

# 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



Cerrados

Fábio G. Faleiro<sup>1\*</sup>, Francisco D. Fernandes<sup>1</sup>, Alexandre O. Barcellos<sup>1</sup>, Ronaldo P. Andrade<sup>1</sup>, Graciele Bellon<sup>1</sup>, Keize P. Junqueira<sup>1</sup>, Renato F. Amabile<sup>1</sup>, Geraldo B. Martha Júnior<sup>1</sup>, Lourival Vilela<sup>1</sup>, Allan K. B. Ramos<sup>1</sup>, Cláudio T. Karia<sup>1</sup>, Rodolfo Godoy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Cerrados, CP 08223, 73310-970 Planaltina-DF; <sup>2</sup>Embrapa Pecuária Sudeste \*e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

O guandu (*Cajanus cajan*) é uma leguminosa tropical arbustiva que pode ser utilizada na composição de pastagens como fonte de proteína e também para a adubação verde. Seu vigoroso sistema radicular pivotante tem merecido atenção como alternativa para a descompactação do solo. Considerando suas características morfo-agronômicas, o guandu tem um excelente potencial para utilização em sistemas de integração lavoura-pecuária e para a recuperação de pastagens degradadas.

Para analisar o potencial do guandu como leguminosa forrageira, a Embrapa tem caracterizado coleções e selecionado acessos com características agrônômicas desejáveis como a alta produtividade, valor nutricional e baixo teor de taninos (Godoy, 1995). 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) analisaram uma coleção de 18 acessos selecionados na Embrapa Cerrados e Pecuária Sudeste.

## OBJETIVO

Utilizar marcadores moleculares do DNA para avaliar a variabilidade genética de uma nova coleção de trabalho de guandu composta por 15 acessos, visando complementar características morfo-agronômicas e dar subsídio para a seleção de materiais para testes em sistemas de integração lavoura-pecuária e recuperação de pastagens degradadas. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a

## MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais genéticos analisados no presente trabalho foram 13 acessos pré-selecionados com base em características morfológicas e desempenho agrônômico na Embrapa Pecuária Sudeste, além das variedades Fava Larga e Anão (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 para obtenção de marcadores 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, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 100 µM de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM 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 14 "primers" decâmeros (Tabela 2). 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 a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 µL 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



Figura 1. Ilustrações do experimento de avaliação morfo-agronômica (A - E) e utilização do guandu no contexto da integração lavoura-pecuária (F) e recuperação de pastagens degradadas (G).

## RESULTADOS

Os 14 "primers" decâmeros geraram um total de 98 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 7,0 marcadores por "primer". A Figura 2 ilustra os produtos de amplificação gerados com o uso do "primer" OPF-05. Dos 98 marcadores, apenas 19 (19,4%) foram polimórficos (Tabela 2). A baixa média de marcadores por "primer" e porcentagem de marcadores polimórficos evidenciam uma baixa variabilidade genética da coleção de trabalho analisada. Faleiro et al. (2005), analisando uma outra coleção de trabalho de guandu, com base em marcadores moleculares, também verificaram uma baixa variabilidade genética, obtendo-se uma média de 8,7 marcadores por "primer" e apenas 28,2% de marcas polimórficas. Como relatado por Faleiro et al. (2005), 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 agrônômicas, principalmente relacionadas à produção de matéria seca.

As distâncias genéticas entre os 15 acessos de guandu variaram entre 0,000 e 0,052 com média de apenas 0,030 (Tabela 1). A maior distância genética foi obtida entre os acessos g59-95 e g168-99, g59-95 e g3-94, g3-94 e g167-97. Os acessos g9m-97 e g29m-94 foram geneticamente idênticos com base nos 98 marcadores analisados. O acesso que apresentou maior média de distâncias genéticas dentro da coleção de trabalho foi o g59-95. A análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas evidencia o estreitamento da base genética da coleção de trabalho analisada (Figura 3). Os marcadores moleculares demonstraram a existência de acessos muito próximos geneticamente. Tal proximidade genética e a estreita base da coleção de trabalho devem ser levadas em consideração na seleção de acessos a serem testados em sistemas de

Tabela 1. Matriz de distâncias genéticas entre os 15 acessos de guandu, calculadas com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando 98 marcadores RAPD.

