (AJ312894, AJ312895, CZ681938a e CZ682017a). A análise foi realizada comparando os alelos dessas plantas com a das linhagens originais, sendo consideradas contaminantes as que apresentavam pelo menos um alelo correspondente à linhagem g6-95.

Por fim, para confirmar a resistência da linhagem promissora aos nematóides *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus zaeae* e *Pratylenchus brachyurus*, testes de resistência foram realizados, um na Aprosmat (Associação dos produtores de sementes de Mato Grosso) e outro na empresa Agronema (Análise, Consultoria e Experimentação Nematológicas), de acordo com metodologia descrita por Queiróz et al. (2014).

Resultados e discussão

Identificação da origem da mistura varietal

A partir dos 13 marcadores SSR avaliados, nove apresentaram perfil eletroforético nítido, tendo sido identificados 21 alelos nas 54 amostras. O número de alelos por loco variou de um a quatro, com uma média de 2,33 alelos/loco (Tabela 2). Todas as plantas com vagens rajadas apresentaram exatamente os mesmos alelos da amostra original da linhagem promissora (g66-95), com uma variação alélica entre algumas plantas no loco AJ306901 que resultou em dois grupos de clones (Tabela 3), um com oito plantas e outro com dezesseis. Nesse loco, o material original, considerado como a linhagem g66-95, apresentou-se heterozigoto, enquanto as demais oito plantas foram consideradas homozigotas para um dos alelos e as dezesseis para o outro alelo. As 24 plantas com vagem verde são clones (Tabela 3) e diferem da linhagem g6-95 apenas em um alelo no loco AJ312892 dentre todos os analisados.

Dado que a manipulação da linhagem e sua produção de sementes genéticas foram conduzidas sempre em isolamento físico ou espacial para impedir polinização cruzada entre materiais, a diferença de um alelo entre a linhagem g6-95 e as 24 plantas de vagem lisa avaliadas pode ser explicada pela segregação desses alelos, ou seja, a linhagem fixou

Tabela 3. Clones putativos identificados entre as plantas avaliadas.

Clones	Quantidade de Indivíduos	Genótipo	Freq. (pi)	-pi Log(pi)
Todas as plantas de vagem verde	24	218221211211168172182184249249170170265265168168136136g	0,429	0,363
Plantas com vagem rajada (1, 2, 6, 9, 11, 14, 16, 17)	8	218221209209166170169171261261170170265265174174136150g	0,143	0,278
Plantas com vagem rajada (3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24)	16	218221211211166170169171261261170170265265174174136150g	0,286	0,358
Duas amostras de g66-95	2	218221209211166170169171261261170170265265174174136150g	0,036	0,119
g48-95	1	218221211211168172169171249249170170265265168168136136g	0,018	0,072
g167-97	1	218221211211168172169171261261170170265265174174150150g	0,018	0,072
g59-95 e g10-94	2	218221211211168172169171249249170170265265174174136136g	0,036	0,119
g123-99	1	218221211211168172169171261261170170265265174178136150g	0,018	0,072
g6-95	1	218221211211168172182184249249170170265265174174136136g	0,018	0,072

apenas um deles. O mesmo pode ser concluído para os dois grupos de vagens rajadas, mas, nesse caso, a g66-95, em 2008, tinha originalmente os dois alelos enquanto que, atualmente, as plantas permaneceram com apenas um deles.

Os outros quatro marcadores não apresentaram perfil eletroforético nítido e, portanto, não foram considerados para as análises (AJ306901, AJ312887, AJ312892 e AJ312893). Os marcadores AJ312887 e AJ312894 foram os mais informativos na avaliação das plantas e os marcadores CZ445540, CZ682017 e CZ681930 foram identificados como monomórficos, ou seja, não puderam diferenciar os genótipos (Tabela 2).

O dendrograma de similaridade genética (Figura 1) sugeriu que as amostras com vagens rajadas são geneticamente semelhantes ao DNA coletado em 2008 da linhagem g66-95 (aproximadamente 87%), enquanto as amostras de vagens verdes estão mais próximas da linhagem g6-95 (85%). Essa diferença se deve pela segregação dos alelos detalhada acima, visto que não existe nenhum alelo externo inédito nos agrupamentos com as mesmas características. Isto significa que as plantas não foram geradas por um cruzamento entre diferentes linhagens. Portanto, a contaminação do lote de sementes da linhagem promissora foi proveniente de uma mistura mecânica. Possivelmente, as sementes da linhagem g6-95, devido a um problema de rotulagem incorreta, foram incorporadas à

g66-95. As vagens rajadas foram divididas em dois grupos diferentes, provavelmente, devido à variação alélica presente no marcador AJ306901.

