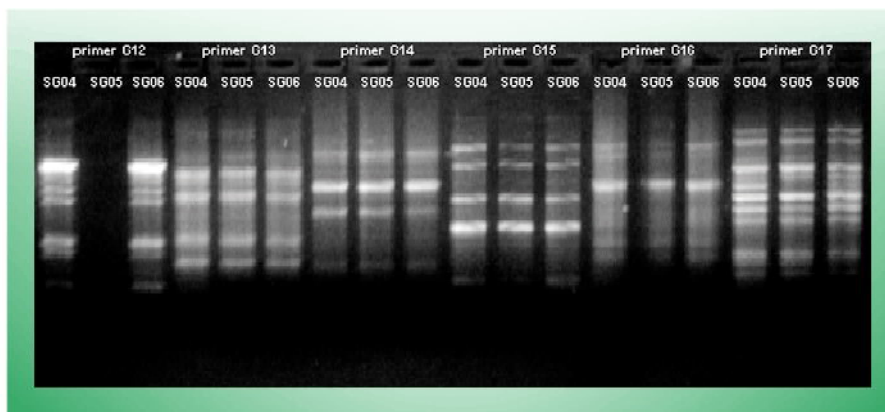

Boletim de Pesquisa 20 **e Desenvolvimento** ISSN 1679-0790 Outubro, 2006

Análise da Diversidade Genética em *Stylosanthes guianensis* Utilizando Marcadores RAPD



ISSN 1679-0790

Outubro, 2006

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 20

Análise da Diversidade Genética em *Stylosanthes guianensis* Utilizando Marcadores RAPD

Lucimara Chiari

João Victor Rodrigues do Valle

Rosângela Maria Simeão Resende

Letícia Jungmann Caçado

Leonardo Rippel Salgado

Gisele Olivas de Campos Leguizámon

Embrapa Gado de Corte

Campo Grande, MS

2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Rodovia BR 262, Km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS

Caixa Postal 154

Fone: (67) 3368 2083

Fax: (67) 3368 2180

<http://www.cnpqc.embrapa.br>

E-mail: publicacoes@cnpqc.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Cleber Oliveira Soares*

Secretário-Executivo: *Wilson Werner Koller*

Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima, Geraldo Augusto de Melo Filho, Gracia Maria Soares Rosinha, Lúcia Gatto, Manuel Antônio Chagas Jacinto, Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra, Tênisson Waldow de Souza, Wilson Werner Koller*

Supervisão editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisão de texto: *Lúcia Helena Paula do Canto*

Normalização bibliográfica: *Maria Antonia M. de Ulhôa Cintra*

Editoração eletrônica e Tratamento de ilustrações: *Ecila Carolina N. Z. Lima*

Foto da capa: *Arquivo Embrapa Gado de Corte*

1ª edição

1ª impressão (2006): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Corte.

Análise da diversidade genética em *Stylosanthes guianensis* utilizando marcadores RAPD / Lucimara Chiari... [et al.]. -- Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2006.

23 p. ; 21 cm. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1679-0790 ; 20).

Autores: Lucimara Chiari, João Victor Rodrigues do Valle, Rosângela Maria Simeão Resende, Letícia Jungmann Cançado, Leonardo Rippel Salgado, Gisele Olivas de Campos Leguizámon

ISBN 85-297-0212-3

1. Melhoramento genético vegetal. 2. *Stylosanthes guianensis*. 3. Marcador molecular. I. Chiari, Lucimara. II. Valle, João Victor Rodrigues do. III. Resende, Rosângela Maria Simeão. IV. Cançado, Letícia Jungmann. V. Salgado, Leonardo Rippel. VI. Leguizámon, Gisele Olivas de Campos. VII. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). VIII. Título. IX. Série.

CDD 633.2 (21.ed.)

© Embrapa Gado de Corte 2006

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	7
Introdução	8
Material e Métodos	11
Material vegetal	11
Extração de DNA	11
Amplificação e eletroforese	13
Análise dos dados	14
Resultados e Discussão	15
Seleção de <i>primers</i>	15
Análise dos dados de RAPD	16
Conclusões	20
Agradecimentos	20
Referências Bibliográficas.....	20

Análise da Diversidade Genética em *Stylosanthes guianensis* Utilizando Marcadores RAPD

