

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTABELECIMENTO DE COLEÇÃO DE TRABALHO DE *Stylosanthes macrocephala* COM BASE EM MARCADORES RAPD

Fábio Gelape Faleiro*, Ana Maria Barros, Alessandra S. Gelape Faleiro, Maria Cristina R. Cordeiro, Cláudio Karia Takao, Antônio Carlos Gomes, Ronaldo Pereira Andrade

Embrapa Cerrados, Caixa Postal 08223, CEP 73301-970, Planaltina-DF
*e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O gênero *Stylosanthes* possui diversas espécies que podem ser utilizadas como alimento para animais em pastagens consorciadas ou banco de proteína e como cobertura e adubo verde. Estas espécies contribuem para o aumento da matéria orgânica e nitrogênio do solo, possibilitando maior eficiência e a sustentabilidade de explorações agrícolas por pequenos e grandes produtores. A espécie *S. macrocephala* (Figura 1A) apresenta grande potencial, desde que se faça um adequado trabalho de seleção e melhoramento, considerando a variabilidade genética disponível. Existem diversas referências à variabilidade morfológica e agrônômica presente em acessos de *S. macrocephala*, entretanto poucas são as informações de caracterização genética de tal variabilidade. Não existe uma lista de descritores morfo-agronômicos estáveis e por isso a utilização de marcadores moleculares do DNA é uma alternativa de grande importância para tais estudos.

OBJETIVO

Caracterizar a variabilidade genético-molecular de 136 acessos de *S. macrocephala* com base em marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e com base neste estudo estabelecer uma coleção de trabalho formada por 15% dos acessos que representem, ao máximo, a variabilidade genética da coleção inicial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados, no presente trabalho, 136 acessos de *Stylosanthes macrocephala* que fazem parte do banco de germoplasma da Embrapa Cerrados, coletado em diferentes regiões do Brasil, além do cultivar 'Mineirão' de *S. guianensis* (Tabela 1). Os 136 acessos foram submetidos a uma avaliação morfo-agronômica preliminar (Figura 1B). Para as análises moleculares, 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 pela técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 μ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 μ M de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μ M 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 15 primers decâmeros: OPD1, OPD3, OPD11, OPE1, OPE2, OPE6, OPE11, OPE14, OPF3, OPF4, OPF7, OPF8, OPF9, OPF12 e OPF14. As amplificações foram efetuadas em termociclador (MJResearch), 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 6 minutos a 72 °C e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 μ L de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%), 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) (Figura 1C). 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 diversidade genética por meio da dispersão gráfica em espaço bidimensional baseada na minimização das diferenças entre as distâncias genéticas originais e as distâncias gráficas.

Para o estabelecimento da coleção de trabalho, foram selecionados 15% dos acessos da coleção inicial, o que corresponde a 20 acessos. O método de seleção adotado foi baseado na estratégia de escolha dependente da diversidade genética (Raamsdonk e Wijnker, 2000). Para isso, os acessos foram divididos em 20 grupos definidos com base na matriz de distâncias genéticas, adotado como critério de agrupamento o método da baseado na média - UPGMA (*Unweighted pair-group arithmetic average*). Para representar a diversidade genética da coleção inicial, foram selecionados um acesso por grupo.