Para a análise populacional, $K = 2$ foi o melhor resultado encontrado, pois revelou o maior delta K (Figura 2A). No entanto, os resultados de $K = 3$ e $K = 4$ também condizem com o significado biológico, já que representa a diferença alélica em um marcador nas plantas com vagem rajada, e os "pools" alélicos encontrados estão de acordo com as análises anteriores de similaridade e clones (Figuras 2B e 2C). Em uma análise de estrutura populacional, um indivíduo pertence a um cluster quando apresenta pelo menos 50% desse genótipo.

Para $K = 2$ (Figura 2A) existe um agrupamento entre as vagens rajadas e as linhagens g66-95, g167-97, g123-99, e o outro entre as vagens verdes e as demais linhagens. Já no gráfico de $K = 3$ (Figura 2B) há um pequeno agrupamento com as linhagens g10-94, g59-95, g123-99 e g167-97, um outro que contém as plantas de vagem verde e as linhagens g6-95 e g48-95 e um terceiro conjunto com as plantas de vagem rajadas e a linhagem g66-95, composto pelos mesmos dois pools de genes do primeiro cluster, mas em uma proporção diferente. Com $K = 4$ é possível verificar a diferença alélica entre as vagens rajadas, pois enquanto os oito clones putativos são formados principalmente pelo pool gênico de cor mais

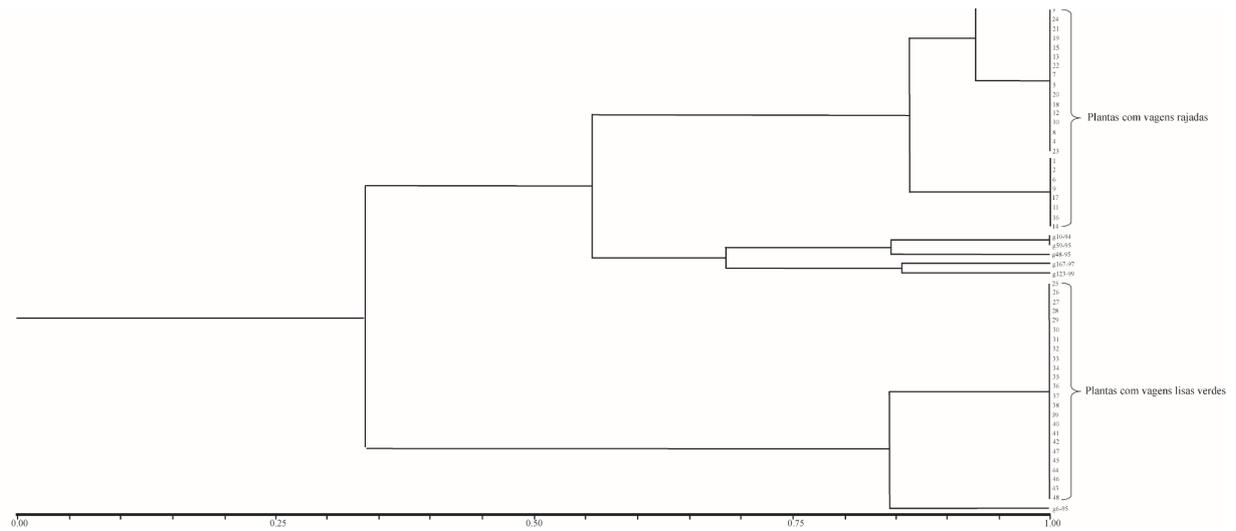


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética UPGMA baseado na avaliação por SSR das amostras.