*Lucimara Chiari*¹

*João Victor Rodrigues do Valle*²

*Rosângela Maria Simeão Resende*³

*Letícia Jungmann Cançado*⁴

*Leonardo Rippel Salgado*⁵

*Gisele Olivas de Campos Leguizámon*⁶

Resumo

O conhecimento da variabilidade genética e da relação entre diferentes acessos de *Stylosanthes guianensis* é importante para maximizar o uso dos recursos genéticos disponíveis. Este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética em 20 acessos dessa espécie, pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, usando marcadores RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso). Foram selecionados 40 *primers* randômicos, que produziram um total de 210 bandas; destas, 82 polimórficas (39,05%). Os dados obtidos foram utilizados para gerar uma matriz de similaridade genética usando o coeficiente de Jaccard. A similaridade genética variou de 0,747 a 0,945, o que indicou uma variabilidade

¹ Bióloga, D.Sc. em Genética e Melhoramento Vegetal, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, lchiari@cnpqg.embrapa.br

² Estudante de graduação em Ciências Biológicas na Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (Uniderp), Campo Grande, MS. Bolsista de Iniciação Científica do CNPq na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, joaovictor@cnpqg.embrapa.br

³ Bióloga, D.Sc. em Genética, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, rosangela@cnpqg.embrapa.br

⁴ Bióloga, M.Sc. em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, jungmann@cnpqg.embrapa.br

⁵ Estudante de graduação em Ciências Biológicas na Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (Uniderp), Campo Grande, MS, leorippel@cnpqg.embrapa.br

⁶ Bióloga, técnica de laboratório da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, gisele@cnpqg.embrapa.br

genética pouco acentuada entre os acessos estudados. Os acessos com menor similaridade genética foram SG01 e SG14. Os resultados das análises de agrupamento com os métodos UPGMA (Agrupamento com Média Aritmética Não Ponderada) e Tocher foram similares. Apesar da baixa variabilidade genética detectada entre os 20 acessos, estes foram separados em nove grupos distintos pelo método UPGMA e seis grupos pelo método de Tocher.

Termos para indexação: leguminosa forrageira, marcadores moleculares, polimorfismo genético, genética vegetal.

Analysis of Genetic Diversity in *Stylosanthes guianensis* Using RAPD Markers

Abstract

The knowledge on genetic variability and the relationship among different Stylosanthes guianensis accessions is important to maximize the use of available genetic resources. The objective of this work was to determine the genetic variability among 20 accessions from the Germplasm Bank of Embrapa Beef Cattle, characterized by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers. A total of 210 bands were generated with the use of 40 random primers and 82 of these were polymorphic (39,05%). The data obtained was used for generating a genetic similarity matrix using the Jaccard coefficient. Genetic similarity ranged from 0.747 to 0.945, indicating low genetic variability for these accessions. The accessions with the lowest genetic similarity were SG01 and SG14. Cluster analyzes using two methods, UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetical Average) and Tocher, were similar. Despite the low genetic variability detected among the 20 accessions, nine distinct clusters were formed by UPGMA and six by the Tocher methods.

Index terms: forage legumes, molecular markers, polymorphism, vegetal genetic.

Introdução

Nos Cerrados brasileiros, a exemplo do que ocorre em outras regiões tropicais e subtropicais, a pecuária bovina é baseada, principalmente, na utilização de pastagens para a alimentação animal. Atualmente, as espécies de maior importância para pastagens em regiões tropicais são as gramíneas dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum* (LOCH; FERGUSON, 1999). No entanto, na estação seca do ano, ocorre uma acentuada diminuição na produção de forragens pelas gramíneas, tanto em quantidade como em qualidade, o que, segundo Macedo (1995), é uma das principais causas da baixa produtividade da exploração da pecuária no Brasil Central.

Além disso, estima-se que na região dos Cerrados 80% da área cultivada com pastagens de gramíneas apresenta algum nível de degradação, dentre outras causas, a deficiência de nitrogênio. Isso significa, em médio e longo prazos, redução da produtividade animal e sério risco ambiental para a região (MACEDO, 2000).

Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas de produção, fundamentados em consórcio de gramíneas e leguminosas forrageiras, tem sido considerado uma alternativa promissora, pois possibilita, entre outras coisas, o aumento da qualidade nutricional da dieta e da quantidade de forragem disponível, especialmente durante o período seco, e a adição de nitrogênio ao solo por meio da fixação biológica de nitrogênio (BALDIÓN et al., 1975; MIRANDA et al., 1999). Isso pode proporcionar um incremento econômico pelo aumento na produtividade de carne e leite e diminuição de gastos com adubos nitrogenados.

Dentre as leguminosas nativas do Brasil, com potencial para uso forrageiro, destacam-se várias espécies do gênero *Stylosanthes* (SCHULTZE KRAFT; GIACOMETTI, 1979). O gênero *Stylosanthes* (*Leguminosae*) inclui 40 espécies e um grande número de subespécies e de variedades botânicas descritas (FERREIRA; COSTA, 1979; STACE; CAMERON, 1984). É originário da América Central e do Sul, e o Brasil é o seu principal centro de origem e maior centro de diversidade (MILES;

LASCANO, 1997). As espécies desse gênero estão entre as mais importantes leguminosas forrageiras em ambientes tropicais áridos e semi-áridos, com destaque para seu uso na Austrália e em países dos continentes asiático e africano, além do Brasil (GUODAO et al., 1997).

As principais espécies de *Stylosanthes* com potencial de uso forrageiro no Brasil são: *S. guianensis*, *S. macrocephala*, *S. capitata* e *S. scabra* (MILES; GROF, 1997). Destaca-se *S. guianensis*, objeto deste estudo.

Stylosanthes guianensis é uma espécie diplóide ($2n = 20$), originária da América Central e do Sul, e ocorre desde o México até a Argentina, e tem sido amplamente utilizada como forrageira em muitos países tropicais e subtropicais (BURT; MILLER, 1975).

Essa espécie é perene de vida longa e se divide em quatro variedades botânicas: *vulgaris*, *canescens*, *microcephala* e *pauciflora*, e os ecótipos apresentam variabilidade quanto à longevidade quando expostos a fatores ambientais adversos. Desta forma, é possível selecionar genótipos superiores para diversas condições ambientais (FERREIRA; COSTA, 1979).

Apresenta ampla diversidade fenotípica e pode apresentar até 18% de proteína bruta na parte aérea, e os acessos das variedades botânicas *pauciflora* e *vulgaris* são os de mais alta produção de matéria seca e retenção de folhas verdes em períodos de seca em solos de baixa fertilidade (KARIA; ANDRADE, 2000).

Apesar da comprovada contribuição de cultivares de *S. guianensis* e de outras espécies de *Stylosanthes* na agropecuária, ainda há poucos estudos sobre a variabilidade genética intra e interespecífica e do controle genético de características de importância agrônoma. A maioria dos estudos sobre a variabilidade genética foi realizada por meio de caracteres morfológicos (STACE; CAMERON, 1984; MANNETJE, 1984; KARIA et al., 2002).

Para estabelecer estratégias de melhoramento que resultem em ganhos genéticos em vários ciclos, é altamente relevante a utilização de métodos

mais elaborados de seleção, que considerem a natureza contínua de distribuição de caracteres agronômicos e seus parâmetros, e que usem marcadores moleculares para agilizar a identificação de genótipos superiores.

A utilização de marcadores moleculares apresenta inúmeras possibilidades de estudo em espécies como as do gênero *Stylosanthes*, dentre estes podem ser citados a geração de informações sobre a variabilidade genética intra e interacessos, determinação da taxa de cruzamento e, em um estágio mais avançado, auxiliar melhoristas nas tomadas de decisões no processo de seleção.

Dentre as técnicas moleculares destaca-se a de Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD, por se tratar de uma metodologia menos laboriosa e com custos comparativamente menores aos de outras técnicas. Além disso, é capaz de fornecer resultados equivalentes aos obtidos por marcadores co-dominantes, por exemplo, na determinação da taxa de cruzamento de uma espécie (FERREIRA et al., 2000; GAIOTTO et al., 1997).

A grande vantagem dos marcadores moleculares do tipo RAPD é a utilização de *primers* randômicos em baixas condições de estringência que permite o anelamento do *primer* a regiões anônimas do DNA, sendo capaz de analisar grande número de locos representando o genoma como um todo, sem a necessidade de conhecimento prévio do genoma do organismo estudado (WILLIAMS et al., 1990; WELSH; MCCLELLAND, 1990).

Os objetivos deste trabalho foram: a) analisar a variabilidade genética e estimar a distância genética em 20 acessos de *S. guianensis*, pela técnica de RAPD e b) selecionar *primers* polimórficos que serão utilizados para analisar a progênie desses acessos e determinar a taxa de cruzamento nessa espécie.

Material e Métodos

Material vegetal

Vinte acessos de *S. guianensis* pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. As análises foram realizadas utilizando uma planta por acesso. As plantas analisadas foram instaladas em casa de vegetação, por meio de estaquia.

