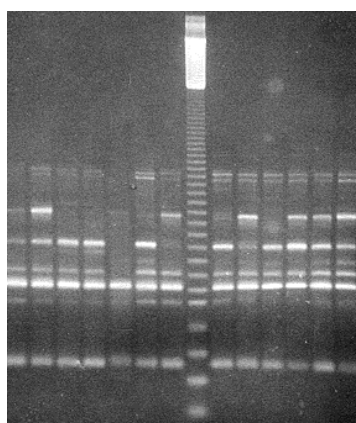
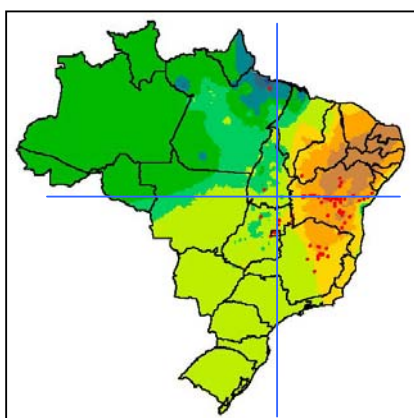




UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA – UCB

Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia

**USO DE MARCADORES RAPD E DO SISTEMA DE INFORMAÇÃO
GEOGRÁFICA NO ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA E
ECOLÓGICA DE *Stylosanthes macrocephala* M. B. FERR. et S. COSTA**



Ana Maria Costa

Brasília, janeiro de 2004



Universidade Católica de Brasília
Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia



**USO DE MARCADORES RAPD E DO SISTEMA DE INFORMAÇÃO
GEOGRÁFICA NO ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA E
ECOLÓGICA DE *Stylosanthes macrocephala* M. B. Ferr. et S. COSTA**

Ana Maria Costa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, da Universidade Católica de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Fábio Gelape Faleiro

Brasília, janeiro de 2004

Ana Maria Costa

**USO DE MARCADORES RAPD E DO SISTEMA DE INFORMAÇÃO
GEOGRÁFICA NO ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA E
ECOLÓGICA DE *Stylosanthes macrocephala* M. B. FERR. ET S. COSTA**

BANCA EXAMIDADORA

Dr. Márcio Elias Ferreira

Dr. José Francisco Montenegro Valls

Dr. Allan Kardec Braga Ramos

Dr. Fábio Gelape Faleiro
(Orientador)

Aos meus queridos filhos, André, Elisa e Vera, ao companheiro Luiz, e aos meus pais pelo estímulo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Católica de Brasília e ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados pelas condições necessárias para a realização deste trabalho.

À minha família, pela ajuda e presença em todos os momentos. Obrigada pelo apoio.

Aos meus companheiros de trabalho, Carlos Magno C. da Rocha, Iêda C. Mendes, Cláudio T. Karia, e Ronaldo P. de Andrade, pela confiança, compreensão e apoio.

Ao meu orientador, Fábio Gelape Faleiro, pela oportunidade de aprendizado, atenção, dedicação e confiança.

Aos meus companheiros de laboratório, Alessandra. Faleiro, Maria Cristina Cordeiro, George Lopes, e Solange André, pelo apoio técnico e amizade.

Aos pesquisadores, Marília Lobo Burle, Luciano S. Shiratsuchi, Márcio Elias Ferreira, Dario Grattapaglia, José Francisco M. Valls e Allan Kardec B. Ramos, pelas valiosas sugestões e críticas.

A todos os colegas de laboratório e campo que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Lista de Figuras e Tabelas	VIII
Abreviaturas.....	X
Resumo.....	XI
Abstract	XII
 1. INTRODUÇÃO.....	 13
1.1 O gênero <i>Stylosanthes</i> Sw	14
1.2 A espécie <i>Stylosanthes macrocephala</i> M. B. Ferr. et S. Costa.....	16
1.3 Importância econômica.....	16
1.4 Banco de germoplasma de <i>Stylosanthes</i>.....	18
1.5 Marcadores moleculares na caracterização de recursos genéticos.....	20
1.6 Utilização do sistema de informação geográfica para complementar informações sobre acessos de banco de germoplasma	22
 2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
 3. Artigo	
Uso de descritores ecológicos e marcadores RAPD no estudo da variabilidade genética de <i>Stylosanthes macrocephala</i> M. B. Ferr et S. Costa.....	26
Resumo.....	26
Termos para indexação.....	27
Abstract.....	27

Introdução.....	28
Material e Métodos	
Material genético.....	30
Obtenção dos descritores ecológicos.....	30
Extração de DNA.....	31
Obtenção de marcadores de RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	33
Análise dos marcadores RAPD	34
Resultados e Discussão	
Características ecogeográficas dos pontos de coleta	34
Análise da variabilidade genética entre os acessos	36
Variabilidade genética dentro do acesso	37
Análise conjunta da diversidade genética e descritores ecológicos	38
Conclusões	40
Referências Bibliográficas	41
Tabelas e Figuras	47
4. Discussão e Perspectivas.....	53
5. Referências Bibliográficas	68

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura A. Flor e folha de <i>Stylosanthes guianensis</i>	15
Figura 1. Produtos de amplificação de DNA genômico de 6 acessos de <i>Stylosanthes macrocephala</i> gerados com a utilização dos <i>primers</i> OPF-02, OPF-03 e OPF-05.....	49
Figura 2. Segmento de um gel de análise dos produtos de amplificação de DNA genômico <i>Stylosanthes macrocephala</i> gerados com a utilização dos <i>primers</i> OPF12. ..	49
Figura 3. Dispersão gráfica dos acessos de <i>Stylosanthes</i> spp. com base na matriz de distâncias genéticas geradas por 176 marcadores RAPD. A análise de agrupamento com base no critério do UPGMA (<i>Unweighted pair-group arithmetic average</i>).....	50
Figura 4. Análise de agrupamento de 86 acessos de <i>Stylosanthes macrocephala</i> baseada na matriz de distâncias genéticas calculadas a partir de 161 marcadores RAPD. O critério de agrupamento foi o do UPGMA.	51
Figura 5. Produtos de amplificação de amostras de DNA genômico de 11 plantas (1 a 11) do acesso CPAC 1192, gerados com a utilização do <i>primer</i> OPD-03 (A) e OPE-01. (B)	52
Figura 6. Distribuição geográfica dos acessos de <i>Stylosanthes macrocephala</i> dos acessos geneticamente próximos (A). Distribuição dos acessos mais divergentes geneticamente (B). A região demarcada corresponde àquelas onde foram coletados acessos com maior diversidade genética entre si	52
Figura 7. Dispersão gráfica de 86 acessos de <i>Stylosanthes macrocephala</i> com base na matriz de distâncias genéticas geradas por 161 marcadores RAPD. Bacias hidrográficas de coleta	53
Figura 8. Mapas do Sistema de Informação Geográfica utilizados para a obtenção dos descritores ecológicos dos acessos de <i>Stylosanthes macrocephala</i> referentes a Bacias Hidrográficas (A); Solos (B), Vegetação (C), Municípios (D), Estradas de Rodagem	

(E) e Pluviometria (F)	54
Figura 9. Distribuição geográfica dos acessos coletados nas diferentes expedições.....	56
Figura 10. Matrizes de distâncias genéticas entre 11 plantas (1 a 11) dos acessos CPAC 1033 (A), CPAC 1043 (B), CPAC 1192 (C), CPAC 2551 (D), e bulks	60
Figura 11. Análises de agrupamento baseada na matriz de distâncias genéticas entre 11 plantas dos acessos CPAC 1033, CPAC 1043, CPAC 1192 e CPAC 2251 de <i>Stylosanthes macrocephala</i> e seus respectivos bulks de DNA	61
Figura 12. Análise de agrupamento da coleção de 87 acessos de <i>Stylosanthes</i> spp. com base na matriz de distâncias genéticas calculadas com base em 176 marcadores RAPD.....	62
Figura 13. Dispersão gráfica de 86 acessos de <i>S. macrocephala</i> com base na matriz de distâncias genéticas geradas por 161 marcadores RAPD. Os acessos foram estratificados quanto aos grupos genéticos.....	63
Figura 14. Dispersão gráfica de 86 acessos de <i>S. macrocephala</i> com base na matriz de distâncias genéticas geradas por 161 marcadores RAPD. Os acessos foram estratificados quanto ao Estado de Origem (A), Bacia Hidrográfica (B), Altitude (C), Pluviometria (D), Tipo de Solo (E) e Tipo de Vegetação (F)	64
Figura 15. Distribuição geográfica dos acessos de <i>Stylosanthes macrocephala</i> identificando o grupo genético.....	66
Figura 16. Identificação das regiões onde foram coletados os acessos de <i>S. macrocephala</i> com maior diversidade genética	67
Tabela 1. Acessos analisados no presente estudo com as respectivas coordenadas geográficas e descritores ecológicos do local de origem	47
Tabela 2. Agrupamento dos acessos de acordo com o critério de similaridade ambiental dos locais de coleta	57

ABREVIATURAS

CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical.

cv – cultivar.

DNA – ácido desoxirribonucleico.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nation* - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentos.

pb – Pares de Bases.

PCR – *Polimerase Chain Reaction* – Reação de polimerização em cadeia.

RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* – Amplificação randômica de segmentos polimórficos de DNA.

SIG – Sistema de Informação Geográfica.

Sw. – Swallen.

UPGMA - *Unweighted pair-group arithmetic mean average* – media aritmética dos pares de grupos não balanceados

RESUMO

As espécies do gênero *Stylosanthes* Sw. vêm sendo utilizadas em muitos países na recuperação de áreas degradadas, na adubação verde e na alimentação animal. A *S. macrocephala* M. B. Ferr. et S. Costa tem despertado o interesse de pesquisadores que realizam trabalhos de conservação e melhoramento genético devido ao seu potencial produtivo, resistência à seca e à antracnose, e grande produção de sementes. A falta de descritores morfológicos e agrônômicos estáveis e de informações ecogeográficas dos locais de coleta dos acessos tem dificultado a caracterização, o estudo da variabilidade genética, e conseqüentemente a utilização dos mesmos em programas de melhoramento genético. Com o objetivo de reduzir tais dificuldades, neste trabalho foram obtidos os descritores ecológicos e realizadas a caracterização molecular e análise da variabilidade genética de 87 acessos de *S. macrocephala* do Banco de Germoplasma da Embrapa Cerrados. Os descritores ecológicos foram obtidos através da sobreposição dos pontos de coleta de cada acesso com os dados fornecidos pelo Sistema de Informação Geográfica (SIG). A caracterização molecular e a análise da variabilidade genética foram realizadas por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) gerados por 15 *primers* decâmeros. Com base nestes marcadores, foram determinadas as distâncias genéticas entre os acessos através do complemento do coeficiente de similaridade de Nei & Li (1979). Análise de agrupamento dos acessos foi feita com base nas distâncias genéticas utilizando-se como critério o método UPGMA (*Unweighted pair-group arithmetic average*). Verificou-se que os acessos foram coletados em locais com diferentes características ecogeográficas, abrangendo sete Estados, cinco bacias hidrográficas, sete tipos de vegetação e sete tipos de solos. As altitudes dos locais de coleta variaram de 1 a 1298m e a pluviometria anual média variou de 550 a mais de 1900 mm. Esta diversidade de ambientes refletiu em diferentes descritores ecológicos, sugerindo alta diversidade adaptativa do banco. Com base em 161 marcadores RAPD verificou-se altas distâncias genéticas entre os acessos, na faixa de 0,02 a 0,42. Com base nas distâncias genéticas, os acessos foram agrupados em 10 grupos. Observou-se uma tendência de separação dos grupos por bacias hidrográficas, sendo que no quadrilátero, Barreiras, Ouro-lândia, Tanhaçus, Caetité, foram coletados acessos de 7 dos 10 grupos observados. A alta variabilidade genética da coleção dos acessos de *S. macrocephala* encontrada neste

trabalho mostra a importância desta coleção para futuros trabalhos de caracterização agronômica e melhoramento genético.

ABSTRACT

The species of *Stylosanthes* have been used in many countries as pastures, as a cover crop or to recover degraded areas. *Stylosanthes macrocephala* M. B. Ferr. et S. Costa has been studied by researchers due to its productive potential, dry resistance, anthracnose resistance, and high seed production. The absence of stable morphological descriptors and lack of ecogeographic information about collecting sites difficult germplasma characterization, genetic variability studies and the development of new commercial varieties. In this work, ecological descriptors and molecular markers were obtained for 87 accessions belonging to a *S. macrocephala* collection existing at the EMBRAPA Cerrados Research Center. The ecological descriptors were obtained by plotting the coordinates for each accession collecting site in GIS maps databanks. Molecular characterization and variability analysis were done by RAPD molecular markers (*Random Amplified Polymorphic DNA*) generated by 15 decamer primers. RAPD markers were used to estimate genetic distances between accessions using the complement of the Nei & Li similarity coefficient. Accessions were clustered by UPGMA method (*Unweighted pair-group mean arithmetic*). The accessions were collected from different ecogeographic areas in seven Brazilian States, five hydrographic regions, seven vegetation types, and seven soils classes. Collecting sites ranged from 1 to 1298 m above sea level with yearly rainfall varying from 550 to 1900 mm. The ambient diversity resulted in many ecological descriptors to the accessions, suggesting high adaptive diversity of the collection. Using 161 RAPD markers it was found that the genetic distances between accessions ranged from 0.02 to 0.42. These genetic distances allowed the establishment of 10 clusters groups. Accessions collected in a specific hydrographic region tended to be grouped in the same genetical group. Accessions collected in Bahia State, around Barreiras, Ouro-lândia, Tanhaçus, Caetite regions, showed high genetic diversity and were grouped in seven distinct genetic groups. The high genetic variability observed between accessions showed the importance of this *Stylosanthes macrocephala* collection for breeding programs.

1 – INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Stylosanthes* vêm sendo utilizadas em muitos países na recuperação de áreas degradadas, na adubação verde e na alimentação animal em virtude de sua adaptação a solos de baixa fertilidade e da capacidade de fixar nitrogênio, graças à simbiose com bactérias do gênero *Rizhobium*, (Nascimento, 1986; Andrade & Karia, 2000). Tais espécies podem ser utilizadas na formação de pastagens de alto valor nutricional tanto por meio do consórcio com gramíneas, quanto em plantios exclusivos como banco de proteínas. Este tipo de pastagem diminui os custos com adubação nitrogenada e melhora a qualidade da dieta animal no período seco do ano, além de contribuir para a recuperação de áreas degradadas (Andrade & Karia, 2000).

O consórcio entre gramínea e *Stylosanthes* vem sendo empregado com sucesso em diferentes países, entretanto, ainda são poucos os produtores que realizam este tipo de consorciação no Brasil. Uma das causas apontadas para esta baixa utilização é a pouca persistência da leguminosa no campo. Nesse sentido, faz-se necessário desenvolver novas variedades de *Stylosanthes* que apresentem as características agronômicas adequadas para as nossas condições de manejo (Andrade & Karia, 2000; Barcellos *et al.*, 2000, Spain & Vilela, 1990). Para isso, a caracterização genética dos acessos existentes em bancos de germoplasma é uma etapa fundamental.

Os bancos de germoplasma foram criados para a conservação e suprimento dos Recursos Genéticos para programas de melhoramento genético. Entretanto a utilização destes Recursos Genéticos tem sido muito baixa devido à falta de informação sobre os acessos disponíveis (FAO, 1996; Van Sloten, 1987). Atualmente, a Embrapa Cerrados

abriga mais de 1400 acessos do gênero *Stylosanthes* (Karia & Andrade, 1996). A falta de descritores morfológicos e agronômicos estáveis e de informações ecogeográficas dos locais de coleta dos acessos tem dificultado a caracterização e o estudo da diversidade genética e, conseqüentemente, a utilização destes acessos em programas de melhoramento genético (Karia *et al.*, 2001).

A utilização de marcadores moleculares do DNA e do Sistema de Informação Geográfica (SIG) tem sido uma alternativa importante para complementar os dados de caracterização de acessos de diferentes coleções. Marcadores moleculares têm sido utilizados para determinar o grau de variabilidade genética presente em diferentes coleções (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Harrison *et al.*, 2000). Tais marcadores assumem grande importância principalmente quando existe carência de descritores morfológicos e agronômicos estáveis para a espécie em estudo (Karia *et al.*, 2001). A utilização de dados fornecidos pelo SIG tem permitido recuperar informações importantes sobre as condições ambientais e biológicas do local de coleta de cada acesso (Chapman & Barreto, 1996; Greene *et al.*, 1999; Guarino *et al.*, 2002). Tais informações têm orientado atividades de coleta, conservação *ex situ* e permitido a identificação de combinações gênicas adaptativas de interesse de programas de melhoramento genético.

1.1 O gênero *Stylosanthes*

O gênero *Stylosanthes* Sw. pertence à família *Fabaceae*, inclui 40 espécies e um grande número de subespécies e variedades botânicas (Mohlenbrock, 1957; Ferreira & Costa, 1977; Lewis & Mannetje, 1982). Em sua maioria, são leguminosas perenes, com vigoroso sistema radicular, alta resistência à seca e a solos de baixa fertilidade, graças à

simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. O porte é prostrado a ereto e pode alcançar a altura de até 1,5 m. As espécies do gênero *Stylosanthes* apresentam folhas do tipo trifolioladas, flores pequenas e caracterizam-se por apresentar grande diversidade morfológica e agronômica, em função da adaptação a diferentes condições ambientais (Ferreira & Costa, 1977, Ferreira & Costa, 1979) (Figura A). Estas espécies produzem grande quantidade de massa verde, e por esta razão têm sido utilizadas na formação de pastagens consorciadas com gramíneas e em programas de preservação de áreas com risco de degradação ambiental (Reyes, *et al.*, 1985). O gênero *Stylosanthes* é originário da América Central e do Sul, mas devido à sua importância econômica, é encontrado sob cultivo também nas Américas Subtropical, bem como na Austrália (Williams *et al.*, 1984; Reyes *et al.*, 1985).

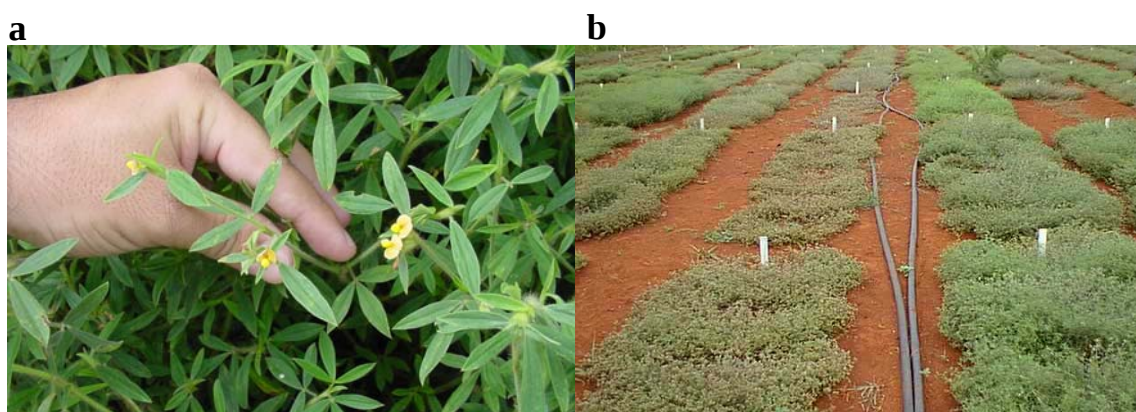


Figura A: Flor e folha de *Stylosanthes guianensis* (a) e parcelas de diferentes acessos de *Stylosanthes macrocephala* mostrando a diversidade intraespecífica (b).

A maioria das espécies do gênero *Stylosanthes* é diplóide com $2n = 20$ cromossomos (Mannetje, 1984), entretanto algumas são alotetraplóides, como no caso das espécies *S. scabra* e *S. hamata* (Stace & Cameron, 1984). O sistema de reprodução ocorre

preferencialmente por autofecundação, existindo uma porcentagem pequena de fecundação cruzada em condições naturais (Miles, 1985; Stace, 1982).