Acessos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 g168-99														
2 g9m-97	0,025													
3 g29m-94	0,022	0,000												
4 g3-94	0,034	0,025	0,022											
5 g10-94	0,017	0,031	0,028	0,017										
6 g59-95	0,052	0,038	0,040	0,052	0,045									
7 Fava Larga	0,035	0,025	0,028	0,035	0,029	0,035								
8 g119-99	0,028	0,031	0,027	0,028	0,022	0,034	0,017							
9 g121-99	0,022	0,037	0,038	0,028	0,022	0,045	0,023	0,022						
10 g123-99	0,022	0,031	0,028	0,040	0,022	0,034	0,029	0,022	0,022					
11 g48-95	0,031	0,043	0,038	0,031	0,025	0,051	0,032	0,012	0,031	0,031				
12 g1m-95	0,022	0,031	0,028	0,040	0,022	0,045	0,029	0,022	0,022	0,011	0,031			
13 g167-97	0,034	0,045	0,040	0,052	0,034	0,029	0,040	0,028	0,034	0,011	0,045	0,011		
14 g146-94	0,030	0,033	0,036	0,043	0,030	0,030	0,018	0,012	0,024	0,012	0,027	0,012	0,006	
15 Anão	0,032	0,028	0,031	0,019	0,025	0,051	0,038	0,025	0,025	0,031	0,035	0,038	0,045	0,027

Tabela 1. "Primers" utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas.

Primer	Seqüência 5'→3'	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
OPD-04	TCTGGTGAGG	0	11
OPD-07	TTGGCAGGGG	5	2
OPE-11	GAGTCTCAGG	1	7
OPE-18	GGACTGCAGA	0	5
OPF-04	GGTATCAGG	1	5
OPF-05	CCGAATTC	0	5
OPF-10	GGAAGCTTGG	0	5
OPF-12	ACGGTACCAG	3	4
OPG-04	AGCGTGTCTG	3	5
OPG-08	TGACGTCCAC	2	6
OPG-13	CTCTCCGCA	1	4
OPG-15	ACTGGGACTC	2	10
OPH-08	GAACACCCC	0	6
OPH-18	GAATCGGCA	1	4
<b>TOTAL</b>		<b>19</b>	<b>79</b>

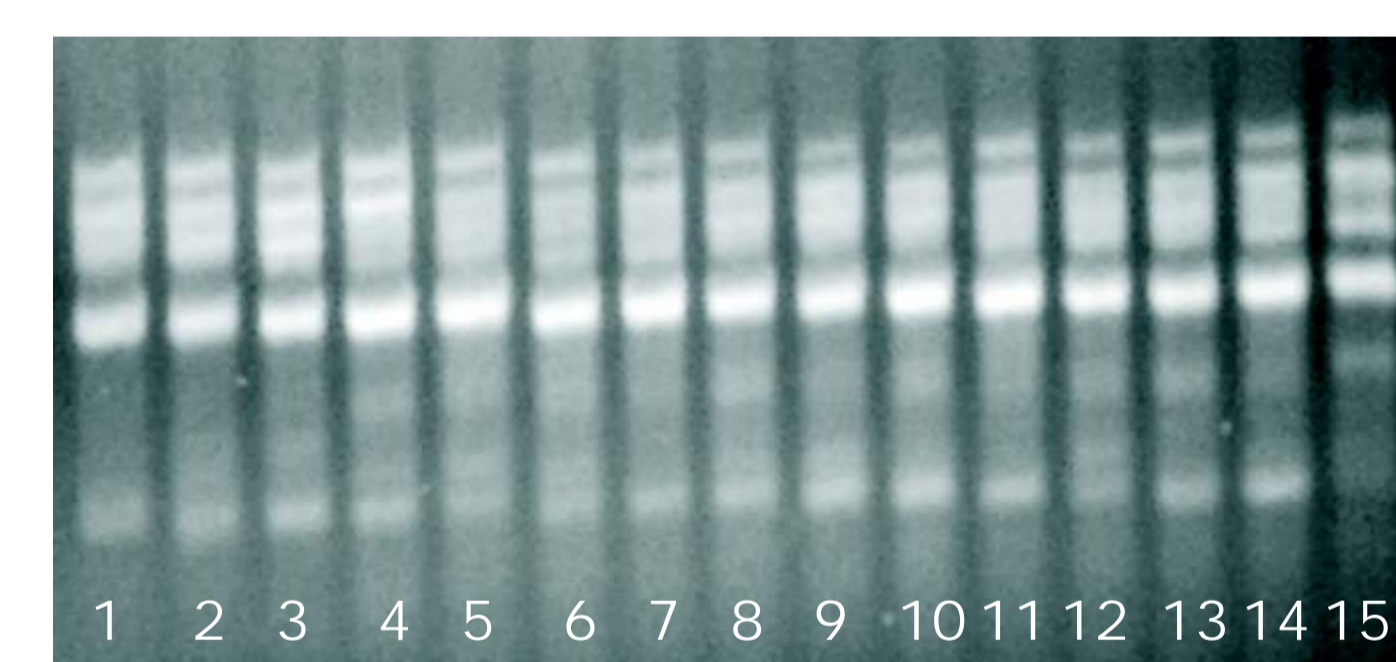


Figura 3. Produtos de amplificação de DNA genômico de 15 acessos de guandu, utilizando-se o "primer" decâmero OPF-05. Os números correspondem aos acessos descritos na Tabela 1.

