

Taxa de Cruzamento em *Stylosanthes capitata* (Vogel) Estimada por RAPD

Elizangela Tieko Matida¹, Lucimara Chiari², Rosangela Maria Simeão Resende³, Carolina Sant'Ana Robles⁴ e Gisele Olivas Campos Leguizamón⁵

Introdução

Stylosanthes capitata destaca-se entre as leguminosas forrageiras, pois, apresenta elevado rendimento de matéria seca, suas inflorescências possuem alto valor nutritivo e são de alta digestibilidade. Adapta-se bem a solos de baixa fertilidade, elevada acidez e alta saturação de alumínio. Além disso, apesar de serem perenes de vida curta, apresentam grande produção de sementes [1].

Miles avaliando a taxa de cruzamento, baseada em marcadores morfológicos, em *Stylosanthes guianensis* [2] e *S. capitata* [3] observou em ambas um sistema de reprodução mista. Segundo o autor, em *S. capitata* a taxa de fecundação cruzada variou de 19,5% a 47,7%, dependendo da época de colheita.

Marcadores moleculares, como o *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), são ferramentas importantes na estimativa da taxa de cruzamento das espécies e vem sendo usados comumente com esse objetivo [4]. A taxa de cruzamento de uma espécie é uma informação essencial para os programas de melhoramento genético de plantas, bem como para conservação de germoplasma.

Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo estimar a taxa de cruzamento em *S. capitata* utilizando marcadores RAPD.

Material e métodos

A. Material Vegetal

Sementes de vinte plantas foram colhidas para obtenção das famílias de polinização aberta, em um experimento de avaliação de 35 acessos, com 1260 plantas. Para cada progênie foram plantados dez indivíduos, totalizando 200 plantas. As plantas foram mantidas em canteiros na Embrapa Gado de Corte.

Os DNAs foram extraídos das folhas jovens pela metodologia de Bonato *et al.* [5], quantificados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, e comparados com padrões de concentração conhecida (100, 300 e 500 ng/μL).

B. Reações de RAPD

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μL contendo: 2,5 μL de tampão da *Taq* DNA polimerase 10X (Invitrogen), 1,0 μL de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 1,10 μL de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 1 μL de DMSO (Sigma), 3,0 μL de *primer* 10 μM, 0,4 μL de *Taq* polimerase 500 U (Invitrogen) e 4 μL de DNA genômico na concentração de 5 ng/μL e 12,0 μL de H₂O milliQ autoclavada. Para todas as reações foi feito um controle negativo, sem a adição de DNA molde.

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research), programado para uma etapa de 94°C por 5 min, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 min, 40°C por 1,5 min e 72°C por 2 min e para finalizar uma etapa de extensão a 72°C por 7 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, já corados com brometo de etídio (0,5 μg/mL). O tampão utilizado para o preparo do gel e na cuba foi o TBE 1X.

Os resultados foram visualizados em luz UV, fotodocumentados em sistema digital e analisados.

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

C. Análise dos Dados

Pela leitura dos géis os dados foram analisados como variáveis binárias, ou seja, valor “1” para presença da banda e “2” para sua ausência. Esses dados foram analisados pelo programa *Estimation of Outcrossing with Dominant Markers* (MLDT) [6], 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 autofecundação (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

1. Elizangela Tieko Matida é Bióloga, Bolsista de Apoio Técnico CNPq na Embrapa Gado de Corte, Laboratório de Biotecnologia Vegetal. Campo Grande, MS, CEP 79002-970. E-mail: matida@cnpqc.embrapa.br

2. Lucimara Chiari é Pesquisadora da Área de Melhoramento Genético Vegetal, Embrapa Gado de Corte. E-mail: lchiari@cnpqc.embrapa.br

3. Rosangela Maria Simeão Resende é Pesquisadora da Área de Melhoramento Genético Vegetal, Embrapa Gado de Corte. E-mail: rosangela@cnpqc.embrapa.br

4. Carolina Sant'Ana Robles, Bolsista de Iniciação Científica/CNPq na Embrapa Gado de Corte. E-mail: carolrobles82@yahoo.com.br

5. Gisele Olivas Campos Leguizamón é Assistente de Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Embrapa Gado de Corte. E-mail: gisele@cnpqc.embrapa.br

Apoio financeiro: Embrapa, UNIPASTO e CNPq.

