

# Estimativa da Taxa de Cruzamento em *Stylosanthes capitata* usando Marcadores RAPD

Lucimara Chiari<sup>1</sup>, Rosângela Maria Simeão Resende<sup>2</sup>, Elizangela Matida<sup>3</sup> e Carolina Sant'Ana Robles<sup>4</sup>

## Introdução

Em *Stylosanthes*, importante gênero de leguminosas forrageiras tropicais, existem poucas informações com relação ao sistema de cruzamento. Há relatos de espécies autógamas, *S. scabra* [1], e de reprodução mista, *S. capitata* e *S. guianensis* [2,3].

O sistema de reprodução tem papel fundamental na determinação da estrutura genética de populações e importante implicações práticas nos programas de melhoramento, desde a formação e manutenção de germoplasma, na escolha de métodos de melhoramento adequados e na produção de sementes [4].

Uma das maneiras de se conhecer o sistema reprodutivo de uma espécie é através da estimativa da taxa de cruzamento obtida a partir de marcadores genéticos usando progênies de polinização aberta ( $t$ ) [5]. Marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), embora de caráter dominante, têm sido utilizados com sucesso para estimar a taxa de cruzamento de diferentes espécies e populações [5, 6, 7].

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estimar a taxa de cruzamento em *S. capitata* usando marcadores RAPD em estrutura de progênies, baseando-se no modelo misto de reprodução.

## Material e métodos

### Material Vegetal

Vinte progênies foram colhidas em um experimento de avaliação de 35 acessos, com 1260 plantas. Dez plantas de cada progênie, num total de 200 indivíduos, tiveram seus DNAs extraídos utilizando a metodologia de Bonato *et al.* [8]. Os DNAs foram quantificados em gel de agarose 0,8%, por comparação com padrões de concentração conhecida (100, 300 e 500 ng/ $\mu$ L).

### Reações de RAPD

As reações foram preparadas em volume final de 25  $\mu$ L contendo: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,08 mM dNTPs, 4% DMSO (Sigma), 1 U *Taq* DNA polimerase, 1x tampão da *Taq* DNA polimerase, 0,4  $\mu$ M de *primer* e 20 ng de DNA

genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research) seguindo 40 ciclos de: desnaturação (94°C, 1 min.), alinhamento dos *primers* (40°C, 1,5 min.) e extensão (72°C, 2 min.); seguidos de uma extensão final (72°C, 7 min.). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídio (0,5  $\mu$ L/mL). Após, os géis foram fotografados e analisados.

Nove *primers* foram utilizados nas análises: A20, AF02, C02, C09, D03, L07, 03, 32, 39.

### Análise dos Dados

Uma matriz de dados binários foi gerada após leitura dos géis de RAPD, onde se utilizou o valor "1" para a presença do marcador e "2" para sua ausência. Somente locos polimórficos foram utilizados nas análises. Esses dados foram analisados pelo programa MLDT (Estimation of Outcrossing with Dominant Markers) [9], que permitiu estimar: a taxa de cruzamento multiloco ( $t_m$ ); a taxa de cruzamento uniloco ( $t_s$ ); a taxa de autofecundação ( $s = 1 - t_m$ ); a taxa de cruzamento entre aparentados ( $t_m - t_s$ ); o coeficiente de endogamia dos genitores ( $F$ ); a correlação de paternidade multiloco ( $r_{pm}$ ) e a correlação de paternidade uniloco ( $r_{ps}$ ). Essas estimativas foram calculadas pelo método de máxima verossimilhança, algoritmo numérico Esperança-Maximização (EM). A variância dos parâmetros avaliados foi estimada por 1000 reamostragens randomizadas (bootstraps) feitas dentro de progênies.

## Resultados

Os nove *primers* geraram 39 locos (bandas) adequados para se estimar os parâmetros do sistema de reprodução de *S. capitata*. O *primer* 32 gerou o maior número de bandas polimórficas (8) e o D03, o menor número (1). A Fig. 1 ilustra o padrão de bandas de duas progênies de *S. capitata* obtido com o *primer* 32.

As estimativas de  $t_m$  ( $0,663 \pm 0,066$ ),  $t_s$  ( $0,618 \pm 0,060$ ), e  $s$  ( $0,337$ ) (Tab. 1), evidenciaram que *S. capitata* é uma espécie de reprodução mista.

