



43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia
24 a 27 de Julho de 2006
João Pessoa - PB

VARIABILIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE “STYLOSANTHES GUIANENSIS” UTILIZANDO MARCADORES RAPD(1)

LUCIMARA CHIARI(2), JOÃO VICTOR RODRIGUES DO VALLE(3), ROSÂNGELA MARIA SIMEÃO RESENDE(4), LETÍCIA JUNGMANN CANÇADO(4), LEONARDO RIPPEL SALGADO(3), GISELE OLIVAS DE CAMPOS LEGUIZÁMON(5)

(1)Embrapa Gado de Corte, CNPq, Fundect e UNIPASTO.

(2)Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional/CNPq. Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR262 Km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970, Campo Grande, MS. E-mail: lchiari@cnpgc.embrapa.br

(3)Estagiário da Embrapa Gado de Corte e Estudante de graduação em Ciências Biológicas na Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP). Centro de Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, Rua Alexandre Herculano, 1400, Parque dos Poderes, Cep: 79037-280, Campus III, Campo Grande – MS.

(4)Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte.

(5)Técnica de laboratório da Embrapa Gado de Corte.

RESUMO

O conhecimento da variabilidade genética e da relação entre diferentes acessos de “Stylosanthes guianensis” é importante para maximizar o uso dos recursos genéticos disponíveis. Dentro desse contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética em 20 acessos dessa espécie pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte usando marcadores RAPD. Foram selecionados 40 iniciadores randômicos, que produziram um total de 210 bandas, sendo 82 polimórficas (39,05%). Os dados obtidos foram utilizados para gerar uma matriz de similaridade genética usando o coeficiente de Jaccard. A similaridade genética variou de 0,747 a 0,945, indicando uma variabilidade genética pouco acentuada entre os acessos estudados. Os acessos com menor similaridade genética foram SG01 e SG14. Os resultados das análises de agrupamento usando os métodos UPGMA e Tocher foram similares. Apesar da baixa variabilidade genética detectada entre os 20 acessos, esses podem ser separados em nove grupos distintos pelo método UPGMA e seis grupos pelo método de Tocher.

PALAVRAS-CHAVE

leguminosa forrageira, marcadores moleculares, polimorfismo genético, pré-melhoramento

GENETIC VARIABILITY IN “STYLOSANTHES GUIANENSIS” ACCESSIONS USING RAPD MARKERS(1)

ABSTRACT

The knowledge on genetic variability and the relationship among different “Stylosanthes guianensis” accessions is important to maximize resource use represented by available genotypes. Inside that context, the objective of this work was to determine the genetic variability among 20 accessions from the Germplasm Bank of the Embrapa Beef Cattle (CNPGC), characterized by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers. A total of 210 bands DNA were generated with the use of 40 random primers and 82 of these bands were polymorphic (39.05%). The obtained data were used for generating

a genetic similarity matrix using the Jaccard coefficient. The genetic similarity ranged from 0.747 to 0.945, indicating low genetic variability for the set of accessions. The accessions with the lowest genetic similarity were SG01 and SG14. The cluster analyzes obtained by two methods, UPGMA and Tocher, were similar. Despite the low genetic variability detected between the 20 accessions were formed nine distinct clusters by UPGMA and six by Tocher method.

KEYWORDS

forage legumes, molecular markers, genetic polymorphism, pre-breeding

INTRODUÇÃO

“*Stylosanthes guianensis*”, pertencente ao gênero “*Stylosanthes*” (Aeschynomeneae, Papilionoideae), está entre as leguminosas mais promissoras para utilização como forrageira no Cerrado. Apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o México até a Argentina. Está dividida em quatro variedades botânicas: “*canescens*”, “*microcephala*”, “*pauciflora*” e “*vulgaris*”, sendo que os acessos de “*pauciflora*” e “*vulgaris*” são os de maior produção de matéria seca e retenção de folhas verde em períodos de seca em solos de baixa fertilidade (Karia & Andrade, 2000).

Apesar da comprovada contribuição de cultivares de “*S. guianensis*” ainda há poucos estudos sobre a variabilidade genética intraespecífica realizados com marcadores moleculares. Kazan et al. (1993), Vander Stappen et al. (1999) e Jiang et al. (2005) analisaram a variabilidade genética entre cultivares e/ou acessos de “*S. guianensis*” utilizando RAPD, SSR e AFLP, respectivamente.

