

Análise da Variabilidade Genética Entre e Dentro de Famílias de *Stylosanthes guianensis*

Rebecca Caroline Ulbricht Ferreira¹, Rosângela Maria Simeão², Lucimara Chiari³

Introdução

Dentre as leguminosas forrageiras nativas do Brasil, destacam-se as do gênero *Stylosanthes*, por sua ampla adaptação e tolerância aos estresses abióticos, tais como seca, solos ácidos e de baixa fertilidade (BRANDÃO, 1992). Nesse gênero, o *Stylosanthes guianensis* é considerado uma das espécies mais promissoras por possuir ampla variabilidade genética e elevado potencial para o consórcio com gramíneas forrageiras, resultando em aumento de produtividade por animal e por área.

Sabendo-se que a otimização do ganho com seleção em médio e longo prazo depende da avaliação correta da quantidade e distribuição da diversidade genética dentro de uma espécie, o objetivo desse trabalho foi analisar a variabilidade genética entre famílias e entre indivíduos de *S. guianensis* por meio de marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), visando auxiliar o programa de melhoramento genético dessa espécie.

Material e métodos

A. Material Vegetal

Foram avaliadas 52 famílias da leguminosa forrageira *S. guianensis* resultantes do terceiro ciclo de seleção, sendo que em 47 famílias foram avaliados quatro indivíduos meios-irmãos, em quatro famílias três indivíduos e em uma família dois indivíduos, totalizando 202 indivíduos.

B. Extração de DNA, Amplificação e Eletroforese

Foi extraído o DNA de folhas jovens segundo o protocolo proposto por Chiari et al. (2009), cuja qualidade e quantidade de DNA foram observadas em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo) a 260 nm e gel de agarose 0,8%. Posteriormente, reações de PCR foram realizadas utilizando-se dez *primers* (AN10/BA01 / BA03/ D03 / G02 / GO3 / G04/ G07 / G10 / G17), previamente selecionados em trabalhos anteriores (CHIARI et al., 2010). As amplificações foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research) e os produtos amplificados foram

submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, pré-corados com brometo de etídeo, sendo que os resultados foram visualizados em luz ultravioleta (UV) e fotodocumentados em sistema digital L-Pix Image – Versão 1.21 (Loccus Biotecnologia).

C. Análise dos dados

Os dados gerados nas análises dos géis foram compilados em uma planilha na forma de variáveis binárias, ou seja, “1” para presença e “0” para ausência de bandas.

A dissimilaridade genética foi estimada pelo Coeficiente de Jaccard e o agrupamento dos indivíduos pelo método UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetical Average), utilizando-se o Programa Genes - versão 1.0.0 (CRUZ, 2001). Empregou-se também o Método de Tocher, por meio do software Selegen Reml-Blup (RESENDE, 2007), para determinação do número de grupos formados. O *software* STRUCTURE 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2010) foi utilizado para inferir a estrutura das famílias baseada em seus genótipos.

Resultados e Discussão

A partir dos dez *primers* foram geradas 104 bandas, perfazendo uma média de 10,4 bandas por *primer*. Esse resultado foi semelhante à média de bandas por *primer* obtida por Barros et al. (2005) em *Stylosanthes macrocephala* (10,7) e superior ao obtido por Chiari et al. (2010) ao analisar 200 indivíduos de *S. guianensis* (6,9) com nove dos dez *primers* utilizados nesse trabalho.

Das 104 bandas obtidas com os dez *primers*, 93 foram polimórficas (89,42%). Kazan et al. (1993), utilizando 200 marcadores RAPD, encontraram um nível de polimorfismo bastante inferior para *S. guianensis* (25,6%) e Vander-Stappen et al. (1999), utilizando 18 locos de microssatélites, que são mais polimórficos comparados aos marcadores RAPD, observaram 45% de polimorfismo em *S. guianensis*. O elevado polimorfismo pode ser devido à utilização de *primers* previamente selecionados em trabalhos anteriores para esse fim (CHIARI et al., 2010).