1.2 A espécie *Stylosanthes macrocephala* M. B. Ferr. et S. Costa

Esta espécie apresenta excelente tolerância a seca e adaptação a solos ácidos e arenosos, de baixa fertilidade (Probert, 1984, Sanzonowicz *et al*, 1987, Andrade & Karia, 2000). As plantas possuem porte subarbusativo, ramoso, de hábito de crescimento prostrado a semi-ereto e com altura de 20 a 80 cm em condições naturais (Ferreira & Costa, 1977). Em ensaios realizados pela Embrapa Cerrados, em 1995 e 1996, os acessos de *S. macrocephala* mostraram-se mais resistentes à antracnose que os acessos de *S. guianensis*, *S. capitata* e *S. scabra*. Em uma escala de notas de 1 a 9 (1= resistente e 9= muito susceptível), a média dos acessos de *S. macrocephala* foi de 1,1; enquanto que a média das demais espécies foi: 4,0; 3,9; e 4,8 respectivamente (Andrade & Karia, 2000).

1.3 Importância Econômica

As vantagens da utilização de pastagens consorciadas formadas por gramíneas e leguminosas são amplamente conhecidas por pesquisadores, extensionistas e produtores. Existem muitos resultados experimentais obtidos nas últimas três décadas, que ressaltam a melhoria na produção animal promovida pela presença da leguminosa na pastagem, a qual melhora a qualidade da dieta do animal e apresenta efeitos indiretos relacionados à fixação biológica de nitrogênio e recuperação de áreas degradadas (Nascimento Jr., 1986; Spain, & Vilela, 1990; Boddey *et al.*, 1993; Barcellos & Vilela, 1994; Pereira *et al.*, 1995;

Maraschin, 1997, Andrade & Karia, 2000). Dentre as espécies utilizadas com tais finalidades, as do gênero *Stylosanthes* merecem posição de destaque. O gênero *Stylosanthes* possui diversas espécies que têm sido utilizadas como alimento para animais, em pastagens consorciadas, banco de proteína, e como cobertura ou adubo verde (Andrade & Karia, 2000). Em 1983, a Embrapa disponibilizou para o mercado as cultivares *Stylosanthes guianensis* cv. Bandeirante (Souza, Andrade & Thomas, 1983a), que apresentava resistência à seca e a doença fúngica antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), alta produção de matéria verde e seca ao longo do ano, contudo considerada baixa produtora de semente quando comparada às cultivares australianas comerciais. No mesmo ano também foi lançada a cultivar *S. macrocephala* cv. Pioneiro (Souza, Andrade & Thomas, 1983b). Esse material foi coletado na área experimental da Embrapa Cerrados, em Planaltina, em 1974, e apresentou excelente resistência à seca e à antracnose, boa produção de massa seca e verde no período chuvoso, e alta produção de sementes. Experimentos de pastejo em Planaltina-DF, mostraram que a presença da cv. Pioneiro na consorciação aumentou os teores de nitrogênio e cálcio na forragem disponível para os animais e aumentou também a produção de carne por hectare (Souza *et al.*, 1983b). Em 1993, nova variedade foi lançada, também pela Embrapa, o *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão (EMBRAPA CPAC/CNGC, 1993) igualmente resistente à seca e à antracnose, com boa produção de massa verde no ano inteiro, inclusive no período seco, alta produção de forragem e com uma produção de sementes maior que a da cv. Bandeirante.

No Brasil, poucos produtores rurais têm da área tropical têm adotado e mantido o uso de leguminosas em suas fazendas (Barcellos *et al.*, 2000), sendo que as razões apontadas foram a baixa persistência destas leguminosas na pastagem e a baixa produção

de sementes dos cultivares comerciais (Spain & Vilela, 1990; Cameron *et al.*, 1993; Barcellos & Vilela, 1994; Nascimento Jr., 1986; Barcellos *et al.*, 2000). Para que o produtor venha desfrutar efetivamente dos benefícios deste tipo de tecnologia, faz-se necessário o desenvolvimento de novas cultivares que apresentem as características desejáveis de persistência, resistência à seca e doenças e boa produção de sementes. A espécie *S. macrocephala* apresenta este potencial, desde que se faça um adequado trabalho de seleção e melhoramento, considerando o perfil da variabilidade genética disponível.

1.4 Banco de Germoplasma de *Stylosanthes*

Nas últimas três décadas, coleções de forrageiras tropicais foram montadas em diferentes países com a finalidade de fornecer material genético para programas de melhoramento, contando atualmente, com milhares de acessos. A Embrapa Cerrados mantém um Banco de Germoplasma de Forrageiras com 1480 acessos do gênero *Stylosanthes* (Karia & Andrade, 1996), dos quais uma parte também se encontra disponível no Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT. Apesar do grande número de acessos, existem poucas informações sobre as características genéticas de cada material coletado, sendo consenso geral, a necessidade de se conhecer, com detalhes, a variabilidade genética disponível e caracterizar morfológica e agronomicamente cada acesso, o que facilitaria a utilização dos mesmos em programas de melhoramento (FAO, 1996; Van Sloten, 1987)

A baixa utilização do germoplasma disponível nos diferentes Bancos de Recursos Genéticos é, atualmente, uma preocupação mundial. Segundo Van Sloten (1987) a baixa utilização decorre principalmente da carência de dados sobre os acessos, seja pela

inexistência, insuficiência ou ainda inacessibilidade das informações. Frankel & Brown (1994) apontaram como outro agravante a dificuldade do melhorista de avaliar e selecionar os acessos quando a coleção disponível é muito grande. Estes autores sugeriram a formação de coleções nucleares, de sorte a remover os acessos redundantes, ou geneticamente próximos, mantendo-se uma representação da variabilidade genética da coleção base da espécie na faixa de 80%.

Com o objetivo de aumentar a utilização dos bancos de recursos genéticos, a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) elaborou um programa para orientar e estimular ações que levassem a avaliação da diversidade genética, organização dos dados disponíveis e caracterização dos acessos existentes, facilitando a seleção dos materiais de interesse por meio do Plano Global de Ação para a Conservação e Utilização Sustentável dos Recursos Genéticos Vegetais para a Alimentação e Agricultura –1996 e 1998 (FAO – 1996 e 1998).

A caracterização dos acessos dentro de uma coleção é feita descrevendo-se as variações fenotípicas e genotípicas entre os acessos ou entre populações, através de descritores quantitativos ou qualitativos, preferencialmente de fácil mensuração e estáveis. Diferentes descritores têm sido utilizados em tais estudos, como os morfológicos, agronômicos, ecológicos, bioquímicos e moleculares. Estas informações, analisadas separadas ou conjuntamente, permitem a formação de agrupamentos de indivíduos similares geneticamente, o que serve de base para o estabelecimento de coleções nucleares e coleções de trabalho (Schultze-Kraft *et al*, 1984; Van Beuning & Busch, 1997).

Com o advento das técnicas moleculares, houve um aporte significativo de informação genotípica que tem permitido correlacionar aspectos genéticos moleculares com

características fenotípicas, melhorando a caracterização dos acessos, auxiliando processos de cruzamentos e de seleção, orientando atividades de coleta e a conservação *ex-situ*, contribuindo para a preservação da espécie (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

1.5 Marcadores Moleculares na Caracterização de Recursos Genéticos

Diferentes metodologias têm sido utilizadas para a obtenção de marcadores moleculares com a finalidade de caracterizar indivíduos e realizar estudos da diversidade genética intra e interespecífica. De um modo geral, faz-se a coleta e o isolamento do DNA, seguido da aplicação das técnicas que irão identificar diferenças genéticas. Existem seqüências do DNA que permitem caracterizar o indivíduo como pertencente a um determinado gênero, outras podem identificar a espécie, e conforme o sistema de identificação empregado, consegue-se determinar relações de parentesco e paternidade de indivíduos dentro da espécie (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Trata-se, portanto, de uma ferramenta poderosa que gradualmente está sendo adotada no estudo de bancos de recursos genéticos, com a finalidade de avaliar o grau de diversidade das coleções, até então, avaliadas somente por descritores fenotípicos, baseados em características fisiológicas e morfo-agronômicas (van Beuning & Busch, 1997; Harrison *et al.*, 2000).

A utilização dos métodos moleculares combinados com informações fenotípicas, vem fornecendo um quadro mais completo e preciso para os agrupamentos, permitindo ao melhorista selecionar de maneira mais eficiente acessos úteis a programas de melhoramento genético entre outras aplicações (Ferreira & Grattapaglia, 1996, Harrison *et al.* 2000). Utilizando-se o método de caracterização molecular baseada na amplificação randômica de segmentos polimórficos de DNA (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*), Harrison

et al. (2000) estudaram a diversidade genética de acessos de morango e correlacionaram este resultado com os caracteres morfológicos, ecogeográficos, chegando a conclusão de que a técnica de RAPD pode ser extremamente útil para auxiliar a estratificação da diversidade genética existente. Nos últimos anos, a disponibilidade de marcadores RAPD permitiu estudos de diversidade genética de muitas espécies para as quais o estudo dessa natureza não era possível em vista da inexistência do conhecimento prévio de seqüências do DNA (Anderen & Fairbanks, 1990). Entre os vários exemplos, pode-se citar o amendoim *Arachis hypogaeae* (Halward *et al.*, 1992), sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) (Yang *et al.*, 1996), *Panicum virgatum* (Gunter *et al.*, 1996), e *Vigna angularis* (Azuki) (Yee *et al.*, 1999), linho (Fu *et al.*, 2003).

Marcadores moleculares, devido a sua alta estabilidade, têm a vantagem de não serem afetados pelas condições ambientais, ao contrário dos marcadores morfológicos e agronômicos. Outra vantagem dos marcadores moleculares é que podem ser empregados para realizar a caracterização e diferenciação de organismos muito próximos geneticamente em virtude do grande número de polimorfismos que podem ser gerados. No caso do gênero *Stylosanthes*, as vantagens citadas acima são de grande importância. A caracterização fenotípica dentro das espécies do gênero *Stylosanthes* baseada em características morfológicas e agronômicas é peculiarmente difícil (Stace & Cameron, 1984, Stappen *et al.*, 1998). No caso das espécies *S. guianensis* e *S. macrocephala*, por exemplo, não existe uma lista de descritores e as diversas tentativas de se encontrar tais descritores demonstraram que somente a coloração das flores é estável (Stace & Cameron, 1984; Stace, 1984, Schultze-Kraft, 1984).

Apesar da grande vantagem oferecida pelos marcadores moleculares, são poucos os trabalhos que utilizaram esta metodologia com a finalidade de caracterização e organização de informações de acessos de *Stylosanthes*. A grande maioria dos trabalhos concentrou seus esforços no estudo da relação filogenética entre espécies deste gênero e não propriamente na determinação da variabilidade intra-específica (Kazan *et al.*, 1992; Kazan *et al.*, 1993 (a); Kazan *et al.*, 1993 (b); Liu & Musial, 1995; Liu *et al.*, 1996; Liu, 1997; Vieira *et al.*, 1997; Stappen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999, Stappen *et al.*, 1999). Atualmente, a Embrapa Cerrados tem concentrado esforços na caracterização do banco de Germoplasma de Forrageiras, com a finalidade de disponibilizar informações mais precisas e adequadas sobre os acessos e dentro desse objetivo, os marcadores moleculares do DNA estão assumindo grande importância.

1.6 Utilização do sistema de informação geográfica para complementar informações sobre acessos de banco de germoplasma.

Um banco de Germoplasma tem por objetivo preservar e disponibilizar acessos que representem a diversidade genética de uma espécie. Portanto, as coletas destes acessos devem ser conduzidas de forma a obter tal diversidade. Um dos critérios para obter diversidade genotípica leva em consideração os locais de coleta dos acessos, partindo-se do pressuposto que pressões ambientais diferentes tendem a favorecer genótipos diferentes. Nesse sentido, os acessos devem ser coletados em diferentes ecossistemas (Guarino *et al.*, 2002). Seguindo este mesmo raciocínio, o conhecimento das condições ecogeográficas dos locais de coleta do germoplasma forneceria um indicativo do processo de adaptação a que o acesso fora submetido, e do seu possível comportamento agrônomo e biológico (Hawtin,

et al., 1996; Beebe *et al.*, 1997). A idéia de se utilizar este tipo de informação é relativamente nova e os descritores obtidos por esta via têm sido denominados, genericamente, de descritores ecológicos (Steiner & Greene, 1996).

A obtenção de descritores ecológicos de acessos de banco de germoplasma vem sendo uma tarefa difícil, já que, na maioria dos casos, as cadernetas de campo dos coletores registram apenas os municípios como locais de coleta. Uma estimativa global da extensão da documentação de acessos reunidos em banco de germoplasma mostrou que em 1984, 65% dos acessos não possuíam dados de passaporte, 80% dados de caracterização e 95% dados de avaliação (Valls, 1988). Levantamentos recentes mostram que esta situação mundial ainda persiste (FAO, 1998; Dudnik, 2001). Diante da dificuldade, os melhoristas acabam optando por coleções de trabalho já caracterizadas, o que leva à sub-utilização dos recursos genéticos presentes nos bancos de germoplasma e conseqüente perda de esforços e recursos financeiros (Valls, 1988). Em relação à coleção de *S. macrocephala* disponível na Embrapa Cerrados, 87 possuem as coordenadas geográficas do ponto de coleta, e 40 foram caracterizados quanto seu potencial produtivo (Schultze-Kraft, 1984), entretanto, a falta de informação ainda tem sido uma barreira para a utilização do banco nos programas de melhoramento genético desta espécie.

Com base no Sistema de Informação Geográfica (SIG), quando as coordenadas do local de coleta são disponíveis, é possível inferir sobre as informações ecogeográficas dos acessos, pela possibilidade de associar os locais de coleta com dados de clima, vegetação, solo, e outros dados geográficos disponíveis (Jones *et. al*, 1996). Esta forma de recuperação de dados está sendo chamada de “retro-classificação de acessos” (Burle, comunicação pessoal) e tem a vantagem de fornecer descritores a acessos de coleções que já estão

estabelecidas ou cujos dados ecológicos foram perdidos (Chapman & Barreto, 1996; Greene *et al.*, 1999).

Desde 1996, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tem utilizado o SIG para obter as informações ecogeográficas dos acessos. A metodologia rotineiramente empregada sobrepõe os dados de coleta com os diferentes mapas do SIG (Hijmans *et al.*, 2001). Mais recentemente, foram disponibilizados programas computacionais que utilizam o SIG com o objetivo de facilitar este tipo de estudo, como o Flora-Map (Jones & Gladkov, 1999) e o DIVA-GIS (Hijmans *et al.*, 2001). Grenier *et al.* (2001), realizaram a estratificação de acessos de sorgo, utilizando somente dados ecogeográficos. Estes autores conseguiram agrupar a coleção em quatro categorias genotípicas quanto ao fotoperíodo, obtido através dos dados de latitude. Uma revisão recente de Guarino *et al.* (2002), mostra diversos exemplos do uso do SIG nas atividades de conservação e uso de recursos genéticos vegetais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a variabilidade genética de 88 acessos de *Stylosanthes* spp., com base em marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e utilizar o Sistema de Informações Geográficas para complementar e atualizar os dados sobre os locais de coleta de cada acesso com base em descritores ecológicos.

2.2. Objetivo específico

- Contribuir para a caracterização de acessos de *S. macrocephala* com base em descritores moleculares e ecológicos, disponibilizando as informações para programas de melhoramento genético.
- Analisar a distribuição geográfica da diversidade genética de acessos de *S. macrocephala* coletados em diferentes regiões do Brasil;
- Orientar, com base nos estudos de variabilidade genética, futuras atividades de coleta e conservação *ex-situ*, contribuindo para a preservação da espécie.

Uso de descritores ecológicos e marcadores RAPD no estudo da variabilidade genética de *Stylosanthes macrocephala* M. B. Ferr et S. Costa¹

Ana Maria Barros², Fábio Gelape Faleiro³, Cláudio Karia Takao⁴, Luciano Shozo Shiratsuchi⁵, Ronaldo Pereira Andrade⁶, George K. B. Lopes⁷

Resumo -*Stylosanthes macrocephala* é uma leguminosa utilizada em pastagens, adubação verde e na recuperação de áreas degradadas. A falta de descritores morfológicos e agronômicos estáveis e de informações ecogeográficas dos locais de coleta dos acessos tem dificultado o estudo da espécie. Com o auxílio do Sistema de Informações Geográficas (SIG) e de marcadores moleculares do tipo RAPD, foram obtidos descritores ecológicos e moleculares de 86 acessos de *S. macrocephala* da Embrapa Cerrados. Verificou-se que os acessos foram coletados em sete Estados, cinco bacias hidrográficas, sete tipos de vegetação e sete tipos de solos. As altitudes variaram de 1 a 1298 m e a pluviometria anual média de 550 a mais de 1900 mm. A variabilidade de descritores ecológicos sugere diversidade adaptativa do banco. Com base em 161 marcadores RAPD incluindo os *out group*, verificou-se altas distâncias genéticas entre os acessos de *S. macrocephala* variando entre 0,02 e 0,42. Com base nas distâncias genéticas, foram estabelecidos 10 grupos de acessos. Observou-se uma tendência de separação dos acessos coletados em

⁽¹⁾ Aceito para publicação em

Extraído da tese de Mestrado apresentada pela primeira autora à Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília, DF.

⁽²⁾ Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (Embrapa Cerrados), Caixa Postal 08223, CEP 73301-970 Planaltina, DF. E-mail: abarros@cpac.embrapa.br

⁽³⁾ Embrapa Cerrados. E-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

⁽⁴⁾ Embrapa Cerrados. E-mail: karia@cpac.embrapa.br

⁽⁵⁾ Embrapa Cerrados. E-mail: shozo@cpac.embrapa.br

⁽⁶⁾ Embrapa Cerrados. E-mail: ronaldo@cpac.embrapa.br

⁽⁷⁾Embrapa Cerrados. E-mail: george@cpac.embrapa.br

diferentes bacias hidrográficas. Alta variabilidade genética foi observada entre acessos coletados na Bahia e Minas Gerais. A alta variabilidade genética da coleção de *S. macrocephala* evidencia a importância desses acessos para futuros trabalhos de melhoramento genético.

Termos para indexação: diversidade genética, marcadores moleculares, germoplasma, leguminosas forrageiras, Sistema de Informação Geográfica, SIG.

**Use of ecological descriptors and RAPD markers to study the genetic variability of
Stylosanthes macrocephala M. B. Ferr et S. Costa**

Stylosanthes macrocephala is a leguminous specie used as forage, cover crop and as a pioneer plant to recoveri degraded areas. Inexistence of stable morphological descriptors and lack of information about the ecogeography of the collecting sites of the bring difficulties to studies of regarding genetical variability in this specie. Using the geographic information system (SIG) and RAPD molecular markers, ecological and molecular descriptors were obtained for 86 accessions belonging to a *S. macrocephala* collection existing at the EMBRAPA Cerrados, located at Planaltina, DF, Brazil. The accessions were collected from different ecogeographic areas in seven Brazilian States, five hydrographic regions, seven vegetation types and seven soils classes. Collecting sites ranged from 1 to 1298 m above sea level with yearly rainfall varying from 550 to 1900 mm. Accession distribution along these diverse ecosystems indicates the high adaptive diversity of the collection. Using 161 RAPD markers it was found that the genetic distances between

accessions ranged from 0.02 to 0,42. These genetic distances allowed the establishment of 10 genetic groups. Accessions collected in a specific hydrographic region tended to be grouped in the same genetical group. Accessions collected in Bahia State, around Barreiras, Ourolândia, Tanhaçus, Caetite regions, showed high genetic diversity. The high genetic variability observed in the accessions showed the importance of this *Stylosanthes macrocephala* collection for breeding programs.

