

# VARIABILIDADE GENÉTICA DE PLANTAS DE *Stylosanthes guianensis* VAR. VULGARIS COM BASE EM MARCADORES RAPD

Fábio Gelape Faleiro<sup>1</sup>, Alexandre de Oliveira Barcellos<sup>1,2</sup>, Ronaldo Pereira Andrade<sup>1</sup>, Cláudio Takao Karia<sup>1</sup>, Allan Kardec Braga Ramos<sup>1</sup>, Marcelo Henrique Coelho<sup>3</sup>, Jefferson Fernando Naves Pinto<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Cerrados, Caixa Postal 08223, CEP 73301-970, Planaltina-DF;

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-FCAV-UNESP;

<sup>3</sup>Universidade de Brasília; <sup>4</sup>Universidade Federal de Goiás

\*e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

O *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv. 'Mineirão' é uma leguminosa forrageira com características agrônomicas importantes como: tolerância à seca e: baixa fertilidade do solo e resistência a pragas e doenças (Embrapa, 1993). A baixa produção de sementes, que resulta em alto custo das mesmas no mercado, e a limitada persistência sob pastejo (4-5 anos) são as características que mais têm cerceado uma ampla adoção da cultivar.

Em 2003, na Embrapa Cerrados, foram identificadas três plantas, designadas MP1, MP2 e MP3 (Figura 1) de *S. guianensis* var. *vulgaris* que apresentavam alto vigor, ramificações longas com inserções próximas ao solo e florescimento abundante e precoce (março-abril). Essas características são associadas à boa persistência sob pastejo (Groft et al., 1970) e alta produção de sementes (Andrade et al., 1983). As plantas foram identificadas em pastagem estabelecida em 1991, utilizando-se o cv. 'Mineirão' e a *Brachiaria brizantha* cv. 'Marandu'. De 1991 a 2000, a área foi utilizada sob pastejo intenso por bovinos e, no ano de 2000, foi vedado o acesso aos animais. O solo é de textura média e não recebeu adubação nos últimos dez anos. Este trabalho foi feito considerando o potencial agrônomico dessas plantas MP e a possibilidade de inclusão das mesmas em programas de avaliação e melhoramento genético (Figura 2) realizados na Embrapa Cerrados.

## OBJETIVO

Analisar a variabilidade genética das plantas MP1, MP2 e MP3 e compará-las com as cultivares comerciais 'Mineirão', 'Bandeirante' e 'Cook', utilizando-se marcadores RAPD, visando a subsidiar a inclusão das mesmas em programas de avaliação e melhoramento genético.

