



Variabilidade genética de acessos de cratília (*Cratylia argentea*) com base em marcadores RAPD

Fábio Gelape Faleiro^{1*}, Allan Kardec Braga Ramos¹, Graciele Bellon¹, Francisco Duarte Fernandes¹,
Cláudio Takao Karia¹

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

Resumo: A *Cratylia argentea* têm grande potencial para uso em sistemas de integração lavoura-pecuária e para a recuperação de pastagens degradada. Neste trabalho, a variabilidade genética de nove acessos do banco de germoplasma da Embrapa Cerrados foram analisados com base em marcadores moleculares RAPD. O DNA genômico de cada acesso foi extraído e 13 primers decâmeros [OPD (4, 10), OPE (11, 19, 20), OPF (12), OPG (4, 5, 9, 15), OPH (4, 8, 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 um total de 183 marcadores, sendo que 141 (77,1%) deles foram polimórficos. As distâncias genéticas entre os nove acessos variaram entre 0,138 e 0,494. A menor distância genética foi obtida entre os acessos CPAC BRA 116 e CPAC BRA 124 e a maior entre os acessos CNPGL e CPAC BRA 531. Os marcadores moleculares demonstraram a alta variabilidade genética dos acessos analisados neste trabalho e a ampla base genética da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados

Palavras-chave: leguminosa forrageira, germoplasma

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

Abstract: *Cratylia argentea* have a high potential to use in crop-livestock integrated systems and to reclaim degraded pasture. In this work, the genetic variability of nine accessions selected from germplasm bank maintained at Embrapa Cerrados were analyzed using RAPD molecular markers. Genomic DNA sample of each accession was extracted and 13 decamer primers [OPD (4, 10), OPE (11, 19, 20), OPF (12), OPG (4, 5, 9, 15), OPH (4, 8, 12)] 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 183 molecular markers were obtained and 141 (77.1%) of them were polymorphic. The genetic distances among the nine accessions ranged from 0.138 and 0.494. The lower genetic distance was verified between the accessions CPAC BRA 116 e CPAC BRA 124 and the largest between the accessions CNPGL e CPAC BRA 531. The molecular markers showed the high genetic variability of the accessions analysed in this work and the high genetic base of the Embrapa Cerrados germplasm bank.

Keywords: forage leguminosae, germplasm

Introdução

A *Cratylia argentea* (Desv.) O. Kuntze é uma leguminosa forrageira arbustiva nativa do Cerrado que têm grande potencial para melhorar os sistemas de produção de ruminantes, com o fornecimento contínuo de forragem, principalmente no período seco do ano. Entre as principais características da cratília que demonstram seu potencial forrageiro são a tolerância à seca (Souza e Oliveira, 1996) e sua qualidade nutritiva (Lascano, 1996).

O potencial da cratília em sistemas de integração lavoura-pecuária e para recuperação de pastagens ainda não foi adequadamente estudado. Considerando o potencial da cratília, a análise da variabilidade genética dentro da espécie é de grande importância visando à seleção de acessos mais adaptados e com melhores características agrônomicas relacionadas à maior produção de matéria seca e resistência a doenças.

Neste trabalho, objetivou-se analisar a variabilidade genética de nove acessos de cratília da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados e inferir sobre a base genética dessa coleção com base em marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Material e Métodos

Os materiais genéticos analisados no presente trabalho foram 9 acessos de cratília do banco de germoplasma da Embrapa Cerrados selecionados com base em características morfológicas e desempenho agrônômico na Embrapa Cerrados (Tabela 1). Dois acessos de guandu foram utilizados como outgroup. 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 via PCR para obtenção de marcadores RAPD.

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 uL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50mM, MgCl₂ 3 mM, 100 uM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (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 13 *primers* decâmeros: [OPD (4, 10), OPE (11, 19, 20), OPF (12), OPG (4, 5, 9, 15), OPH (4, 8, 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, utilizando como critério, o método do UPGMA. Foi também realizada a 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 183 marcadores RAPD com a utilização dos 13 *primers* decâmeros, perfazendo uma média de 14,1 marcadores por *primer*. Dos 183 marcadores, 141 (77,1%) foram polimórficos. A alta média de marcadores por *primer* e porcentagem de marcadores polimórficos evidenciam uma alta variabilidade genética dos acessos de cratília analisados.