Para enriquecer estas informações, os objetivos deste trabalho foram: i. analisar a variabilidade genética e estimar a distância genética em 20 acessos de “*Stylosanthes guianensis*”, utilizando a técnica de RAPD e ii. selecionar iniciadores randômicos que gerem polimorfismos neste grupo de acessos para posterior estudo da taxa de cruzamento em suas progênes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas folhas jovens de 20 acessos de “*S. guianensis*” pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, que foram instalados em casa de vegetação por meio de estaquia. Para preservar informações do programa de melhoramento em andamento nessa instituição os acessos foram identificados por SG seguidos de números de 1 a 20.

O DNA desses acessos foi extraído segundo metodologia descrita por Bonato et al. (2002), com modificações, utilizando o seguinte tampão de extração: CTAB 2%; NaCl 1,4 M; 2-b-mercaptoetanol 0,2%; EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e PVP 40 1%. A desproteínização foi feita utilizando fenol:clorofórmio (1:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Para eliminação dos polissacarídeos da amostra foi adicionado acetato de amônio 7,5 M e para degradação do RNA foi utilizado RNase A (10 mg/mL). No final da extração o DNA foi ressuspensionado em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA).

A quantificação dos DNAs extraídos foi realizada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), por comparação das bandas obtidas com padrões do DNA lambda com concentrações conhecidas (100 µg/µL, 150 µg/µL e 300 µg/µL).

As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 25 µL contendo: 1X tampão da Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,08 mM dNTPs (Invitrogen), 4% DMSO (Sigma), 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 µM de iniciador (Invitrogen) e 20 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research) programado para uma etapa de 94°C por 5 min; 40 ciclos de 94°C por 1 min, 40°C por 1,5 min e 72°C por 2 min; seguidos por uma etapa final de 72°C por 7 min. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etideo (0,5 µg/mL). Os resultados foram visualizados em luz UV e fotodocumentados em sistema digital. Para cada análise foi feito um controle negativo, reação contendo todos os reagentes exceto o DNA, para dar maior confiabilidade aos dados.

Inicialmente, 51 iniciadores foram testados em três acessos de “*S. guianensis*” para seleção daqueles utilizados nas análises com os 20 acessos. Essa seleção foi realizada com base no número de bandas (fragmentos de DNA amplificados) geradas por iniciador, quatro ou mais, e na confiabilidade dessas bandas, nitidez e reprodutibilidade.

Os dados obtidos foram compilados em uma planilha na forma de variáveis binárias, ou seja, “1” significando presença de banda e “0”, ausência, para todos os iniciadores analisados nos 20 acessos. Os dados foram utilizados para construção de uma matriz de similaridade genética pelo programa GENES versão para Windows (Cruz, 1997), utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard (S). A análise de agrupamento foi realizada por dois métodos, UPGMA (“Unweighted Pair-group Method with Arithmetical Average”) e Tocher, utilizando-se o complemento aritmético dos dados de similaridade genética (1-S).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 51 iniciadores randômicos sintetizados pela Invitrogen testados em três acessos de “*S. guianensis*”, 40 foram selecionados para a análise nos 20 acessos, todos com conteúdo GC entre 60-70%: B14, D03, D12, D13, E01, E11, F03, F04, F07, F12, G02, G03, G04, G06, G07, G10, G11, G13, G15, G17, G19, H07, AD03, AF01, AF02, AJ06, AJ09, AK04, AK19, AL01, AL02, AL03, AN10, AN11, BA01, BA02, BA03, BB01, BB02, BB03. A Figura 1 representa o perfil de RAPD obtido com o iniciador G04 para os 20 acessos de “*S. guianensis*”.

Os 40 iniciadores selecionados produziram um total de 210 bandas, perfazendo uma média de 5,25 bandas por iniciador. Essa média foi inferior a obtida por Kazan et al. (1993) que utilizaram essa mesma metodologia para estudar a variabilidade genética em 20 cultivares e acessos de quatro espécies de “*Stylosanthes*”, entre elas “*S. guianensis*”, e obtiveram uma média de 9,09 bandas por iniciador.

Das 210 bandas obtidas, 82 foram polimórficas (39,05%), sendo que os iniciadores que produziram o maior número de bandas polimórficas foram G02 (7 bandas) e G07 (6). Apesar do baixo número de bandas polimórficas foi possível identificar 31 iniciadores que geraram polimorfismos (77%), os quais poderão ser utilizados em análises futuras.

De maneira geral, a técnica de RAPD não gera muitos polimorfismos, Kazan et al. (1993) também observaram baixo polimorfismo (25,6%) estudando a variabilidade genética em “*S. guianensis*” utilizando a técnica de RAPD. Enquanto valores maiores foram obtidos por outros autores para esta espécie utilizando outros marcadores, 45% com SSR (Vander Stappen et al., 1999) e 95,5% com AFLP (Jiang et al., 1995).