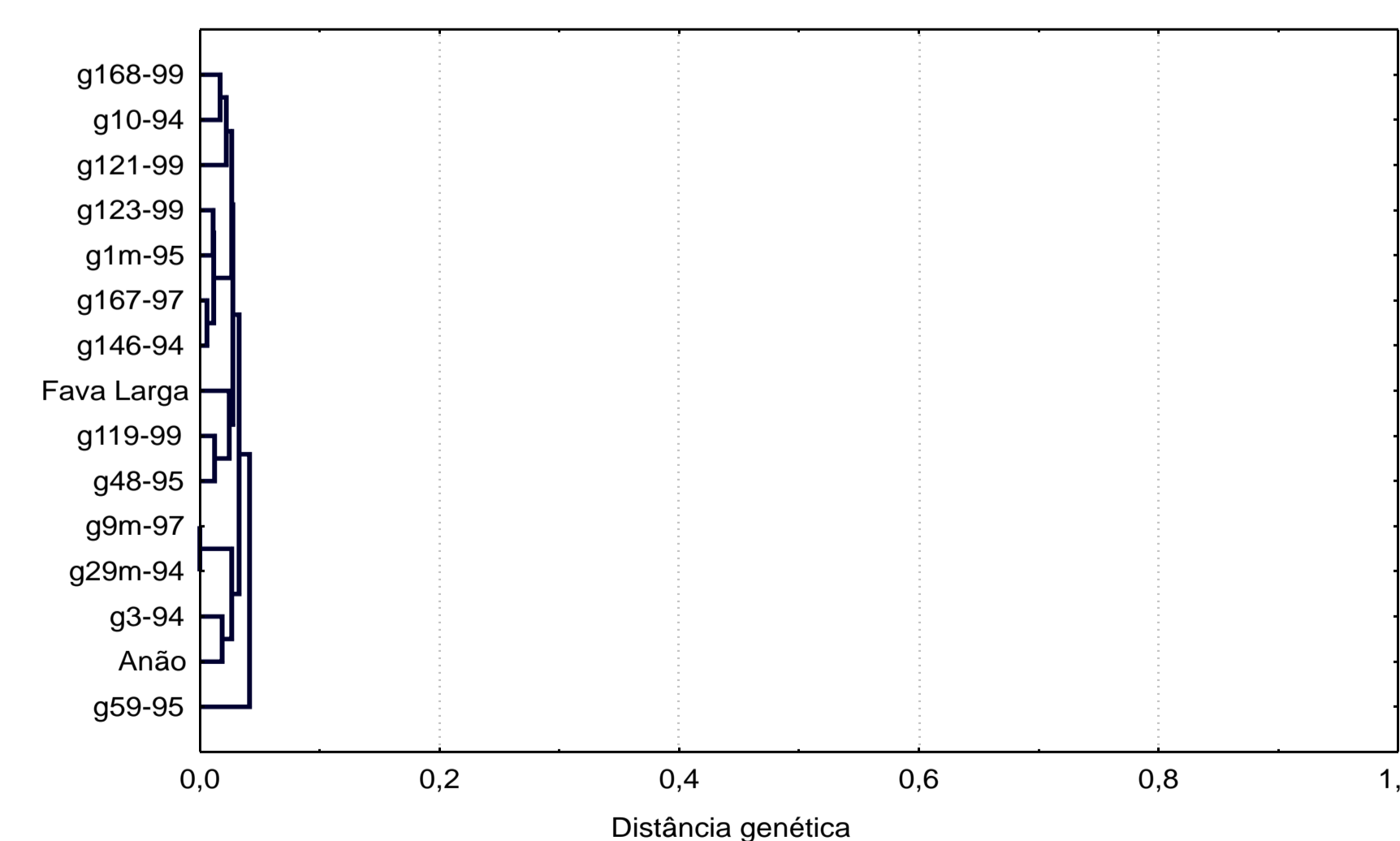


Figura 3. Análise de agrupamento de 15 acessos de guandu, baseada na matriz de distâncias genéticas. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

## CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares demonstraram uma baixa variabilidade genética da coleção de trabalho de guandu. Para reduzir custos experimentais e evitar desnecessária trabalho de avaliação, acessos muito próximos geneticamente não deveriam ser incluídos nos testes agrônômicos em sistemas de integração lavoura-pecuária e recuperação de pastagens degradadas.

## 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.
- 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: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Goiânia, 2005. Unidade CD. 2005.
- 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.