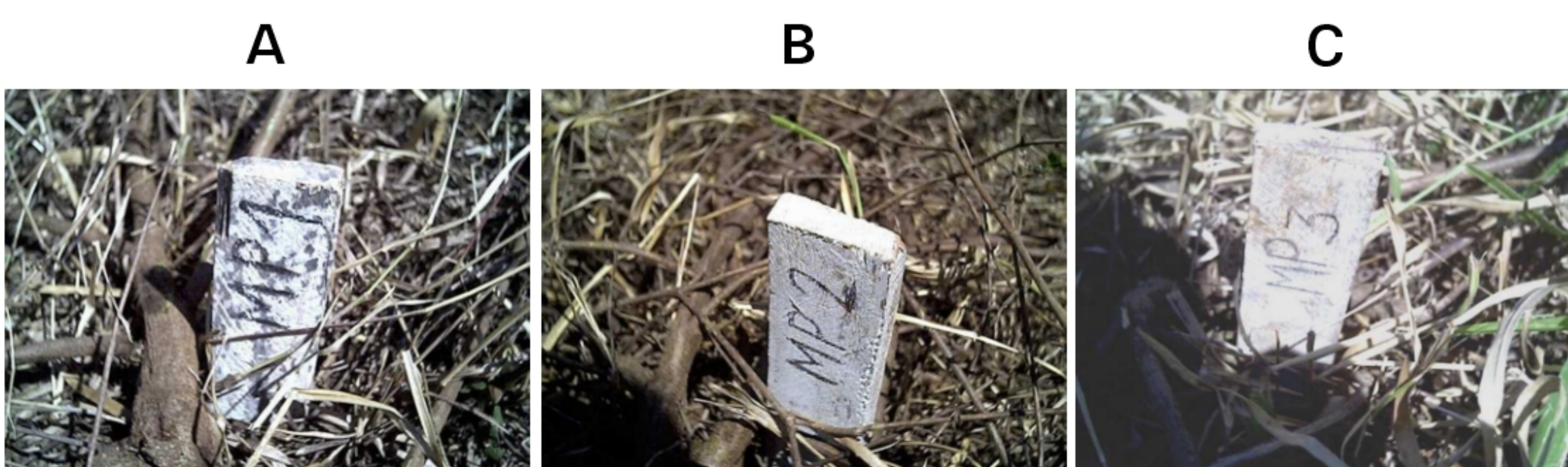


Figura 1. Detalhes das plantas MP1 (A), MP2 (B) e MP3 (C) *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* identificadas na Embrapa Cerrados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os acessos de *Stylosanthes guianensis* analisados no presente trabalho foram as plantas MP1, MP2 e MP3 identificadas no campo experimental do Chapadão na Embrapa Cerrados e as cultivares comerciais 'Mineirão', 'Bandeirante' e 'Cook'.

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. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 100 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM 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 14 primers decâmeros: OPD-03, OPD-12, OPD-13, OPD-15, OPE-01, OPE-11, OPF-03, OPF-04, OPF-07, OPF-12, OPG-10, OPG-11, OPG-19 e OPH-07. As amplificações foram efetuadas em termociclador, programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Depois dos 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Depois da amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei & Li, utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar a análise de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se o método do UPGMA (*Unweighted pair-group arithmetic average*) como critério de agrupamento, e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS e do Programa Statistica.

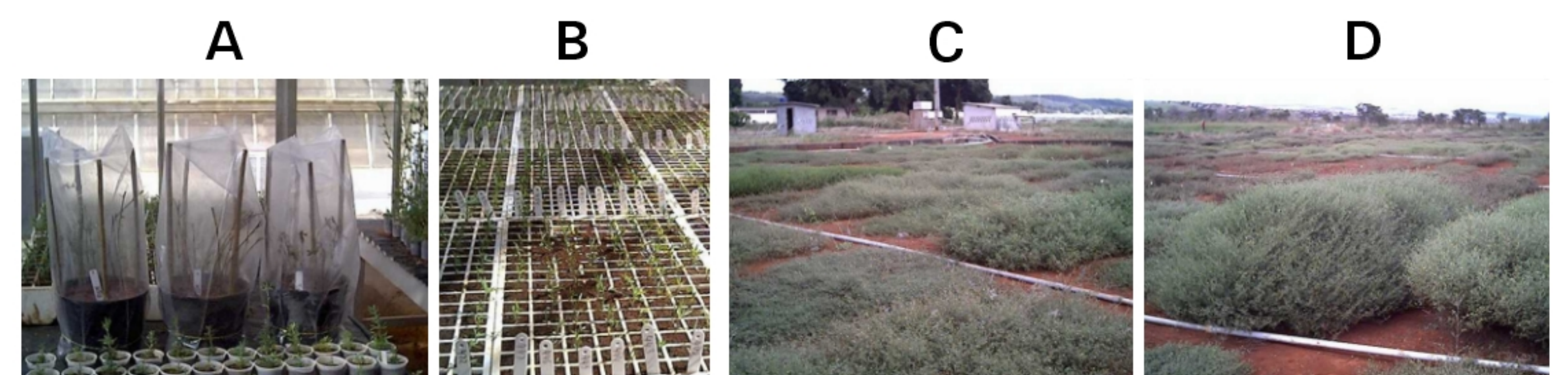


Figura 2. Visão geral de experimentos dos programas de avaliação e melhoramento genético realizados na Embrapa Cerrados: produção de mudas (A e B), avaliação a campo (C e D).

