

**Variabilidade genética e taxa
de cruzamento em progênies
da população de melhoramento
de *Stylosanthes guianensis***



ISSN 1983-9715

Outubro, 2014

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 32

**Variabilidade genética e taxa de
cruzamento em progênies da
população de melhoramento de
*Stylosanthes guianensis***

*Rebecca Caroline Ulbricht Ferreira
Rosângela Maria Simeão
Lucimara Chiari*

Embrapa
Brasília, DF
2014

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Av. Rádio Maia, 830 Vila Popular, CEP 79106-550

Campo Grande, MS

Fone: (67) 3368 2000

Fax: (67) 3368 2180

<http://www.embrapa.br/gado-de-corte>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Pedro Paulo Pires*

Secretário-Executivo: *Rodrigo Carvalho Alva*

Membros: *Elane de Souza Salles, Valdemir Antônio Laura, Davi José Bungenstab, Andréa Alves do Egito, Roberto Giolo de Almeida, Guilherme Cunha Malafaia*

Supervisão editorial: *Rodrigo Carvalho Alva*

Revisão de texto e Editoração Eletrônica: *Rodrigo Carvalho Alva*

Arte da capa: Luiz Antônio Dias Leal

1ª edição

Versão online (2014)

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.

Variabilidade genética e taxa de cruzamento em progênes da população de melhoramento de *Stylosanthes guianensis* [recurso eletrônico] / Rebecca Caroline Ulbricht Ferreira... [et al]. – Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2012.

16 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN1983-974X ; 32).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/bp/BP32.pdf>>

Título da página da Web (acesso em 30 de outubro de 2014).

Outros autores: Rosângela Maria Simeão; Lucimara Chiari.

1. Variabilidade genética. 2. Melhoramento genético vegetal. 3. Gramínea forrageira. 4. *Stylosanthes*. 5. *Guianensis*. I. Ferreira, Rebecca Caroline Ulbricht. II. Simeão, Rosângela Maria. III. Chiari, Lucimara. IV. Série.

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Introdução	8
Material e métodos	10
Resultados e discussão	12
Conclusão	19
Agradecimentos	19
Referências bibliográficas	19

Variabilidade genética e taxa de cruzamento em progênies da população de melhoramento de *Stylosanthes guianensis*

Rebecca Caroline Ulbricht Ferreira¹

Rosângela Maria Simeão²

Lucimara Chiari²

Resumo

As leguminosas forrageiras do gênero *Stylosanthes* apresentam sistema reprodutivo misto, o que resulta em estruturas genéticas populacionais bem distintas e alta variabilidade genética. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar a variabilidade genética e a taxa de cruzamento em progênies de *Stylosanthes guianensis*, por meio de marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), visando auxiliar o programa de melhoramento genético dessa espécie. Um total de dez *primers* RAPD foram utilizados para gerarem as marcas moleculares necessárias para as análises dos 202 indivíduos de 52 famílias de *S. guianensis*. Os marcadores foram analisados como dados binários visando estimar a variação genética (AMOVA) entre e dentro de famílias. A estrutura das populações foi obtida visando auxiliar nas estimativas de distribuição da variabilidade genética. A taxa de cruzamento foi estimada de acordo com o modelo misto de cruzamento com marcadores dominantes. Os 202 indivíduos formaram seis grupos, considerando a estrutura genética na geração estudada, com maior diversidade dentro do que entre grupos. Esse resultado foi corroborado pela análise de variância molecular, com maior variação genética dentro

¹Mestranda em Genética e Melhoramento pela Universidade Estadual de Maringá.

²Pesquisadores da Embrapa Gado de Corte.

do que entre famílias. A taxa de cruzamento nessa população-base foi estimada em 0,869 e 0,742, respectivamente, para multilocos e unilocos. Os resultados reforçam a adequação do método de seleção recorrente intrapopulacional como adequado ao melhoramento genético de *S. guianensis*.

Termos para indexação: leguminosas forrageiras, marcadores moleculares, melhoramento genético.