Introdução

O gênero *Stylosanthes* pertence à família *Fabaceae*, inclui 40 espécies e um grande número de subespécies e variedades botânicas, descritas taxonomicamente por Mohlenbrock (1957), Ferreira & Costa (1977) e Lewis & Mannetje (1982). Em sua maioria são leguminosas perenes, com potente sistema radicular, tolerante à seca e de grande capacidade de colonizadora devido a sua adaptação a solos de baixa fertilidade e simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (Andrade & Karia, 2000). O porte é prostrado a ereto podendo alcançar a altura de até 1,5 m. As espécies do gênero *Stylosanthes* apresentam folhas trifolioladas, flores pequenas e caracterizam-se pela grande diversidade morfológica e agrônômica (Mohlenbrock, 1957; Ferreira & Costa, 1979; Mannetje, 1984; Ferreira & Costa, 1984; Brandão *et al*, 1986; Kazan *et al.*, 1993a). A maioria das espécies pertencente a este gênero é diplóide com $2n = 20$ cromossomos (Mannetje, 1984), entretanto, algumas são alotetraplóides, como no caso das espécies *S. scabra* e *S. hamata* (Stace & Cameron, 1984). O sistema de reprodução ocorre preferencialmente por autofecundação, com taxa de polinização cruzada da ordem de 2 a 6 % em condições naturais (Miles, 1985; Stace, 1984).

Vários países têm empregado, com grande sucesso, as espécies do gênero *Stylosanthes* em pastagens (Gillard & Winter, 1984; Clatworthy, 1984; Edye, 1984) em virtude da alta produção de massa verde e alto valor nutricional (Reyes, *et al.*, 1985). Esta utilização, apesar de vantajosa, tem sido pouco adotada no Brasil devido à falta de variedades com características que facilitem sua ampla adoção como a baixa produção de sementes e a baixa persistência no campo que afetam o preço de mercado das sementes e adequação aos sistemas de produção existentes (Andrade & Karia, 2000). Possivelmente, somente por meio de melhoramento genético, que utilize a variabilidade disponível nos bancos de germoplasma, tais limitações poderão ser solucionadas.

Os bancos de germoplasma têm por objetivo conservar material genético representativo da diversidade genética da espécie e disponibilizar estes materiais para os programas de melhoramento genético (FAO, 1996; Karia *et al.*, 2001). Atualmente, a Embrapa Cerrados possui um banco com mais de 1400 acessos do gênero *Stylosanthes*, sendo que 136 são da espécie *S. macrocephala*, a qual tem apresentado alto potencial, principalmente para a utilização em programas de melhoramento genético (Karia & Andrade, 1996). A caracterização genética de cada acesso é essencial para determinar o grau de variabilidade das coleções, enquanto que características ecogeográficas dos pontos de coleta permitem inferir sobre possíveis vantagens adaptativas de cada acesso (Chapman & Barreto, 1996; Greene *et al.* 1999; Guarino *et al.*, 2002). Ambas informações orientam os programas de coleta e fornecem subsídios para a seleção do material adequado ao trabalho de melhoramento genético.

Atualmente, marcadores moleculares do DNA e o Sistema de Informação Geográfica (SIG) têm sido ferramentas importantes na caracterização dos acessos e no

estudo da variabilidade genética (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Harrison *et al.*, 2000). A utilidade desta ferramenta é maior principalmente quando existe carência de descritores botânicos e agronômicos estáveis como no caso de espécie *S. macrocephala* (Karia *et al.*, 2001).

Neste trabalho objetivou-se utilizar o Sistema de Informações Geográficas para complementar e atualizar os dados sobre os locais de coleta de 87 acessos de *Stylosanthes macrocephala*, gerando descritores ecológicos para cada acesso, e avaliar a variabilidade genética entre os acessos com base em marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Material e Métodos

Material genético

Foram analisados 88 acessos de *Stylosanthes* spp. que apresentavam, em seus passaportes, informações sobre as coordenadas geográficas e municípios dos pontos de coletas (Tabela 1). Estes acessos foram coletados em diferentes regiões do Brasil no período de 1975 a 1983 conforme mostrado na Tabela 1, e fazem parte da coleção de *S. macrocephala* 136 acessos do banco de germoplasma da Embrapa Cerrados. As sementes utilizadas no presente trabalho vieram em grande parte da primeira geração após a coleta e, em alguns casos, da segunda ou terceira geração. O controle interespecífico (*out group*) utilizado foi a cv Mineirão, que pertence à espécie *Stylosanthes guianensis* var vulgaris, (EMBRAPA CPAC/ CNPGC, 1993).

Obtenção dos descritores ecológicos

Com o auxílio dos programas ArcView GIS (www.esri.com), as informações de latitude e longitude do local de coleta de cada acesso foram plotadas conjuntamente e

mapas do SIG (Brasil, 1981) com informações macro sobre o tipo de vegetação, tipo de solos, Estados e municípios, Bacias Hidrográficas e Pluviometria foram sobrepostos para obtenção dos descritores ecológicos para cada acesso (escala de 1: 1.000.000).

Com o objetivo de determinar a similaridade entre os ecossistemas dos pontos de coleta, realizou-se análise conjunta dos descritores ecológicos considerando as características de solo, vegetação, altitude e pluviometria. Foram classificados como pontos com “ambientes semelhantes” aqueles locais que compartilharam pelo menos 3 dos quatro descritores citados, não sendo considerado neste estudo descritores ecológicos de localização que implicaria variações nos comprimento dos dias.

Extração de DNA

Folhas de cada acesso, em estágio intermediário de maturação, foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando-se o método do CTAB (Doyle & Doyle, 1990) com algumas modificações (Faleiro *et al.*, 2003a). Foram realizadas extrações de DNA para analisar a pureza genética das sementes de cada acesso e a variabilidade genética entre os acessos. No estudo da variabilidade dentro do acesso, realizou-se a análise individual de 11 plantas de cada um dos acessos CPAC 1033, 1043, 1192 e 2251. Os acessos 1033 e o 1192 foram selecionados para o teste por terem apresentado maior divergência genética em relação aos demais acessos. Nos experimentos para determinar a variabilidade genética entre os diferentes acessos foram utilizadas folhas provenientes de pelo menos 3 plantas de cada acesso extraído-se em conjunto o DNA (“*bulk*”).

A extração foi realizada a partir de aproximadamente 500 mg de tecido foliar, o qual foi macerado com N₂ líquido. Parte do macerado foi transferido para tubo de microcentrífuga de 2,0 ml, ocupando ¼ do seu volume. Em seguida, foi adicionado 800 µl

de tampão de lise constituído por Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM, CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) 2,8% (p/v), NaCl 1,3 M, Polivinilpirrolidona 1% (p/v) e 2-mercaptoetanol 0,2% (p/v). O macerado foi misturado ao tampão de lise e os tubos foram mantidos em banho-maria (70 °C) por uma hora, sendo agitados, a cada 10 minutos. Após a incubação, foi realizada a desproteinização, adicionando-se 700 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida, as amostras foram agitadas, por suaves inversões, por 10 minutos e centrifugadas a 4 °C, a 18.845 g, por 10 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 2,0 ml limpos, foi adicionado 55 µl de CTAB 7% (p/v) e o processo de desproteinização foi repetido.

Para a precipitação do DNA, foi adicionado ao sobrenadante final 700 µl de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20 °C por duas horas e, a seguir, centrifugados como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% (v/v) e seco à temperatura ambiente. Posteriormente, os ácidos nucléicos totais foram ressuspensos em 150 µl de água contendo RNase na concentração de 40 µg/ml e colocados em banho-maria a 37 °C para a completa ressuspensão. Após esse período, o DNA foi novamente precipitado, centrifugado e ressuspensado em 150 µl de água, como já descrito.

A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989). A relação A260/A280 foi utilizada para avaliar a pureza do DNA. Bandas de DNA genômico total separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) foram usadas como indicadoras da integridade do DNA extraído.

Obtenção de marcadores de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Para avaliar a diversidade genética dos 88 acessos de *Stylosanthes* spp., amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para a obtenção de marcadores 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, MgCl₂ 3 mM, 100 µM de cada um dos desoxirribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um *primer* decâmero (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima *Taq polimerase* e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Foram testados 22 *primers* sendo que 15 foram selecionados por apresentarem padrões de bandas mais consistentes : OPD1, OPD3, OPD11, OPE1, OPE2, OPE6, OPE11, OPE14, OPF3, OPF4, OPF7, OPF8, OPF9, OPF12 e OPF14. 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. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão de 6 minutos a 72 °C e redução para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 µl da mistura de azul de bromofenol (0,25% p/v), glicerol (60% v/v) 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.

Além da diversidade genética dos 88 acessos de *Stylosanthes* spp., foi avaliada a diversidade genética dentro de quatro acessos. Para este estudo, foram analisadas 11 plantas de cada um dos acessos CPAC 1033, CPAC 1043, CPAC 1192 e CPAC 2251. Foram utilizados os *primers* OPD3, OPE1, OPE11, OPE14, OPF3, OPF4, OPF12 e OPF14 para

obtenção dos marcadores RAPD. As amplificações foram efetuadas da mesma forma que na obtenção de marcadores de RAPD para a diversidade entre os acessos.

Análise dos marcadores RAPD

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 (1979), 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 baseada nas coordenadas principais. Utilizou-se como critério de agrupamento dos acessos o método UPGMA (*Unweighted pair-group arithmetic average*), com o auxílio do sistema SAS (SAS Institute Inc, 1990).

Resultados e Discussão

Características ecogeográficas dos pontos de coleta.

Os descritores ecológicos de cada acesso foram obtidos com base nas características ecogeográficas dos pontos de coleta de cada acesso. Com base na análise das informações geradas pelos mapas de Estados e Municípios e de Estradas de Rodagem, foi feita uma análise das rotas das expedições de coleta dos acessos de *S. macrocephala*. Observa-se que os acessos foram coletados, em sua maioria, ao longo das rodovias. Outra informação gerada pelo mapa de Estados e Municípios foi que em 66% dos casos, o nome do município de coleta contido nos dados de passaporte foi diferente daquele gerado pelo SIG. Estas diferenças nos nomes dos municípios ocorreram devido a desatualização cadastral dos nomes dos municípios, surgimento de novos municípios e erros de localização quando a coleta se deu muito próxima às divisas municipais.

As coordenadas geográficas do local de coleta do acesso CPAC 1636, em Belém - PA, levantaram suspeita quanto à sua verdadeira origem já que não existiam registros de coletas de *S. macrocephala* naquela região. Em virtude da dúvida quanto à origem do acesso decidiu-se não registrar seus descritores ecológicos.

Uma vez confirmados os locais de coleta, outras informações ecogeográficas foram obtidas com base nos diferentes mapas do SIG (Tabela 1). Verificou-se que dos 85 acessos, 53 tiveram origem na Bahia e 21 em Minas Gerais, sete em Goiás, três no Distrito Federal, um acesso em Tocantins, e um no Piauí. Quanto à distribuição dos acessos nas bacias hidrográficas, 45 acessos foram coletados na bacia do Atlântico- Leste, 29 na bacia do São Francisco, oito na do Araguaia, quatro na do Paraguai, e um na do Atlântico N-NE. Em relação à vegetação, as coletas foram realizadas em sete tipos distintos, sendo que a grande maioria, 39, se deu no ambiente de Savana, ficando em segundo lugar as áreas de Tensão Ecológica, com 16 coletas (Tabela 1). Quanto ao tipo de solo, os acessos foram coletados predominantemente em solos com baixa fertilidade, sendo 43 em latossolo e 23 em solos litólicos, os outros acessos foram coletados em outros sete tipos de solos (Tabela 1). Os locais de coleta apresentaram altitudes variando de 1-165 m a 1026-1298 m e a pluviometria anual média de 550 – 700 mm a mais de 1900 mm por ano.

Os Acessos com os mesmos descritores ecológicos, mas provenientes de diferentes Estados ou Bacias Hidrográficas (Tabela 1) puderam ser agrupados, como, por exemplo, os acessos CPAC 2232 e 2251, coletados na Bahia e Minas Gerais, respectivamente. Estes dois acessos foram coletados em altitudes na faixa de 669 a 825 m, em vegetação do tipo Floresta Estacional Decidua em Latossolos e em locais com pluviometria anual média de 1000 a 1150 mm. Com base na similaridade ambiental do local de coleta foram

identificados 44 grupos de acessos. Estas várias combinações ecogeográficas sugerem a presença de acessos com diferentes capacidades adaptativas, sendo um indicativo da variabilidade genética da coleção analisada neste trabalho. Vários autores têm utilizado critérios ecogeográficos como indicativo da variabilidade genética de coleções de germoplasma (Chapman & Barreto, 1996; Greene *et al.*, 1999; Grenier *et al.*, 2001; Guarino, *et al.*, 2002). Tal variabilidade é de extremo interesse e essencial para os programas de melhoramento genético.

Análise da variabilidade genética entre os acessos.

A análise dos 88 acessos de *Stylosanthes* spp foi baseada em 188 marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), gerados por 15 *primers*, perfazendo uma média de 12,5 marcas por *primer*.

As distâncias genéticas do conjunto dos 88 acessos variaram entre 0,02 e 0,74. A Figura 1 ilustra a diversidade no padrão de amplificação do DNA genômico de 6 acessos de *S. macrocephala*, escolhidos aleatoriamente, gerados pelos com os *primers* OPF02, OPF03, OPF05, enquanto que a Figura 2 mostra um segmento do gel de análise gerado pelo *primer* OPF12. A análise de dispersão gráfica dos 88 acessos de *Stylosanthes* spp estudados neste trabalho (Figuras 3 A, B, C) ilustram os dados de distâncias genéticas. A cv Mineirão (*out group*) e o acesso CPAC 1348, posteriormente identificado como *S. capitata* (Faleiro *et al.*, 2003b) apresentaram dispersão muito diferente dos demais acessos (Figura 3 A e B). Considerando-se apenas os 86 acessos de *S. macrocephala*, foram analisadas 161 marcas de RAPD, perfazendo uma média de 10,7 marcas por *primer*. Mesmo após a retirada dos *out group* observou-se uma alta variabilidade genética dentro da coleção de 86 acessos de *S. macrocephala*, com distâncias variando entre 0,023 e 0,42. Esta alta variabilidade intra-

específica não foi observada por Kazan *et al.* (1993a). Estes autores, estudaram a diversidade genética entre 20 cultivares e acessos de 5 espécies do gênero *S. scabra*, *S. hamata*, *S. guianensis*, *S. humilis*, e encontraram uma alta variabilidade interespecífica e uma baixa variabilidade dentro da espécie, possivelmente por terem analisado poucos acessos. A análise de agrupamento, via dendrograma, dos 86 acessos de *S. macrocephala* também ilustra a variabilidade genética da coleção (Figura 4). No dendrograma, traçando-se uma linha de corte na distância de genética relativa de 0,42, observou-se a formação de 10 grupos: O grupo 1 com 63 acessos, o grupo 2 com 9 acessos, o grupo 3 com 6 acessos e o grupo 4 com 2 acessos. Seis acessos não se agruparam, indicando a divergência genética entre os mesmos. Pode-se observar que dentro do grupo 1 existem vários subgrupos, com distâncias genéticas variando entre 0,023 e 0,243. Os acessos mais próximos foram os CPAC 1307, 1308, 1309, 1310 e 1311, com distâncias entre 0,023 a 0,063. Os acessos CPAC 1636, 1644, 2227, 1639 e 1640 também são muito similares com distâncias genéticas variando de 0,035 a 0,099. Tais acessos formam subgrupos dentro do grupo 1. Considerando uma menor distância de ligação para traçar a linha de corte, observar-se-ia um aumento significativo no número de grupos com apenas um integrante, mostrando, mais uma vez, a diversidade genética entre os acessos estudados.

Variabilidade genética dentro do acesso

Para este estudo, foram analisadas 11 plantas de cada um dos acessos CPAC 1033, CPAC 1043, CPAC 1192 e CPAC 2251. Foram utilizados 8 *primers* os quais geraram, em média, 50 marcadores para cada acesso. A Figura 5 ilustra os produtos de amplificação de plantas do acesso CPAC 1192 gerados pelos *primers* OPD03 e OPE01.

Em geral, observou-se uma baixa variação entre as distâncias genéticas dentro dos acessos de 0,00 a 0,06. Entretanto foi possível observar a presença de uma planta muito divergente do conjunto CPAC 2251, com valores de distância genética entre 0,27 e 0,41, o que é um forte indício de contaminação física de sementes ou de um produto de polinização cruzada. No acesso CPAC 1192, uma planta apresentou uma pequena distância genética, na ordem de 0,04 das demais plantas, sugerindo tratar-se de um possível produto de segregação.

A baixa diversidade intra-acesso era esperada considerando a reprodução da espécie sendo preferencialmente por autofecundação. Não existem estudos mostrando a taxa de cruzamento dentro da espécie *S. macrocephala*, porém supõe-se que deva estar variando na faixa de 2%, a qual foi verificada em estudos com *S. scabra* (Stace, 1984). Por outro lado, tal taxa de fecundação cruzada pode chegar a valores maiores como os observados no estudo com *S. guianensis*, obtidos por Miles (1985). A maior ou menor taxa de fecundação cruzada ocorre em função, possivelmente, da presença de menor ou maior número de insetos polinizadores no campo.

Análise conjunta da diversidade genética e descritores ecológicos

A análise conjunta da diversidade genética e dos descritores ecológicos (Figura 6) mostrou que nos Estado da Bahia e Minas Gerais foram coletados acessos com alta variabilidade genética. O Estado da Bahia foi onde se verificou maior número de genótipos diferentes entre si e de combinações de descritores ecológicos distintos, possivelmente em decorrência do grande número de coletas realizadas neste Estado.

Dos acessos coletados na Bahia, 25% não pertencem ao grupo genético 1. A região que forneceu o maior número de acessos distintos foi a do polígono Barreiras, Ouroândia,

Tanhaçu e Caetitê (Grupos 2, 3, 4, 6, 7, 9 e 10). Os acessos coletados nesta região foram alocados em 7 dos 10 grupos genéticos observados. Os acessos coletados em Minas Gerais também apresentaram alta diversidade genética, sendo que 43% dos acessos coletados pertenceram a quatro dos grupos mais divergentes (Grupos 2, 3, 4 e 8). As regiões de Corinto, Bocaiúvas, Diamantina e Lagoa Santa merecem destaque quanto à coleta de acessos com alta diversidade genética. Estas regiões de Minas Gerais e Bahia são interessantes para futuras coletas, no sentido de maximizar a diversidade genética dos acessos coletados, o que é essencial para trabalhos futuros de caracterização agrônômica e melhoramento genético. Por outro lado, observou-se um baixo número de coletas realizadas nos Estados de Tocantins e Piauí, regiões que poderiam ser melhor exploradas para a obtenção de novos genótipos de *S. macrocephala*.

Houve uma tendência de regionalização da diversidade genética com base nas bacias hidrográficas (Figura 7), visto que 66,7% dos acessos do grupo 2 foram coletados na bacia do São Francisco e 66,7% dos acessos do grupo 3 na do Atlântico Leste. Com relação a altitude, pluviometria, tipo de solo e vegetação, não houve relação com a diversidade genética.

Foram coletados de ecossistemas semelhantes acessos de grupos geneticamente distintos, como no caso dos acessos CAPC 1191 (grupo 3) e CPAC 1192 (grupo 8), coletados no mesmo local em Lagoa Santa – MG, acessos CPAC: 1190, 1196, 1204, 2265, 2794, coletados no município de Diamantina – MG, pertencentes respectivamente aos grupos 3, 2, 3, 2, 1, e dos acessos CPAC 1040 e CPAC 1041 dos grupos 1 e 9, proveniente de duas regiões ecologicamente semelhantes no município de Seabra – BA (Tabela 1). De forma inversa, observou-se alta homogeneidade genética entre os acessos coletados em

diferentes ecossistemas no Distrito Federal e Goiás (Tabela 1). Na figura 5, é possível observar a alta proximidade genética entre os acessos 1307 (Alexânia – GO), 1308 (S. João da Aliança – GO), 1309 (Brasília – DF), 1310 (Santo Antônio do Descoberto – GO) e 1311 (Formosa – GO), provenientes de Cambissolos ou Latossolos, e de altitudes nas faixas de 826 – 1025 m ou 1026 – 1298 m, todos pertencentes ao mesmo subgrupo do grupo genotípico 1, quando a linha de corte é trazida para valores da ordem de 0,25.