A diferença entre as estimativas de  $t_m$  e  $t_s$  ( $0,045 \pm 0,032$ ) foi baixa e estatisticamente igual a zero, considerando-se o

1. Lucimara Chiari é Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, BR 262 Km 4, Campo Grande, MS, CEP 79002-970. E-mail: lchiari@cnpqc.embrapa.br

2. Rosângela Maria Simeão Resende é Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, BR 262 Km 4, Campo Grande, MS, CEP 79002-970. E-mail: rosangela@cnpqc.embrapa.br

3. Elizangela Matida é Bióloga, Bolsista de Apoio Técnico/CNPq na Embrapa Gado de Corte, BR 262 Km 4, Campo Grande, MS, CEP 79002-970. E-mail: matida@cnpqc.embrapa.br

4. Carolina Sant'Ana Robles é Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal e Bolsista de Iniciação Científica/CNPq na Embrapa Gado de Corte, BR 262 Km 4, Campo Grande, MS, CEP 79002-970. E-mail: carolrobles82@yahoo.com.br

Apoio financeiro: CNPq, FUNDECT e UNIPASTO.

erro padrão da média, indicando que a ocorrência de cruzamentos entre genitores aparentados não foi significativa.

O coeficiente de endogamia ( $F$ ) (Tab. 1) estimado para os genótipos maternos foi alto e estatisticamente significativo ( $0,571 \pm 0,055$ ), o que indica uma alta homozigose (em média 57%) em cada genitor. Essa taxa é superior a estimada na geração atual ( $F = 0,20$ ).

As estimativas de correlação de paternidade multilocos  $r_{pm}$  ( $0,309 \pm 0,030$ ) e unilocos  $r_{ps}$  ( $0,124 \pm 0,006$ ) foram estatisticamente significativas, evidenciando a ocorrência de cruzamentos biparentais, ou seja, progênies geradas pelos mesmos genitores materno e paterno (irmãos completos). A diferença entre essas correlações foi baixa ( $0,185 \pm 0,028$ ), mas significativamente diferente de zero, revelando que cada genitor masculino contribuiu para a geração de diferentes famílias de irmãos completos.

## Discussão

Os resultados comprovaram que *S. capitata* é uma espécie de reprodução mista e que neste ciclo reprodutivo, 33,7% das plantas foram originadas por autofecundação e 66,3% por cruzamentos, sendo 61,8% entre indivíduos não aparentados e 4,5% entre aparentados. Miles [2] encontrou 20% de alogamia em *S. capitata* usando marcadores morfológicos, num estudo realizado na Colômbia. Alterações nas taxas de cruzamento em diferentes populações de uma espécie pode ser explicada por fatores como: alterações no comportamento e, ou, na densidade de animais polinizadores [10]; e o marcador genético utilizado. Marcadores RAPD, usados aqui, derivam, geralmente, de regiões não-codificantes do DNA e são neutros; enquanto os marcadores morfológicos, usados por Miles [2], são derivados de regiões codificantes do DNA e, em geral, sofrem influência do ambiente e conferem algum valor adaptativo [4].

As estimativas das correlações de parentesco multiloco e uniloco denotam que as plantas originadas de cruzamentos são constituídas, não apenas de meios irmãos, mas também de irmãos completos. As possíveis explicações para a ocorrência de cruzamentos biparentais incluem: o comportamento dos polinizadores, com visitas sistemáticas de plantas próximas; e o assincronismo no florescimento dos acessos de *S. capitata* utilizados como genitores.

O conhecimento da taxa de cruzamento em *S. capitata* é determinante na definição de estratégias de manutenção de seu germoplasma e de melhoramento, nas estimativas de parâmetros genéticos, predição de