Os valores de similaridade genética obtidos entre os 20 acessos de “*S. guianensis*” estudados variaram pouco (0,747 – 0,945), denotando baixa variabilidade genética para este grupo de acessos. Os acessos SG01 e SG04 foram os geneticamente mais similares (0,945) e os acessos SG13 e SG20 (0,747), os geneticamente mais divergentes.

Embora os acessos utilizados neste estudo sejam diferentes dos estudados por Kazan et al. (1993), esses autores também encontraram baixa variabilidade genética intraespecífica em 20 acessos e cultivares de “*S. guianensis*” e outras espécies de “*Stylosanthes*” (“*S. scabra*”, “*S. hamata*” e “*S. humilis*”) e alta variabilidade genética interespecífica, utilizando marcadores RAPD. Em contrapartida, alta variabilidade genética foi detectada em “*S. guianensis*” por Vander Stappen et al. (1999) analisando 65 genótipos com 18 microssatélites e Jiang et al. (2005) utilizando a técnica de AFLP com 11 combinações de iniciadores em 42 acessos.

A baixa variabilidade genética observada neste estudo pode ser consequência da técnica empregada, visto que é de conhecimento que a técnica de RAPD gera pouco polimorfismo. Além disso, os acessos analisados foram selecionados para este estudo pelas características morfoagronômicas interessantes e não contrastantes, pois fazem parte do programa de melhoramento em andamento na Embrapa Gado de Corte.

Para representar graficamente o padrão de distância genética, o complemento aritmético dos dados da

matriz de similaridade foi utilizado para gerar um dendrograma pelo método UPGMA (Figura 2). Considerando a média das porcentagens das dissimilaridades genéticas entre todos os acessos (55,8%) pode-se distinguir a formação de nove grupos. O grupo I constituído pelos acessos SG01, SG04, SG05, SG06 e SG07; o grupo II pelos acessos SG03, SG09, SG02 e SG08; o grupo III pelos acessos SG10, SG11 e SG12; o acesso SG13 não se agrupou com nenhum outro, formando o grupo IV; grupo V foi formado pelos acessos SG16, SG18 e SG17; e os demais acessos não se agruparam formando os outros quatro grupos (VI, VII, VIII e IX).

O método de Tocher separou os acessos em seis grupos, mas o resultado foi similar ao obtido pelo método UPGMA. Os acessos SG13, SG15, SG19 e SG20 também não agruparam com nenhum outro acesso, formando quatro grupos diferentes, sugerindo que esses acessos são os mais distantes geneticamente entre si e dos demais acessos. O acesso SG14 ficou agrupado com os acessos SG16, SG17 e SG18 e os demais acessos formaram o maior grupo (Tabela 1).

CONCLUSÕES

Os resultados indicam uma alta similaridade genética entre os acessos de “*S. guianensis*” estudados. Apesar da alta similaridade genética detectada foi possível separar os acessos em diferentes grupos pelos métodos de análise empregados.

Dos iniciadores analisados, 77% geraram polimorfismos e poderão ser empregados como ferramenta de auxílio ao programa de melhoramento da espécie em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BONATO, A.L.V.; VERZIGNASSI, J.R.; RESENDE, R.M.S. et al. “Extração de DNA genômico de “*Stylosanthes*” spp”. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4p. (Comunicado Técnico, 78).
2. CRUZ, D.C. “Programa genes - aplicativo computacional em genética e estatística”. Viçosa: Editora UFV, 1997. 442p.
3. JIANG, C.S.; MA, X.R.; ZHOU, D.M. et al. AFLP analysis of genetic variability among “*Stylosanthes guianensis*” accessions resistant and susceptible to the stylo antracnose. “*Plant Breeding*”, v.124, n.6, p.595-598, 2005.
4. KARIA, C.T.; ANDRADE, R.P. Uso de “*Stylosanthes*” em pastagens no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS 1., Lavras, 2000. “Temas em evidência”. Lavras: UFLA, 2000. p.471-475.
5. KAZAN, K.; MANNERS, J.M.; CAMERON, D.F. Genetic variation in agronomically important species of “*Stylosanthes*” determined using random amplified polymorphic DNA mark. “*Theoretical and Applied Genetics*”, v.85, p.882-888, 1993.
6. VANDER STAPPEN, J.; WELTJENS, I; VOLCKAERT, G. Microsatellite markers in “*Stylosanthes guianensis*”. “*Molecular Ecology*”, v.8, n.3, p.513-525, 1999.