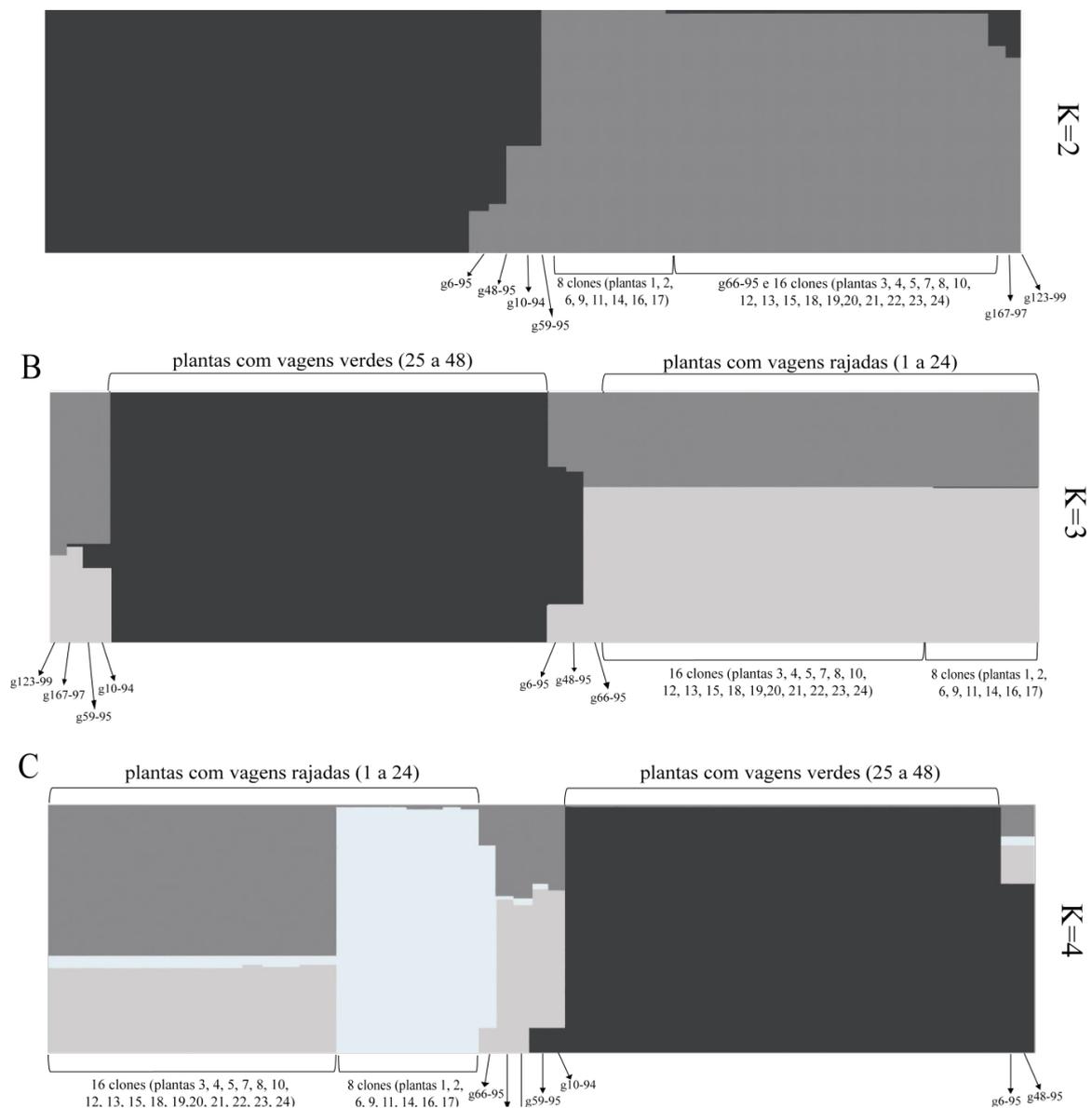


Figura 2. Estrutura populacional estimada nas análises das amostras de feijão-guandu com K = 2 (A); K = 3 (B); K = 4 (C).

clara, os outros 16 clones estão agrupados com a linhagem g66-95 (Figura 2C). As plantas de vagem verde estão no mesmo “cluster” do g6-95. Pode-se observar que a estrutura populacional com $K = 4$ coincide com o agrupamento de similaridade genética do dendrograma UPGMA, como observado anteriormente para outras espécies (Pramanik et al., 2019).

A identificação tardia de erros de rotulagem em programas de melhoramento de plantas pode resultar em soluções demoradas e custos desnecessários, especialmente quando cultivares são desenvolvidas para programas futuros (Muhammad et al., 2017). A identificação tardia de erros de rotulagem em programas de melhoramento de plantas pode resultar em soluções demoradas e custos desnecessários, especialmente quando cultivares são desenvolvidas para programas futuros (Muhammad et al., 2017).

