VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA COLEÇÃO DE TRABALHO DE CAPIM-ELEFANTE *Pennisetum purpureum* COM BASE EM MARCADORES RAPD

Fábio Gelape Faleiro[1*], Francisco Duarte Fernandes[1], Geraldo Bueno Martha Júnior[1], Allan Kardec Braga Ramos[1], Graciele Bellon[1], Cláudio Takao Karia[1], Ronaldo Pereira de Andrade[1], Silvana Dias de Oliveira[1], Francisco José da Silva Lédo[2], Antônio Vander Pereira[2]

[1]Embrapa Cerrados, CP 08223, 73310-970 Planaltina-DF; [2]Embrapa Gado de Leite
*e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma das mais importantes forrageiras, sendo cultivado em quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, devido ao seu elevado potencial de produção de matéria seca, qualidade, palatabilidade, vigor e persistência (Pereira et al., 2001). Apesar da importância econômica e seu uso na formação de capineiras e em sistemas de pastejo rotativo, o número de cultivares disponíveis é pequeno e muitas apresentam problemas agronômicos como a concentração da produção de forragem no período de verão, suscetibilidade à cigarrinha das pastagens e baixa produtividade, resultante da utilização de cultivares pouco adaptadas a um determinado ambiente.

Diante do problema, a Embrapa Gado de Leite tem desenvolvido um programa de melhoramento genético do capim-elefante com a pré-seleção de clones promissores que estão sendo avaliados pela Rede Nacional de Ensaios de Capim-Elefante (RENACE), a qual envolve 12 instituições (Lédo et al., 2005). O objetivo principal dos Ensaios em Rede é selecionar clones com alto desempenho agronômico e adaptativo visando a recomendação regionalizada e a utilização em futuros programas de seleção e melhoramento genético.

OBJETIVO

Avaliar a variabilidade genética e complementar as avaliações agronômicas da coleção de trabalho composta por 12 clones de capim-elefante, utilizando marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais genéticos analisados no trabalho foram 12 clones de capim-elefante *Pennisetum purpureum*, sendo duas cultivares comerciais (Napier e Roxo) e 10 clones pré-selecionados com base em características morfológicas e desempenho agronômico (Figura 1 e 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 uL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, $MgCl_2$ 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 12 *primers* decâmeros: OPD-04, OPD-07, OPD-10, OPD-16, OPE-20, OPF-01, OPF-14, OPF-15, OPF-17, OPG-08, OPG-09 e OPG-17. 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 clones, 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.

Figura 1. Aspecto fenotípico dos clones de capim-elefante analisados neste trabalho: 91.33.1 (A), 92.41.1 (B), 92.51.1 (C), 92.66.3 (D), 92.101.2 (E), 93.18.2 (F), 93.32.2 (G), 93.41.1 (H) 94.13.1 (I), 94.38.2. (J), Napier (K) e Roxo (L).

RESULTADOS

Os 12 *primers* decâmeros geraram um total de 135 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 11,25 marcadores por *primer*. Dos 135 marcadores, 90 (66,7%) foram polimórficos (Tabela 1).

As distâncias genéticas entre os 12 clones de *P. purpureum* variaram entre 0,070 e 0,236 (Tabela 2). A menor distância genética foi entre o cv. Napier e o acesso 94.38.2 e a maior entre o cv. Roxo e o acesso 94.13.1 (Tabela 2). Com base nas distâncias genéticas médias das cultivares comerciais em relação aos 10 clones pré-selecionados (Tabela 2), verifica-se que a cv. Napier é mais próxima geneticamente dos clones, quando comparada com a cv. Roxo.

A análise de agrupamento por métodos hierárquicos (Figura 2) ilustra esta maior proximidade do cv. Napier. As distâncias genéticas e a análise de agrupamento mostram que não existem duplicatas ou redundância entre os clones. Ao nível de 0,25 de distância genética relativa, pode-se verificar a formação de um grupo maior com 9 clones, do qual faz parte o cv. Napier. Dentro deste grupo maior estão presentes clones com diferentes produtividades de matéria seca (Tabela 2), o que ilustra a variabilidade genética da coleção de trabalho.