A alta variabilidade genética entre os acessos de *S. macrocephala*, mostrou a adequação dos critérios utilizados na coleta, entretanto, o elevado número de grupos com um único representante sugere uma diversidade genética ainda maior do que a presente na coleção estudada, indicando a possibilidade de ampliar a variabilidade genética em novas expedições.

Conclusões

1. Marcadores RAPD permitem a diferenciação clara entre acessos de *Stylosanthes macrocephala*, cv Mineirão de *S. guianensis* e de *S. capitata* (acesso CPAC 1348), além de evidenciar a alta variabilidade genética dos 86 acessos de *S. macrocephala*.
2. A alta diversidade genética entre os acessos de *S. macrocephala* encontrada neste trabalho mostra a importância desta coleção para futuros trabalhos de caracterização agronômica e melhoramento genético.
3. O SIG permitiu atualizar e gerar novos descritores ecológicos para cada um dos 86 acessos de *S. macrocephala* analisados neste trabalho, cujas informações poderão ser úteis na identificação de características adaptativas dos diferentes acessos.

4. A análise conjunta da diversidade genética e dos descritores ecológicos mostrou uma tendência de regionalização da diversidade genética por bacia hidrográfica.
5. Novas expedições de coleta devem ser realizadas nos Estados de Tocantins e Piauí nos quais a diversidade de *S. macrocephala* foi pouco explorada.

Referências Bibliográficas

- ANDRADE, R. P.; KARIA, C. T. O uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGEM, 1., 2000. Lavras. **Temas em evidência**. Lavras: UFLA, 2000. p. 273-309.
- BRANDÃO, M.; COSTA, N. M. S.; SCHULTZE-KRAFT, R. Pauciflora uma nova variedade de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 36., 1986, Curitiba, PR. **Anais...** Curitiba: Sociedade Botânica do Brasil, 1986. p 323.
- BRASIL. Ministério das Minas e Energia. Secretaria Geral. Projeto Radam Brasil. **Folha SD.22 Goiás**: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro, 1981. 640 p.
- CHAPMAN, S. H.; BARRETO, H. J. Using simulation models and spatial databases to improve the efficiency of plant breeding programs. In: COOPER, M.; HAMMER, G. L. (Ed.). **Plant adaptation and crop improvement**. Wallingford: CAB International, 1996. p. 563-587.

CLATWORHTY, J. N. Global ventures in *Stylosanthes* III. south-east Africa. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. New York: Academic Press, 1996. p. 487-502.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 1997. 442 p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg-MD, v. 12, p. 13-15, 1990.

EDYE, L. A. Global ventures in *Stylosanthes* III. India. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. New York, Academic Press, 1984. p. 535-546.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte. **Recomendações para estabelecimento e utilização do *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão**. Campo Grande, MS: Embrapa-CNPGC, 1993. 6 p. (Embrapa-CNPGC. Comunicado Técnico, 49).

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando a análises moleculares**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003a. 5 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 92).

FALEIRO, F.G. BARROS, A. .M.; FALEIRO A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R. ; KARIA, C. T.; GOMES, A. C.; ANDRADE, R. P. Caracterização molecular e estabelecimento de coleção de trabalho de *Stylosanthes macrocephala* com base em marcadores RAPD. In:

Reunião Anual Da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40, Santa Maria. **Anais...**, 2003. Santa Maria: Unidade CD. 2003b. 7p.

FAO. Report of the International Technical Conference on Plant Genetic Resource. **Global plan of action for the conservation and sustainable utilization of plant genetic resources for food in agriculture**. Leipzig Germany, 1996.

FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. Novas espécies do gênero *Stylosanthes* para Minas Gerais. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 28., 1977, Belo Horizonte. **Anais...** [S.l.]: Sociedade Botânica do Brasil, 1977. p. 77-102.

FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. **O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1979. 107 p.

FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. Some Brazilian Species of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. New York: Academic Press, 1984. p 23-48.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1996. 220 p. (Embrapa-Cenargen. Documentos, 20).

FU, Y.-B.; GUERIN, S.; PETERSON, G. W.; CARLSON, J. E.; RICHARDS, K. W. Assessment of bulking strategies for RAPD analyses of flax germoplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Netherlands, 50: 743 – 746, 2003.

GILLARD, P.; WINTER, W. H. Animal production from *Stylosanthes* based in Australia. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press, 1984. p. 405-432.

GREENE, S. L.; HART, T. C.; AFOONIN, A. Using geographic information to acquire wild crop germoplasm for *ex situ* collections: II Post-collection analysis. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 843-849, 1999.

GRENIER, C.; BRAMEL-COX, P. J.; HAMON, O. Core collection of sorghum. I Stratification based on eco-geographical data. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 234-240, 2001.

GUARINO, L.; JARVIS, A.; HIJMANS, R. J.; MAXTED, N. Geographic information systems (GIS) and the conservation and use of plant genetic resource. In: EGELS, J. M. M.; RAMATHA, R. A. O. V.; BROWN, A. H. D.; JACKSON, M. T. (Ed.) **Managing plant genetic diversity**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 387-404.

HARRISON, R. E.; LUBY, J. J.; FUNIER, G. R.; HANCOCK, J. F. Differences in the apportionment of molecular and morphological variation in North American strawberry and consequences for genetic resources management. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht-Holanda, v. 47, p. 647-657, 2000.

KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. de ; SILVA, G. P. da Conservação de espécies forrageiras tropicais no campo. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 53-55.

KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. de. Avaliação preliminar de espécies forrageiras no Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados: perspectivas futuras. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 8., 1996, Brasília. **Anais...** Planaltina: Embrapa-CPAC, 1996. p. 471-475.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; CAMERON, D. F. Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random polymorphic DNA. **Genome**, Ottawa-Canada, v. 36, p. 43-49, 1993b.

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**, New York, v. 85, p. 882-888, 1993a.

LEWIS, G. P.; MANNETJE, L.´T – Two new species of leguminosae Papilionoideae from Bahia, Brazil. **Kew Bulletin**, London-Inglaterra, v. 37, n. 1, p. 123-127, 1982.

MANNETJE, L.´T. Considerations on the taxonomy of genus *Stylosanthes*. In: STACE, H. .M.; EDDY, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. New York: Academic Press, 1984. p 1-21.

MILES, J. W. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of out crossing rate in *Stylosanthes guianensis*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria-Australia, v. 36, p. 259-265, 1985.

MOHLENBROCK, R. H. A revision of the genus *Stylosanthes*, **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v 44, p. 299 – 355, 1957.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academic Science**, New York, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

REYES, C.; ORDOÑEZY, H.; PINEDO, L. *Stylosanthes guianensis* cv. *Pucallpa* – **Boletín Técnico– Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y Altura**, Peru, n. 3, p.3, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 653 p.

SAS INSTITUTE INC. **User guide version 6.04**. 4. ed. Cary , 1990.

SCHUTLZE-KRAFT, R.; COSTA, N. M. S.; FLORES, A. *Stylosanthes, macrocephala* M. B. Ferr. Et S. Costa: collection and preliminary agronomic evaluation of a new tropical pasture legume. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 61, p. 229-240, 1984.

STACE, H. M. Breeding system in *Stylosanthes*. I. Observations of outcrossing in *S. scabra* at an alcohol dehydrogenase locus. **Australia Journal of Agricultural Research**, Victoria-Australia, v. 33, p. 87-96, 1984.

STACE, H. M.; CAMERON, D. F. Cytogenetics and evolution of *Stylosanthes*. In: STACE H. M, EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press, 1984. p. 49-72.

Tabela1. Acessos de *Stylosanthes* spp com as respectivas coordenadas geográficas e descritores ecológicos, descritor genético e de similaridade de ecossistemas.

Nº	LAT	LONG	CPAC	Data da coleta	Local de coleta-passaporte	Local de coleta – baseado no SIG	E	B	A	S	P	V	G	C
1	-14,86667	-46,40000	<u>1031</u>	27/09/78	Alvorada Norte - GO	Formoso - MG	4	5	5	4	6	6	2	38
2	-14,58333	-46,15000	<u>1032</u>	27/09/78	Alvorada Norte - GO	Damianopolis- GO	3	1	5	7	5	6	1	38
3	-12,23333	-45,03333	<u>1033</u>	06/10/78	Barreiras - BA	Barreiras - BA	1	5	4	8	4	1	10	6
4	-12,11667	-43,88333	1035	28/09/78	Ibotirama - BA	Wanderley- BA	1	5	5	8	3	4	3	28
5	-12,30000	-42,90000	<u>1036</u>	05/10/78	Ibotirama - BA	Oliveira d Brejinhos- BA	1	5	4	4	2	2	1	13
6	-12,35000	-42,61667	<u>1037</u>	29/09/78	Ibotirama - BA	Oliveira d Brejinhos- BA	1	5	4	4	1	2	1	10
7	-12,40000	-41,86667	<u>1039</u>	29/09/78	Seabra - BA	Seabra- BA	1	2	7	4	2	1	1	4
8	-12,45000	-41,65000	<u>1040</u>	29/09/78	Seabra - BA	Seabra- BA	1	2	5	4	3	6	1	33
9	-12,45000	-41,63333	<u>1041</u>	29/09/78	Seabra - BA	Seabra- BA	1	2	5	4	3	6	9	33
10	-12,46667	-41,28333	<u>1043</u>	04/10/78	Seabra - BA	Lencois - BA	1	2	3	4	3	4	1	27
11	-12,55000	-39,36667	<u>1045</u>	30/09/78	Feira Santana - BA	Rafael Jambeiro - BA	1	2	1	2	2	4	1	24
12	-12,40000	-41,86667	1187	29/09/78	Seabra - BA	Seabra - BA	1	2	7	4	2	1	1	4
13	-18,40000	-43,55000	<u>1190</u>	17/01/77	Diamantina -MG	Diamantina - MG	4	2	6	8	4	6	3	36
14	-19,66667	-43,91667	<u>1191</u>	23/05/78	Lagoa Santa - MG	Lagoa Santa - MG	4	5	6	4	6	1	3	9
15	-19,66667	-43,91667	<u>1192</u>	25/05/78	Lagoa Santa - MG	Lagoa Santa - MG	4	5	6	4	6	1	8	9
16	-18,40000	-44,65000	<u>1193</u>	25/05/78	Datas - MG	Corinto - MG	4	5	4	4	7	6	2	41
17	-18,40000	-44,65000	<u>1194</u>	26/05/78	Cruz Alta – MG*	Corinto - MG	4	5	4	4	7	6	1	41
18	-18,13333	-43,55000	<u>1196</u>	26/05/78	Diamantina - MG	Diamantina - MG	4	2	6	8	4	6	2	36
19	-17,91667	-43,06667	<u>1197</u>	26/05/78	S. Modest. G. - MG	Itamarandiba - MG	4	2	6	4	4	3	1	20
20	-17,96667	-43,16667	<u>1198</u>	27/05/78	Felixberto C. - MG	Sen.Modest.Goncal.-MG	4	2	6	9	4	3	1	21
21	-17,18333	-43,55000	<u>1199</u>	07/06/79	Trebol – MG	Bocaiuva - MG	4	2	6	8	3	6	4	34
22	-17,20000	-43,43333	<u>1200</u>	07/06/79	Diamantina - MG	Bocaiuva - MG	4	2	6	8	3	6	1	34
23	-17,35000	-42,68333	<u>1201</u>	07/06/79	Turmalina - MG	Turmalina - MG	4	2	5	9	4	1	1	7
24	-17,85000	-43,36667	<u>1202</u>	08/06/78	Sem. Mourão – MG	Sen.Modest.Goncal.-MG	4	2	6	8	4	1	1	6
25	-18,13333	-43,55000	<u>1204</u>	08/06/79	Diamantina - MG	Diamantina - MG	4	2	6	8	4	6	3	36
26	-18,13333	-42,51667	<u>1205</u>	08/06/79	Diamantina - MG	S. Sebast. Maranh.-MG	4	2	4	4	5	3	1	22
27	-17,10000	-44,36667	<u>1206</u>	07/08/79	Montes Claros - MG	Jequitai - MG	4	5	5	4	5	6	1	37
28	-16,11667	-48,36667	<u>1307</u>	03/10/80	Brasília - GO	Alexânia - GO	3	4	6	3	7	6	1	40
29	-14,50000	-47,51667	<u>1308</u>	15/10/80	S. João Aliança- GO	S. João Aliança- GO	3	1	6	4	7	6	1	42
30	-15,80000	-47,91667	<u>1309</u>	02/10/80	Brasília - DF	Brasília - DF	2	4	7	4	7	6	1	42
31	-15,71667	-48,20000	<u>1310</u>	02/10/80	Sto. Antônio D.- DF	Brasília - DF	2	4	7	3	7	6	1	40
32	-14,98333	-47,56667	1311	15/10/80	S. João Aliança - GO	Formosa - GO	3	1	7	4	7	6	1	42
33	-13,81667	-41,31667	1332	24/08/81	Ituacu - BA	Ituacu - BA	1	2	4	8	1	1	1	1
34	-13,66667	-41,41667	1333	23/08/81	Mucuje - BA	Barra da Estiva - BA	1	2	6	4	1	6	1	31
35	-12,51667	-41,36667	1336	04/09/81	Itaberaba - BA	Lençóis - BA	1	2	3	4	3	3	1	18
36	-13,70000	-40,96667	1337	24/08/81	Contendas Sinc -BA	Barra da Estiva - BA	1	2	3	8	1	2	1	12
37	-14,81667	-40,83333	1339	26/08/81	Vit. da Conquista - BA	Vit. da Conquista - BA	1	2	6	4	2	4	1	25
38	-12,80000	-41,30000	1340	21/08/81	Andarai - BA	Andarai - BA	1	2	3	4	4	3	1	20
39	-13,80000	-41,35000	1341	24/08/81	Ituacu - BA	Ituacu - BA	1	2	4	8	1	1	1	1
40	-13,15000	-41,81667	1345	20/08/81	Boninal - BA	Piata - BA	1	2	7	8	2	6	6	32
41	-15,26667	-41,10000	1346	27/08/81	Vit.Conquista - BA	Vit. da Conquista - BA	1	2	6	4	2	4	1	25
42	-13,58333	-41,36667	1347	23/08/81	Mucuje - BA	Barra Da Estiva - BA	1	2	7	9	2	6	1	32
43	-12,16667	-44,88333	1348	19/08/81	Barreiras - BA	Barreiras - BA	1	5	5	4	4	4	**	29
44	-12,40000	-42,58333	1358	20/08/81	Seabra - BA	Oliveira d Brejinhos- BA	1	5	3	4	1	2	1	10
45	-12,08333	-44,30000	1361	19/08/81	Cristopolis - BA	Cotegipe - BA	1	5	4	4	3	6	1	33
46	-14,23333	-40,31667	1362	24/08/81	Jequie - BA	Manoel Vitorino - BA	1	2	3	9	3	2	1	15
47	-13,10000	-41,83333	1363	20/08/81	Boninal - BA	Piata - BA	1	2	6	8	3	6	1	34
48	-14,08333	-46,11667	1367	18/08/81	Alvorada Norte - GO	Jaborandi - BA	1	5	6	4	5	6	1	37
49	-12,50000	-41,33333	1373	21/08/81	Itaberaba - BA	Lencois - BA	1	2	3	4	3	3	1	18
50	-12,45000	-41,73333	1376	22/08/81	Seabra - BA	Seabra - BA	1	2	5	9	3	1	1	5
51	-14,03333	-41,10000	1378	24/08/81	Contendas Sinc- BA	Tanhacu - BA	1	2	3	9	1	2	3	12
52	-12,85000	-41,83333	1382	20/08/81	Boninal - BA	Piata - BA	1	2	6	4	3	6	1	33
53	-12,96667	-41,85000	1383	20/08/81	Boninal - BA	Piata - BA	1	2	7	8	3	6	1	34
54	-1,43333	-48,50000	<u>1636</u>	?	Belem - Pa	Belém - PA	-	-	-	-	-	-	1	-

Tabela 1 Cont....

Nº	LAT	LONG	CPAC	Data da coleta	Local de coleta-passaporte	Local de coleta – baseado no SIG	E	B	A	S	P	V	G	C
55	-12,41667	-38,90000	1639	18/07/80	Cruz das Almas- BA	S. Gonçalo Campos -BA	1	2	1	9	5	1	1	8
56	-12,23333	-38,46667	1640	18/07/80	Alagoinhas - BA	Alagoinhas - BA	1	2	1	9	5	5	1	30
57	-14,55000	-47,50000	<u>1641</u>	01/05/75	Alto Paraíso - GO	S. João D'Aliança - GO	3	1	6	3	7	6	1	40
58	-11,50000	-49,00000	<u>1642</u>	02/07/75	Duerê - GO	Duerê - TO	7	1	2	4	9	6	1	44
59	-14,25000	-49,33333	<u>1644</u>	18/05/76	Hidrolândia - GO	Alto Horizonte - GO	3	1	5	4	8	6	1	43
60	-11,88333	-38,06667	2227	18/07/80	Alagoinhas - BA	Entre Rios - BA	1	2	1	9	6	3	1	23
61	-14,08333	-46,11667	2230	18/08/81	Alvorada Norte - GO	Jaborandi - BA	1	5	6	4	5	6	1	37
62	-12,15000	-45,01667	2231	19/08/81	Barreiras - BA	Barreiras - BA	1	5	3	8	4	1	1	6
63	-12,16667	-44,88333	2232	19/08/81	Barreiras - BA	Barreiras - BA	1	5	5	4	4	4	1	29
64	-12,96667	-41,85000	2235	20/08/81	Boninal - BA	Piata - BA	1	2	7	8	3	6	1	34
65	-12,80000	-41,30000	2239	21/08/81	Andaraí - BA	Andaraí - BA	1	2	3	4	4	3	1	20
66	-15,88333	-41,40000	2251	27/08/81	Divisa Alegre - MG	Cachoeira d Pajeú- MG	4	2	5	4	4	4	1	29
67	-12,10000	-39,95000	2252	04/09/81	Baixa Grande - BA	Ipirá - BA	1	2	2	5	1	2	1	11
68	-18,13333	-43,55000	2265		Diamantina - MG	Diamantina - MG	4	2	6	8	4	6	2	36
69	-10,13333	-45,21667	2712	01/06/83	Corrente - PI	S. Gonc. Gurgueia- PI	6	3	4	8	3	6	2	34
70	-10,81667	-41,20000	2713	01/06/83	Jacobina - BA	Ouroândia - BA	1	5	4	4	1	1	2	1
71	-10,36667	-41,31667	2714	01/06/83	Alagoinhas - BA	Uburanas - BA	1	5	7	8	1	1	1	2
72	-11,15000	-41,33333	2715	01/06/83	Morro d Chapéu-BA	Morro d Chapéu - BA	1	5	5	3	2	1	1	3
73	-12,78333	-43,21667	2716	01/06/83	Paratinga - BA	Paratinga - BA	1	5	3	6	2	3	1	17
74	-14,05000	-42,53333	2717	01/06/83	Igopora - BA	Caetite - BA	1	5	6	4	2	3	4	16
75	-12,56667	-42,30000	2719	01/06/83	Br-242 - BA	Ibitiara - BA	1	5	7	8	2	2	1	14
76	-12,20000	-43,50000	2720	01/06/83	Ibotirama - BA	Muquém S.Francis.-BA	1	5	4	4	2	4	1	25
77	-12,11667	-44,03333	2721	01/06/83	Ibotirama - BA	Wanderley - BA	1	5	5	8	3	3	2	19
78	-15,63333	-47,56667	<u>2777</u>	14/06/77	Brasília- DF	Brasília - DF	2	4	7	4	6	6	1	39
79	-14,86667	-46,40000	2779	27/09/78	Alvorada Norte - GO	Formoso - MG	4	5	5	4	6	6	2	38
80	-14,58333	-46,15000	2780	27/09/78	Alvorada Norte - GO	Damianópolis - GO	3	1	5	7	5	6	5	38
81	-12,30000	-42,90000	2782	05/10/78	Ibotirama - BA	Oliveira d Brejinhos- BA	1	5	4	4	2	2	1	13
82	-12,45000	-42,18333	2783	29/09/78	Seabra - BA	Ibitiara - BA	1	5	7	4	2	1	7	4
83	-12,05000	-44,31667	2784	28/09/78	Barreiras - BA	Cotegipe - BA	1	5	4	9	3	6	2	35
84	-12,43333	-40,81667	<u>2790</u>	04/10/78	Itaberaba - BA	Lajedinho - BA	1	2	4	9	2	4	1	26
85	-12,40000	-41,70000	<u>2792</u>	29/09/78	Seabra - BA	Seabra - BA	1	2	6	4	2	6	3	31
86	-18,13333	-43,55000	<u>2794</u>	03/07/80	Mendonça - MG	Diamantina - MG	4	2	6	8	4	6	1	36
87	-17,18333	-43,55000	2795	07/06/79	Trebol - MG	Bocaiúva - MG	4	2	6	8	3	6	1	34