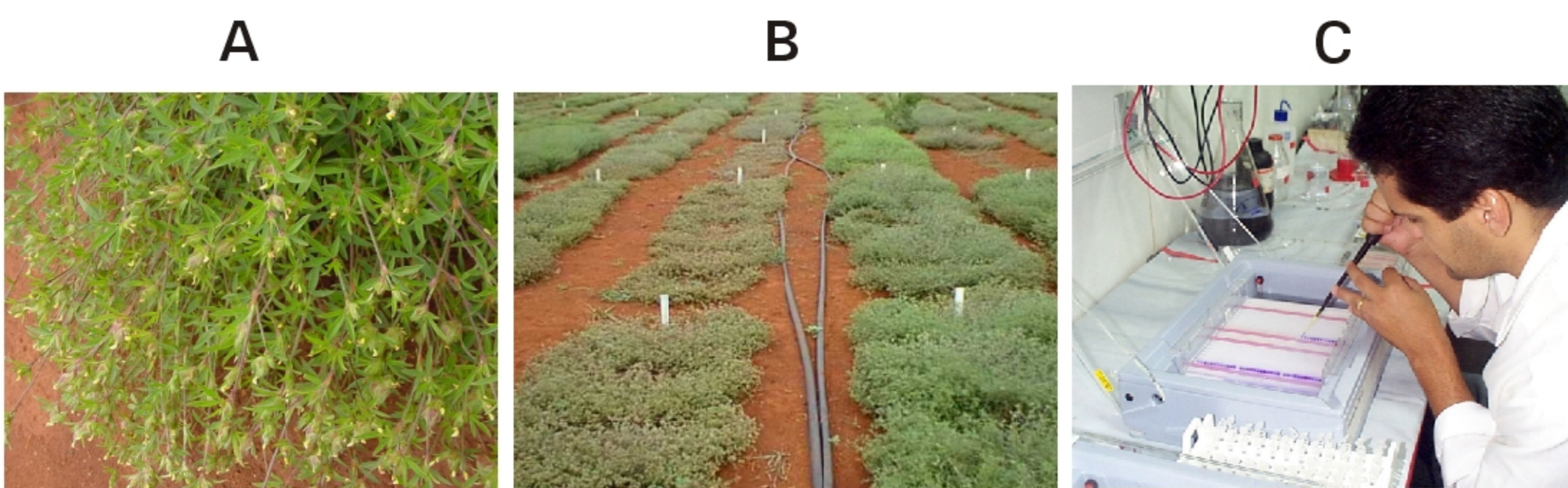


Figura 1. Ramificações de *Stylosanthes macrocephala* (A); Visão geral do experimento de campo para avaliações morfo-agronômicas preliminares de *S. macrocephala* (B); Aplicação de amostras de DNA dos 136 acessos de *S. macrocephala* avaliados neste trabalho (C).

RESULTADOS

Os 15 primers decâmeros geraram um total de 188 marcadores RAPD, incluindo-se aqueles gerados para o cultivar 'Mineirão' (*outgroup*), perfazendo uma média de 12,5 marcadores por primer. As distâncias genéticas entre os diferentes acessos de *Stylosanthes* variaram entre 0,02 a 0,74. As distâncias genéticas entre os acessos de *S. macrocephala* e o cultivar 'Mineirão' de *S. guianensis* (*outgroup*) variaram entre 0,5 a 0,74. O acesso CPAC1348 também chamou atenção pelas altas distâncias genéticas em relação aos demais acessos, as quais variaram entre 0,4 a 0,57. Uma análise fenotípica mais apurada deste acesso mostrou que o mesmo não pertencia à espécie *S. macrocephala* e sim à espécie *S. capitata*. A presença de três espécies de *Stylosanthes* é evidenciada pela análise de agrupamento feita com base nos marcadores moleculares (Figura 2).

Com base na matriz de distâncias genéticas entre os 135 acessos de *S. macrocephala*, foram estabelecidos 20 agrupamentos (Tabela 1). O número de acessos por agrupamento variou de 1 a 37. Apenas um acesso de cada grupo foi selecionado para compor a coleção de trabalho. Dez grupos apresentaram apenas um acesso. Os critérios de seleção dentro dos grupos com mais de um acesso foram características de sobrevivência, disponibilidade de semente e uniformidade genética de cada acesso avaliadas no campo e casa-de-vegetação (C. T. Karia, comunicação pessoal).

A dispersão gráfica dos acessos selecionados para compor a coleção de trabalho e dos demais acessos da coleção inicial pode ser observada na Figura 3. Os acessos selecionados ficaram bem distribuídos ao longo do espaço bidimensional do gráfico de dispersão, representando boa parte da diversidade genética dos acessos da coleção inicial.