A dissimilaridade entre os indivíduos variou de 0 (zero), entre os indivíduos 21D e 23C, a 0,55, entre os indivíduos 20A e 48C. Esse resultado foi corroborado pelo

1. Aluno de Ciências Biológicas, Bolsista PIBIC/CNPq, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS. E-mail: rebecca.ulbricht@hotmail.com

2. Pesquisador da Área de Melhoramento Genético Vegetal, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, CEP 79002-970. E-mail: rosangela@cnpgc.embrapa.br

3. Pesquisador da Área de Melhoramento Genético Vegetal, Embrapa Gado de Corte, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Campo Grande, MS, CEP 79002-970. E-mail: lchiari@cnpgc.embrapa.br

Apoio financeiro: UNIPASTO e CNPq.



dendrograma obtido pelo método UPGMA (dados não apresentados) e, em magnitude, foram semelhantes ao obtido por Faleiro et al. (2003), que utilizou marcadores RAPD na análise de 35 acessos de *S. guianensis* (variação de 0,04 a 0,54). Pelo método de Tocher (Tab. 1) o indivíduo 20A ficou isolado em um grupo, separado dos seus meios-irmãos. Esses resultados foram corroborados pela análise de *Cluster* (*Software Structure* – PRITCHARD et al., 2010). Evidenciou-se a formação de grupos compostos de indivíduos da mesma família ou de diferentes, com base em todos os métodos de análise empregados. Isso indica diversidade entre e dentro de famílias (Fig. 2), e favorece o programa de melhoramento da espécie pela estratégia adotada.

A análise de agrupamento pelo método de Tocher resultou na formação de 35 grupos (Tab. 1), sendo que as progênes de 11 famílias (1, 8, 10, 13, 17, 19, 28, 33, 40, 42 e 44) ficaram alocadas em um mesmo agrupamento, e 15 grupos foram compostos por apenas um indivíduo cada. Uma menor dissimilaridade entre os indivíduos de uma mesma família era esperada em função do sistema de reprodução, do tipo misto para a espécie, e pela taxa de cruzamento de 0,26 estimada (SANTOS-GARCIA et al., 2011) com base em marcadores microssatélites. Entretanto, os grupos formados com base na análise pelo Método de Tocher, juntamente com os resultados do dendrograma obtido pelo método UPGMA, sugerem que existe divergência genética suficiente para distribuir indivíduos de uma mesma família em subgrupos diferentes.

A plotagem dos agrupamentos baseada no modelo que infere estrutura de “populações”, com base em dados de genótipos obtidos de marcadores (*Software Structure* – PRITCHARD et al., 2010), resultou na formação de seis grupos (Fig. 1). Santos-Garcia et al. (2009) obtiveram cinco grupos a partir da avaliação de 134 acessos de *S. macrocephala* e nove grupos utilizando 150 acessos de *S. guianensis*. Dois grupos foram compostos por todos os indivíduos de uma mesma família (45A, 45B, 45C, 45D/ 48A, 48B, 48C, 48D), ou seja, há alta similaridade entre eles e menor similaridade com as outras famílias, com base nos genótipos analisados. No dendrograma obtido pelo Método UPGMA os quatro indivíduos das famílias 45 e 48 também foram alocados em um mesmo grupo, e no agrupamento pelo Método de Tocher (Tab. 1), três indivíduos dessas duas famílias foram inseridos em um mesmo grupo. Isso demonstra que, apesar da utilização de três diferentes métodos de análise, houve corroboração no agrupamento de alguns indivíduos, o que sugere maior confiabilidade aos dados obtidos.

Observou-se também elevada similaridade entre indivíduos de famílias diferentes (Fig. 2), muitos desses alocados em um mesmo agrupamento pelo método de Tocher (Tab. 1).

A variabilidade genética observada entre e dentro das famílias nesse terceiro ciclo de seleção recorrente VANDER- STAPPEN, J.; WELTJENES, I.; VOLCKAERT, G. Microsatellite markers in *Stylosanthes*

intrapopulacional em *S. guianensis* não será o fator de restrição, em termos de tamanho efetivo, para a continuidade e realização de novos ciclos seletivos em médio prazo.

Agradecimentos

À UNIPASTO pelo apoio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio financeiro e pela bolsa de Iniciação Científica.