88 *Stylosanthes guianensis* - Controle

(E) Estado: (1) BA, (2) DF, (3) GO, (4) MG, (5) PA, (6) PI, (7) TO; **(B) Bacia:** (1) Araguaia - TO, (2) Atlântico Leste, (3) Atlântico N-NE, (4) PR - Paraguai, (5) São Francisco; **(A) Altitude:** (1) 1-165 m, (2) 166-335 m, (3) 336-506 m, (4) 507-668 m, (5) 669-825 m, (6) 826-1025 m, (7) 1026-1298 m; **(P) Pluviometria (média anual):** (1) 550 - 700 mm, (2) 700,01 - 850 mm, (3) 850,01 - 1000 mm, (4) 1000,1 - 1150 mm, (5) 1150,1 - 1300 mm, (6) 1300,1 - 1450 mm, (7) 1600,1 - 1750 mm, (8) 1750,1 - 1900 mm, (9) 1900 mm<; **(S) Tipo de Solo:** (2) Brunizens, (3) Cambissolos, (4) Latossolos, (5) Planossolos, (6) Solos Aluviais, (7) Solos Arenosquartzosos Profundos, (8) Solos Litólicos, (9) Solos Podzólicos; **(V) Vegetação - Grupo:** (1) Áreas de Tensão Ecológica (Contatos Entre Tipos De Vegetação), (2) Estepe, (3) Floresta Estacional Decidual (Mata Caducifolia), (4) Floresta Estacional Semidecidual (Mata Semicaducifolia), (5) Floresta Ombrofila Densa, (6) Savana; **(G) Grupos Genotípicos obtidos pela análise de dispersão:** (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), **(C) Agrupamento dos Acessos de acordo com a Similaridade Ambiental Dos Locais De Coleta, (**)** identificado como *Stylosanthes capitata*. Os acessos sublinhados foram caracterizados agronomicamente por Schultze-Kraft, (1984).

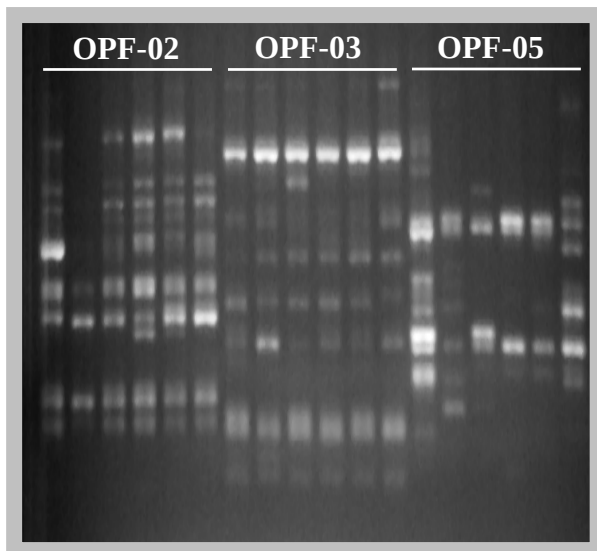


Figura 1. Produtos de amplificação de DNA genômico de 6 acessos de *Stylosanthes macrocephala* gerados com a utilização dos primers OPF-02, OPF-03 e OPF- 05.

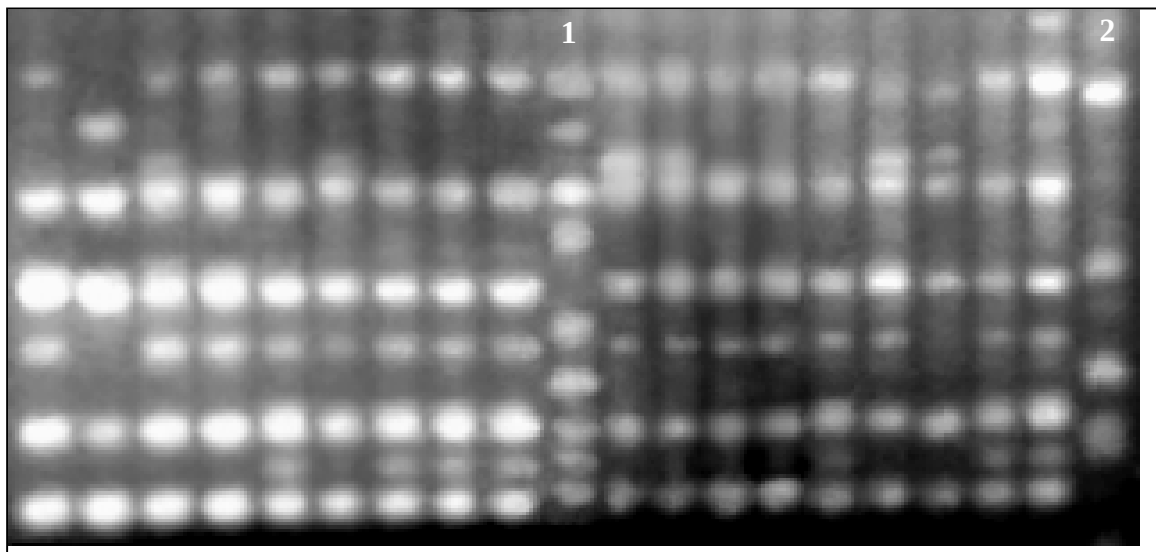


Figura 2. Segmento de um gel de análise dos produtos de amplificação de DNA genômico *Stylosanthes macrocephala* gerados com a utilização dos primers OPF12, evidenciando os acessos *S. capitata* (1) e *S. guianensis* (2).

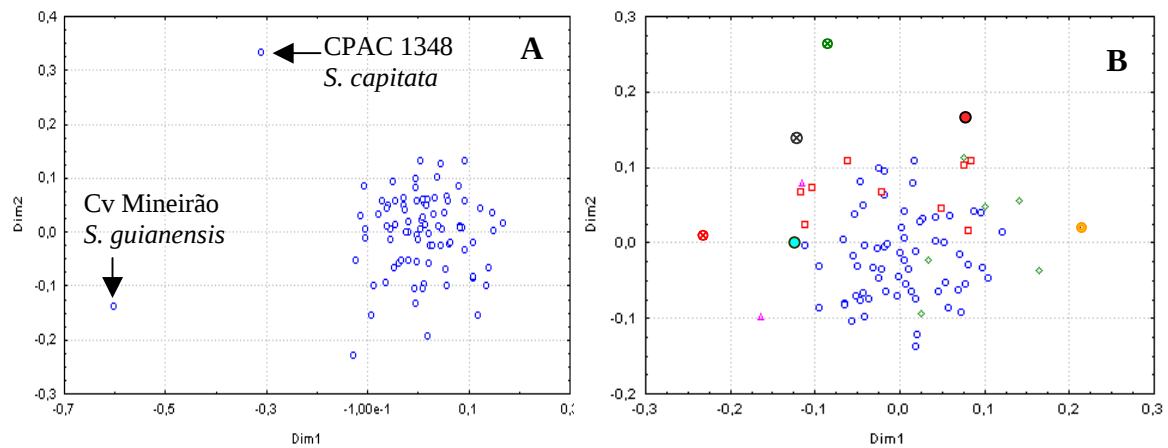


Figura 3. Dispersão gráfica dos acessos de *Stylosanthes* spp com base na matriz de distâncias genéticas geradas por 176 marcadores RAPD. A análise de grupamento foi feita com base no critério do UPGMA (*Unweighted pair-group arithmetic average*), com o auxílio do sistema SAS. **A** – Dispersão dos 88 acessos **B** – Dispersão e agrupamento dos 86 acessos de *S. macrocephala*, sendo: ○ Grupo 1: com 63 acessos ; □ Grupo 2: com 9 acessos; ◇ Grupo 3: com 6 acessos; △ Grupo 4: com 2 acessos; Seis grupos com apenas 1 acesso: ◆ 3, ◆ 9, ◆ 15, ◆ 40, ● 80, ● 82.

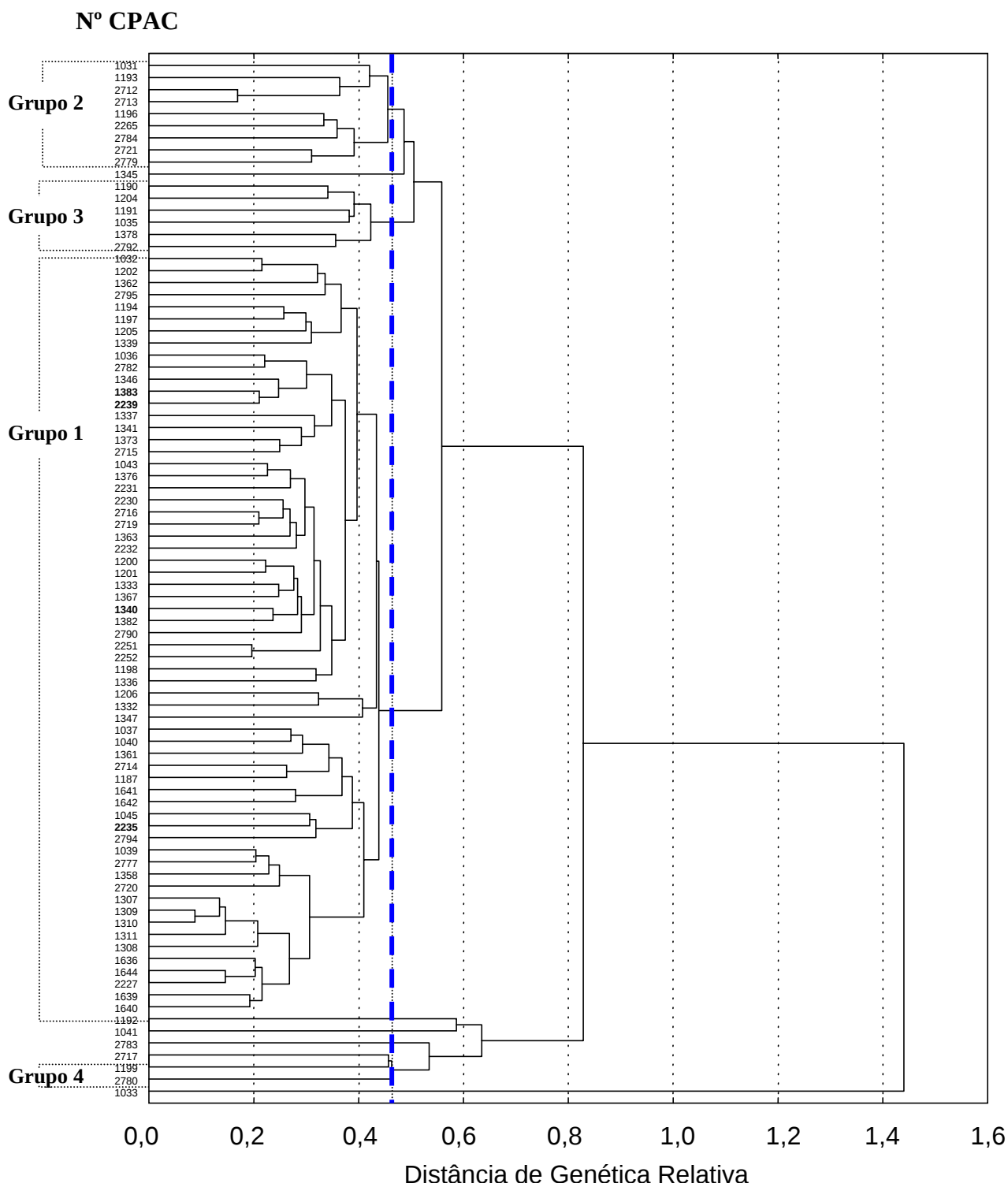


Figura 4. Análise de agrupamento de 86 acessos de *Stylosanthes macrocephala*. baseada na matriz de distâncias genéticas calculadas com 161 marcadores RAPD. O critério de agrupamento foi o do UPGMA.

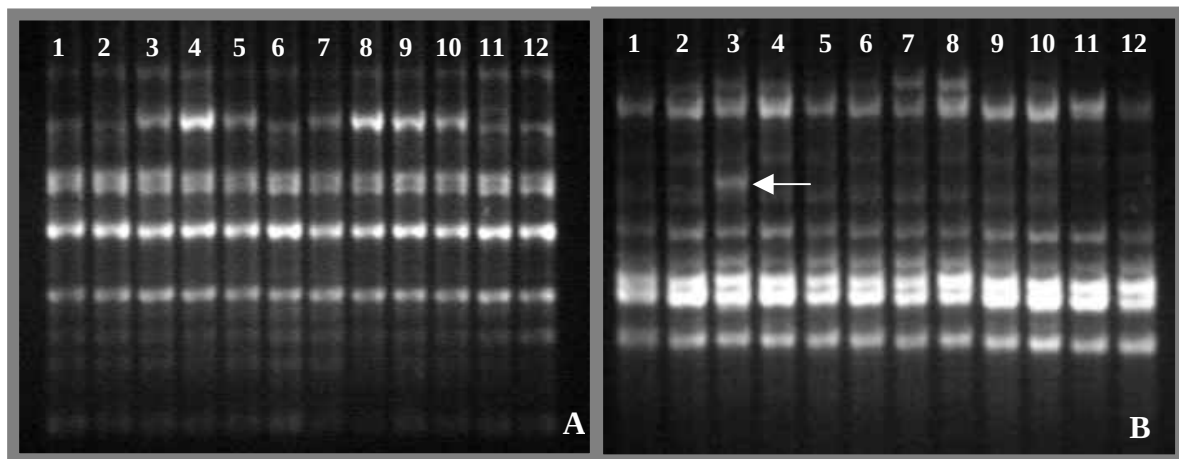


Figura 5. Produtos de amplificação de amostras de DNA genômico de 11 plantas (1 a 11) do acesso CPAC 1192, gerados com a utilização do *primer* OPD-03 (A) e OPE-01. B) A seta indica um polimorfismo verificado na planta 3. A coluna 12 mostra os produtos de amplificação de um *bulk* de amostras de DNA do mesmo acesso.

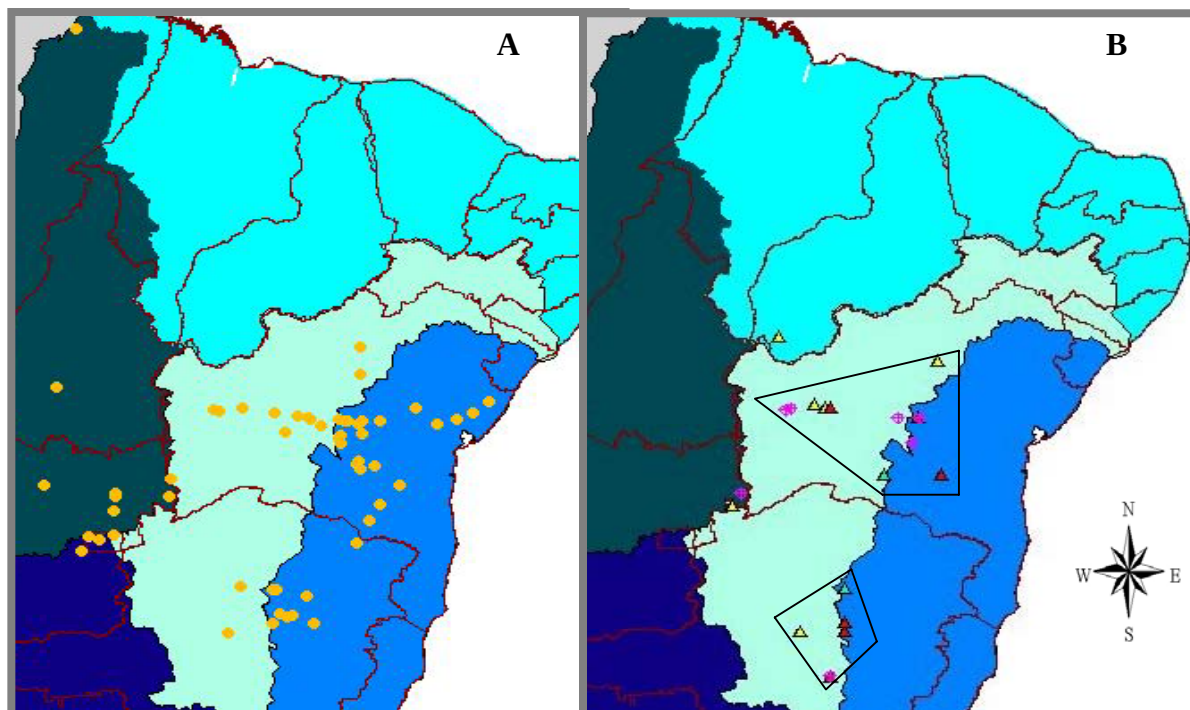


Figura 6. Distribuição geográfica dos acessos de *Stylosanthes macrocephala* geneticamente próximos (A), Distribuição dos acessos mais divergentes geneticamente (B). A região demarcada corresponde àquelas onde foram coletados acessos com maior diversidade genética entre si. • Grupo 1, ▲ Grupo 2, ▲ Grupo 3, ▲ Grupo 4, ⊕ acessos que não se agruparam; □ Estados Brasileiros, ■ Araguaia – TO; ■ Atlântico Leste; ■ Atlântico N-NE; ■ PR - Paraguai; ■ São Francisco.