Tabela 1. Identificação, local de coleta e resultado da análise de agrupamento dos acessos de *Stylosanthes* spp. utilizados no presente trabalho.

| Nº | Nº CPAC | Nº grupo | Local de Coleta | Nº | Nº CPAC | Nº grupo | Local de Coleta |
|-----|--------------|----------|-----------------------|------|---------|----------|-------------------------|
| 1 | cv. Mineirão | 1 | Bresília-DF | 53** | 1348 | outgroup | Barreras-BA |
| 2* | cv. Mineirão | 1 | Bresília-DF | 54 | 1358 | 1 | Oliveira Brejinhos-BA |
| 3 | 1030 | 10 | Batista-MG | 55 | 1381 | 4 | Colegipe-BA |
| 4 | 1031 | 7 | Fomosa-MG | 56 | 1382 | 4 | Manoel Vitorino-BA |
| 5 | 1032 | 4 | Diamantina-MG | 57 | 1383 | 3 | Plata-BA |
| 6 | 1033 | 20 | Barreras-BA | 58 | 1387 | 3 | Jaborandá-BA |
| 7 | 1035 | 9 | Vitória-BA | 59 | 1370 | 3 | Lençóis-BA |
| 8 | 1036 | 3 | Oliveira Brejinhos-BA | 60 | 1373 | 3 | Lençóis-BA |
| 9 | 1037 | 1 | Oliveira Brejinhos-BA | 61 | 1376 | 3 | Seabra-BA |
| 10 | 1039 | 1 | Seabra-BA | 62 | 1378 | 13 | Tiering-BA |
| 11 | 1040 | 1 | Seabra-BA | 63 | 1380 | 6 | Lençóis-BA |
| 12 | 1041 | 19 | Seabra-BA | 64 | 1382 | 3 | Plata-BA |
| 13 | 1043 | 3 | Lençóis-BA | 65 | 1383 | 3 | Plata-BA |
| 14 | 1045 | 5 | Rafael Jacobina-BA | 66 | 1636 | 1 | Belo-BA |
| 15 | 1187 | 3 | Seabra-BA | 67 | 1639 | 1 | S. Gonzalo Campos-BA |
| 16 | 1189 | 1 | Rio de Janeiro-RJ | 68 | 1640 | 1 | Alagoinhas-BA |
| 17 | 1190 | 9 | Diamantina-MG | 69 | 1641 | 1 | São João D'El-Rey-GO |
| 18 | 1191 | 10 | Lagoa Santa-MG | 70 | 1642 | 1 | Dour-TO |
| 19 | 1192 | 17 | Lagoa Santa-MG | 71 | 1644 | 1 | Alto Horizonte-GO |
| 20 | 1193 | 2 | Couto-MG | 72 | 1646 | 1 | Cristalina-GO |
| 21 | 1194 | 3 | Couto-MG | 73 | 2227 | 1 | Entre Rios-BA |
| 22 | 1196 | 4 | Diamantina-MG | 74 | 2229 | 1 | Entre Rios-BA |
| 23 | 1197 | 3 | Sen. Mot. Goiás-MG | 75 | 2230 | 3 | Jaborandá-BA |
| 24 | 1198 | 3 | Barreras-BA | 76 | 2231 | 3 | Barreras-BA |
| 25 | 1199 | 16 | Bocaina-MG | 77 | 2232 | 3 | Barreras-BA |
| 26 | 1200 | 3 | Bocaina-MG | 78 | 2235 | 5 | Plata-BA |
| 27 | 1201 | 3 | Turmalina-MG | 79 | 2236 | 3 | Andaraí-DF |
| 28 | 1202 | 4 | Sen. Mot. Goiás-MG | 80 | 2251 | 3 | Caroana Pajeú-MG |
| 29 | 1204 | 6 | Diamantina-MG | 81 | 2252 | 3 | Ipirá-BA |