## RESULTADOS

Os 14 primers decâmeros geraram um total de 145 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 10,4 marcadores por primer. As distâncias genéticas entre os acessos calculadas com base nesses marcadores moleculares variaram entre 0,050 e 0,724 (Tabela 1). As plantas MP1, MP2 e MP3 foram geneticamente próximas entre si, com distâncias genéticas variando entre 0,050 e 0,082. Em relação às cultivares comerciais, as plantas MP1, MP2 e MP3 foram mais próximas da cv. Mineirão do que das cultivares 'Bandeirante' e 'Cook'. As distâncias genéticas médias das plantas MP em relação aos cultivares 'Mineirão', 'Bandeirante' e 'Cook' foram 0,089; 0,657 e 0,684, respectivamente.

Análises de agrupamento por meio de dendrograma (Figura 3) e gráfico de dispersão (Figura 4) confirmaram a proximidade genética das plantas MP1, MP2 e MP3 com a cv. 'Mineirão'. Apesar desta alta similaridade genética, as plantas MP não foram idênticas à cv. Mineirão, o que pôde também ser verificado com base na fenologia e morfologia, pois as plantas MP apresentaram florescimento mais intenso e precoce, além de possuírem caules curtos e grossos e ramificações prostradas, longas e com inserções próximas ao solo. A variabilidade genética das plantas MP pode ter origem na diversidade genética existente na população que deu origem à cv. 'Mineirão'. Comparado à cv. Mineirão, que apresenta florescimento tardio e em plena estação seca (Embrapa, 1998), o florescimento precoce e profuso das plantas MP1, MP2 e MP3 pode indicar maior capacidade de produção de sementes. Além disso, caules grossos e ramificações longas são características adaptativas que possivelmente explicam a alta persistência, sob pastejo, das plantas identificadas.

Além das características relacionadas à maior capacidade de produção de sementes e persistência no campo, o alto vigor e o tamanho destas plantas também chamaram a atenção. As plantas MP1, MP2 e MP3 estão sendo multiplicadas por propagação vegetativa para produção de sementes, as quais serão utilizadas para a inclusão das plantas MP nos ensaios de avaliação e seleção realizados pela Embrapa Cerrados.