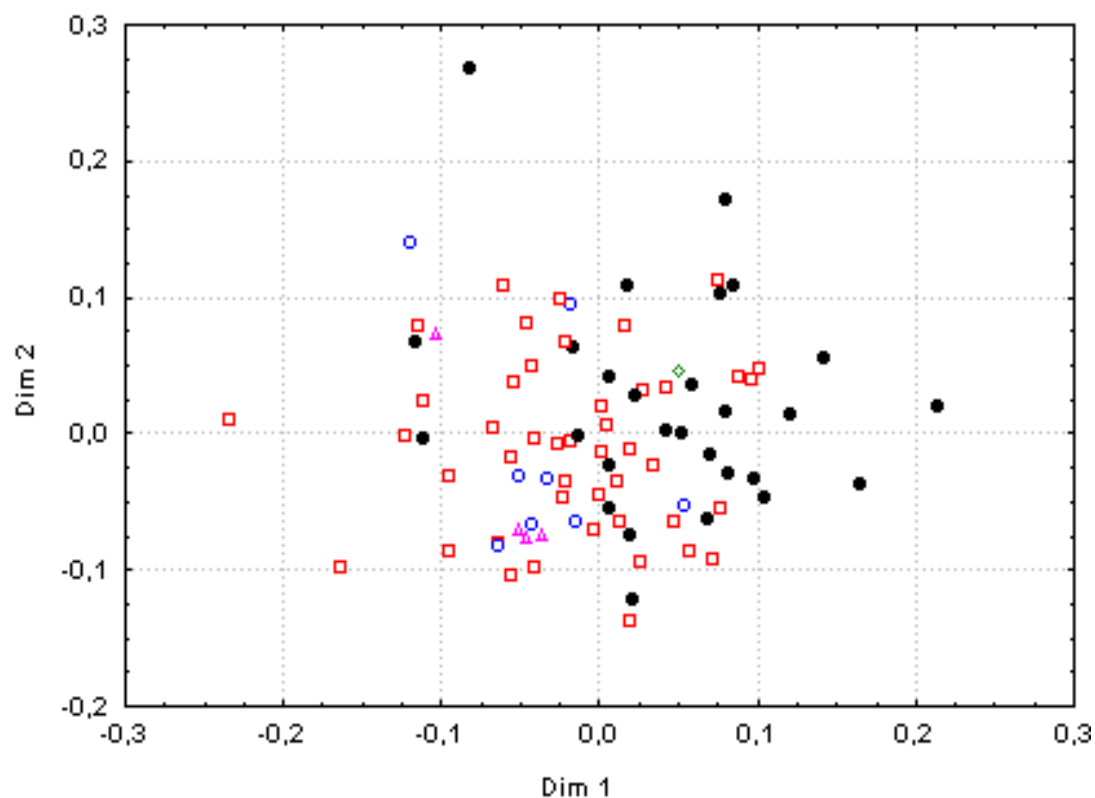


Figura 7. Dispersão gráfica de 86 acessos de *Stylosanthes macrocephala* com base na matriz de distâncias genéticas geradas por 161 marcadores RAPD, identificando os acessos coletados em diferentes bacias hidrográficas: ○ Araguaia – TO, □ Atlântico Leste, ◇ Atlântico N-NE, △ PR - Paraguai, ● São Francisco.

Os mapas mostrados na Figura 9 indicam as rotas seguidas pelas expedições de coleta dos acessos de *Stylosanthes macrocephala*, realizadas em diferentes épocas. Estes acessos foram introduzidos no Banco de Germoplasma da Embrapa Cerrados e também no CIAT. Observa-se que os pontos de coleta margearam as rodovias e que alguns municípios foram registrados incorretamente nos dados de passaporte. Estes municípios registrados incorretamente aparecem na Figura 9 sem a presença do correspondente acesso.

A Tabela 2 mostra o agrupamento dos acessos em função da similaridade de seus ambientes ecogeográficos (altitude, tipo de solo, precipitação e vegetação), tendo sido agrupado na mesma categoria os acessos que apresentaram igualdade em três destes 4 tipos de descritores ecológicos. Observa-se que por este critério, obteve-se 44 categorias. Municípios diferentes foram agrupados na mesma categoria como no caso de Ituaçu e Ourolândia, pertencentes a categoria 1, ou mesmo municípios de Estados diferentes como nos casos de Barreiras – BA e Sen. Modestino Gonçalves – MG. De forma inversa, acessos coletados em regiões diferentes de um mesmo município ficaram separados em diferentes categorias como no caso daqueles coletados em Barreiras, presentes nas combinações 5 e 29. Esta alta diversidade de combinação de descritores subsidia a alta diversidade genética entre os acessos, e sugere uma diversidade adaptativa da coleção.

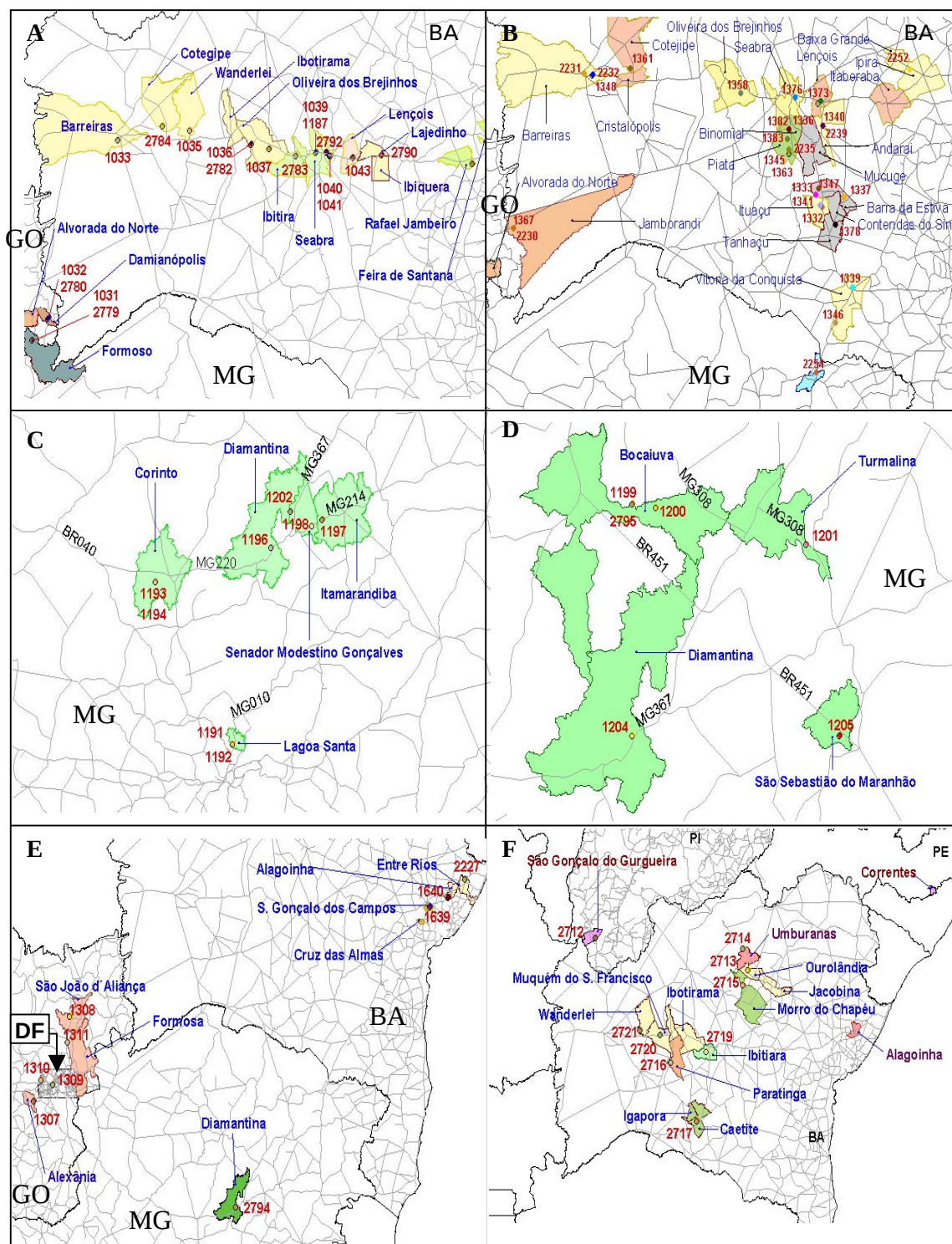


Figura 9: Distribuição geográfica dos acessos coletados nas diferentes expedições. em maio-junho/1978 (A), setembro/outubro/ 1978 (B), junho/1979 (C), agosto – setembro/ 1981 (D), junho/ 1983 (E), Demais expedições (F).

Tabela 2. Agrupamento dos acessos de acordo com a similaridade ambiental dos locais de coleta.

Nº	LAT	LONG	CPAC	Local de coleta – baseado no SIG	A	S	P	V	Combinações
70	-10,81667	-41,20000	2713	Ourolândia - BA	4	4	1	1	1
33	-13,81667	-41,31667	1332	Ituacu - BA	4	8	1	1	
39	-13,80000	-41,35000	1341	Ituacu - BA	4	8	1	1	
71	-10,36667	-41,31667	2714	Umburanas - BA	7	8	1	1	2
72	-11,15000	-41,33333	2715	Morro do Chapéu - BA	5	3	2	1	3
7	-12,40000	-41,86667	1039	Seabra - BA	7	4	2	1	4
12	-12,40000	-41,86667	1187	Seabra - BA	7	4	2	1	
82	-12,45000	-42,18333	2783	Ibitiara - BA	7	4	2	1	
50	-12,45000	-41,73333	1376	Seabra - BA	5	9	3	1	5
62	-12,15000	-45,01667	2231	Barreiras - BA	3	8	4	1	6
3	-12,23333	-45,03333	1033	Barreiras - BA	4	8	4	1	
24	-17,85000	-43,36667	1202	Sen. Modest. Goncal.- MG	6	8	4	1	
23	-17,35000	-42,68333	1201	Turmalina - MG	5	9	4	1	7
55	-12,41667	-38,90000	1639	S.Gonçalo Campos -BA	1	9	5	1	8
14	-19,66667	-43,91667	1191	Lagoa Santa - MG	6	4	6	1	9
15	-19,66667	-43,91667	1192	Lagoa Santa - MG	6	4	6	1	
44	-12,40000	-42,58333	1358	Oliveira dos Brejinhos- BA	3	4	1	2	10
6	-12,35000	-42,61667	1037	Oliveira dos Brejinhos- BA	4	4	1	2	
67	-12,10000	-39,95000	2252	Ipira - BA	2	5	1	2	11
36	-13,70000	-40,96667	1337	Barra da Estiva - BA	3	8	1	2	12
51	-14,03333	-41,10000	1378	Tanhacu - BA	3	9	1	2	
5	-12,30000	-42,90000	1036	Oliveira d Brejinhos- BA	4	4	2	2	13
81	-12,30000	-42,90000	2782	Oliveira d Brejinhos- BA	4	4	2	2	
75	-12,56667	-42,30000	2719	Ibitiara - BA	7	8	2	2	14
46	-14,23333	-40,31667	1362	Manoel Vitorino - BA	3	9	3	2	15
74	-14,05000	-42,53333	2717	Caetité - BA	6	4	2	3	16
73	-12,78333	-43,21667	2716	Paratinga - BA	3	6	2	3	17
35	-12,51667	-41,36667	1336	Lençóis - BA	3	4	3	3	18
49	-12,50000	-41,33333	1373	Lençóis - BA	3	4	3	3	
77	-12,11667	-44,03333	2721	Wanderley - BA	5	8	3	3	19
38	-12,80000	-41,30000	1340	Andaraí - BA	3	4	4	3	20
65	-12,80000	-41,30000	2239	Andaraí - BA	3	4	4	3	
19	-17,91667	-43,06667	1197	Itamarandiba - MG	6	4	4	3	
20	-17,96667	-43,16667	1198	Sen. Modestino Goncal. - MG	6	9	4	3	21
26	-18,13333	-42,51667	1205	S. Sebast. Maranhão -MG	4	4	5	3	22
60	-11,88333	-38,06667	2227	Entre Rios - BA	1	9	6	3	23
11	-12,55000	-39,36667	1045	Rafael Jambeiro - BA	1	2	2	4	24
76	-12,20000	-43,50000	2720	Muquém S. Francis.-BA	4	4	2	4	25
37	-14,81667	-40,83333	1339	Vitória Conquista - BA	6	4	2	4	
41	-15,26667	-41,10000	1346	Vitória da Conquista - BA	6	4	2	4	
84	-12,43333	-40,81667	2790	Lajedinho - BA	4	9	2	4	26
10	-12,46667	-41,28333	1043	Lençóis - BA	3	4	3	4	27
4	-12,11667	-43,88333	1035	Wanderley- BA	5	8	3	4	28
66	-15,88333	-41,40000	2251	Cachoeira d Pajeú- MG	5	4	4	4	29
63	-12,16667	-44,88333	2232	Barreiras - BA	5	4	4	4	
43	-12,16667	-44,88333	1348	Barreiras - BA	5	4	4	4	

Tab. 2. Cont...

Nº	LAT	LONG	CPAC	Local de coleta – baseado no SIG	A	S	P	V	Combinações
56	-12,23333	-38,46667	1640	Alagoinhas - BA	1	9	5	5	30
34	-13,66667	-41,41667	1333	Barra da Estiva - BA	6	4	1	6	31
85	-12,40000	-41,70000	2792	Seabra - BA	6	4	2	6	
40	-13,15000	-41,81667	1345	Piata - BA	7	8	2	6	32
42	-13,58333	-41,36667	1347	Barra da Estiva - BA	7	9	2	6	
45	-12,08333	-44,30000	1361	Cotegipe - BA	4	4	3	6	33
8	-12,45000	-41,65000	1040	Seabra - BA	5	4	3	6	
9	-12,45000	-41,63333	1041	Seabra - BA	5	4	3	6	
52	-12,85000	-41,83333	1382	Piata - BA	6	4	3	6	
69	-10,13333	-45,21667	2712	S. Gonçalves da Gurgueia - PI	4	8	3	6	34
47	-13,10000	-41,83333	1363	Piata - BA	6	8	3	6	
22	-17,20000	-43,43333	1200	Bocaiuva - MG	6	8	3	6	
87	-17,18333	-43,55000	2795	Bocaiúva - MG	6	8	3	6	
21	-17,18333	-43,55000	1199	Bocaiuva - MG	6	8	3	6	
53	-12,96667	-41,85000	1383	Piata - BA	7	8	3	6	
64	-12,96667	-41,85000	2235	Piata - BA	7	8	3	6	
83	-12,05000	-44,31667	2784	Cotegipe - BA	4	9	3	6	35
86	-18,13333	-43,55000	2794	Diamantina - MG	6	8	4	6	36
18	-18,13333	-43,55000	1196	Diamantina - MG	6	8	4	6	
68	-18,13333	-43,55000	2265	Diamantina - MG	6	8	4	6	
13	-18,40000	-43,55000	1190	Diamantina - MG	6	8	4	6	
25	-18,13333	-43,55000	1204	Diamantina - MG	6	8	4	6	
27	-17,10000	-44,36667	1206	Jequitai - MG	5	4	5	6	37
48	-14,08333	-46,11667	1367	Jaborandi - BA	6	4	5	6	
61	-14,08333	-46,11667	2230	Jaborandi - BA	6	4	5	6	
2	-14,58333	-46,15000	1032	Damianopolis- GO	5	7	5	6	38
80	-14,58333	-46,15000	2780	Damianopolis - GO	5	7	5	6	
1	-14,86667	-46,40000	1031	Formoso - MG	5	4	6	6	
79	-14,86667	-46,40000	2779	Formoso - MG	5	4	6	6	
78	-15,63333	-47,56667	2777	Brasília - DF	7	4	6	6	39
57	-14,55000	-47,50000	1641	S. João da Aliança - GO	6	3	7	6	40
28	-16,11667	-48,36667	1307	Alexânia - GO	6	3	7	6	
31	-15,71667	-48,20000	1310	Brasília - DF	7	3	7	6	
17	-18,40000	-44,65000	1194	Corinto - MG	4	4	7	6	41
16	-18,40000	-44,65000	1193	Corinto - MG	4	4	7	6	
29	-14,50000	-47,51667	1308	S. João da Aliança- GO	6	4	7	6	42
32	-14,98333	-47,56667	1311	Formosa - GO	7	4	7	6	
30	-15,80000	-47,91667	1309	Brasília - DF	7	4	7	6	
59	-14,25000	-49,33333	1644	Alto Horizonte - GO	5	4	8	6	43
58	-11,50000	-49,00000	1642	Duerê – TO	2	4	9	6	44

(A) **Altitude:** (1) 1-165 m, (2) 166-335 m, (3) 336-506 m, (4) 507-668 m, (5) 669-825 m, (6) 826-1025 m, (7) 1026-1298 m; (P) **Pluviometria (média anual):** (1) 550 – 700 mm, (2) 700,01 – 850 mm, (3) 850,01 – 1000 mm, (4) 1000,1 – 1150 mm, (5) 1150,1 – 1300 mm, (6) 1300,1 – 1450 mm, (7) 1600,1 – 1750 mm, (8) 1750,1 – 1900 mm, (9) 1900 mm<; (S) **Tipo de Solo:** (2) Brunizens, (3) Cambissolos, (4) Latossolos, (5) Planossolos, (6) Solos Aluviais, (7) Solos Arenoquartzosos Profundos, (8) Solos Litólicos, (9) Solos Podzólicos; (V) **Vegetação – Grupo:** (1) Áreas de Tensão Ecológica (Contatos Entre Tipos De Vegetação), (2) Estepe, (3) Floresta Estacional Decidua (Mata Caducifolia), (4) Floresta Estacional Semidecidual (Mata Semicaducifolia), (5) Floresta Ombrófila Densa, (6) Savana.

Com a finalidade de identificar a variabilidade dentro do acesso, onze plantas de quatro acessos distintos tiveram seus DNAs extraídos e amplificados para gerar marcadores do tipo RAPD. Dois dos acessos (CPAC 1033 e 1192) foram escolhidos por apresentarem maior divergência genética dentro da coleção, enquanto que os acessos 1043 e 2251 foram aleatoriamente escolhidos dentro do grupo 1.

Um *bulk* de amostras de DNA de diferentes plantas do mesmo acesso também foi amplificado. Os marcadores de RAPD obtidos foram utilizados para calcular as distâncias genéticas que resultaram nas matrizes de distância mostrada na Figura 11. De um modo geral, observou-se uma alta proximidade entre as plantas do mesmo acesso e seu respectivo *bulk* (Figura 10). Entretanto verificou-se que a planta 3 do acesso CPAC 1192 apresentou um certo distanciamento do grupo, o que pode ser melhor visualizado nas Figuras 10 e 11. Este resultado sugere que esta planta pode ser um produto de recombinação dentro do acesso. Outra situação foi verificada com a planta 11 do acesso CPAC 2251, a qual apresentou altas distâncias genéticas em relação ao restante do grupo, com valores entre 0,280 e 0,407 (Figura 10 D). Este distanciamento é bem evidente quando se observa o dendrograma da Figura 11, sugerindo-se tratar de uma planta proveniente de uma contaminação física de sementes.

A Figura 12 ilustra a diversidade genética entre os acessos de *S. macrocephala*. Observou-se que o acesso CPAC 1348 é muito diferente dos demais. Posteriormente, verificou-se que tal acesso possuía uma mistura de sementes de *S. capitata* (Faleiro *et al.*, 2003).