| 30 | 1205 | 2 | S. Seb. Maranhão-MG | 82 | 2254 | 6 | Diamantina-MG |
| 31 | 1206 | 1 | Jaqué-MG | 83 | 2255 | 6 | Diamantina-MG |
| 32 | 1302 | 1 | - | 84 | 2256 | 4 | Coto Magalhães-MG |
| 33 | 1303 | 1 | - | 85 | 2257 | 4 | Diamantina-MG |
| 34 | 1304 | 8 | - | 86 | 2258 | 3 | Varzea da Palma-MG |
| 35 | 1305 | 7 | - | 87 | 2259 | 3 | Varzea da Palma-MG |
| 36 | 1306 | 6 | - | 88 | 2260 | 3 | Pinopolis-MG |
| 37 | 1307 | 1 | Alcanide-GO | 89 | 2261 | 3 | Morro do Chapéu-BA |
| 38 | 1308 | 1 | São João D'El-Rey-GO | 90 | 2282 | 4 | Porteirão-MG |
| 39 | 1309 | 1 | Bresília-DF | 91 | 2283 | 3 | Rancho Machado-MG |
| 40 | 1310 | 1 | Bresília-DF | 92 | 2284 | 6 | Rancho Machado-MG |
| 41 | 1311 | 1 | Fomosa-MG | 93 | 2285 | 4 | Diamantina-MG |
| 42 | 1332 | 4 | Ruço-BA | 94 | 2286 | 3 | Porteirão-MG |
| 43 | 1333 | 3 | Barreras-BA | 95 | 2287 | 9 | Capão Enxame-MG |
| 44 | 1334 | 3 | Barreras-BA | 96 | 2288 | 5 | Porteirão-MG |
| 45 | 1338 | 4 | Lençóis-BA | 97 | 2709 | 1 | - |
| 46 | 1337 | 3 | Barreras-BA | 98 | 2710 | 18 | Barreras-BA |
| 47 | 1339 | 3 | Vitória-BA | 99 | 2711 | 3 | Barreras-BA |
| 48 | 1340 | 3 | Andaraí-DF | 100 | 2712 | 2 | S. Gonz. Gurgelândia-MG |
| 49 | 1341 | 3 | Ruço-BA | 101 | 2713 | 2 | Carandiru-BA |
| 50 | 1345 | 11 | Platina-BA | 102 | 2714 | 3 | União-BA |
| 51 | 1346 | 3 | Vitória-BA | 103 | 2715 | 3 | Morro do Chapéu-BA |
| 52 | 1347 | 5 | Barreras-BA | 104 | 2716 | 3 | Paragominas-BA |
| 53 | 2217 | 54 | Alcanide-GO | 122 | 4136 | 3 | Lençóis-BA |
| 106 | 2719 | 3 | Itaúna-BA | 123 | 4137 | 1 | Lençóis-BA |
| 112 | 2730 | 5 | Diamantina-MG | 129 | 4168 | 1 | Fomosa-MG |
| 113 | 2732 | 15 | Oliveira Brejinhos-BA | 130 | 4200 | 1 | Fomosa-MG |
| 114 | 2733 | 12 | Itaúna-BA | 131 | 4271 | 1 | Cristalina-GO |
| 115 | 2734 | 5 | Colegipe-BA | 132 | 4377 | 3 | Barreras-BA |
| 116 | 2739 | 1 | Lajedinho-BA | 133 | 4378 | 3 | Barreras-BA |
| 117 | 2750 | 3 | Seabra-BA | 134 | 5071 | 1 | Bocaina-MG |
| 118 | 2792 | 6 | Seabra-BA | 135 | 5184 | 4 | Bocaina-MG |
| 119 | 2794 | 3 | Diamantina-MG | 136 | 5296 | 4 | - |
| 120 | 2795 | 4 | Bocaina-MG | 137 | 2061479 | 1 | - |
| 121 | 4135 | 4 | Morro do Chapéu-BA | | | | |