Foram obtidas 78 bandas com os nove *primers* utilizados, sendo 48 polimórficas (61,5%) para todas as famílias. A média da taxa de polimorfismo dentro de cada família foi de 22,5% (Fig. 1).

O *primer* 32 gerou o maior número de bandas polimórficas (8) e o D03, o menor número (1). A Fig. 2 ilustra o padrão de bandas de duas progênes de *S. capitata* obtido com o *primer* 32.

Com base nos parâmetros estimados (Tabela 1), evidenciou-se que *S. capitata* é uma espécie de reprodução mista e que, neste ciclo reprodutivo, 43,7% das plantas foram originadas por autofecundação e 68,1% por cruzamentos, sendo 24,5% entre indivíduos aparentados.

Numa análise prévia dessas mesmas progênes, com base em um número menor de *primers* e 39 bandas, obteve-se resultado similar para a taxa de cruzamento multilocus ($t_m = 0,663$). Entretanto, a estimativa da taxa de cruzamento unilocus apresentou magnitude menor quando estimada com menos *primers*. Esse resultado indicou que a amostragem dentro de indivíduos pode ser determinante na estimação e inferência da taxa de cruzamento entre parentes.

Diferenças nas taxas de cruzamento em populações diferentes, de uma mesma espécie, pode ser explicada pelo tipo de marcador utilizado, pela época de plantio, distribuição espacial das plantas, sobreposição de florescimento, densidade de insetos polinizadores, compatibilidade, entre outros.

O coeficiente de endogamia (F) estimado para os genótipos maternos foi de 64,3%, o que indica uma alta homozigose em cada genitor. Essa taxa é superior a estimada para a geração atual ($F_{ap} = 21,73\%$).

As estimativas de r_{pm} (31,3%) e de r_{ps} (34,2%) revelaram a ocorrência de cruzamentos biparentais e de autofecundação. Cruzamentos biparentais significam que algumas progênes são geradas pelos mesmos genitores materno e paterno (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, produção de sementes 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 [7]. Diante dos resultados evidencia-se a necessidade de explorar a variabilidade genética dentro de progênes 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 Embrapa Gado de Corte pela oportunidade de executar este trabalho, ao CNPq pela concessão da

bolsa de Apoio Técnico e à Fundect e UNIPASTO pelos recursos destinados ao projeto.

Referências

- [1] FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. 1979. O Gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil. Belo Horizonte, EPAMIG, 107p.
- [2] 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.
- [3] MILES, J. W. 1983. Natural outcrossing in *Stylosanthes capitata*. Tropical Grasslands, Cali, v. 17, n. 3, p. 114-117.
- [4] WADT, L. H. DE O. & KAGEYAMA, P. Y. 2004. Estrutura genética e acasalamento de *Piper hispidinervum*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 39, n.2, p. 151-157.
- [5] 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).
- [6] RITLAND, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. Heredity, v. 88, p. 221-228.
- [7] VENCOVSKY, R.; PEREIRA, M. B.; CRISÓSTOMO, J. R.; FERREIRA, M. A. J. F. Genética e melhoramento de populações mistas. In: NASS, L. L.; VALLOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento – plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 549-601.