As distâncias genéticas entre os 9 acessos de cratília variaram entre 0,138 e 0,494 (Tabela 1). A menor distância genética foi obtida entre os acessos CPAC BRA 116 e CPAC BRA 124. A maior distância genética foi obtida entre os acessos CNPGL e CPAC BRA 531. A análise de agrupamento permitiu a formação de pelo menos cinco grupos de similaridade genética a uma distância genética de 0,20 (Figura 1). O maior grupo foi formado por quatro acessos, todos da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC BRA 116, 124, 124 e 523). Os acessos CNPGL, CPAC antiga e CPAC BRA 531 formaram grupos isolados, evidenciando a diferença genética entre estes materiais.

A análise de dispersão gráfica realizada com base nas distâncias genéticas mostra a separação clara dos acessos de cratília e dos acessos de guandu, utilizados como outgroup e evidencia as diferenças genéticas entre os acessos de cratília, principalmente os acessos CNPGL e o CPAC BRA 531.

Tabela 1 Matriz de distâncias entre nove acessos de cratília e dois de guandu, calculadas com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei & Li, utilizando-se 183 marcadores RAPD.

Nº	Acessos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	CNPGL	0,000	0,313	0,326	0,319	0,363	0,373	0,394	0,432	0,494	0,718	0,610
2	CNPGC-JMV	0,313	0,000	0,182	0,246	0,213	0,257	0,200	0,237	0,349	0,641	0,612
3	CIAT 18668	0,326	0,182	0,000	0,237	0,188	0,217	0,249	0,249	0,344	0,688	0,613
4	CPAC antiga	0,319	0,246	0,237	0,000	0,215	0,240	0,242	0,252	0,350	0,665	0,614
5	CPAC BRA 116	0,363	0,213	0,188	0,215	0,000	0,138	0,122	0,149	0,274	0,624	0,584
6	CPAC BRA 124	0,373	0,257	0,217	0,240	0,138	0,000	0,124	0,193	0,279	0,630	0,592
7	CPAC BRA 132	0,394	0,200	0,249	0,242	0,122	0,124	0,000	0,153	0,276	0,693	0,640
8	CPAC BRA 523	0,432	0,237	0,249	0,252	0,149	0,193	0,153	0,000	0,174	0,685	0,641
9	CPAC BRA 531	0,494	0,349	0,344	0,350	0,274	0,279	0,276	0,174	0,000	0,609	0,594
10	Guandu - Fava Larga	0,718	0,641	0,688	0,665	0,624	0,630	0,693	0,685	0,609	0,000	0,270
11	Guandu - Anão	0,610	0,612	0,613	0,614	0,584	0,592	0,640	0,641	0,594	0,270	0,000

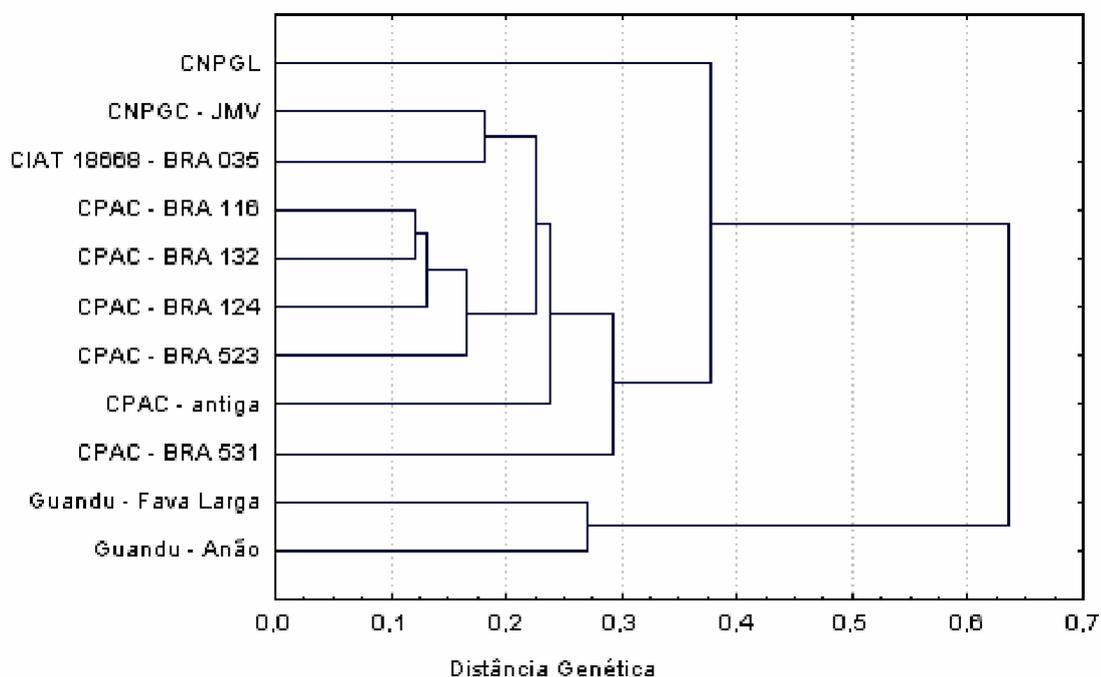


Figura 1 Análise de agrupamento de nove acessos de cratília e dois de guandu com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 183 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