* *S. guianensis* (*outgroup*); ** *S. capitata*; não disponível na base de dados do CPAC (em atualização). Os acessos em destaque correspondem aos acessos selecionados para compor a coleção de trabalho.

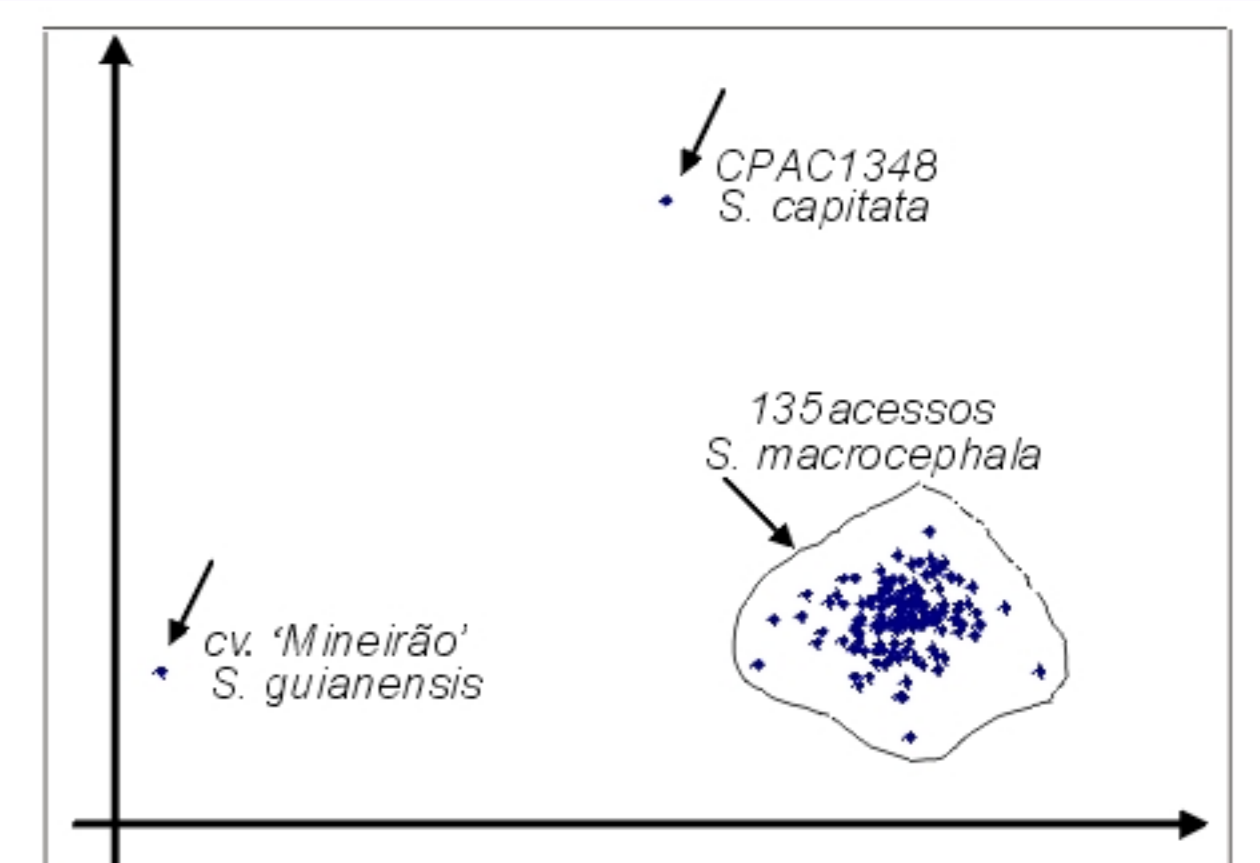


Figura 2. Análise de dispersão de 137 acessos de *Stylosanthes* spp. (135 de *S. macrocephala*, 1 de *S. capitata* e 1 de *S. guianensis*), baseada na matriz de distâncias genéticas calculadas com base em marcadores RAPD.