1	0,000													A
2	0,060	0,000												
3	0,035	0,024	0,000											
4	0,036	0,024	0,000	0,000										
5	0,035	0,024	0,000	0,000	0,000									
6	0,000	0,055	0,018	0,019	0,018	0,000								
7	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000							
8	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000						
9	0,030	0,015	0,015	0,015	0,015	0,000	0,000	0,015	0,000					
10	0,049	0,025	0,012	0,013	0,012	0,038	0,013	0,013	0,000	0,000				
11	0,050	0,038	0,025	0,013	0,025	0,038	0,014	0,027	0,000	0,026	0,000			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

1	0,000													B
2	0,024	0,000												
3	0,021	0,049	0,000											
4	0,000	0,014	0,000	0,000										
5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000									
6	0,013	0,045	0,013	0,000	0,000	0,000								
7	0,000	0,012	0,021	0,000	0,000	0,013	0,000							
8	0,011	0,012	0,032	0,000	0,000	0,026	0,000	0,000						
9	0,014	0,032	0,014	0,000	0,000	0,000	0,014	0,028	0,000					
10	0,011	0,026	0,011	0,000	0,000	0,000	0,011	0,023	0,000	0,000				
11	0,023	0,026	0,023	0,013	0,000	0,014	0,023	0,034	0,000	0,000	0,000			
12	0,011	0,013	0,023	0,013	0,000	0,014	0,011	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

1	0,000													C
2	0,009	0,000												
3	0,030	0,041	0,000											
4	0,009	0,000	0,040	0,000										
5	0,010	0,000	0,040	0,000	0,000									
6	0,000	0,010	0,030	0,010	0,010	0,000								
7	0,013	0,000	0,026	0,000	0,000	0,013	0,000							
8	0,010	0,000	0,041	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000						
9	0,023	0,012	0,025	0,011	0,011	0,013	0,000	0,012	0,000					
10	0,010	0,000	0,044	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,013	0,000				
11	0,019	0,010	0,052	0,010	0,010	0,021	0,014	0,010	0,023	0,011	0,000			
12	0,010	0,000	0,043	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,012	0,000	0,011	0,000		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

1	0,000													D
2	0,013	0,000												
3	0,000	0,016	0,000											
4	0,014	0,000	0,016	0,000										
5	0,016	0,016	0,020	0,017	0,000									
6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000								
7	0,074	0,055	0,067	0,037	0,045	0,022	0,000							
8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,000	0,057	0,000						
9	0,048	0,048	0,040	0,051	0,019	0,037	0,111	0,053	0,000					
10	0,015	0,000	0,019	0,000	0,019	0,000	0,055	0,000	0,048	0,000				
11	0,375	0,333	0,273	0,290	0,333	0,333	0,280	0,407	0,355	0,333	0,000			
12	0,000	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000	0,057	0,000	0,048	0,000	0,355	0,000		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

Figura 10. Matrizes de distâncias genéticas entre 11 plantas (1 a 11) dos acessos CPAC 1033 (A), CPAC 1043 (B), CPAC 1192 (C), CPAC 2551 (D). A amostra 12 corresponde aos dados de um *bulk* de amostras de DNA de diferentes plantas do mesmo acesso. O *bulk* do acesso CPAC1033 apresentou problemas de amplificação, sendo os dados descartados.

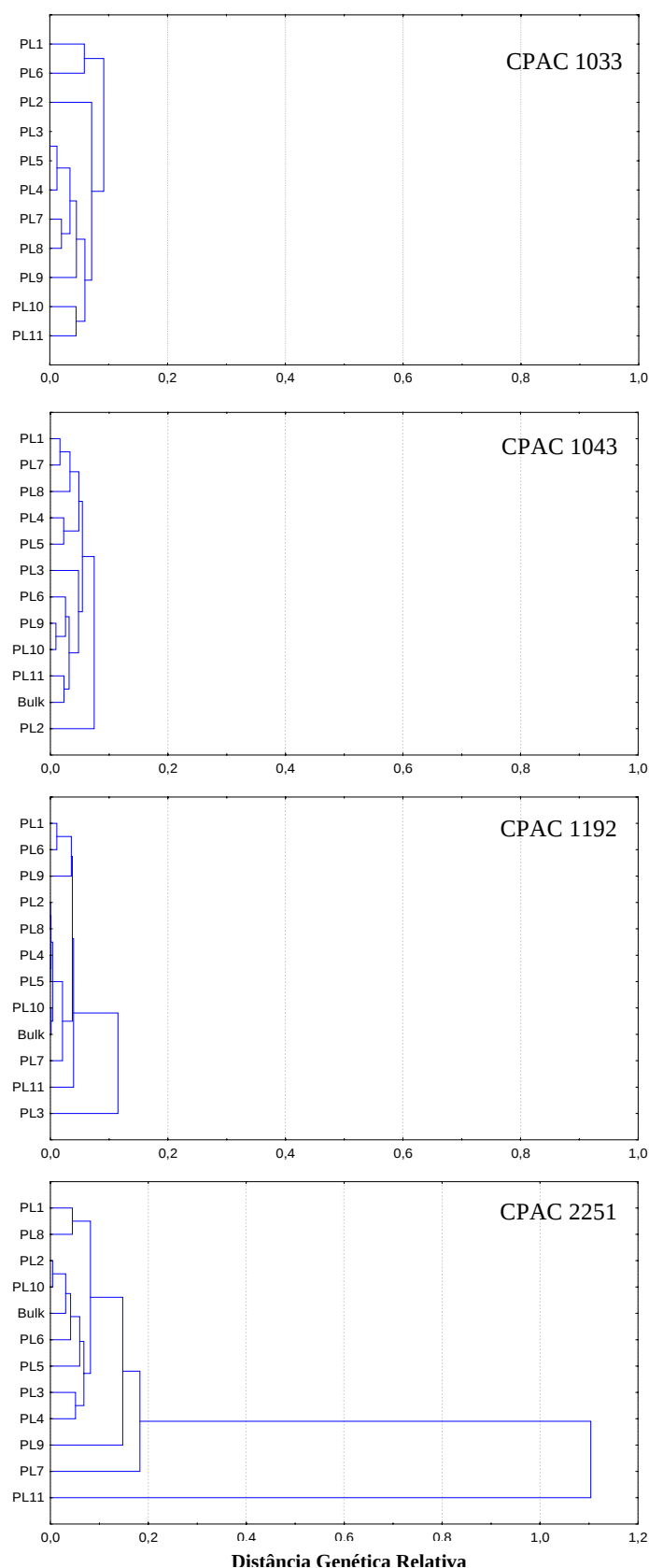


Figura 11 . Análises de agrupamento baseada na matriz de distâncias genéticas entre 11 plantas dos acessos CPAC 1033, CPAC 1043, CPAC 1192 e CPAC 2251 de *Stylosanthes macrocephala* e seus respectivos bulks de DNA. O critério de agrupamento foi o do UPGMA.

Nº CPAC

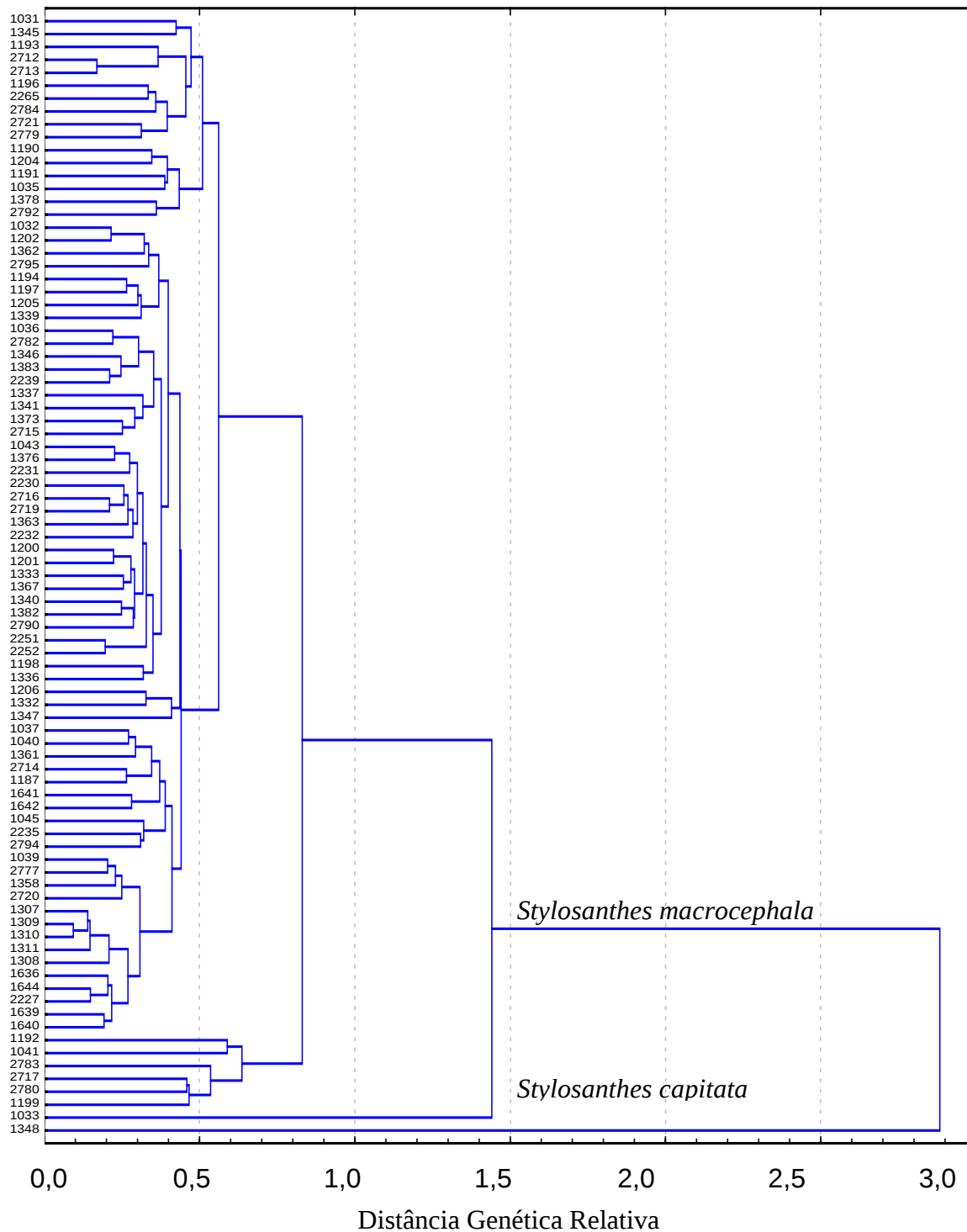


Figura 12. Análise de agrupamento da coleção de 87 acessos de *Stylosanthes* spp com base na matriz de distâncias genéticas calculada com base em 176 marcadores RAPD. O critério de agrupamento foi o do UPGMA.

Com base na análise de agrupamento da coleção de 87 acessos de *Stylosanthes* spp foram gerados os grupos genéticos cuja dispersão está mostrada na Figura 13. Observa-se que o agrupamento 1 concentra a grande maioria dos acessos.

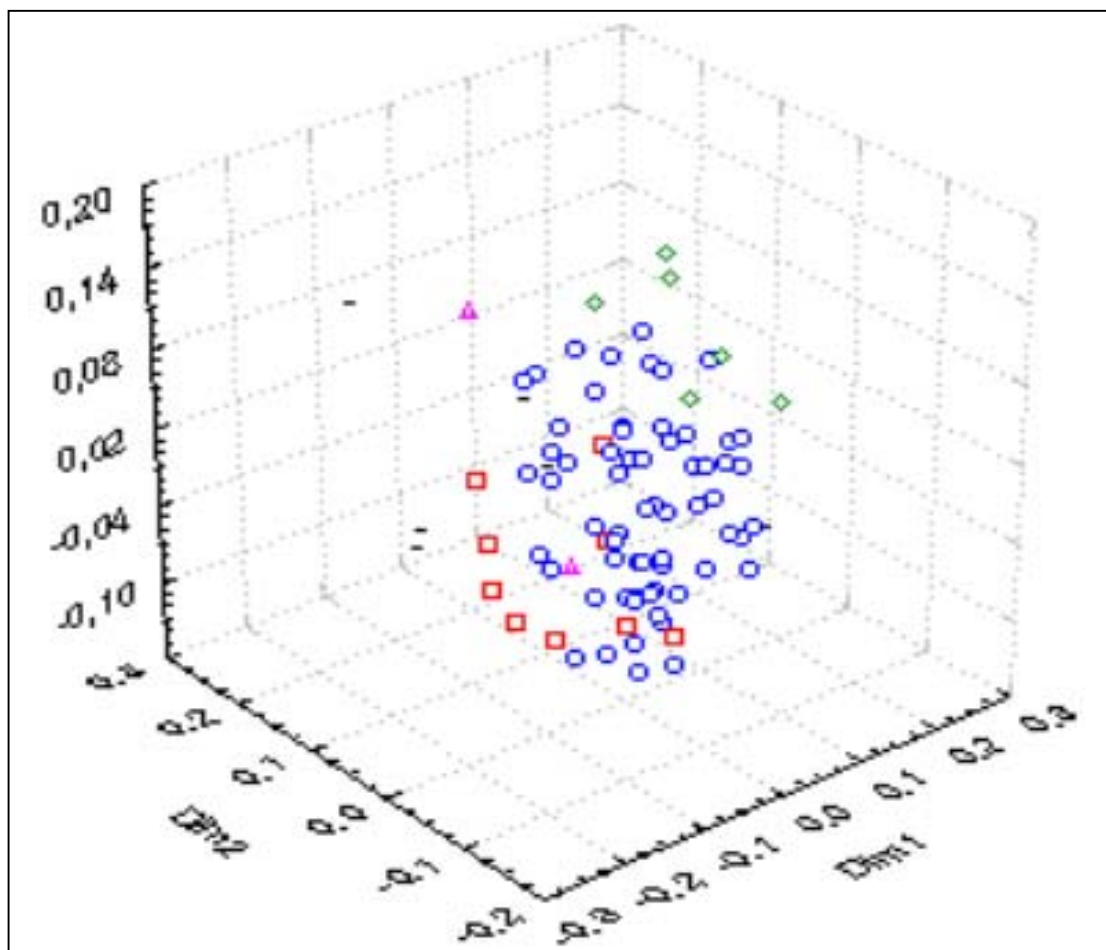


Figura 13. Dispersão gráfica de 86 acessos de *S. macrocephala* com base na matriz de distâncias genéticas geradas por 161 marcadores RAPD. Os acessos foram estratificados quanto aos grupos genéticos. ○ Grupo 1, □ Grupo 2, ◇ Grupo 3, △ Grupo 4, — grupos com apenas um acessos em cada.

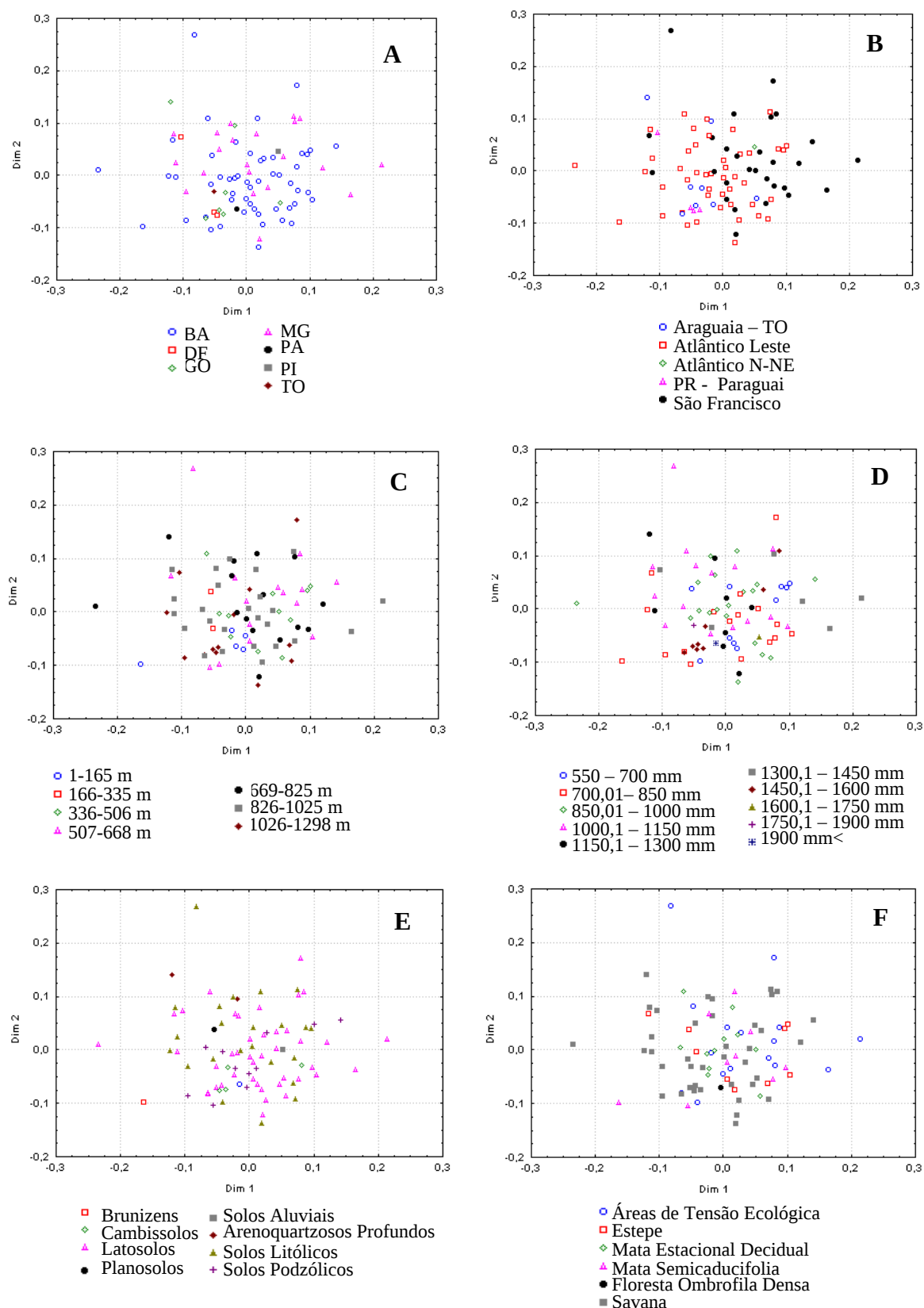


Figura 14. Dispersão gráfica de 86 acessos de *S. macrocephala* com base na matriz de distâncias genéticas geradas por 161 marcadores RAPD. Os acessos foram estratificados quanto ao Estado de Origem (A), Bacias Hidrográficas (B), Altitude (C), Pluviometria anual média (D), Tipo de Solo (E) e Tipo de Vegetação (F).

Na Figura 14 observa-se a dispersão gráfica dos 86 acessos de *S. macrocephala* com base na matriz de distâncias genéticas calculadas com base nos marcadores RAPD, estratificando os acessos por Estado de origem, bacia hidrográfica, altitude, pluviometria, tipo de solo e tipo de vegetação. A Figura 14 B mostra uma certa tendência de regionalização dos acessos por bacia hidrográfica, o que também pode ser observado na Figura 15. Não se observou a separação dos acessos em função dos demais descritores ecológicos (Figura 14 A, C, D, E e F).

A Figura 16 mostra a distribuição geográfica dos locais de coleta dos acessos de *S. macrocephala* que apresentaram maior distância genética entre si. Os acessos sublinhados são aqueles mais divergentes, ou seja, aqueles que não se agruparam na análise genotípica. Os Estados que forneceram maior número de acessos diferentes foram Bahia e Minas Gerais. A região compreendida no polígono baiano Barreiras, Ouro-lândia, Tanhaçus e Caetité foi onde foram coletados maior número de acessos distintos. Tais acessos ficaram alocados em 7 dos 10 grupos observados. Na Região Mineira, compreendendo as cidades Corinto, Bocaiuvas, Diamantina e Lagoa Santa, também foram coletados grande número de acessos divergentes, os quais ficaram alocados em 4 dos 10 grupos. Entretanto, o número de coletas realizadas nos municípios mineiros foi muito menor do que nos municípios baianos. Enquanto foram coletados 53 acessos em 27 municípios baianos, em Minas Gerais, foram coletados 21 acessos em 12 municípios, o que sugere que ambas as regiões são potencialmente interessantes para a realização de novas coletas, com a finalidade de abranger maior número de acessos distintos.