Genetic variability and outcrossing rate in progenies of Stylosanthes guianensis breeding population

Abstract

Forage legumes of the genus Stylosanthes present mixed mating system, which results in distinct population genetic structure and high genetic variability. Aiming to characterize and to assist the breeding program, the genetic variability and outcrossing rate in progenies of Stylosanthes guianensis was studied using RAPD markers (DNA Polymorphism Random Amplified). Ten primers were applied in 202 individuals from 52 families. Markers were analyzed as binary data to estimate the genetic variation (AMOVA) among and within families. The population structure was obtained aiming to help the estimated distribution of genetic variability. The outcrossing rate was estimated using the mixed mating model with dominant markers. Considering the genetic structure, six groups were established involving all 202 individuals evaluated in this breeding generation, with higher diversity within than among groups. This result was corroborated by analysis of molecular variance, with greater genetic variation within than between families. Breeding population outcrossing rate was estimated at 0.869 and 0.742, for multilocus and unilocus, respectively. The results support the appropriateness of the intrapopulational recurrent selection method as suitable for S. guianensis breeding.

Index terms: *forage legumes, molecular markers, breeding.*

Introdução

A flora brasileira é extremamente rica em leguminosas, sendo, inclusive, centro de origem de diversas espécies que são cultivadas em pastagens. A introdução de leguminosas forrageiras adaptadas ao sistema de criação de animais sob pastejo pode resolver dois problemas: a) o baixo nível de nitrogênio nos solos tropicais e b) a reduzida qualidade proteica disponível na dieta de animais ruminantes (SHELTON et al., 2005).

As leguminosas forrageiras do gênero *Stylosanthes* destacam-se pela sua alta adaptação aos solos fracos e ácidos dos Cerrados, alta capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio, tolerância à seca e elevada produtividade (RESENDE et al., 2008). Dentre as espécies do gênero, *Stylosanthes guianensis* é considerada uma das mais promissoras pela sua alta produção de matéria seca e retenção de folhas verdes em períodos de seca em solos de baixa fertilidade (ANDRADE & KARIA, 2000). Apresenta-se ainda como a alternativa menos onerosa para a recuperação de pastagens degradadas e elevado potencial para o consórcio com gramíneas forrageiras, resultando em aumento de produtividade por animal e por área (ANDRADE et al., 2004).

O programa de desenvolvimento de novas cultivares de *Stylosanthes guianensis* e *S. capitata* na Embrapa Gado de Corte adota como estratégia a seleção recorrente intrapopulacional (SRI), que envolve a obtenção de progênies, sua avaliação, seleção e recombinação para geração de novas progênies em novos ciclos. Nesse procedimento aplica-se moderada intensidade de seleção, a fim de garantir a presença de variabilidade genética nas futuras gerações, mantendo tamanho efetivo adequado (RESENDE et al., 2008). Em cada ciclo, uma maior intensidade de seleção é aplicada visando obter as linhagens-irmãs que são candidatas à composição de novas cultivares. No caso do *Stylosanthes* spp., pela reprodução sexuada dos indivíduos, as cultivares podem e devem ser formadas por mais de uma linhagem-irmã, uma vez que o estreitamento excessivo da base genética da cultivar pode comprometer a sua viabilidade em função da suscetibilidade das espécies à antracnose.

Atualmente, o programa encontra-se no terceiro ciclo de seleção e estão sendo avaliadas as primeiras linhagens-irmãs que, combinadas para compor cultivares, deverão contribuir para o sistema produtivo pecuário nacional.

O conhecimento do sistema de cruzamento da espécie é fundamental para a conservação e melhoramento genético de uma espécie, devido ao seu papel crucial na composição genética das populações, visto que determina a frequência dos genótipos individuais nas gerações, influenciando na distribuição e no conteúdo da variação genética dentro e entre populações (BROWN, 1990).

S. guianensis apresenta sistema reprodutivo misto (SANTOS-GARCIA et al., 2010; CHIARI et al., 2010), ou seja, se reproduz tanto por autofecundações quanto por cruzamentos naturais, o que causa impacto direto na composição genética das populações. O modo de dispersão do pólen e sementes determina como os genes são transferidos e recombinados para formar as futuras gerações, afetando a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações (GOODWILLIE et al., 2005), e pode variar entre populações de uma mesma espécie, a depender tanto de fatores genéticos quanto ambientais. Dos fatores ambientais que influenciam na taxa de cruzamento de uma espécie podem ser citadas a intensidade, a homogeneidade e a sobreposição de florescimento entre indivíduos. O comportamento e intensidade de atuação de animais polinizadores também influenciam nas variações da taxa de cruzamento de uma espécie.