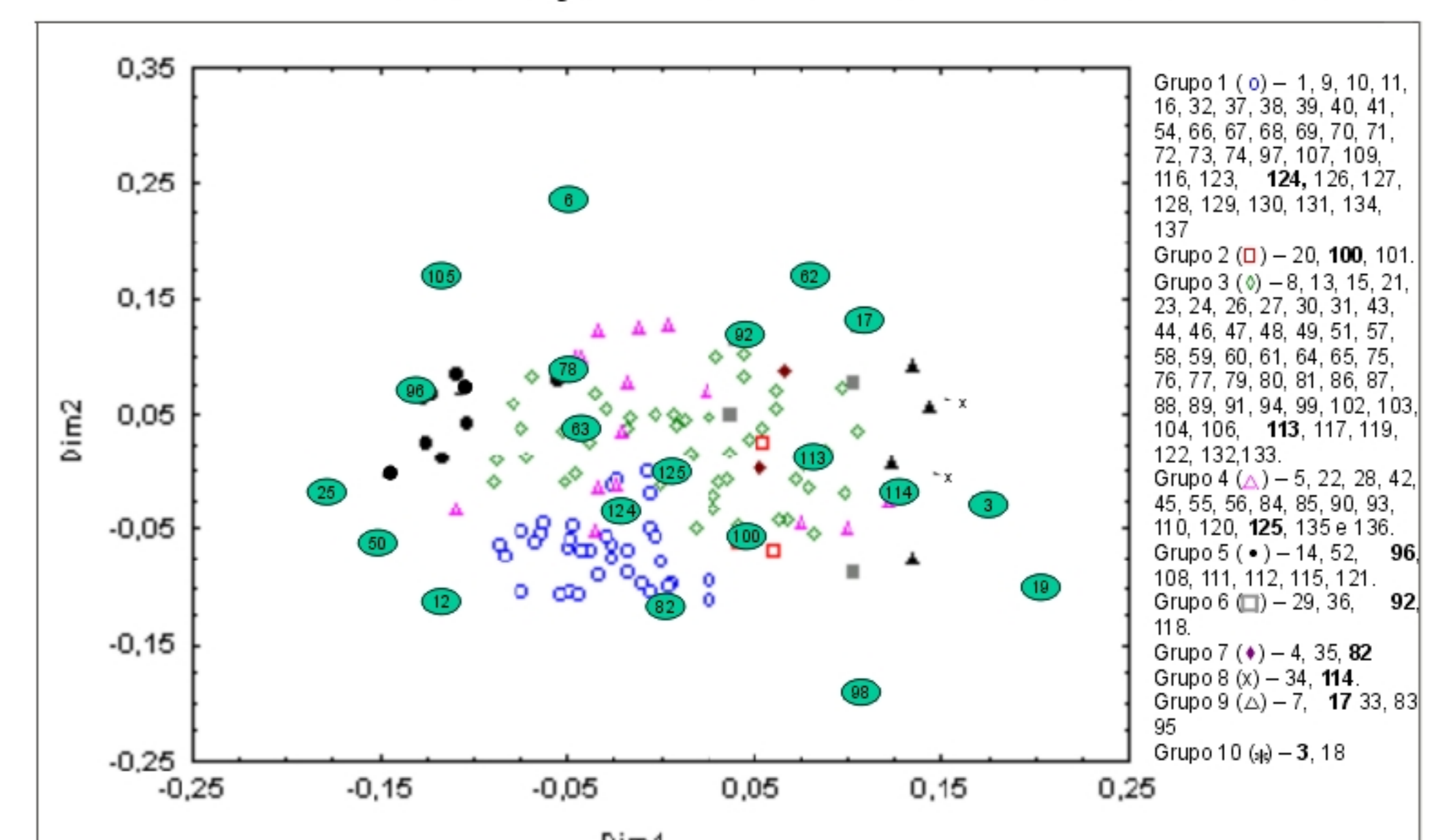


Figura 3. Dispersão gráfica de 135 acessos de *S. macrocephala* com base na matriz de distâncias genéticas geradas por 188 marcadores RAPD. Os acessos numerados no gráfico, correspondem aos acessos selecionados para a coleção de trabalho.

CONCLUSÕES

- Os 135 acessos de *S. macrocephala* estudados neste trabalho apresentam alta diversidade genética com base na caracterização molecular.
- Marcadores RAPD são eficientes na identificação genotípica entre e dentro de espécies do gênero *Stylosanthes* e também para o estabelecimento de coleções de trabalho.
- A coleção de trabalho será avaliada em ensaios de rede, em vários locais, com base em características de interesse agrônômico visando a liberação de cultivares comerciais e uso em programas de melhoramento genético.

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, 2003. (Comunicado Técnico) (no prelo).
- RAAMSDONK, L.W.D.; WIJNKER, J. The development of a new approach for establishing a core collection using multivariate analyses with tulip as case. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 47, p. 403-416, 2000.