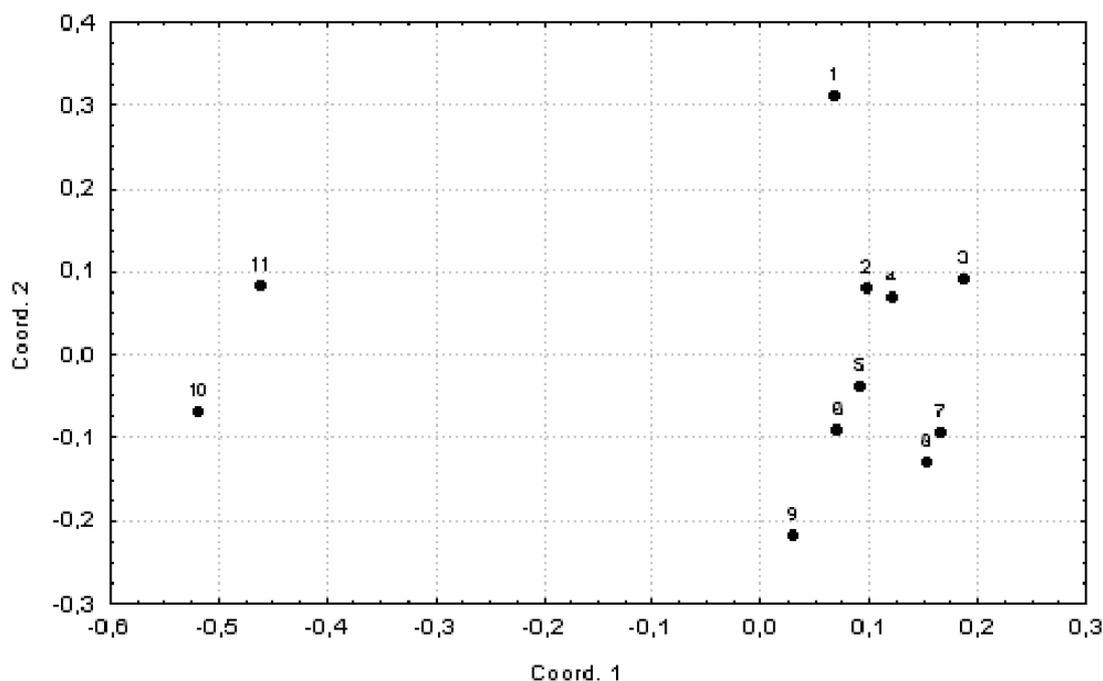


Figura 2 Análise de dispersão de nove acessos de cratília e dois de guandu com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 183 marcadores RAPD. Os números dos acessos são os mesmos da Tabela 1.

Conclusões

Os marcadores moleculares evidenciaram a ampla base genética dos acessos de cratília analisados neste trabalho. Esta alta variabilidade abre boas perspectivas para trabalhos de seleção de acessos mais adaptados e com melhores características agrônomicas, principalmente relacionadas à produção de matéria seca e resistência a doenças.

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.

LASCANO, C.E. **Calidad nutritiva y utilization de *Cratylia argentea***. In: Pizarro, E.A. e Coradin, L. (Eds.) Potencial del genero *Cratylia* como leguminosa forrajera. Memorias del taller de trabajo realizado el 19 y 20 de julio de 1995, Brasília, Brasil. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT: Cali, Colombia, 1996. p.83-97.

SOUZA, F.B.; OLIVEIRA, M.C. **Avaliação agrônômica do gênero *Cratylia* na região semi-árida do Brasil**. In: Pizarro, E.A. e Coradin, L. (Eds.) Potencial del genero *Cratylia* como leguminosa forrajera. Memorias del taller de trabajo realizado el 19 y 20 de julio de 1995, Brasília, Brasil. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT: Cali, Colombia, 1996. p.50-52.

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.