Na determinação da taxa de cruzamento, marcadores moleculares dominantes como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) podem ser utilizados e apresentam resultados similares aos obtidos com marcadores codominantes (GAIOTTO et al., 1997; FERREIRA et al., 2000). Marcadores RAPD também podem ser utilizados nos estudos em genética de populações e os modelos de estimação dos parâmetros populacionais são atualmente bastante robustos para lidar com marcadores dominantes (FALUSH et al., 2007).

Nesse contexto, o objetivo nesse trabalho foi analisar a variabilidade genética e a taxa de cruzamento em progênies do terceiro ciclo de seleção recorrente intrapopulacional de *S. guianensis*, por meio de marcadores RAPD, visando auxiliar o programa de melhoramento genético dessa espécie.

Material e métodos

Nesse estudo foram avaliadas 52 famílias da leguminosa forrageira *S. guianensis*, mantidas no campo experimental da Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande – Mato Grosso do Sul. As famílias são oriundas do terceiro ciclo de seleção recorrente intrapopulacional, sendo 47 delas compostas por quatro indivíduos meios-irmãos, quatro famílias com três indivíduos e uma família com dois indivíduos, totalizando 202 indivíduos.

No Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte extraiu-se o DNA de folhas jovens de *S. guianensis* segundo o protocolo modificado por CHIARI et al. (2009). O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo) a 260nm e, posteriormente, parte do DNA das amostras foi diluída numa concentração de 5 ng/μL para uso nas reações de PCR e o restante mantido a -20°C.

Para as análises moleculares, foram utilizados dez *primers* previamente selecionados (Tabela 1). As reações de RAPD foram preparadas em volume final de 15 μL, contendo 1x tampão da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,4 μM de *primer* (Operon Technologies - OP), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research) programado para uma desnaturação inicial a 94°C por quatro minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 40°C durante 1,5 minutos, 72°C por dois minutos e, para finalizar, uma etapa de extensão a 72°C por cinco minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% pré-corado com brometo de etídeo, sendo os resultados visualizados em luz ultravioleta (UV) e fotodocumentados em sistema digital LPix (Loccus Biotecnologia).

Os dados obtidos para os 202 indivíduos de *S. guianensis* foram compilados em uma planilha na forma de variáveis binárias, ou seja, "1" significando presença de banda e "0", ausência. O procedimento estatístico de análise da variância molecular (*Analysis of Molecular Variance* – *AMOVA*) foi empregado visando obter a informação da distribuição da variação genética entre e dentro das famílias estudadas. Para essa análise foi utilizado o software GenAEx 6.5 (Peakall; Smouse, 2012).

Análises com base no software *Structure* 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2010) foram realizadas com a finalidade de avaliar a estratificação das famílias em função da origem. O procedimento utilizado pelo *Structure* compreende a utilização de métodos bayesianos para determinar a probabilidade de indivíduos pertencerem a subpopulações com base em seus marcadores. No presente caso, essa análise buscou determinar se os indivíduos de uma mesma família poderiam ser distribuídos em grupos diferentes e, ainda, determinar o número aproximado de grupos formados por todos os indivíduos de todas as famílias. O número ótimo de grupos (k) foi inferido após cinco rodadas independentes umas das outras e com um número de iterações de 100000 cada uma delas, usando um modelo que admite que os indivíduos tenham algum parentesco (*admixture model*).

O sistema de cruzamento foi analisado de acordo com o modelo misto de cruzamento com marcadores dominantes, utilizando-se o programa MLTR - Multilocus Mating System Program (RITLAND, 2002), que permitiu estimar a taxa de cruzamento multiloco (tm), a taxa de cruzamento uniloco (ts), a taxa de autofecundação ($s = 1 - tm$), a taxa de cruzamento entre aparentados ($tm - ts$), o coeficiente de endogamia dos genitores (F), a correlação entre as taxas de cruzamento (t) entre

as progênies (*rt*) e a correlação de *t* entre locos. Essas estimativas foram calculadas pelo método de máxima verossimilhança, algoritmo numérico Esperança-Maximização (EM). A variância dos parâmetros avaliados foi estimada por 10000 reamostragens randomizadas (*bootstraps*) feitas dentro das progênies de *S. guianensis*.

Tabela 1 - Primers de RAPD analisados nos 202 indivíduos de *Stylosanthes guianensis* com suas respectivas sequências de oligonucleotídeos

Primer	Sequência de nucleotídeos 5'- 3'	Primer	Sequência de nucleotídeos 5'- 3'
AN10	CTC TGT GCT C	G03	GAG CCC TCC A
BA01	TTC CCC ACC C	G04	AGC GTG TCT G
BA03	GTG CGA GAA C	G07	GAA CCT GCG G
D03	GTC GCC GTC A	G10	AGG GCC GTC T
G02	GGC ACT GAG G	G17	AGG GCC GTC T

Resultados e discussão

Os *primers* analisados amplificaram 104 bandas, perfazendo uma média de 10,4 bandas por primer. CHIARI et al. (2010), ao avaliarem progênies de melhoramento de *S. guianensis* com nove dos dez primers utilizados nesse trabalho, obtiveram uma média de 6,9 bandas por *primer*. Das 104 bandas obtidas com os dez primers, 93 foram polimórficas (89,42%), provavelmente devido à utilização de *primers* previamente selecionados para esse fim (CHIARI et al., 2010).

Seis grupos foram formados pela plotagem dos indivíduos baseada no modelo que infere a estrutura de populações (Structure 2.3.3) (Figura 1). Os grupos de um a seis foram compostos por 1,5%, 23,3%, 27,2%, 2%, 27,7% e 18,3% dos 202 indivíduos analisados, respectivamente. Fazem parte do grupo quatro apenas os indivíduos da família 48, ou seja, há alta similaridade entre os indivíduos dessa família e

menor similaridade com as outras famílias, com base nos marcadores analisados. Já o grupo seis alocou todos os indivíduos das famílias 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 32, sendo, portanto, o grupo composto pelo maior número de famílias similares entre si.

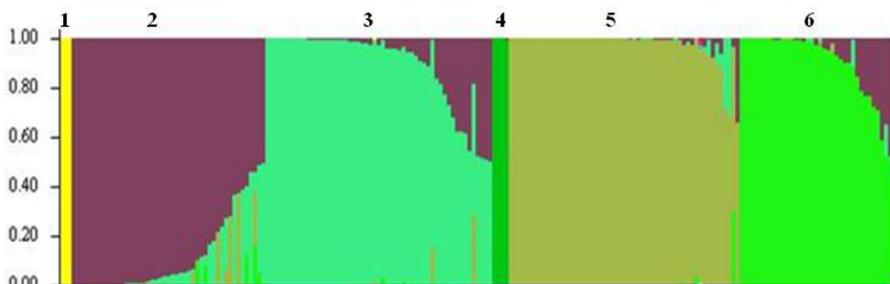


Figura 1. Agrupamento de 202 indivíduos de *S. guianensis* obtido para $k = 6$, resultante da análise realizada com o *Structure* 2.3.3 usando o *admixture model* e frequências alélicas correlacionadas. Os números acima da figura indicam cada um dos grupos.

Na plotagem dos 202 indivíduos de *S. guianensis* na ordem original por família (Figura 2), observou-se elevada similaridade genética ($> 0,60$) dos indivíduos dentro de algumas famílias, com destaque para as famílias 1, 8, 19, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 32, 33, 35, 42, 45, 48 e 52. Entretanto, outras famílias apresentaram menor similaridade genética entre os seus indivíduos, tais como as famílias 4, 5, 6, 15, 16, 17, 18, 25, 26 e 47, cujos irmãos faziam parte de grupos diferentes. Esse resultado pode ser visualizado conforme representado na Figura 3, em que as seis cores básicas indicam um dos seis grupos formados e, ainda, que os indivíduos com mais de uma cor na sua respectiva coluna compartilham alelos com indivíduos de outros grupos ou famílias.

Esses resultados são importantes orientadores do melhoramento de *S. guianensis*. O primeiro deles remete a uma limitação no registro de acessos no germoplasma dessa espécie na Embrapa Gado de Corte. A maioria dos acessos disponíveis, os quais formam a base para o programa de melhoramento, não têm o registro do local de origem. Assim, a formação de grupos estruturados dentro da população-base de melhoramento pode ser resultante de uma origem geográfica comum. O segun-

do aspecto do conhecimento da estrutura das famílias é a sua orientação quanto ao futuro do próprio programa e a obtenção das novas cultivares compostas por linhagens-irmãs. Como um dos principais objetivos do programa é a seleção para resistência à antracnose, teoricamente, cultivares compostas por linhagens-irmãs obtidas de grupos diferentes podem ter alelos de resistência diferentes, potencialmente prolongando a vida útil da cultivar nas pastagens plantadas.

A estrutura dessa população-base de melhoramento foi utilizada na avaliação da distribuição da variação molecular entre e dentro de grupos, usando a AMOVA, além da análise considerando a distribuição da variação molecular das famílias e seus componentes.

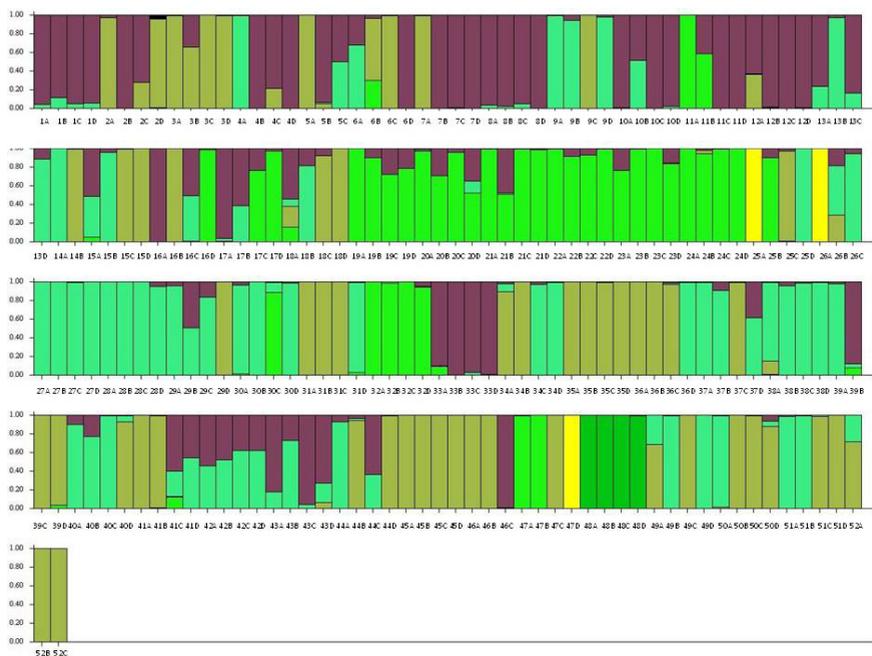


Figura 2. Representação gráfica dos 202 indivíduos de 52 famílias de *S. guianensis*, para $k = 6$, resultante da análise realizada com o *Structure* 2.3.3 usando o *admixture model* e frequências alélicas correlacionadas. Cada barra vertical representa cada um dos 202 indivíduos analisados. Barras com duas ou mais cores representam indivíduos que compartilham pools alélicos. Cada família é identificada pelo mesmo número e os indivíduos dentro de família pelas letras de A a D.

A análise de variância molecular resultou em uma estimativa de maior proporção da variação molecular dentro de famílias (75%) do que entre famílias (25%). Da mesma forma, quando foram considerados os agrupamentos dos indivíduos obtidos com base na análise pelo *Structure* (independentemente das famílias a que pertencem), evidenciou-se uma maior variação dentro de grupos do que entre grupos. Resultado similar foi obtido por Santos-Garcia (resultados não publicados) com a análise dos dados de 16 famílias comuns (da geração anterior) às avaliadas no presente trabalho, por meio de marcadores microssatélites. Naquela avaliação com o uso de marcadores microssatélites, obteve-se 41% da variação genética total concentrada entre famílias e 59% da variação total ocorrendo dentro das famílias, com um índice de fixação padronizado de Hedrick igual a $Gst = 0,561$, bastante coerente com a taxa de cruzamento estimada por Santos-Garcia et al. (2010).

A taxa de cruzamento estimada para as famílias nesse terceiro ciclo de seleção de *S. guianensis* (Tabela 2), com base em multilocos e locos únicos foi 0,869 e 0,742, respectivamente. A taxa de cruzamento unilocos foi menor que a taxa multilocos, o que deve ser interpretado como efeito de cruzamentos entre indivíduos aparentados, ou seja, entre indivíduos da mesma família, ou por autofecundação ou geitonogamia. A correlação entre a taxa de cruzamento (t) estimada entre todos os locos foi de 0,870 (0,131), consideravelmente alta, o que reforça a confiabilidade no resultado. No primeiro ciclo de seleção de *S. guianensis*, Santos-Garcia et al. (2010) encontraram correlação de 0,86 (0,046).

O coeficiente de endogamia (F) (Tabela 2) estimado para os genitores, nessa geração, foi igual a zero. O valor de F estimado usando marcadores RAPD no primeiro ciclo de seleção por Chiari et al. (2010) foi igual a 0,62 e o obtido por marcadores microssatélites para as mesmas famílias por Santos-Garcia et al. (2010), igual a 0,002. As diferenças encontradas para o valor de F obtidas por esses autores podem ser creditadas aos tipos diferentes de marcadores usados e as prováveis diferenças nas regiões do genoma amostradas em cada tipo. O valor de

F obtido no presente trabalho não deve ser diretamente comparado com os resultados anteriores uma vez que se trata de uma geração diferente e ainda, que a amostragem do genoma foi diferente da realizada por Chiari et al. (2010), uma vez que foram utilizados apenas os *primers* selecionados para elevado polimorfismo.

A correlação entre as medidas de taxa (*t*) de cruzamento entre as 52 progênies, a qual indica se a taxa de cruzamento variou entre as progênies, foi estimada em 12%. Essa variação observada é importante para fins de reprodução, pois apesar da espécie apresentar sistema reprodutivo misto, a taxa de cruzamento pode variar entre as famílias. Esse aspecto pode e deve ser considerado no melhoramento genético da espécie considerando o método adotado e a sua adequação.

As avaliações anteriores da taxa de cruzamento em algumas espécies do gênero *Stylosanthes* indicaram que a autogamia prevalecia, mas existiam evidências de que algumas espécies realizavam cruzamentos. Stace (1982) descreveu 2% de cruzamento em *S. scabra*, com base em isoenzimas, e Miles (1983) observou 20% de cruzamento estudando a presença de pelos nas estípulas de *S. capitata*. Em *S. guianensis*, Miles (1985) observou 14% de cruzamento com base na coloração das flores como marcador genético. Em todas essas estimativas, a taxa de cruzamento foi estudada em pequenas amostras de famílias, de poucos acessos originais, diferentemente do realizado no presente estudo.

Allard (1971) orientou que a estimativa da taxa de fecundação cruzada em uma espécie deve ser obtida em vários anos e locais, pois pode ser influenciada por variações nos genótipos e nas condições ambientais. Pode ainda ser influenciada pelo tipo de marcador empregado, sejam os fenotípicos ou os moleculares (BRESSAN et al., 2013).

A diferença entre as taxas de cruzamento multilocos e unilocos ($t_m - t_s$) indica que aproximadamente 12,7% dos cruzamentos ocorreram entre indivíduos aparentados, valor esse superior ao estimado no primeiro ciclo de seleção através de marcadores microssatélites (3%) por Santos-Garcia et al. (2010) e por marcadores RAPD (8,2%) (CHIARI et al., 2010).

Entretanto, Santos-Garcia et al. (2010) obtiveram valor semelhante em estudo da taxa de cruzamento de *S. capitata* (12,3%) por meio de marcadores microssatélites. O cruzamento entre parentes, a autofecundação e a geitonogamia contribuem para a fixação de alelos em indivíduos ao longo das gerações, no entanto, o número de gerações para atingir a homozigose poderá ser variável entre as formas de endogamia.

Há algumas hipóteses para interpretar a elevada taxa de fecundação cruzada evidenciada nessa amostra de indivíduos, com base nos marcadores estudados. Uma delas poderia ser a maior intensidade, precocidade, homogeneidade e sobreposição de florescimento evidenciada nessas famílias, uma vez que esse foi um dos critérios de seleção. Na prática, evidencia-se uma maior precocidade de florescimento na população atual, a qual apresenta produção plena de sementes em maio-junho, enquanto que nas populações iniciais a amplitude de florescimento/produção de sementes variou de maio a agosto. Além disso, as alterações no comportamento e na intensidade de atuação de animais polinizadores influenciam nas variações da taxa de cruzamento de uma espécie.

A estimativa da taxa de cruzamento depende também do(s) loco(s) amostrado(s). Segundo Gaiotto et al. (1997), para marcadores dominantes, um grande número de locos são necessários para obter uma estimativa robusta e comparável com marcadores codominantes. Os primers usados neste estudo foram previamente selecionados em função do polimorfismo apresentado, o que pode ter influenciado o resultado e ser específico para esse experimento.

Outra amostragem a ser discutida é a do número de indivíduos por família. O número de indivíduos por família igual a quatro, utilizado na presente estimação da taxa de cruzamento, de acordo com Brown e Allard (1970), é suficiente para uma precisão de 98% em espécies predominantemente autógamias. Entretanto, Resende (2002) indica que 25 indivíduos são necessários na amostragem dentro de famílias em espécies alógamas. No caso do *S. guianensis* essa questão deverá ser considerada nos resultados, ou seja, o número adequado de indivíduos por família talvez devesse ter ficado entre quatro e 25.

A outra hipótese seria uma superestimação da taxa de cruzamento nessa geração pelo marcador dominante. No primeiro ciclo de seleção obteve-se uma estimativa diferente da taxa de cruzamento quando baseada em marcadores RAPD (CHIARI et al. 2010) e em microssatélites (SANTOS-GARCIA et al., 2011) ao serem estudadas as mesmas famílias de *S. guianensis*. Entretanto, Gaiotto et al. (1997) não evidenciaram diferenças significativas entre as taxas de cruzamento em *Eucalyptus urophylla* estimadas por RAPD, AFLP e isoenzimas. Essa questão precisa ser elucidada e uma das formas possíveis será por meio de nova amostragem de marcadores dominantes e codominantes. Além disso, novas gerações de seleção no programa de melhoramento de *S. guianensis* deverão ser acompanhadas.

Os resultados de endogamia obtidos no presente trabalho e nos anteriores devem ser interpretados com parcimônia, uma vez que no primeiro ciclo foram avaliadas famílias selecionadas de populações naturais, originárias de várias regiões geográficas isoladas, enquanto que nos ciclos seguintes, possibilitou-se a sua coexistência e uma extensa oferta de pólen para atração de polinizadores. Além disso, aliou-se a questão fenológica de florescimento, com maior sobreposição de florescimento entre os indivíduos analisados e a seleção para maior produção de sementes, que é um dos principais critérios de seleção na obtenção e para o sucesso comercial de uma cultivar de *Stylosanthes*.

Tabela 2 - Estimativas dos parâmetros associados ao modo de cruzamento de *S. guianensis*

Parâmetros	Estimativas (erro padrão)
Taxa de cruzamento multiloco (t_m)	0,869 (0,036)
Taxa de cruzamento uniloco (t_s)	0,742 (0,034)
Taxa de autofecundação ($s = 1 - t_m$)	0,131
Taxa de cruzamento entre parentes ($t_m - t_s$)	0,127 (0,021)
Coefficiente de endogamia dos genitores (F)	-0,097 (0,043)
Correlação de t entre progênies (rt)	0,119 (0,162)
Correlação de t entre locos	0,870 (0,131)

Conclusão

Os resultados obtidos com base nos marcadores moleculares sugerem a existência de variabilidade genética considerável e, juntamente com os dados referentes ao modo de cruzamento, serão utilizados no melhoramento de *S. guianensis* para a continuidade e realização de novos ciclos seletivos em médio prazo.

A taxa de cruzamento estimada na terceira geração de seleção recorrente intrapopulacional em *S. guianensis* indica que o método de melhoramento adotado é adequado e deve ser continuado.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida ao primeiro autor, e à Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras (UNIPASTO) pelo apoio financeiro.

Referências bibliográficas

- ALLARD, R.W. **Princípios de melhoramento genético das plantas**. Rio de Janeiro: Ed. Blucher, 1971. p. 25-34.
- ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T.; RAMOS, A.K.B. *Stylosanthes* as a forage legume at its centre of diversity. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.). **High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2004. p. 37-50.
- ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T. Uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil. **Anais...** Lavras: UFLA, 2000. p. 471- 475.
- BRESSAN, E. A.; SEBEN, A. M.; FERREIRA, R. R.; LEE, T. S. G.; FIGUEIRA, A. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) exhibits a mixed mating system, high correlated mating and apomixis. **Tree Genetics & Genomes**, v. 9, p. 1089-1097. 2013.
- BROWN, A. H. Genetic characterization of plant mating system. In: HAMRICK, J.L.; GODT, M. J.; BROWN, A. H.; CLEGG, M. T. (Ed.). **Plant population genetics, breeding**

and genetic resources. Sunderland: Sinauer, 1990. p. 155-162.

BROWN, A. H. D.; ALLARD, R. W. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. **Genetics**, v.66, n.1, p. 489-503, 1970.

CHIARI, L.; VALLE, C. B.; RESENDE, R. M. S.; CANÇADO, L. J.; SALGADO, L. R.; LEGUIZAMÓN, G. O. C. **Análise da diversidade genética em *Stylosanthes guianensis* utilizando marcadores RAPD**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2006. 25p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 20).

CHIARI, L.; VALLE, J. V. R.; RESENDE, R. M. S. **Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis***. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2009. 6p. (Embrapa Gado de Corte. Circular Técnica, 36).

CHIARI, L.; RESENDE, R. M. S.; MATIDA, E. T. Mating system parameters in *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. based on RAPD markers. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.36, p. 5820-5822, 2010.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 574-578. 2007.

FERREIRA, M. A. J. DA F.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. C.; QUEIRÓZ, M. A. Outcrossing rate and implications for the improvement of a segregating population of watermelon. **Acta Horticulturae**, v. 510, p. 47-54, 2000.

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

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C. G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. **Annual Review of Ecology Evolution Systematic**, v. 36, p. 47-79. 2005.

MILES, J. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of outcrossing rate in *Stylosanthes guianensis*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.36, n.2, p. 259-265, 1985.

MILES, J. Natural outcrossing in *Stylosanthes capitata*. **Tropical Grasslands**, v.17, n.3,

p.114-117, 1983.

PEAKALL, R.; SMOUSSE, P. E. GENEALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research- an update. **Bioinformatics**, v.28, n.19, p.2537-2539, 2012.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P (2010) *Structure Software*. Version 2.3.3. Disponível em: <<http://pritch.bsd.uchicago.edu>> Acesso em: 07 set. 2011.

RESENDE, M. D. V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Informação Tecnológica, Brasília, DF; Embrapa Florestas, Colombo, 975p. 2002.

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

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating system using n independent loci. **Heredity**, v.88, p. 221-228, 2002.

SANTOS-GARCIA, M.O.; RESENDE, R.M.S.; CHIARI, L.; ZUCHI, M.I.; SOUZA, A.P. Mating systems in tropical forages: *Stylosanthes capitata* Vog. and *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) SW. **Euphytica**, v.178, p. 185-193, 2010.

SHELTON, H.M.; FRANZEL, S.; PETERS, M. Adoption of tropical legume technology around the world: analysis of success. In: MCGILLOWAY, D.A. (Ed.) **Grassland: a global resource**. Academic Press Wageningen, 2005, p.149-166.

STACE, H. Breeding systems in *Stylosanthes*. Observations of outcrossing in *S. scabra* at an alcohol dehydrogenase locus. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.33, p. 87-96, 1982.



Gado de Corte

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**

CGPE 11535