Os clones 93.41.1 e 94.13.1 formaram um segundo grupo. Estes clones tiveram uma produtividade de matéria seca muito semelhante entre si e estatisticamente igual à obtida pelo cv. Napier (Tabela 2). Estes clones são muito promissores para a ampliação da base genética dos cultivares recomendados de capim-elefante. O cv. Roxo foi o material genético que mais diferiu dos demais (Figura 2). Com relação à produtividade de matéria seca, o cv. Roxo ficou no grupo dos clones com menor produtividade.

Tabela 2. Matriz de distâncias genéticas entre os 12 clones de capim-elefante, calculadas com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando 135 marcadores RAPD.

Clones	PMS*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 91.33.1	20.247 c											
2 92.41.1	23.641 b	0,118										
3 92.51.1	20.644 c	0,145	0,143									
4 92.66.3	26.517 b	0,128	0,097	0,129								
5 92.101.2	25.742 b	0,125	0,111	0,105	0,082							
6 93.18.2	21.789 c	0,132	0,109	0,137	0,065	0,108						
7 93.32.2	25.057 b	0,090	0,118	0,102	0,123	0,106	0,117					
8 93.41.1	33.428 a	0,231	0,176	0,164	0,090	0,186	0,085	0,206				
9 94.13.1	32.666 a	0,206	0,146	0,209	0,137	0,195	0,108	0,184	0,139			
10 94.38.2	17.992 c	0,158	0,121	0,121	0,126	0,131	0,115	0,099	0,156	0,153		
11 Napier	30.741 a	0,117	0,097	0,073	0,129	0,124	0,104	0,107	0,179	0,119	0,070	
12 Roxo	21.752 c	0,175	0,180	0,209	0,165	0,211	0,195	0,145	0,212	0,236	0,156	0,160

* Produção acumulada de matéria seca (Kg) de folhas + colmos no ano de 2003 na Embrapa Cerrados (Fernades, F.D et al. 2005). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 1. *Primers* utilizados para a obtenção dos marcadores RAPD e respectivos números de marcas polimórficas e monomórficas.

Primer	Seqüência 5´→3´	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
OPD-07	TTGGCACGGG	5	3
OPD-08	GTGTGCCCCA	2	2
OPD-10	GGTCTACACC	0	2
OPD-16	AGGGCGTAAG	7	2
OPE-20	AACGGTGACC	10	3
OPF-01	ACGGATCCTG	8	6
OPF-14	TGCTGCAGGT	3	6
OPF-15	CCAGTACTCC	9	3
OPF-17	AACCCGGGAA	11	3
OPG-08	TCACGTCCAC	10	9
OPG-09	CTGACGTCAC	10	4
OPG-17	ACGACCGACA	15	2
	TOTAL	**90**	**45**

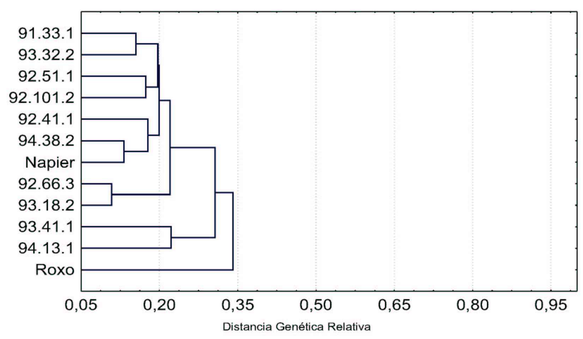

Figura 2. Análise de agrupamento de 12 clones de capim-elefante com base na matriz de distâncias genéticas. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

CONCLUSÃO

Os marcadores moleculares demonstraram que não existe redundância de clones na coleção de trabalho de *P. purpureum*, o que é muito interessante para os trabalhos de avaliação em rede e também para futuros trabalhos de seleção e melhoramento genético.

LITERATURA CITADA

CRUZ, C.D. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV, 1997. 442p.

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.

PEREIRA, A.V.; VALLE, C.B.; FERREIRA et al. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso. 2001. p. 549-602.

LÉDO, F.J.S.; PEREIRA, A.V.; ITALIANO, E.C. et al. Avaliação de clones de capim-elefante em diferentes regiões do Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2005 (no prelo).

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

Convênio Embrapa - Unipasto

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento