

**Variabilidade genética molecular
entre acessos de *Stylosanthes
capitata* e *Stylosanthes
macrocephala*, resistentes e
suscetíveis à antracnose**



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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 27

**Variabilidade genética
molecular entre acessos
de *Stylosanthes capitata* e
Stylosanthes macrocephala,
resistentes e suscetíveis à
antracnose**

Lucimara Chiari

Vanessa de Fátima Jerba

Celso Dornelas Fernandes

Rosângela Maria Simeão Resende

Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2010

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.cnpvc.embrapa.br>

E-mail: publicacoes@cnpvc.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Cleber Oliveira Soares*

Secretário-Executivo: *Grácia Maria Soares Rosinha*

Membros: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima, Elane de Souza Salles, Fabiane Siqueira,*

Grácia Maria Soares Rosinha, Jaqueline Rosemeire Verzignassi, Lucimara Chiari, Paulo

Henrique Nogueira Biscola, Roberto Giolo de Almeida, Rodrigo Amorim Barbosa

Supervisão editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisão de texto: *Lúcia Helena Paula do Canto*

Normalização bibliográfica: *Elane de Souza Salles*

Editoração eletrônica e Tratamento de ilustrações: *Rodrigo Carvalho Alva*

Foto da capa: *Celso Dornelas Fernandes*

1ª edição

Versão online (2010)

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.

C 532v Chiari, Lucimara

Variabilidade genética molecular entre acessos de *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*, resistentes e suscetíveis à antracnose / Lucimara Chiari... [et al.]. – Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2010.

28 p. ; 21 cm. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN ISSN 1983-9715 ; 27).

Autores: Lucimara Chiari; Vanessa de Fátima Jerba;
Celso Dornelas Fernandes; Rosângela Maria Simeão Resende.

1. Pastagem. 2. Melhoramento genético vegetal. 3. Leguminosa forrageira. 4. *Stylosanthes capitata* 5. *Stylosanthes macrocephala* 6. Variedade resistente. 7. Antracnose. I. Chiari, Lucimara. II. Jerba, Vanessa de Fátima. III. Fernandes, Celso Dornelas. IV. Resende, Rosângela Maria Simeão. V. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). VI. Série.

CDD 636.2 (21. ed.)

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	9
Introdução.....	10
Material e Métodos.....	13
Resultados	15
Discussão	20
Conclusão	22
Agradecimentos	23
Referências	23

Variabilidade genética molecular entre acessos de *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*, resistentes e suscetíveis à antracnose

Lucimara Chiari

Vanessa de Fátima Jerba

Celso Dornelas Fernandes

Rosângela Maria Simeão Resende

Resumo

Stylosanthes capitata e *S. macrocephala* são, atualmente, as leguminosas forrageiras mais importantes para incrementar a alimentação animal, como fonte de proteína para o gado, e para a recuperação de pastagens degradadas, por capacidade de fixação de nitrogênio no solo. Marcadores Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) foram utilizados com o objetivo de avaliar a variabilidade genética de 14 acessos, resistentes e suscetíveis à antracnose, dessas duas espécies. Um total de 154 bandas de DNA foi gerado usando-se 26 primers, e em *S. capitata* foram amplificadas 115 bandas e em *S. macrocephala* 105. Os índices de similaridade genética obtidos variaram de 0,741 a 0,913 em *S. capitata* e de 0,724 a 0,924 em *S. macrocephala*, revelando uma baixa variabilidade genética em

² Bióloga, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, BR 262 Km 4, Caixa Postal 154, Campo Grande, MS, Brasil, CEP 79002-970, Telefone (67) 3368-2079, Fax (67) 3368-2150. Correio eletrônico: lchiari@cnpqg.embrapa.br

³ Bióloga, D.Sc., Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional (DCR) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect). Correio eletrônico: vjerba@cnpqg.embrapa.br

³ Engenheiro-Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Gado de Corte. Correio eletrônico: celsof@cnpqg.embrapa.br

³ Bióloga, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte. Correio eletrônico: rosangela@cnpqg.embrapa.br

cada espécie. Enquanto que, comparando-se os acessos das duas espécies, a média de similaridade foi 0,363, indicando uma alta variabilidade genética interespecífica. Um dendrograma foi construído conforme o método Unweighted Pair-group Method with Arithmetical Average (UPGMA) e dois grupos bem distintos foram formados, que corresponderam as duas espécies. Subgrupos puderam ser evidenciados em cada espécie, sem mostrar relação com a resistência ou suscetibilidade à antracnose. Resultado similar foi obtido com o método de Tocher, porém, nesse caso, em *S. macrocephala* os acessos resistentes ficaram agrupados separadamente dos suscetíveis. Esses resultados são relevantes na escolha de acessos resistentes à antracnose, visando ao desenvolvimento de novas cultivares a partir de misturas desses acessos ou seleção de genitores para cruzamentos.

Termos para indexação: leguminosas forrageiras, polimorfismos de DNA, RAPD, similaridade genética, *Stylosanthes*.

Molecular genetic variability among accessions of Stylosanthes capitata and Stylosanthes macrocephala, resistant and susceptible to anthracnose

Abstract

Stylosanthes capitata and S. macrocephala are, nowadays, the most important forage legume to increase animal feed, as a protein source for cattle, and to recover degraded pastures, by their soil nitrogen fixation capacity. RAPD markers (Random amplified polymorphic DNA) were used to evaluate the genetic variability of 14 anthracnose resistant and susceptible accessions of these two species. A total of 154 fragments of DNA were generated using 26 primers of arbitrary sequence. The genetic similarity indices ranged from 0.741 to 0.913 in S. capitata and from 0.724 to 0.924 in S. macrocephala, showing a low genetic variability in each species. However, the average genetic similarity among the accessions between species was 0.363, indicating a significant inter-specific genetic variability. A dendrogram was constructed based on pattern of bands using UPGMA method (Unweighted pair-group method with arithmetical average) and two main groups were obtained, corresponding to each species. Subgroups were also evidenced within each species, without relation with resistance or susceptibility to anthracnose. Similar result was obtained using the Tocher clustering method, but, in S. macrocephala this method clustered resistant accessions. These results are relevant in the choice of anthracnose resistant accessions, aiming to develop cultivars from mixtures of those accessions or selection of genitors.

Index terms: forage legumes, polymorphisms of DNA, RAPD, genetic similarity, *Stylosanthes*.

Introdução

Nos Cerrados brasileiros, a exemplo do que acontece em outras regiões tropicais e subtropicais, a pecuária bovina se baseia principalmente na utilização de pastagens para alimentação animal. Em consequência do grande número de espécies forrageiras existentes e da diversidade registrada entre elas quanto às exigências nutricionais e à adaptação a diferentes condições edafoclimáticas, as pastagens podem ocupar as mais variadas áreas, inclusive aquelas consideradas impróprias para a agricultura. Entretanto, a contribuição delas para a produção animal depende de sua produtividade e qualidade.

De acordo com Aronovich e Rocha (1985), um dos principais problemas da pecuária nos trópicos consiste na falta de alimentação nutricionalmente adequada para o gado, fato ainda verdadeiro no presente. Essa alimentação carece, principalmente, de suplementos vegetais proteicos durante todo o pastoreio e confinamento. Para amenizar esse problema, há vários anos, as leguminosas forrageiras vêm despertando interesse na alimentação animal, podendo ser utilizadas como bancos de proteína ou em consorciação com gramíneas.

Dentre todas as leguminosas tropicais com potencial forrageiro, o gênero *Stylosanthes* destaca-se, em virtude de possuir espécies ou acessos com alto conteúdo proteico, bom crescimento em solos relativamente pobres, fácil propagação, manutenção e boa produção de forragem, além de incorporar nitrogênio ao solo, em função da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* (BALDIÓN et al., 1975; SCHULTZE-KRAFT; GIACOMETTI, 1979; GROF et al., 2005).

Stylosanthes capitata e *S. macrocephala* destacam-se entre as espécies mais promissoras para uso forrageiro no Brasil, principalmente, por serem nativas e bem-adaptadas às condições edafoclimáticas do País (FERNANDES et al., 2005). Thomas et al. (1987) afirmam que *S. capitata* possui bom potencial para utilização em consorciação com gramíneas forrageiras, principalmente em áreas de cerrado, em virtude de se adaptar bem em solos ácidos e pouco férteis, resistir ao pastoreio, produzir significativas quantidades de matéria seca e de sementes, e ser palatável. Fernandes et al. (2000) verificaram que, em média, os acessos de *S. capitata* destacaram-se em produtividade de forragem e de sementes quando comparados a acessos das espécies de *S. guianensis*, *S. macrocephala* e *S. scabra*, em dois anos de avaliação.

Stylosanthes macrocephala tem sido citada pela sua tolerância a elevados teores de alumínio no solo, excelente adaptação aos solos ácidos (pH até 3,8) e baixa exigência em fósforo, além de alto valor nutritivo (SCHULTZE-KRAFT et al., 1984; FERNANDES, 2003). Ainda, segundo esses mesmos autores, acessos de *S. macrocephala* muito se assemelham aos de *S. capitata* quanto ao valor nutritivo e adaptação, no entanto, esta tem distribuição natural mais ampla.

Apesar da importância dessas leguminosas, o seu cultivo tem sido limitado em virtude da alta intensidade de antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* que, em genótipos suscetíveis, provoca intensa desfolha e morte de plantas, reduzindo a qualidade e a produção total delas (SONODA, 1973; LENNÉ; SONODA, 1978; BALDIÓN et al., 1975; LENNÉ et al, 1983; GROF et al., 2005; FERNANDES, 2003; FERNANDES et al, 2005). O controle de tal doença é agravado pela grande especialização patogênica de *C. gloeosporioides*, possibilitando ao fungo a geração de novas raças fisiológicas (LENNÉ et al. 1984; IRWIN et al., 1984).

Em estudos realizados por Fernandes et al. (1993, 2000), visando a avaliar a reação de acessos de *S. capitata* à antracnose, foram observadas diferenças significativas em resistência entre eles, identificando-se

materiais com grande potencial. Em *S. macrocephala*, um grande número de acessos tem apresentado alta resistência à antracnose (FERNANDES, 2003).

O programa de melhoramento de *Stylosanthes*, desenvolvido na Embrapa Gado de Corte, baseia-se na identificação de genótipos promissores que são, posteriormente, arrançados em multilinhas com uma ou duas espécies. Há evidência de baixos níveis de severidade da antracnose em pastagens semeadas com misturas na Austrália (DAVIS et al., 1994) e América de Sul (LENNÉ, 1985; FERNANDES, 2003; GROF et al., 2005). Seguindo essa premissa, a Embrapa Gado de Corte lançou em 2000 uma multilinha de *S. capitata* e *S. macrocephala*, denominada estilosantes-campo-grande. Tal cultivar é composta de progênes melhoradas de *S. capitata* e *S. macrocephala*, cujas sementes são misturadas fisicamente na proporção de 80% e 20%, respectivamente (CULTIVO..., 2007). Os resultados obtidos revelaram que essa é uma boa estratégia para uso comercial de *Stylosanthes* em seu centro de diversidade, onde a doença é endêmica e há muita variabilidade do patógeno (GROF et al., 2005).

Sem dúvida, uma das maneiras mais eficientes e econômicas de controlar uma doença em plantas é por meio do uso de cultivares resistentes. Logo, estratégias devem ser combinadas para auxiliar os programas de melhoramento que visam à obtenção de cultivares comerciais resistentes, adaptadas às várias regiões do País. Nesse sentido, métodos que exploram a variabilidade intra e interacessos vêm sendo adotados visando a estabelecer estratégias de melhoramento.

Marcadores moleculares, como Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (WILLIAMS et al., 1990), têm sido considerados ferramentas poderosas para o estudo da variabilidade genética, especialmente em genomas "anônimos" (desconhecidos) (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998), como é o caso das espécies de *Stylosanthes* estudadas. Esse fato, aliado às facilidades de automatização, ao baixo custo operacional, à rapidez e simplicidade na análise, ao bom grau de polimorfismo e

à ampla cobertura do genoma, fez dessa técnica uma das mais utilizadas para estudos de diversidade genética em plantas (DIAS et al., 2004), o que ainda ocorre no presente e nas mais diversas espécies vegetais (CÍCERO et al., 2007; JUNQUEIRA et al., 2007; PEREIRA et al., 2008).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de acessos elite de *S. capitata* e *S. macrocephala*, resistentes e suscetíveis à antracnose, fazendo uso de marcadores RAPD. Os resultados poderão ser utilizados pelo programa de melhoramento genético de *Stylosanthes* realizado pela Embrapa Gado de Corte, para auxiliar na escolha de acessos para cruzamentos e/ou para formação de misturas, visando a desenvolver novas cultivares.

Material e Métodos

Foram analisados 14 acessos elite de *Stylosanthes*, previamente selecionados quanto às características agronômicas e avaliados quanto à resistência à antracnose, sendo sete de *S. capitata* e sete de *S. macrocephala* (Tabela 1), todos pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, localizada no município de Campo Grande, MS. Foram feitas mudas desses acessos, por meio de estaquia, mantidas em casa de vegetação desse centro de pesquisa. Dessas plantas individuais foram colhidas folhas jovens e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer (-80°C) até a extração de DNA.

Para extração de DNA foi utilizado o método descrito por Bonato et al. (2002), com a seguinte modificação: adição de acetato de amônio 7,5 M nas etapas de precipitação, para diminuir a contaminação por polissacarídeos presentes nas amostras de DNA. O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose 0,8%, pré-corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado em luz ultravioleta (UV). As concentrações foram estimadas por comparação com padrões de bandas do lambda DNA (Invitrogen) diluídos para 100 ng/µL, 200 ng/µL e 300 ng/µL. Após

Tabela 1 – Acessos de *Stylosanthes macrocephala* e *S. capitata* estudados, suscetíveis (S) e resistentes (R) à antracnose

Espécie	Acesso	Avaliação para antracnose	Espécie	Acesso	Acesso	Avaliação para antracnose
<i>S. macrocephala</i>	Sm1506	R	<i>S. capitata</i>	Sc1019	Sc1019	R
	Sm1508	R		Sc1081	Sc1081	S
	Sm1509	R		Sc1082	Sc1082	S
	Sm1511	R			Sc1091	R
	Sm1572	S			Sc1158	R
	Sm1582	R			Sc1170	S
	Sm1587	S			Sc1091	Sc1469

quantificadas, parte das amostras de DNA foi diluída a 5 ng/ μ L para utilização nas reações de amplificação. Essas reações foram realizadas em volume total de 25 μ L contendo: 0,4 mM de primer; 0,2 mM de cada dNTP; 2 units de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 1x tampão da Taq DNA polimerase (Invitrogen); 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen); e 20 ng de DNA. Foi utilizado o termociclador PTC-100 (MJ Research) programado para 40 ciclos consistindo de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 35°C e 2 minutos a 72°C, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para cada análise, foi feito um controle negativo (reação contendo todos os reagentes exceto o DNA) utilizado para maior confiabilidade dos resultados. As amplificações foram feitas com um total de 26 primers de RAPD (Tabela 2), sintetizados pela Invitrogen, que foram previamente selecionados quanto ao polimorfismo expresso em acessos de *S. capitata* em trabalhos anteriores (dados não publicados).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 1,5%, pré-corados com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), utilizando o tampão TBE 1X (0,89 M Tris; 0,89 M borato e 0,08 M EDTA) a 100 volts durante, aproximadamente, 3 horas. Após a eletroforese,

Tabela 2 – Lista dos 26 primers de RAPD utilizados nas análises em *S. macrocephala* e *S. capitata* com suas sequências de nucleotídeos

Primer	Sequência	Primer	Sequência
2	GGG AAC GTG T	B14	TCC GCT CTG G
3	CAA ACG TGG G	E01	CCC AAG GTC C
9	CCT TGA CGC A	E03	CCA GAT GCA C
12	ACA ACT GGG G	F12	ACG GTA CCA G
20	ACT TCG CCA C	M02	ACA ACG CCT C
21	CCC AGT CAC T	N01	CTC ACG TTG G
28	AAG GCT CGA C	Q20	TCG CCC AGT C
32	GGC ACG CGT T	Z10	CCG ACA AAC C
35	GGG AAC CCG T	AD03	TCT CGC CTA C
39	GGT GAC TGT G	AL03	CCC ACC CTT G
52	AAG TGC ACG G	AN10	CTG TGT GCT C
81	GGA GCG TAC T	BA02	TGC TCG GCT C
95	GTG ACC AGA G	BA03	GTG CCA GAA C

os géis foram visualizados em luz UV e fotodocumentados usando o sistema L.Pix Image (Loccus Biotecnologia).

Os padrões de RAPD obtidos para cada primer foram analisados quanto à presença “1” e à ausência “0” de bandas, para construção de uma matriz de similaridade genética usando o coeficiente de Jaccard. A análise de agrupamento foi realizada pelos métodos Unweighted Pair-group Method with Arithmetical Average (UPGMA) e de Tocher, utilizando os dados de dissimilaridade genética (complemento aritmético dos dados de similaridade). As análises foram feitas pelo programa GENES para Windows (CRUZ, 2001) versão 2005.6.1.

Resultados

Os 26 primers de RAPD utilizados amplificaram com sucesso o DNA dos indivíduos das duas espécies estudadas, apesar de a seleção desses primers ter sido realizada apenas em *S. capitata*. Um total de 154

bandas nítidas e reproduzíveis foi gerado, perfazendo uma média de aproximadamente seis bandas por primer. Para cada espécie, o número total de bandas amplificadas e polimórficas foram, respectivamente, 115 e 45 (39,13%) em *S. capitata* e 105 e 36 (34,28%) em *S. macrocephala*.

Os coeficientes de similaridade genética calculados variaram de 0,317 a 0,924, e os acessos geneticamente mais divergentes foram Sm1582 (*S. macrocephala*) e Sc1019 (*S. capitata*) (0,317) e os mais similares foram os acessos de *S. macrocephala* Sm1511 e Sm1508 (0,924) (Tabela 3).

Nesta matriz, observa-se que os coeficientes de similaridade genética entre os acessos da mesma espécie foram altos e variaram pouco. Em *S. capitata*, a variação foi de 0,741 a 0,913, sendo os acessos Sc1019 e Sc1082 os mais similares (0,913) e Sc1082 e Sc1170 os mais divergentes (0,741). Da mesma forma, em *S. macrocephala* os coeficientes variaram de 0,724 a 0,924, e os acessos mais similares foram Sm1506 e Sm1587 (0,924) e os mais divergentes Sm1511 e Sm1508 (0,724). Esses resultados indicam uma baixa variabilidade intraespecífica, tanto em *S. capitata* quanto em *S. macrocephala*. Por outro lado, quando os acessos dessas duas espécies foram comparados aos pares, a similaridade genética foi baixa e variou de 0,317 a 0,4, indicando uma alta variabilidade genética interespecífica.

O dendrograma baseado nos dados de dissimilaridade genética entre os acessos mostra, claramente, os acessos separados em dois grupos que correspondem às espécies estudadas. Considerando-se uma dissimilaridade genética relativa de 30%, esses grupos podem ainda ser divididos em três subgrupos para *S. macrocephala* e dois para *S. capitata* (Figura 1).

Em *S. macrocephala*, o subgrupo 1A foi formado pelos acessos Sm1511, Sm1508 e Sm1506, todos resistentes à antracnose; o subgrupo 1B por dois acessos resistentes (Sm1582, Sm1509) e um suscetível à antracnose (Sm1572) e o subgrupo 1C por apenas um

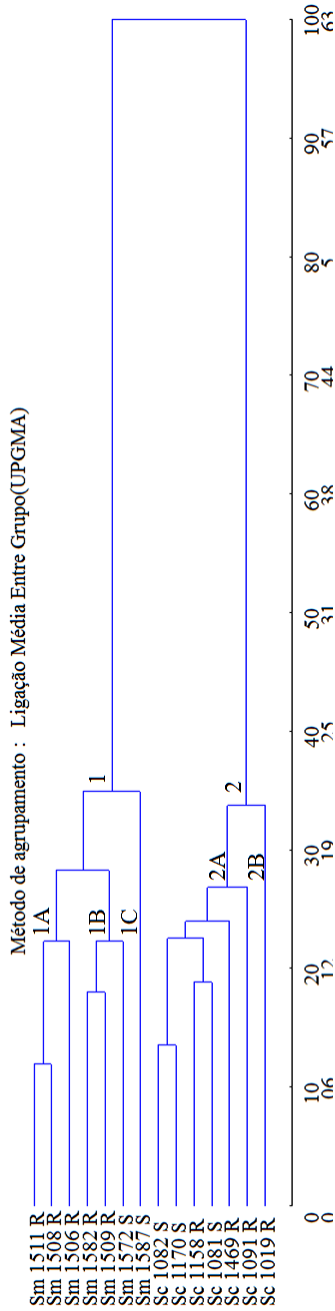


Figura 1 – Dendrograma obtido pelo método UPGMA com dados de dissimilaridade genética entre os acessos de *Stylosanthes*, sendo Sm os acessos de *S. macrocephala* e Sc os acessos de *Stylosanthes capitata*, R são acessos resistentes à antracnose e S os suscetíveis à antracnose; 1 e 2 são os grupos principais e 1A, 1B, 1C, 2A e 2B, os subgrupos.

acesso suscetível à antracnose (Sm1587). Em *S. capitata*, os subgrupos formados foram: 2A - constituído pelos acessos Sc1091, Sc1469 e Sc1158 (resistentes à antracnose) e Sc1081, Sc1082 e Sc1170 (suscetíveis à antracnose); e subgrupo 2B - formado pelo acesso Sc1019, que é resistente à antracnose.

A análise de agrupamento realizada pelo método de otimização de Tocher obteve resultado similar ao dendrograma, separando os acessos em quatro grupos, sendo dois grupos para cada espécie (Tabela 4).

Tabela 4 – Agrupamento dos 14 acessos de *Stylosanthes* obtido pelo método de otimização de Tocher e marcadores RAPD

Grupos	Acessos
I	Sm 1511 (R) Sm 1508 (R) Sm1506 (R) Sm1509 (R) Sm1582 (R)
II	Sc 1082 (S) Sc 1170 (S) Sc 1158 (R) Sc 1469 (R) Sc 1081 (S) Sc 1091 (R)
III	Sm 1572 (S) Sm 1587 (S)
IV	Sc 1019 (R)

Sm = *Stylosanthes macrocephala*; Sc = *S. capitata*; (R) resistente à antracnose e (S) = e suscetível à antracnose

Os acessos de *S. macrocephala* ficaram agrupados nos grupos I (Sm1511, Sm1508, Sm1506, Sm1509 e Sm1582; resistentes à antracnose) e III (Sm1572 e Sm1587; suscetíveis à antracnose). O primeiro grupo de Tocher corresponde aos subgrupos 1A e 1B do dendrograma, exceto pelo acesso Sm1572, que nessa análise ficou agrupado com o acesso Sm1587, ambos os acessos suscetíveis à antracnose. Os acessos de *S. capitata* ficaram agrupados nos grupos II (Sc1082, Sc1170, Sc1158, Sc1469, Sc1081 e Sc1091; sendo três acessos suscetíveis e três resistentes à antracnose) e IV (Sc1019; resistente à antracnose). Os grupos II e IV de Tocher correspondem, exatamente, aos subgrupos 1B e 2B do dendrograma, respectivamente.

Discussão

Apesar da baixa variabilidade intraespecífica detectada neste trabalho para *S. capitata* e *S. macrocephala*, observada pelos altos coeficientes de similaridade genética estimados, os níveis de polimorfismo detectados (34,28% para *S. macrocephala* e 39,13% para *S. Capitata*), com a utilização de 26 primers, foram superiores aos descritos por outros autores que avaliaram acessos de outras espécies de *Stylosanthes*, também por marcadores RAPD. Kazan et al. (1993a) estimaram a variabilidade genética em 20 acessos e cultivares representando quatro das espécies de *Stylosanthes*, *S. guianensis*, *S. scabra*, *S. hamata* e *S. humilis*, com cerca de 200 marcadores RAPD, e observaram uma variação de 0% a 16% no nível de polimorfismo detectado dentro de cada espécie.

Kazan et al. (1993b), utilizando 200 marcadores RAPD, encontraram um nível de polimorfismo um pouco superior para *S. guianensis* (25,6%), mas nesse trabalho eles avaliaram um número maior de acessos de diferentes taxas dentro do complexo *S. guianensis*. Logo, pela comparação com esses resultados, o maior nível de polimorfismo detectado neste trabalho sugere que a variabilidade genética em *S. capitata* e *S. macrocephala* seja mais acentuada que nas espécies estudadas por Kazan et al. (1993a, 1993b).

O tipo de marcador molecular também interfere no nível de polimorfismo observado. Vander-Stappen et al. (1999), utilizando 18 locos de SSR ou microssatélites, que são mais polimórficos comparados aos marcadores RAPD, observaram 45% de polimorfismo em *S. guianensis*. Até o momento, não foram descritos na literatura primers específicos de microssatélites para as duas espécies estudadas neste trabalho. Níveis maiores de polimorfismos podem ser esperados com o uso desses marcadores em trabalhos futuros.

Os coeficientes de similaridade genética interespecíficos obtidos neste trabalho foram em média 0,36, denotando alta variabilidade genética entre as duas espécies estudadas; o contrário foi observado dentro de

cada espécie. Esses resultados são concordantes com os de Kazan et al. (1993a), que também observaram alta variabilidade interespecífica e baixa variabilidade genética intraespecífica estudando *S. guianensis*, *S. scabra*, *S. hamata* e *S. humilis* com marcadores RAPD. Da mesma forma, Vieira et al. (1997), baseados nesses marcadores, encontraram o mesmo resultado em acessos de *S. guianensis*, *S. gracilis*, *S. grandifolia* e *S. humilis*. Por outro lado, Barros et al. (2005) observaram coeficientes de similaridade genética entre 0,58 e 0,97 em 86 acessos de *S. macrocephala*, usando marcadores RAPD, revelando uma variabilidade genética um pouco mais acentuada do que a observada neste trabalho para essa espécie. Uma explicação para esse achado pode ser o grande número de acessos analisados provenientes de diferentes regiões edafoclimáticas, enquanto neste trabalho foram avaliados apenas sete acessos sob seleção.

O dendrograma obtido pelo método UPGMA mostra a potencialidade dos marcadores RAPD na discriminação de espécies e de indivíduos dentro de espécies. Por esse dendrograma e os resultados da análise de Tocher, nota-se que existe divergência genética suficiente para distribuir acessos da mesma espécie em subgrupos diferentes, apesar da baixa variabilidade genética intraespecífica observada.

A importância desses resultados deve ser discutida em termos de tipos de cultivares a serem obtidas em programas de melhoramento genético do gênero, nos quais a persistência da leguminosa sob pastejo é um dos objetivos da seleção. A persistência está estritamente relacionada com a sobrevivência, a qual depende também da longevidade, capacidade de competição e da ressemeadura natural (RESENDE et al., 2008). Particularmente para *Stylosanthes*, deve-se mencionar a resistência à antracnose como um dos fatores determinantes da sobrevivência. Do componente resistência é essencial a compreensão do seu mecanismo e da dinâmica do fungo causador da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), de forma a promover o desenvolvimento de cultivares com resistência múltipla, pois o fungo possui raças fisiológicas que levam à superação da resistência à doença (FERNANDES, 2003).

Dessa forma, estudos de combinações de espécies de *Stylosanthes* e/ou de acessos resistentes dentro dessas espécies, bem como de gramíneas e leguminosas com melhor compatibilidade, poderão resultar em recomendações de cultivares mais persistentes e adequadas ao sistema de produção.

Nesse contexto, os resultados de similaridade genética e agrupamento entre os acessos estudados reforçam a ideia de realizar misturas interespecíficas buscando explorar a variabilidade genética existente, no caso combinando acessos resistentes de *S. capitata* e *S. macrocephala*. Diferentes combinações de acessos resistentes podem ser candidatas a novas cultivares.

Especificamente em *S. capitata*, em ambas as análises de agrupamento, também podem ser selecionados acessos resistentes mais divergentes, que ficaram em grupos diferentes, para compor misturas intraespecíficas, e serem estas lançadas como cultivares, ou para hibridação, dando continuidade ao programa de melhoramento da espécie. Porém, em *S. macrocephala*, apenas pelo método UPGMA foram observados acessos resistentes distribuídos em subgrupos distintos, possibilitando a seleção de acessos mais divergentes. Tal diferenciação de grupos para *S. macrocephala* não foi observada quando o método de Tocher foi usado. Este separou os acessos dessa espécie em um grupo de acessos resistentes e outro de acessos suscetíveis à antracnose.

Conclusões

Conforme a análise desses 14 acessos, resistentes e suscetíveis à antracnose, das espécies *S. capitata* e *S. macrocephala* por marcadores RAPD:

- Existe alta variabilidade genética interespecífica que pode ser explorada nos programas de melhoramento genético do gênero para fins de composição de misturas de acessos resistentes à antracnose para recomendação de cultivo.

- Em *S. capitata*, houve a separação de acessos resistentes em diferentes grupos em ambas as análises de agrupamento, os quais podem compor misturas intraespecíficas mais divergentes para lançamento como cultivares, ou, ainda, ser utilizados em cruzamentos divergentes.

Agradecimentos

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

Referências

- ARONOVICH, S.; ROCHA, G. L. da. Gramíneas e leguminosas forrageiras de importância no Brasil Central Pecuário. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.132, p.3-13, 1985.
- BALDIÓN, R.; LOZANO, J. C.; GROF, B. Evaluación de la resistencia de *Stylosanthes spp.* a la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Fitopatología**, v.10, n.2, p.104-108, 1975.
- BARROS, A. M.; FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; SHIRATSUCHI, L. S.; ANDRADE, R. P. de; LOPES, G. K. B. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 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. de 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).
- CÍCERO, E. A. S.; PITELLI, R. A.; SENA, J. A. D.; FERRAUDO, A. S. Variabilidade genética e sensibilidade de acessos de *Pistia stratiotes* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.25, n.3, p.579-587, 2007.
- CRUZ, C. D. Programa Genes – versão windows. Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. 642 p.

CULTIVO e uso do Estilosantes-campo-grande. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2007. 11 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado técnico, 105).

DAVIS, R. D.; BOLAND, R. M.; HOWITT, C. J. The developing relationship between *Stylosanthes* and anthracnose after 14 years in a north Queensland pasture. 2. Diversity in the pathogen population. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, Au, v.34, n.5, p.621-626, 1994.

DIAS, L. A. dos S.; PICOLI, E. A. T.; ROCHA, R. B.; ALFENAS, A. C. A priori choice of hybrid parents in plants. **Genetics Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.3, n.3, p.356-368, 2004.

FERNANDES, A. T. F.; FERNANDES, C. D.; GROF, B. Reação de acessos de *Stylosanthes capitata* à antracnose. **Pasturas Tropicais**, v.15, n.3, p.23-26, 1993.