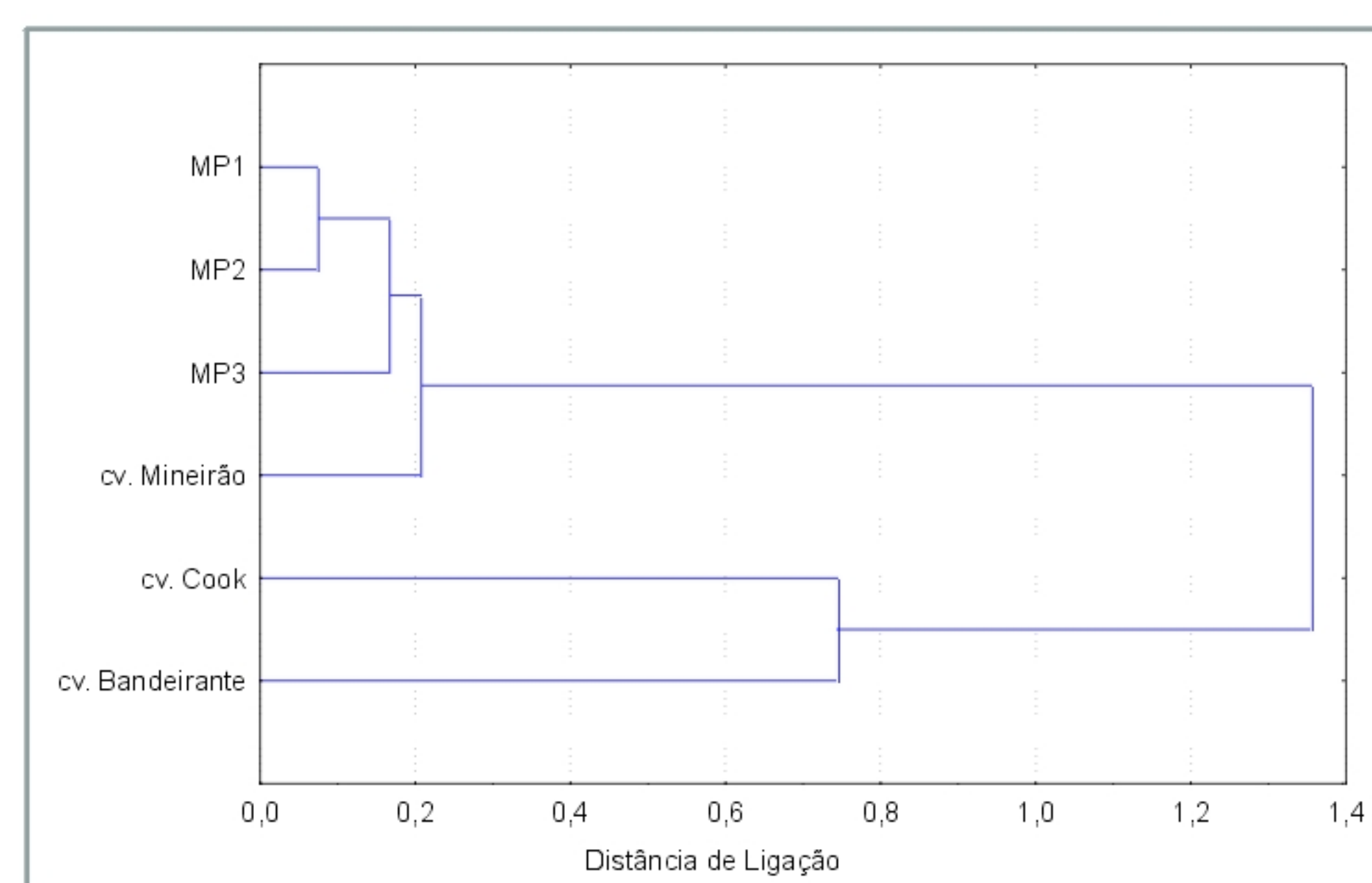


Figura 3. Análise de agrupamento de três plantas MP e três cultivares comerciais de *S. guianensis* com base na matriz de distâncias genéticas. Utilizou-se como critério de agrupamento o método do UPGMA.

Tabela 1. Matriz de distâncias genéticas entre plantas MP e cultivares comerciais de *Stylosanthes guianensis*, baseada em 145 marcadores RAPD.

	1	2	3	4	5	6
1 MP1	0					
2 MP2	0,050	0				
3 MP3	0,063	0,082	0			
4 cv. Mineirão	0,110	0,105	0,051	0		
5 cv. Cook	0,657	0,671	0,723	0,592	0	
6 cv. Bandeirante	0,619	0,629	0,724	0,550	0,525	0