Confirmação da identidade das plantas produtoras de sementes

Das 308 plantas obtidas no total, sete foram excluídas por marcadores morfológicos e, no fim, 301 prosseguiram para as análises moleculares. Foram identificadas 41 plantas contaminantes (13,6%), uma taxa de contaminação importante, considerando tratar-se de uma linhagem. Os marcadores moleculares do tipo microsatélite se apresentaram como uma ótima ferramenta para identificação dos contaminantes, assim como já relatados em estudos de análise de pureza genética em lotes de sementes de soja (Schuster et al., 2004) e milho (Ramos et al., 2006).

Embora a morfologia das vagens seja diferente entre as linhagens da mistura varietal, as sementes são muito semelhantes (Tabela 1) e não permitiram a identificação da mistura. A cor e o padrão da vagem foram determinantes para a identificação

Tabela 4. Valores de fator de reprodução (FR) de espécies de nematoides na linhagem g66-95 de guandu e culturas de referência (boas ou más hospedeiras) para cada espécie de nematoide.

Local	Nematoide	Tratamento	Fator de reprodução
Agronema*	<i>Meloidogyne incognita</i>	linhagem g66-95	0,04
		Soja Fibra***	2,07
	<i>Meloidogyne javanica</i>	linhagem g66-95	0,15
		Soja Fibra***	327,57
	<i>Pratylenchus brachyurus</i>	linhagem g66-95	0,60
		Soja Fibra***	4,74
Aprosmat**	<i>Pratylenchus zaei</i>	linhagem g66-95	0,07
		Milho Balu 787***	10,76
	<i>Meloidogyne incognita</i>	linhagem g66-95	0,60
		<i>Crotalaria spectabilis</i> ****	0,10
	<i>Meloidogyne javanica</i>	linhagem g66-95	0,20
		<i>Crotalaria spectabilis</i> ****	0
<i>Pratylenchus brachyurus</i>	linhagem g66-95	0,30	
	<i>Crotalaria spectabilis</i> ****	0,10	
<i>Pratylenchus zaei</i>	linhagem g66-95	0,10	
	<i>Crotalaria spectabilis</i> ****	0	

*Avaliados aos 72 dias após a inoculação (*Meloidogyne* spp.) e 79 dias após a inoculação (*Pratylenchus* spp.).

**Avaliados aos 60 dias após a inoculação, exceto para *P. zaei* (80 dias).

*** planta má hospedeira.

**** planta boa hospedeira.

morfológica dos contaminantes e sua eliminação. No total, 91 plantas foram eliminadas por morfologia e 41 pelos marcadores SSR. Assim, houve a eliminação de 132 plantas (42,8%), indicando a complementaridade das técnicas para atingir os objetivos com sucesso. Esse trabalho teve aplicação direta no programa de melhoramento de feijão-guandu da Embrapa Pecuária Sudeste, visto que foi possível identificar as plantas contaminantes e, com a sua retirada do lote, a pureza aumentou significativamente.

O lote, após a retirada dos contaminantes, foi submetido à avaliação com as quatro espécies de nematoides em que o material original se mostrou resistente. Os resultados são apresentados na Tabela 4. Os fatores de reprodução (FR) dos nematoides foram iguais ou muito próximos de zero em todas as avaliações, demonstrando a manutenção da resistência da linhagem aos nematoides avaliados.

Dessa forma, ao final da seleção com base nos marcadores morfológicos e moleculares, as progênies das plantas selecionadas demonstraram-se uniformes e resistentes às três espécies de nematoides, mantendo sua principal característica.

Conclusões

- 1) A combinação de marcadores morfológicos e moleculares permite a identificação da origem da contaminação do lote de sementes genéticas da linhagem promissora g66-95 de feijão-guandu como sendo um erro de rotulagem entre a mesma e a linhagem g6-95.
- 2) A eliminação das plantas contaminantes estabelece uma maior pureza das sementes genéticas e traz maior segurança para o seu lançamento como nova cultivar.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa ISB (#166555/2019-3). À Embrapa e à Unipasto (Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras) pelo financiamento e à empresa Sementes Facholi pela identificação da contaminação e colaboração com a pesquisa.