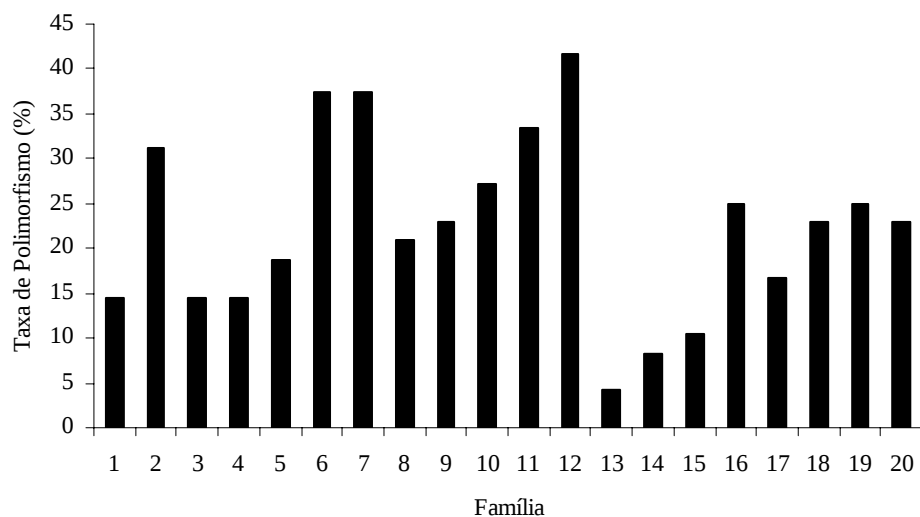


Figura 1. Taxa de polimorfismo para cada família de *Stylosanthes capitata* amostradas na Embrapa Gado de Corte.

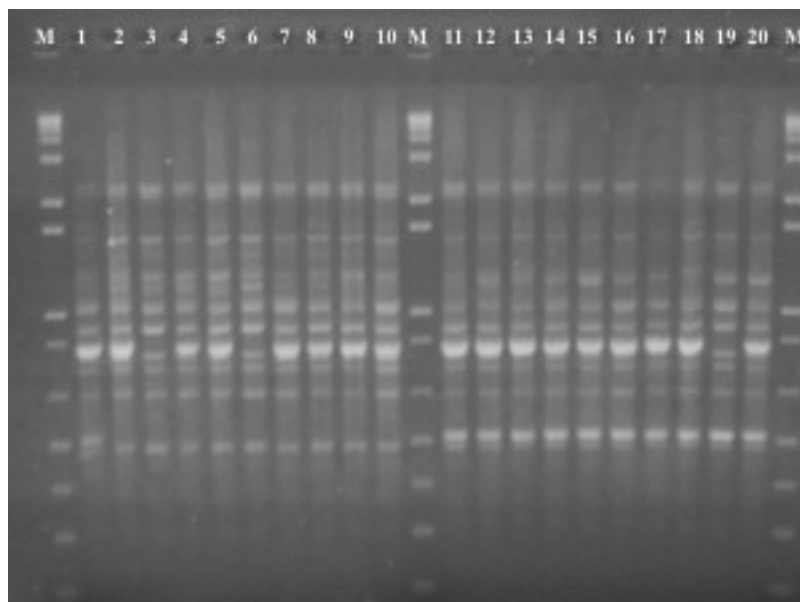


Figura 2. Perfil de RAPD de duas progênie de *S. capitata* gerado com o *primer* 32. Sendo de 1 a 10 os indivíduos da progênie I e de 11 a 20, indivíduos da progênie II. **M** é o marcador de peso molecular 1 kb *plus* DNA *ladder* (Invitrogen).

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

Parâmetros	Estimativas (erro padrão)
Taxa de cruzamento multiloco (t_m)	0,681 (0,058)
Taxa de cruzamento uniloco (t_s)	0,437 (0,048)
Taxa de autofecundação ($s = 1 - t_m$)	0,319
Taxa de cruzamento entre parentes ($tm - ts$)	0,245 (0,033)
Coefficiente de endogamia dos genitores maternos (F)	0,643 (0,043)
Correlação de paternidade multiloco (r_{pm})	0,313 (0,035)
Correlação de paternidade uniloco (r_{ps})	0,342 (0,094)