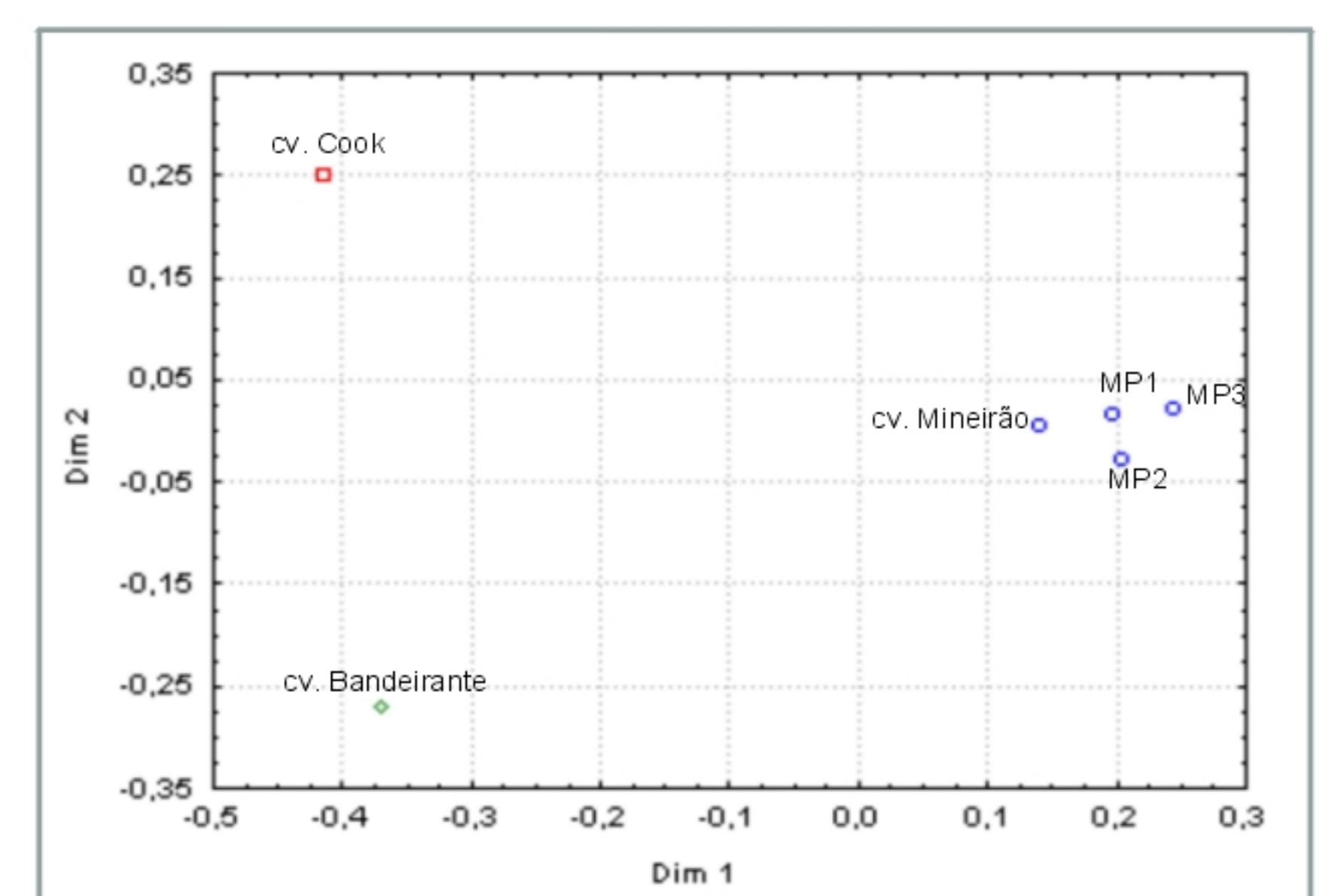


Figura 4. Análise de dispersão de três plantas MP e três cultivares comerciais de *S. guianensis* com base na matriz de distâncias genéticas. Utilizou-se o procedimento de escalas multidimensionais e o método das coordenadas principais.

## CONCLUSÕES

As plantas MP1, MP2 e MP3 foram próximas, porém, não-idênticas à cv. 'Mineirão'. Tais resultados indicam que a maior precocidade, quantidade de flores, vigor e tamanho das plantas MP1, MP2 e MP3 podem ser de origem genética. Entretanto, tais características precisam ser confirmadas em ensaios apropriados visando a uma futura adoção das plantas MP ou utilização em programas de melhoramento genético.

## LITERATURA CITADA

- ANDRADE, R.P.; THOMAS, D.; FERGUSON, J.E. Seed production of pasture species in a tropical savanna region of Brazil. I. Legumes. *Tropical Grassland*, v.17, p.54-8, 1983.
- CRUZ, C.D. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV, 1997. 442p.
- EMBRAPA. Recomendações para estabelecimento e utilização do 'Stylosanthes guianensis' cv. Mineirão. Planaltina: Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados - CPAC, 1993. (Comunicado Técnico, No.87 CPAC e No.49 CNP GC).
- EMBRAPA. Estabelecimento e utilização do estilosantes Mineirão. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1998. (Comunicado Técnico, No.74).
- FALEIRO, F.G.; FALERO, A.S.G.; CORDERO, M.C.R. et al. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. (Comunicado Técnico, No.92).
- GROFT, B.; HARDING, W.A.T.; WOOLCOCK, R.F. Effects of cutting on three ecotypes of 'Stylosanthes guianensis'. In: Proceedings XI International Grassland Congress, 11, 1970, Surfers Paradise, QLD, Austrália. 1970. p. 226-230.