Referências

- BOHRA, A.; SAXENA, K. B.; VARSHNEY, R. K.; SAXENA, R. K. Genomics-assisted breeding for pigeonpea improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 133, p. 1721-1737, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03563-7>.
- BRASIL. Lei n. 9.456, de 25 de abril de 1997. Lei de Proteção de Cultivares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 abr. 1997. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Registro Nacional de Cultivares. 2023. Disponível em: http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php. Acesso em: 14 abr. 2023.
- BURNS, M. J.; EDWARDS, K. J.; NEWBURY, H. J.; FORD-LLOYD, B.V.; BAGGOTT, C. D. Development of simple sequence repeat (SSR) markers for the assessment of gene flow and genetic diversity in pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Molecular Ecology**, v. 1, p. 283-285, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00109.x>.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.
- EVANNO, G; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
- FRANCIS, R. M. POPHELPER: An R package and web app to analyze and visualize population structure. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 1, p. 27-32, jan. 2017. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12509>.
- FRANDOLOSO, V.; MENEGHELLO, G. E.; CASTELLANOS, C. I. S.; TILLMANN, M. A. A.; DEUNER, C. Physical and sanitary quality of soybean seeds produced in the state of Santa Catarina. **Ciências Agrárias**, v. 36, n. 4, p. 2515-2526, 2015. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n4p2515>.
- GODOY, R.; BACCHI, O. O. S.; MOREIRA, F. A.; REICHARDT, K. Evaluation of Pigeon Pea lines for biological soil decompaction. **International Journal of Agronomy**, v. 2009, 609717, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/609717>.

- GODOY, R.; BATISTA, L. A. R.; SOUZA, F. H. D. de; PRIMAVESI, A. C. P. de A. Caracterização de linhagens puras selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 3, p. 546-555, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000300006>.
- HUBISZ, M. J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 1322–1332, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>.
- KUMAR, R.; KUMAR, P.; SHARMA, V. K.; KUMARI, R.; NEHA K. Genetic purity assessment of rice varieties using microsatellite markers. **International Journal of Agriculture Sciences**, v. 7, n. 7, p. 581-586, 2015.
- MUHAMMAD, A. J.; ABDULLAH, M. Z.; MUHAMMAD, N.; RATNAM, N. Detecting mislabeling and identifying unique progeny in Acacia mapping population using SNP markers. **Journal of Forestry Research**, v. 28, p. 1119–1127, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11676-017-0405-8>
- ODENY, D. A.; JAYASHREE, B.; FERGUSON, M.; HOISINGTON, D.; CROUCH, J.; GEBHARDT, C. C. Development, characterization and utilization of microsatellite markers in pigeonpea. **Plant Breeding**, v. 126, p. 130-136, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01324.x>.
- OLIVEIRA, P. P. A. 2007. Recuperação e reforma de pastagens. In: PEDREIRA, C. G. S.; MOURA, J. C. de; SILVA, S. C. da; FARIA, V. P. de. (Ed.). SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 24., 2007, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2007. p. 39-73.
- OLIVEIRA, P. P. A.; RODRIGUES, P. H. M.; AZENHA, M. V.; LEMES, A. P.; SAKAMOTO, L. S.; CORTE, R. U.; PRAES, M. F. F. M. Emissões de GEEs e amônia em sistemas pastoris: mitigação e boas práticas de manejo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 27., Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2015. p. 179-223.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, oct. 2012. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- PRAMANIK, A.; TIWARI, S.; TOMAR, R. S.; TRIPATHI, M. K.; SINGH, A. K. Molecular characterization of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm lines and varietal set for yield and yield attributing traits. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 79, n. 1, p. 56-65, 2019. <https://doi.org/10.31742/IJGPB.79.1.8>
- PROJETO MAPBIOMAS – Coleção v.8.0 da Série Anual de Mapas da Cobertura e Uso do Solo no Brasil. 2023. Disponível em: <https://plataforma.brasil.mapbiomas.org/pastagem>. Acesso em: 14 set. 2023. <https://doi.org/10.58053/MapBiomias/VJIJCL>.
- PROVAZI, M.; CAMARGO, L. H. G. de; SANTOS, P. M.; GODOY, R. Descrição botânica de linhagens puras selecionadas de guandu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 328-334, abr. 2007. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007000200008>.
- QUEIRÓZ, C. A.; FERNANDES, C. D.; VERZIGNASSI, J. R.; VALLE, C. B. DO; JANK, L.; MALLMANN, G.; BATISTA, M. V. Reação de acessos e cultivares de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum* à *Pratylenchus brachyurus*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 3, p. 226-230, set. 2014.
- RAMOS, N. P.; BRUNELLI, K. R.; CAMARGO, L. E. A.; MARCOS FILHO, J. Sensibilidade dos microssatélites para determinar a pureza varietal em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 99-105, 2006.
- RHS colour chart. London: The Royal horticultural Society, 2001. In: PROVAZI, M.; CAMARGO, L. H. G. de; SANTOS, P. M.; GODOY, R. Descrição botânica de linhagens puras selecionadas de guandu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 328-334, abr. 2007. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007000200008>.
- RODRIGUES, A. de A.; SANTOS, P. M.; GODOY, R.; NUSSIO, C. M. B. **Utilização de guandu na alimentação de novilhas leiteiras**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2004. 8 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Circular técnica, 34).
- ROHLF, F. J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. **Exeter Publishing Setauket**, 2000.
- SCHUSTER, I.; QUEIROZ, V. T. de; TEIXEIRA, A. I.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 3, p. 247-253, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004000300007>.
- SEIFERT, N. F.; THIAGO, L. R. L. S. **Legumineira: cultura forrageira para produção de proteína**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1983. 52 p. (EMBRAPA-CNPGC. Circular Técnica, 13).