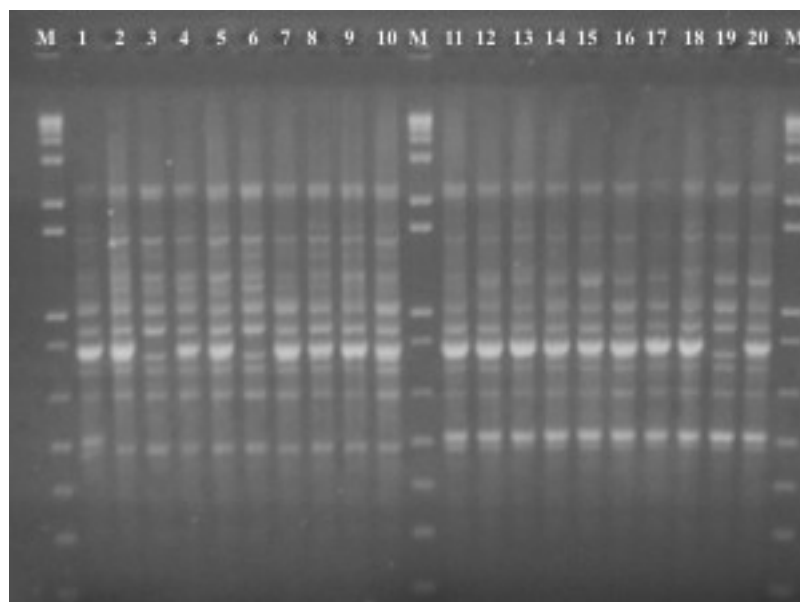
valores genéticos dos indivíduos candidatos à seleção e dos tipos de cultivares a serem obtidas. Diante dos resultados evidencia-se a necessidade de explorar a variabilidade genética dentro de progênies e dentro de acessos de *S. capitata*, de forma a obter maiores ganhos com seleção em curto prazo e definir estratégias mais indicadas para o melhoramento da espécie.

## Agradecimentos

À Gisele Campos Olivas Leguizamon, laboratorista da Embrapa Gado de Corte, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho e ao CNPq pelas bolsas de Apoio Técnico e Iniciação Científica concedidas à terceira e à quarta autora, respectivamente.

## Referências

- [1] STACE, H. M. 1982. Breeding systems in *Stylosanthes*. I. Observations of outcrossing in *S. scabra* at an alcohol dehydrogenase locus. Australian Journal of Agricultural Research, v. 33, p. 87-96.
- [2] MILES, J. W. 1983. Natural outcrossing in *Stylosanthes capitata*. Tropical Grasslands, Cali, v. 17, n. 3, p. 114-117.
- [3] MILES, J. W. 1985. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of outcrossing rate in *Stylosanthes guianensis*. Australian Journal of Agricultural Research, v. 36, p. 259-265.
- [4] SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y. & SEBBENN, A. M. 2003. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (Bombaceae). Revista Brasileira de Botânica, v. 26, n. 1, p. 113-121.
- [5] WADT, L. H. O. & KAGEYAMA, P. Y. 2004. Estrutura genética e sistema de acasalamento de *Piper hispidinervum*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 39, n. 2, p. 151-157.
- [6] FERREIRA, M. A. J. F.; QUEIROZ, M. A.; VENCOSKY, R.; BRAZ, L. T. & VIEIRA, M. L. C. 2004. Implicações da expressão sexual e do sistema reprodutivo de melancia em programas de pré-melhoramento. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 24 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 65).
- [7] GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. 1997. Estimation of outcrossing rate in breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, v. 95, p. 842-849.
- [8] BONATO, A. L. V.; VERZIGNASSI, J. R.; RESENDE, R. M.; FERNANDES, C. D. & LEGUIZAMON, G. O. C. 2002. Extração de DNA genômico de *Stylosanthes* spp. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. 4 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 78).
- [9] RITLAND, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. Heredity, v. 88, p. 221-228.
- [10] MURAWSKI, D. A. 1995. Reproductive biology and genetics of tropical trees from canopy perspective. In: LOWMAN, M. D. & NADKARNI, N. M. (Eds.). Forest canopies. New York: Academic Press. p. 457-493.



**Figura 1.** Padrão de bandas de duas progênes de *S. capitata*, gerado com os *primer* 32: 1 a 10, indivíduos da progênie I; 11 a 20, indivíduos da progênie II; M, marcador de peso molecular 1kb *plus* DNA *ladder*.

**Tabela 1:** Estimativas dos parâmetros associados ao modo de cruzamento de *S. capitata*.

Parâmetros	Estimativas (erro padrão)
Taxa de cruzamento multiloco ( $t_m$ )	0,663 (0,066)
Taxa de cruzamento uniloco ( $t_s$ )	0,618 (0,060)
Taxa de autofecundação ( $s = 1 - t_m$ )	0,337
Taxa de cruzamento entre parentes ( $tm - ts$ )	0,045 (0,032)
Coefficiente de endogamia dos genitores maternos ( $F$ )	0,571 (0,055)
Correlação de paternidade multiloco ( $r_{pm}$ )	0,309 (0,030)
Correlação de paternidade uniloco ( $r_{ps}$ )	0,124 (0,006)