FERNANDES, C. D. **Resistência de progênie de *Stylosanthes capitata* e *S. macrocephala* à antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides***. Botucatu, 2003. 90 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

FERNANDES, C. D.; GROF, B.; CHAKRABORTY, S.; VERZIGNASSI, J. R. Estilosantes Campo Grande in Brazil: a tropical forage legume success story. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 20., 2005, Ireland; United Kingdom. **Offered Papers**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2005. p. 330.

FERNANDES, C. D.; MIRANDA, C. H. B.; FERNANDES, A. T. F.; CHAKRABORTY, S.; GROF, B. Avaliação agrônômica de acessos de *Stylosanthes spp.* nos cerrados de Mato Grosso do Sul. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2000, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: SBZ, 2000. p. 20. 1 CD-ROM.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p. il. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20).

GROF, B.; FERNANDES, C. D.; VERZIGNASSI, J. R. Recent advances in *Stylosanthes* research in Tropical America. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 20., 2005, Ireland; United Kingdom. **Offered Papers**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2005. p. 339.

IRWIN, J. A. G.; CAMERON, D. F.; RATCLIFF, D. Influence of environmental factors

on development of the anthracnose diseases of *Stylosanthes* spp. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.35, n.4, p.473-478, 1984.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; RAMOS, J. D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.3, p.571-575, 2007.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; CAMERON, D. F. Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genome**, Toronto, v.36, n.1, p.43-49, 1993b.

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

LENNÉ, J. M. Potential of mixtures of *Stylosanthes guianensis* for controlling anthracnose. **Phytopathology**, St. Paul, MN, v.75, n.11, p.1317-1318, 1985.

LENNÉ, J. M. ; SONODA, R. M. *Colletotrichum* spp. on tropical forage. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, MD, v.62, n.9, p.813-17, 1978.

LENNÉ, J. M.; THOMAS, D.; ANDRADE, R. P. de.; VARGAS, A. Anthracnose of *Stylosanthes capitata*: implications for future disease evaluations of indigenous tropical pasture legumes. **Phytopathology**, St. Paul, MN, v.74, n.9, p.1070-1073, 1984.

LENNÉ, J. M.; VARGAS H., A.; TORRES G., C. **Descripción de las enfermedades de las principales leguminosas forrajeras tropicales**. Cali: CIAT, 1983. 50 p. (CIAT. Guia de Estudio. Serie O4SP)

PEREIRA, V. A.; MACHADO, M. A.; AZEVEDO, A. L. S.; NASCIMENTO, C. S. do; CAMPOS, A. L.; LÉDO, F. J. da S. Diversidade genética entre acessos de capim-elefante obtida com marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.37, n.7, p.1216-1221, 2008.

RESENDE, R. M. S.; RESENDE, M. D. V.; JANK, L.; VALLE, C. B. do; CANÇADO, L. J.; CHIARI, L. Melhoramento genético de leguminosas forrageiras. In: RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do; JANK, L. (Ed.). **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2008. p. 117-159.

SCHULTZE-KRAFT, R.; GIACOMETTI, D. C. Genetic resources of forage legumes for the acid infertile savannas of tropical America. In: SANCHEZ, P. A.; TERGAS, L. E. **Pasture production in acid soils of the tropics-beef program**. Cali: CIAT, 1979. p. 55-64.

SCHULTZE-KRAFT, R.; COSTA, N. M. S.; FLORES, A. *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferr. et S. Costa: collection and preliminary agronomic evaluation of a new tropical pasture legume. **Tropical Agriculture**, v.3, n.61, p.230-240, 1984.

SONODA, R. M. Incidence of Colletotrichum leaf spot and stem canker on introductions and selections of *Stylosanthes humilis*. **Plant Disease Report**, Beltsville, MD, v.57, p.747-749, 1973.

THOMAS, D.; LASCANO, C. E.; VERA, R. R. A tropical pasture legume for poor soils. **Span**, v.30, n.2, p.59-61, 1987.

VANDER-STAPPEN, J.; WELTJENS, I.; VOLCKAERT, G. Microsatellite markers in *Stylosanthes guianensis*. **Molecular Ecology**, v.8, p.514-517, 1999. Issue 3.

VIEIRA, M. L. C.; FUNGARO, M. H. P.; JUBIER, M. F.; LEGEUNE, B. Determination of taxonomic relationships among Brazilian taxa of *Stylosanthes sw.*, Leguminosae, using RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.32, n.3, p.305-310, 1997.

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



Gado de Corte

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**

CGPE 8923