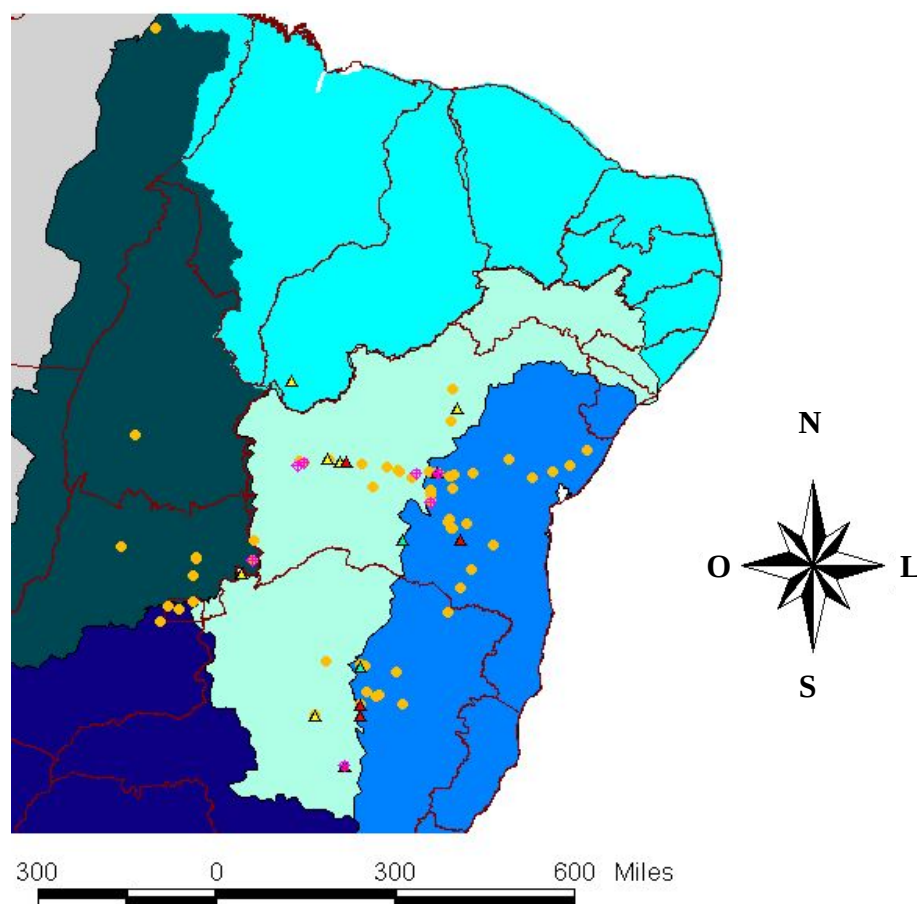


Figura 15. Distribuição geográfica dos acessos de *Stylosanthes macrocephala* identificando o grupo genético. • Grupo 1, ▲ Grupo 2, ▲ Grupo 3, ▲ Grupo 4, ⊕ acessos que não se agruparam; Estados Brasileiros, Araguaia – TO; Atlântico Leste; Atlântico N-NE; PR - Paraguai; São Francisco.

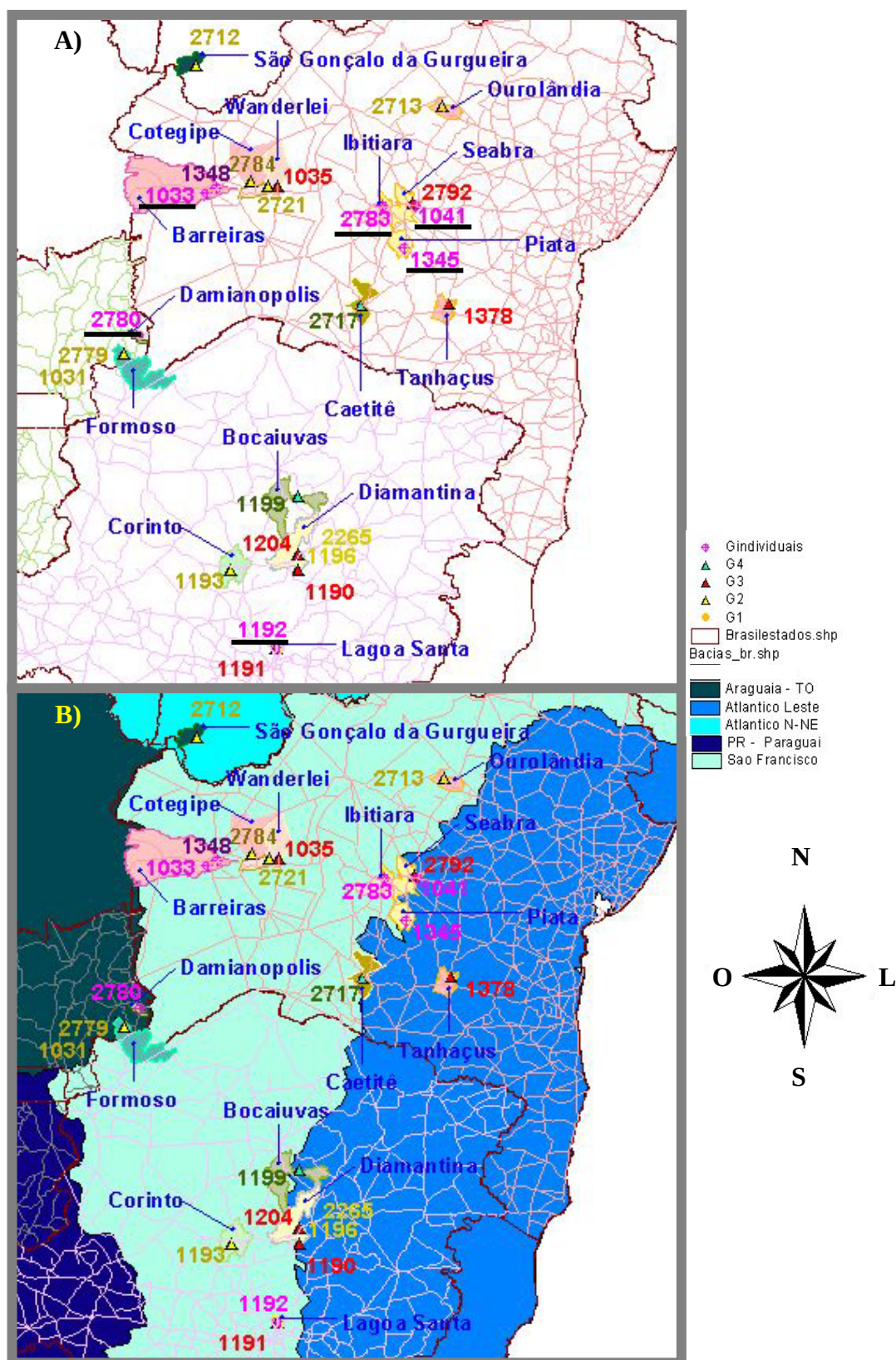


Figura 16. Identificação das regiões onde foram coletados os acessos com maior diversidade genética (*hot spot* de diversidade)

5. Referências Bibliográficas

ANDERSEN, W. R.; FAIRBANKS, D. J. Molecular markers: important tools for plant genetic resource characterization. **Diversity**, Bethesda, v. 6, p. 3-4, 1990.

ANDRADE, R. P.; KARIA, C. T. O uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil . In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGEM, 1., 2000. Lavras. **Temas em evidência**. Lavras: UFLA, 2000. p. 273-309.

BARCELLOS, A. de O.; ANDRADE, R. P. de.; KARIA, C. T. Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena* . In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 17., 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 297-357.

BARCELLOS, A. de O.; VILELA, L. Leguminosas forrageiras tropicais: estado de arte perspectivas futuras. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31., 1994, Maringá, PR. **Anais...** Maringá: EDUEM, 1994. p.1-56.

BEEBE, S.; LYNCH, J.; GALWEY, N.; TOHME, J.; OCHOA, I. A geographical approach to identify phosphorus-efficient genotypes among landraces and wild ancestors of common bean. **Euphytica**, Wageningen-Holanda, v. 95, p. 325-336, 1997.

BODDEY, R. M.; RESENDE, C. de P.; PEREIRA, J. M. The cycle in pure grass and grass/legume pastures: evaluation of pasture sustainability. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM NUCLEAR AND RELATED TECHNIQUES IN SOIL/PLANT-STUDIES OF SUSTAINABLE AGRICULTURE AND ENVIRONMENTAL PRESERVATION. **Proceedings...** Viena: [s.n.], 1993.

BRANDÃO, M.; COSTA, N. M. S.; SCHULTZE -KRAFT, R. Pauciflora uma nova variedade de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 36., 1986, Curitiba, PR. **Anais...** Curitiba: Sociedade Botânica do Brasil, 1986. p 323.

BRASIL. Ministério das Minas e Energia. Secretaria Geral. Projeto Radam Brasil. **Folha SD.22 Goiás:** geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro, 1981. 640 p.

CAMERON, D. F.; MILLER, C. P.; EDYE, L. A. Advances in research and development with *Stylosanthes* and other tropical pastures legumes. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 17., 1993, Palmerston North, New Zeland, **Proceedings**. Palmerston North: New Zeland Grassland Association, 1993. p. 2109-2114.

CHAPMAN, S. H.; BARRETO, H. J. Using simulation models and spatial databases to improve the efficiency of plant breeding programs. In: COOPER, M.; HAMMER, G. L. (Ed.). **Plant adaptation and crop improvement**. Wallingford: CAB International, 1996. p. 563-587.

CLATWORHTY, J. N. Global ventures in *Stylosanthes* III. south-east Africa. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. New York: Academic Press, 1984. p. 487-502.

CRUZ, C. D. **Programa Genes:** aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 1997. 442 p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg-MD, v. 12, p. 13-15, 1990.

EDYE, L. A. Global ventures in *Stylosanthes* III. India. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. New York, Academic Press, 1984. p 535-546.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte. **Recomendações para estabelecimento e utilização do *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão**. Campo Grande, MS: Embrapa-CNPGC, 1993. 6 p. (Embrapa-CNPGC. Comunicado Técnico, 49).

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando a análises moleculares**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003a. 5 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 92).

FALEIRO, F.G. BARROS, A.M.; FALEIRO A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R. ; KARIA, C. T.; GOMES, A. C.; ANDRADE, R. P. Caracterização molecular e estabelecimento de coleção de trabalho de *Stylosanthes macrocephala* com base em marcadores RAPD. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40, Santa Maria. **Anais...**, 2003. Santa Maria: Unidade CD. 2003b. 7p.

FAO. Report of the International Technical Conference on Plant Genetic Resource. **Global plan of action for the conservation and sustainable utilization of plant genetic resources for food in agriculture**. Leipzig Germany, 1996.

FAO. **The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture**. Rome, 1998. 510 p.

FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. Novas espécies do gênero *Stylosanthes* para Minas Gerais. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 28., 1977, Belo Horizonte. **Anais...** [S.l.]: Sociedade Botânica do Brasil, 1977. p. 77-102.

FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. **O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1979. 107 p.

FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. Some Brazilian Species of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. New York: Academic Press, 1984. p 23-48.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1996. 220 p. (Embrapa-Cenargen. Documentos, 20).

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D. Plant Genetic resources today: a critical reappraise. In: HOLDEN, J. H. W.; WILLIAMS, J. T. (Ed.). **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: George Allen & Unwin, 1994. p. 249-257.

FU, Y.-B.; GUERIN, S.; PETERSON, G. W.; CARLSON, J. E.; RICHARDS, K. W. Assessment of bulking strategies for RAPD analyses of flax germoplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Netherlands, 50: 743 – 746, 2003.

GILLARD, P.; WINTER, W. H. Animal production from *Stylosanthes* based in Australia. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press, 1984. p. 405-432.

GREENE, S. L.; HART, T. C.; AFOONIN, A. Using geographic information to acquire wild crop germoplasm for *ex situ* collections: II Post-collection analysis. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 843-849, 1999.

GRENIER, C.; BRAMEL-COX, P. J.; HAMON, O. Core collection of sorghum. I Stratification based on eco-geographical data. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 234-240, 2001.

GUARINO, L.; JARVIS, A.; HIJMANS, R. J.; MAXTED, N. Geographic information systems (GIS) and the conservation and use of plant genetic resource. In: EGELS, J. M. M.; RAMATHA, R. A. O. V.; BROWN, A. H. D.; JACKSON, M. T. (Ed.) **Managing plant genetic diversity**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 387-404.

GUNTER, L. E.; TUSKAN, G. A.; WULLSCHLEGER, S. D. Diversity among populations of switch grass based on RAPD marks. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 4, p. 1017-1022, 1996.

HALWARD, T. M.; STALKER, H. T.; LARUE, E. A.; KOCHERT, G. Use of single-primer DNA amplification in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht-Holanda, v. 18, p. 315-325, 1992.

HARRISON, R. E.; LUBY, J. J.; FUNIER, G. R.; HANCOCK, J. F. Differences in the apportionment of molecular and morphological variation in North American strawberry and

consequences for genetic resources management. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht-Holanda, v. 47, p. 647-657, 2000.

HAWTIN, G.; IWANAGA, M.; HODGKIN, T. Genetic resource in breeding for adaptation. **Euphytica**, Wageningen-Holanda, v. 92, p. 255-266, 1996.

HIJMANS, R. J.; GUARINO, L.; CRUZ, M.; ROJAS, E. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1.DIVA-DIS. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Roma, v. 127, p. 15-19, 2001.

JONES P. G.; REBGETZ, R.; MASS, B. L.; KERRIDGE, P. Genetic diversity *Stylosanthes* species: a GIS mapping approach. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 8.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS, 1., 1996, Brasília, DF. **Biodiversidade e produção sustentável de alimentos e fibras nos Cerrados: anais...** Planaltina: Embrapa-CPAC, 1996. p. 186-189.

JONES, P. G.; GLADKOV, A. **FloraMap**: a computer tools for the distribution of plant and others organisms in the wild. Cali: CIAT, 1999.

KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. de ; SILVA, G. P. da Conservação de espécies forrageiras tropicais no campo. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 53-55.

KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. de. Avaliação preliminar de espécies forrageiras no Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados: perspectivas futuras. In: SIMPÓSIO

SOBRE O CERRADO, 8., 1996, Brasília. **Anais...** Planaltina: Embrapa-CPAC, 1996. p. 471-475.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; CAMERON, D. F. Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random polymorphic DNA. **Genome**, Ottawa-Canada, v. 36, p. 43-49, 1993b.

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**, New York, v. 85, p. 882-888, 1993a.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; CAMERON, D. F. Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in an interspecific cross in the genus *Stylosanthes*. **Genome**, Ottawa-Canada, v. 36, p. 50-56, 1992.

LEWIS, G. P.; MANNETJE, L. T – Two new species of leguminosae Papilionoideae from Bahia, Brazil. **Kew Bulletin**, London-Inglaterra, v. 37, n. 1, p. 123-127, 1982.

LIU, C. J. Geographical distribution of genetic variation in *Stylosanthes scabra* revealed by RAPD analysis. **Euphytica**, Wageningen-Holanda, v. 98, p. 21-27, 1997.

LIU, C. J.; MUSIAL, J. M. Restriction fragment length polymorphism detected by cDNA and genomic DNA clones in *Stylosanthes*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 91, p. 1210-1213, 1995.

LIU, C. J.; MUSIAL, J. M.; SMITH, F. W. Evidence for a low level of genomic specificity of sequence-tagged-site in *Stylosanthes*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 93, p. 864-868, 1996.

LIU, C. J.; MUSIAL, J. M.; THOMAS, B. D. Genetic relationship among *Stylosanthes* species as revealed by RFLP and STS analyses. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, p. 1179-1186, 1999.

MANNETJE, L. T. Considerations on the taxonomy of genus *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. New York: Academic Press, 1984. p 1-21.

MARASCHIN, G. E. Oportunidade do uso de leguminosas em sistemas intensivos de produção animal a pasto. In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C. de; FARIA, V. P. de. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 14., 1997, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1997. p.139-160.

MILES, J. W. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of out crossing rate in *Stylosanthes guianensis*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria-Australia, v. 36, p. 259-265, 1985.

MOHLENBROCK, R. H. A revision of the genus *Stylosanthes*, **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v 44, p. 299 – 355, 1957.

NASCIMENTO JÚNIOR, D. Leguminosas: espécies disponíveis, fixação de nitrogênio e problemas fisiológicos para manejo da consorciação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PASTAGENS, 1986, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1986. p. 389-411.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academic Science**, New York, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

PEREIRA, J. M.; MORENO, R. M. A.; CANTARUTTI, R. B. Crescimento e produtividade estacional de germoplasma forrageiro. In: CEPLAC. **Informe de pesquisas 1987/1990**. Ilhéus, 1995. p. 307-309.

PROBERT, M. E. The mineral nutrition of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A., (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press, 1984. p. 203-226.

REYES, C.; ORDOÑEZY, H.; PINEDO, L. *Stylosanthes guianensis* cv. *Pucallpa* – **Boletín Técnico– Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y Altura**, Peru, n. 3, p.3, 1985.

ROBERTS, C. R. Some problems of establishment and management of legume based tropical pastures. **Tropical Grasslands**, Brisbane-Queensland-Australia, v. 1, p. 61-67, 1974.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 653 p.

SANZONOWICZ, C.; COUTO, W.; KORNELIUS, E.; BARCELLOS, A. de O. Necessidade de calcário e fósforo para leguminosas e gramíneas forrageiras. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados. **Relatório Técnico Anual do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados 1982/1985**. Planaltina, 1987. p 149-153.

SAS INSTITUTE INC. **User guide version 6.04**. 4. ed. Cary , 1990.

SCHUTLZE-KRAFT, R.; COSTA, N. M. S.; FLORES, A. *Stylosanthes, macrocephala* M. B. Ferr. Et S. Costa: collection and preliminary agronomic evaluation of a new tropical pasture legume. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 61, p. 229-240, 1984.

SOUZA, F. B.; ANDRADE, R. P.; THOMAS, D. *Stylosanthes* cv. Bandeirante uma leguminosa forrageira para região dos Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 18, n.3, p. 319-320, 1983a.

SOUZA, F. B.; ANDRADE, R. P.; THOMAS, D. Pioneiro: a new legume pasture for the Cerrados region. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 321-322, 1983b.

SPAIN, J. M.; VILELA, L. Perspectivas para pastagens consorciadas na América Latina nos anos 90 e futuros. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 27., 1990, Campinas, SP. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1990. p. 101-119.

STACE, H. M. Breeding system in *Stylosanthes*. I. Observations of outcrossing in *S. scabra* at an alcohol dehydrogenase locus. **Australia Journal of Agricultural Research**, Victoria-Australia, v. 33, p. 87-96, 1984.

STACE, H. M. Genetic system in *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press, 1984. p. 147-161.

STACE, H. M.; CAMERON, D. F. Cytogenetics and evolution of *Stylosanthes*. In: STACE H. M, EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press, 1984. p. 49-72.

STAPPEN, J. V.; WELTJENS, I.; CAMPENHOUT, S. Van; VOLCKAERT, G. Genetic relationship among *Stylosanthes* species as revealed by sequence-tagged site markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, p. 1054-1062, 1999.

STAPPEN, V. J.; CAMPENHOUT, S. Van.; LOPEZ, S. G.; VOLCKAERT, G. Sequencing of the internal transcribed spacer region ITS1 as a molecular tool detecting variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, p. 869-877, 1998.

STEINER, J. J.; GREENE, S. L. Proposed ecological descriptors and their utility for plan germplasm collections. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 439-451, 1996.

VALLS, J. F. M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., 1988, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP-FCAV; Brasília: Embrapa-Cenargen, 1988. p. 108-128.

VAN BEUNING, L. T.; BUSCH, R. H. Genetic diversity among North American spring wheat cultivars: III. Cluster analysis based on quantitative morphological traits. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 981-988, 1997.

VAN SLOTEN, D. H. The role of curators, breeders and others users of germoplasm in characterization and evaluation of crop genetic resources. **IBPGR/SEAN, Special Issue**, Rome, p. 3-8, 1987.

VIEIRA, M. L. C.; FUNGARO, M. H. P.; JUBIER, M. F.; LEJEUNE, B. Determination of taxonomic relationship among brazilian taxa of *Stylosanthes* SW., leguminosae, using RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 305-310, 1997.

WILLIAMS R. J.; REID, R.; SCHULTZE-KRAFT R.; COSTA N. M. S.; THOMAS B. D. Natural distribution of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press, 1984, p. 73-101.

YANG, W.; OLIVEIRA, A. C.; GODWIN, I.; SCHERTZ, K.; BENNETZEN, J. L. Comparison of DNA Marker Technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 1669-1676, 1996.

YEE, E.; KIDWELL, K. K.; SILLS, G. R.; LUMPKIN, T. A. diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki), accessions on the basis of RAPD, and AFLP markers **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 269-275, 1999.