Desses acessos, foram coletadas folhas jovens (primeira folha completamente expandida a partir do ápice), as quais foram envolvidas em papel de alumínio, devidamente identificadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para serem transportadas até o laboratório onde se prosseguiu com as extrações dos DNAs.

Extração de DNA

Os DNAs foram extraídos segundo o protocolo descrito por Bonato et al. (2002) com modificações.

As amostras de folhas jovens de cada acesso foram maceradas com nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana e o pó fino obtido foi transferido para tubos de microcentrífuga de 2 mL. Adicionaram-se às amostras, 900 µL de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2% 2-β-mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8; 1% PVP 40). Após 60 minutos de incubação a 65°C, com suave inversão a cada 10 min., as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente (TA) e centrifugadas durante 10 min. a 10.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf modelo 5410.

Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para novos tubos de microcentrífuga de 2 mL e a estes foram adicionados 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio. Após suave homogeneização durante 10 min. as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm também por 10 min., para separação das fases. A fase superior foi transferida e novamente foram adicionados 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio às amostras que foram homogeneizadas durante 10 min. e centrifugadas. A fase superior

foi transferida e adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após suave homogeneização durante 10 min. as amostras foram centrifugadas e 400 µL da fase superior de cada amostra foram transferidos para novos tubos de microcentrifuga de 1,5 mL.

Foram adicionados 200 µL de acetato de amônio 7,5 M e 400 µL de isopropanol gelado às amostras para a precipitação do DNA. Após suave inversão e incubação a -20°C por 30 min., as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 min, formando um precipitado (DNA) que foi lavado com etanol 70% gelado e deixado secar a TA.

O DNA foi ressuspensionado em 400 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA) e mantido a 4°C até a manhã seguinte.

Após, foram adicionados 10 µL de RNase A (10 mg/mL) e as amostras foram incubadas a 37°C durante 30 min., para a digestão completa do RNA. Em seguida, foram adicionados 40 µL de acetato de amônio 7,5 M e duas vezes o volume de etanol absoluto gelado. As amostras foram cuidadosamente invertidas, incubadas a -20°C por 30 min e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. O precipitado foi lavado com 400 µL de etanol 70% gelado, deixado secar a TA e ressuspensionado em 100 µL de TE.

Para quantificar e avaliar a integridade do DNA extraído fez-se uma diluição 1:10 (v/v) de cada amostra com 2 µL de tampão de corrida 6X (0,25 g de azul de bromofenol, 15 g de ficoll 400 em 100 mL de água milliQ autoclavada) e esta foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8%, já corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). O tampão utilizado para o preparo do gel e na cuba foi o TBE 1X (0,89 M Tris; 0,89 M borato e 0,08 M EDTA).

Após a corrida eletroforética, o resultado foi visualizado em luz UV, fotodocumentado em sistema digital e salvo em formato JPEG. A quantificação foi realizada por comparação das bandas obtidas dos DNAs extraídos com padrões de concentrações conhecidas do DNA lambda (Invitrogen).

Depois de estimada a concentração, as amostras de DNA foram diluídas na concentração de 5 ng/μL e mantidas a 4°C. Os estoques foram congelados a -20°C.

Amplificação e eletroforese

As reações foram preparadas em volume final de 25 μL contendo: 1X tampão da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2 mM MgCl₂ (Invitrogen), 2,5 mM dNTPs (Invitrogen), 4% DMSO (Sigma), 1U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1,2 μM de *primer* (Invitrogen) e 20 ng de DNA genômico.

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research) utilizando uma etapa de 94°C por 5 min.; 40 ciclos de 94°C por 1 min., 40°C por 1,5 min. e 72°C por 2 min.; seguidos por uma etapa final de 72°C por 7 min.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, já corado com brometo de etídio (0,5 μL/mL), e adicionados, a cada reação, 3 μL de tampão de corrida. O tampão utilizado para o preparo do gel e na cuba foi o TBE 1X.

Os resultados foram visualizados em luz UV, fotodocumentados em sistema digital e salvos em formato JPEG.

Para cada análise foi feito um controle negativo: reação contendo todos os reagentes exceto o DNA, para verificar se não havia contaminação de reagentes com DNA e dar maior confiabilidade aos dados.

Inicialmente, três diferentes acessos de *S. guianensis* foram analisados com 51 *primers* decâmeros randômicos sintetizados pela Invitrogen, dos quais 40 foram selecionados para as análises dos 20 acessos (Tabela 1), todos com conteúdo GC entre 60% e 70% e que geraram bandas (fragmentos de DNA amplificados) nítidas e reproduzíveis.

Tabela 1. Lista dos 40 *primers* selecionados para as análises de RAPD em *Stylosanthes guianensis* com suas seqüências de oligonucleotídeos e conteúdo G-C (%).

<i>Primer</i>	Seqüência e G-C (%)	<i>Primer</i>	Seqüência e G-C (%)
B14	TCC GCT CTG G (70%)	G19	GTC AGG GCA A (80%)
D03	GTC GCC GTC A (70%)	H07	CTG CAT CGT G (60%)
D12	CAC CGT ATC C (80%)	AD03	TCT CGC CTA C (80%)
D13	GGG GTG ACG A (70%)	AF01	GCT ACA CGG T (80%)
E01	CCC AAG GTC C (70%)	AF02	CAG CCG AGA A (80%)
E11	GAG TCT CAG G (80%)	AJ08	GTC GGA GTG G (70%)
F03	CCT GAT CAC C (80%)	AJ09	ACG GCA CGC A (70%)
F04	GGT GAT CAG G (80%)	AK04	AGG GTC GGT C (70%)
F07	CCG ATA TCC C (80%)	AK19	TCG CAG CGA G (70%)
F12	ACG GTA CCA G (80%)	AL01	TGT GAC GAG G (80%)
G02	GGC ACT GAG G (70%)	AL02	ACC CTG TGG G (70%)
G03	GAG CCC TCC A (70%)	AL03	CCC ACC CTT G (70%)
G04	AGC GTG TCT G (80%)	AN10	CTG TGT GCT C (80%)
G06	GTG CCT AAC C (80%)	AN11	GTC CAT GCA G (80%)
G07	GAA CCT GCG G (70%)	BA01	TTC CCC ACC C (70%)
G10	AGG GCC GTC T (70%)	BA02	TGC TCG GCT C (70%)
G11	TGC CCG TCG T (70%)	BA03	GTG CCA GAA C (80%)
G13	CTC TCC GCC A (70%)	BB01	ACA CTG GCT G (80%)
G15	ACT GGG ACT C (80%)	BB02	CCC CCG TTA G (70%)
G17	ACG ACC GAC A (80%)	BB03	TCA CGT GGC T (80%)

Análise dos dados

Os dados obtidos dos 40 *primers* para os 20 acessos de *S. guianensis* foram compilados em uma planilha na forma de variáveis binárias, ou seja, "1" significando presença de banda e "0", ausência. Esses dados foram utilizados para a construção de uma matriz de similaridade genética pelo programa GENES versão para Windows (CRUZ, 1997), utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard (J), calculado de acordo com a fórmula $J = N/P$, onde, N é o número de concordâncias positivas e P é o total de variáveis, menos as concordâncias negativas. A análise de agrupamento

foi realizada por dois métodos: Unweighted Pair-group Method with Arithmetical Average - UPGMA e Tocher, com o complemento aritmético dos dados de similaridade genética.

Resultados e Discussão

Seleção de *primers*

Dos 51 *primers* randômicos testados em três acessos de *S. guianensis*, 40 foram selecionados para a análise dos 20 acessos.

A Fig. 1 representa uma seleção com seis *primers*, dos quais três foram escolhidos para as análises com os 20 acessos: G13, G15 e G17. O *primer* G12 não foi selecionado porque falhou na amplificação de uma das amostras. O *primer* G14 amplificou menos de quatro bandas, critério utilizado na seleção, e o *primer* G16 amplificou bandas pouco nítidas. Os resultados apresentados para esses *primers* fornecem uma indicação do procedimento utilizado na seleção deles a fim de realizar análise nos 20 genótipos estudados.

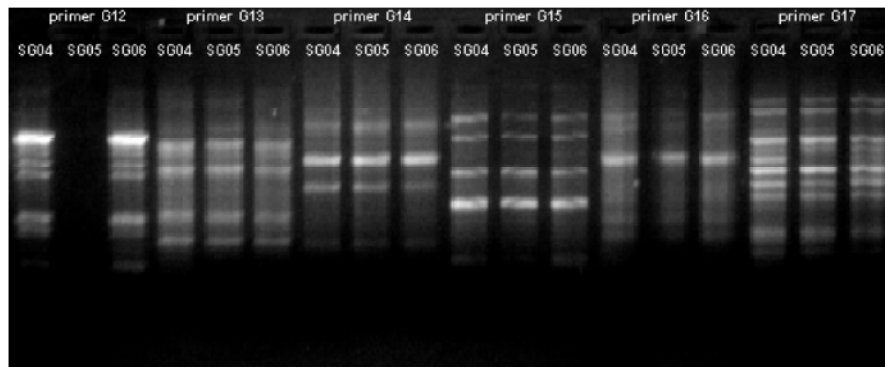


Fig. 1. Gel de agarose 1,5% representando uma seleção com seis *primers* em três diferentes acessos de *Stylosanthes guianensis*.

Análise dos dados de RAPD

Os 40 *primers* selecionados produziram um total de 210 bandas possíveis de serem analisadas com segurança para os 20 acessos deste estudo, perfazendo uma média de 5,25 bandas por *primer*. A média obtida de bandas por *primer* foi inferior ao obtido por Barros et al. (2005) em *Stylosanthes macrocephala* (10,7). A Fig. 2 representa o perfil de RAPD obtido com o *primer* G04 para os 20 acessos de *S. guianensis*.

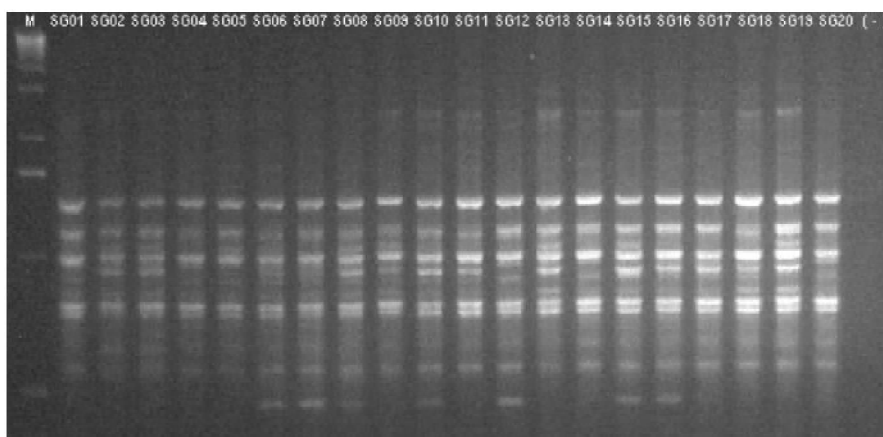


Fig. 2. Perfil de RAPD obtido com o *primer* G04 para os 20 acessos de *Stylosanthes guianensis*. M = 1 kb DNA ladder e (-) = controle negativo.

Das 210 bandas obtidas com os 40 *primers*, 82 foram polimórficas (39,05%). Os *primers* que produziram o maior número de bandas polimórficas foram o G02 (7) e o G07 (6). Apesar do baixo número de bandas polimórficas foi possível identificar 31 *primers* polimórficos (77%), ou seja, uma média de 2,6 bandas polimórficas por *primer*. De maneira geral, essa técnica não gera muitos polimorfismos por *primer*, porém, ela apresenta como vantagens à rapidez e simplicidade, necessidade de pequena quantidade de DNA e o custo relativamente baixo quando comparado ao de outras técnicas moleculares (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Assim, pode-se utilizar um grande número de *primers* para solucionar o problema do baixo polimorfismo detectável por *primer*.

A partir dos dados de ausência e presença de bandas dos 40 *primers* foram estimadas as similaridades genéticas utilizando o coeficiente de Jaccard. Os valores de similaridade genética entre os 20 acessos de *S. guianensis* variaram pouco, os acessos SG01 e SG04 foram os geneticamente mais similares (0,945) e os acessos SG13 e SG20 (0,747) foram os geneticamente mais divergentes, indicando que a variabilidade genética nesses acessos é pouco acentuada.

Kazan et al. (1993) estudaram a variabilidade genética em 20 cultivares de *S. guianensis* e de outras espécies de *Stylosanthes* (*S. scabra*, *S. hamata* e *S. humilis*), utilizando marcadores RAPD, e também encontraram baixa variabilidade intraespecífica e alta variabilidade interespecífica. Em contrapartida, Karia et al. (2002), avaliando 72 acessos de *S. guianensis*, 44 de *S. capitata* e 26 de *S. scabra*, observaram alta variabilidade intraespecífica utilizando marcadores morfológicos e agrônômicos. Barros et al. (2005) também observaram alta variabilidade genética intraespecífica em 86 acessos de *S. macrocephala* utilizando marcadores RAPD e Sistema de Informações Geográficas (SIG).

A baixa variabilidade genética observada neste estudo, entre os 20 acessos de *S. guianensis* pode ser consequência do pequeno número de acessos analisados e do modo como estes foram selecionados, pois fazem parte do programa de melhoramento da Embrapa Gado de Corte e foram selecionados pelas características morfoagronômicas interessantes e não contrastantes. Sabe-se que essa espécie apresenta ampla distribuição geográfica e, conseqüentemente, grande diversidade fenotípica, desde plantas rasteiras até semi-arbustivas; número de ramificações variáveis; período de florescimento variando de fevereiro (precoces) a maio (tardias); entre outras (KARIA; ANDRADE, 2000).

A fim de representar graficamente o padrão de distância genética, o complemento aritmético dos dados da matriz de similaridade foi utilizado para gerar um dendrograma pelo método UPGMA representado na Fig. 3.

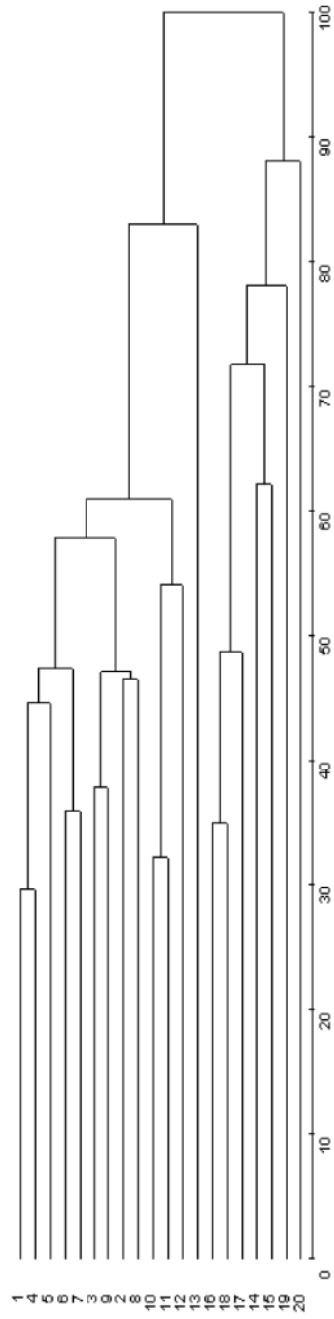


Fig. 3. Dendrograma obtido pelo método UPGMA das distâncias genéticas entre os 20 acessos (SG01 a SG20) de *Stylosanthes guianensis*.

Considerando-se a média das porcentagens das distâncias genéticas entre todos os acessos (55,8%) pode-se distinguir a formação de nove grupos. Os acessos SG01, SG04, SG05, SG06 e SG07 formaram o primeiro grupo. O segundo grupo foi formado pelos acessos SG03, SG09, SG02 e SG08. O terceiro grupo pelos acessos SG10, SG11 e SG12. O acesso SG13 não se agrupou com nenhum outro, formando o quarto grupo. O quinto grupo foi formado pelos acessos SG16, SG18 e SG17. Os demais acessos não se agruparam formando os outros quatro grupos.

O método de Tocher agrupou os acessos em seis grupos, mas o resultado foi similar aquele obtido pelo método UPGMA. Os acessos SG13, SG15, SG19 e SG20 também não agruparam com nenhum outro acesso, formando quatro grupos diferentes, sugerindo que esses acessos são os mais distantes geneticamente entre si e dos demais acessos. O acesso SG14 ficou agrupado com os acessos SG16, SG17 e SG18 e os demais acessos formaram o maior grupo (Tabela 2).

Tabela 2. Grupos formados pelo método de Tocher com os 20 acessos de *Stylosanthes guianensis*.

Grupos	Acessos
I	1 4 7 6 9 8 10 3 11 5 12 2
II	16 18 17 14
III	15
IV	19
V	20
VI	13

Conclusões

Os resultados indicam uma alta similaridade genética entre os 20 acessos de *S. guianensis* estudados.

Apesar da alta similaridade genética detectada entre os 20 acessos foi possível separá-los em diferentes grupos pelos métodos de análise de agrupamento empregados.

Os marcadores moleculares RAPD discriminaram todos os acessos de *S. guianensis* estudados.

Dos *primers* analisados, 77% geraram bandas polimórficas e poderão ser empregados como ferramenta de auxílio ao programa de melhoramento da espécie em questão.

Agradecimentos

À Embrapa Gado de Corte, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect) e à Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais (Unipasto), pelo auxílio financeiro.

Referências

BALDIÓN, R.; LOZANO, J. C.; GROF, B. Evaluación de la resistencia de *Stylosanthes* spp. a la antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides*). **Fitopatologia**, Lima, v. 10, n. 3, p. 104-108, 1975.

BARROS, A. M.; FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; SHIRATSUCHI, L. S.; ANDRADE, R. P.; LOPES, G. K. B. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, n. 9, p. 899-909, 2005.

BONATO, A. L. V.; VERZIGNASSI, J. R.; RESENDE, R. M. S.; FERNANDES, C. D.; LEGUIZAMON, G. O. C. **Extração de DNA genômico de *Stylosanthes* spp.** Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 78).

BURT, R. L.; MILLER, C. P. *Stylosanthes* – a source of pasture legumes. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 9, n. 2, p. 117-123, 1975.

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

FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. **O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil.** Belo Horizonte: EPAMIG, 1979. 108 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. A. J. F.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C.; QUEIROZ, M. A. Outcrossing rate and implications for the improvement of a segregating population of watermelon. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1, n. 510, p. 47-54, 2000.

GAIOTTO, F. A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n. 5-6, p. 842-849, 1997.

GUODAO, L.; PHAIKAEW, C.; STÜR, W. W. Status of *Stylosanthes* development in other countries. II. *Stylosanthes* development and utilisation in China and south-east Asia. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 31, n. 4, p. 460-466, 1997.

KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. Uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil. In: Simpósio de forragicultura e pastagens: temas em evidência. **Anais...** Lavras: UFLA, 2000. p. 471-475.

KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P.; CHARCHAR, M. J. A.; GOMES, A. C. **Caracterização morfológica de acessos do gênero *Stylosanthes* no banco ativo de germoplasma da Embrapa Cerrados - coleção 1994/1995.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 24 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 72).

KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; CAMERON, D. F. Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA mark. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 6-7, p. 882-888, 1993.

LOCH, D. S.; FERGUSON, J. E. Tropical and subtropical forage seed production: an overview. In: LOCH, D. S.; FERGUSON, J. E. (Ed.). **Forage seed production. 2. Tropical and subtropical species**, New York: CABI Publishing, 1999. p. 1-40.

MACEDO, M. C. M. Pastagens no ecossistema Cerrados: pesquisa para o desenvolvimento sustentável. In: SIMPÓSIO SOBRE PASTAGENS NOS ECOSSISTEMAS BRASILEIROS. **Anais...** Brasília, DF: SBZ, 1995. p. 28-62.

MACEDO, M. C. M. Sistemas de produção animal em pasto nas savanas tropicais da América: limitações à sustentabilidade. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 16.; CONGRESO URUGUAYO DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 3., 2000, Montevideo. **Anais...** Montevideo: ALPA, 2000. 1 CD-ROM.

MANNETJE, L. Considerations on the taxonomy of the genus *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney: Academic Press, 1984. p. 1-21.

MILES, J. W.; GROF, B. Recent advances in studies of anthracnose of *Stylosanthes*. III. *Stylosanthes* breeding approaches in South America. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 31, n. 5, p. 430-434, 1997.

MILES, J. W.; LASCANO, C. E. Status of *Stylosanthes* development in other countries. I. *Stylosanthes* development and utilization in South America. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 31, n. 5, p. 454-459, 1997.

MIRANDA, C. H. B.; FERNANDES, C. D.; CADISCH, G. Quantifying the nitrogen fixed by *Stylosanthes*. **Pasturas tropicales**, Cali, v. 21, n. 1, p. 64-69, 1999.

SCHULTZE-KRAFT, R.; GIACOMETTI, D. C. Genetic resources of forage legumes for the acid infertile savannas of tropical America. In: SANCHES, P. A.; TERGAS, L. E. (Ed.). **Pasture production in acid soils of the tropics-beef program**. Cali: Centro Nacional de Agricultura Tropical, 1979. p. 55-64.

STACE, H. M.; CAMERON, D. F. Natural Distribution of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney: Academic Press, 1984. p. 73-101.

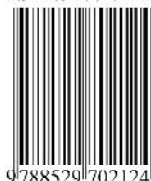
WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprints genomes using PCR with arbitrariness primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. L.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. **Nucleic Acidic Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

Embrapa

Gado de Corte

ISBN 85-297-0212-3



9 788529 702124

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**