- SINGH, N. K.; GUPTA, D. K.; JAYASWAL, P. K.; MAHATO, A. K.; DUTTA, S.; SINGH, S.; BHUTANI, S.; DOGRA, V.; SINGH, B. P.; KUMAWAT, G.; PAL, J. K.; PANDIT, A.; SINGH, A.; RAWAL, H.; KUMAR, A.; PRASHAT, G. R.; KHARE, A.; YADAV, R.; RAJE, R. S.; SINGH, M. N.; DATTA, S.; FAKRUDIN, B.; WANJARI, K. B.; KANSAL, R.; DASH, P. D.; JAIN, P. K.; BHATTACHARYA, R.; GAIKWAD, K.; MOHAPATRA, T.; SRINIVASAN, R.; SHARMA, T. R. The first draft of the pigeonpea genome sequence. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 21, p. 98–112, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0088-8>
- SOUSA, A. C. B.; GODOY, R.; SFORÇAL, D.; CAMPOS, T. de.; ZUCCHI, M. I.; JANK, L.; SOUZA, A.P. de. Genetic diversity analysis among pigeonpea genotypes adapted to South American regions based on microsatellite markers. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 4, p. 431- 439, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000400007>.
- SOUZA, F. H. D. de; FRIGERI, T.; MOREIRA, A.; GODOY, R. **Produção de sementes de guandu**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 68 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 69).
- SULTANA, R.; SAXENA, K. B. Natural cross-pollination is both a boon and bane for pigeonpea breeders. **Legume Research**, v. 44, n. 5, p. 493-500, 2019. DOI 10.18805/LR-4115.
- VARSHNEY, R. K.; CHEN, W.; LI, Y.; BHARTI, A. K.; SAXENA, R. K.; SCHLUETER, J. A.; DONOGHUE, M. T. A.; AZAM, S.; FAN, G.; WHALEY, A. M.; FARMER, A. D.; SHERIDAN, J.; IWATA, A.; TUTEJA, R.; PENMETSA, R. V.; WU, W.; UPADHYAYA, H. D.; YANG, S.-P.; SHAH, T.; SAXENA, K. B.; MICHAEL, T.; McCOMBIE, W. R.; YANG, B.; ZHANG, G.; YANG, H.; WANG, J.; SPILLANE, C.; COOK, D. R.; MAY, G. D.; JACKSON, S. A. Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 83-89, 2012. <https://doi.org/10.1038/nbt.2022>.
- VENKATA, S. K. C.; RAMA, G. R. N. V. P.; SAXENA, R. K.; SAXENA, K.; UPADHYAYA, H. D.; SIAMBI, M.; SILIM, S. N.; REDDY, K. N.; HINGANE, A. J.; SHARMA, M.; SHARMA, S.; LYIMO, S. D.; UBWE, R.; MAKENGE, M.; GAD, K.; KIMURTO, P. K.; AMANE, M.; KANENGA, K.; OBONG, Y.; MONVO, E.; OJIEWO, C.; VENKATA, N. K. M.; RAO, J. P.; LAKKIREDDY, P.; CHOURAT, S.; SINGH, I.; SAIJA, S.; BELIAPPA, S. H.; VARSHNEY, R. K. Pigeonpea improvement: an amalgam of breeding and genomic research. **Plant Breeding**, v. 138, n. 4, p. 445-454, aug. 2019. <https://doi.org/10.1111/pbr.12656>.
- WILSON, R. F. Horticultural colour chart II. [London]: British Colour Council, 1938. v. 2. In: GODOY, R.; BATISTA, L. A. R.; SOUZA, F. H. D. de; PRIMAVESI, A. C. P. de A. Caracterização de linhagens puras selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 3, p. 546-555, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000300006>.