Referências

- BARROS, A. M.; FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T et al. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.40: 899-909, 2005.
- BRANDÃO, M. Plantas forrageiras do cerrado. **Informativo Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.173, p. 36-39, 1992.
- CHIARI, L.; RESENDE, R. M. S.; MATIDA, E. T. Mating system parameters in *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. based on RAPD markers. **African Journal of Biotechnology** 9: 5820-5822, 2010.
- CHIARI, L.; VALLE J. V. R do.; RESENDE, R. M. S. **Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis***. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. 6p. (Embrapa Gado de Corte. Circular Técnica, 36), 2009.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES** – versão Windows. Editora UFV, Viçosa, 642p, 2001.
- FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. de et al. Diversidade Genética de uma Coleção de Trabalho de *Stylosanthes guianensis* com base em marcadores RAPD. **In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2003.
- KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; CAMERON, D. F. Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genome** 36: 43-49, 1993.
- PRITCHARD, J. K; STEPHENS, M; DONNELLY, O. *Structure Software: Version 2.3.3*. 2002. Disponível em: <<http://pritch.bsd.uchicago.edu>> Acesso em: 07 set. 2011.
- RESENDE, M. D. V. **Selegen – Reml/Blup**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2007. 359 p.
- SANTOS- GARCIA, M. O.; RESENDE, R. M. S.; CHIARI, L. et al. Mating systems in tropical forages: *Stylosanthes capitata* Vog. and *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) SW. **Euphytica** 178: p.185-193, 2011.
- SANTOS- GARCIA, M. O.; SASSAKI, R. P.; FERREIRA, T. H. S. Tropical Forage Legumes: II Genetic Diversity in *Stylosanthes macrocephala* Ferr. Et Costa, 2009.
- guianensis*. **Molecular Ecology** 8: p.514-517, 1999.



Tabela 1. Agrupamento dos 202 indivíduos pertencentes a 52 acessos de *S. guianensis* obtido pelo método de otimização de Tocher modificado.

Grupos	Indivíduos	Grupos	Indivíduos
1	4A, 4B, 4D, 5B, 5C, 6A, 6D, 7B, 7C, 7D, 8A, 8B, 8C, 8D , 9A, 9B, 10A, 10B, 10C, 10D , 11C, 11D, 12C, 12D, 13A, 13B, 13C, 13D , 15A, 15B, 17A, 17B, 17C, 17D , 18A, 18B, 19A, 19B, 19C, 19D , 20B, 20C, 20D, 21B, 21C, 21D, 22A, 22C, 23A, 23B, 23C, 24A, 24D, 25D, 26B, 27A, 27B, 27D, 28A, 28B, 28C, 28D , 29A, 29B, 29C, 31D, 32A, 32B, 32C, 33A, 33B, 33C, 33D , 34C, 34D, 36D, 37A, 37B, 37D, 38B, 38C, 38D, 39A, 39B, 40A, 40B, 40C, 40D , 41C, 41D, 42A, 42B, 42C, 42D , 43A, 43B, 43C, 44A, 44B, 44C, 44D , 46C, 47A, 47B, 49B, 49D, 51B	15	2D, 3C
2	48A, 48B, 48C	16	15D, 16A, 16C
3	6B, 11A, 11B, 16D, 24B, 32D, 47C	17	31C, 50C
4	29D, 31A, 35A, 35C, 36A, 39C, 41A, 41B, 45A, 45C, 45D, 46A	18	25A, 26A, 47D
5	2B, 4C, 6C, 7A, 14C, 16B, 22B, 23D, 25B, 39D, 50D	19	22D, 24C
6	1A, 1B, 1C, 1D , 9D, 26C, 51A	20	34B, 46B
7	31B, 35D, 36C, 38A, 43D	21	25C
8	49A, 49C, 51C, 52A, 52B	22	5A
9	14B, 27C, 30B	23	50B
10	3D, 36B, 37C	24	52C
11	34A, 50A	25	18C
12	30A, 30D	26	15C
13	3A, 3B	27	9C
14	12A, 12B, 30C, 35B	28	45B
		29	2A
		30	21A
		31	51D
		32	2C
		33	18D
		34	20A
		35	48D

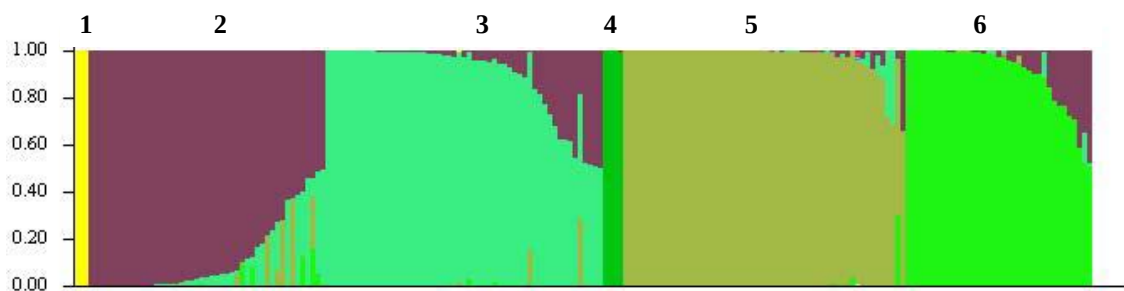


Figura 1. Plotagem do agrupamento obtido com base na análise de 202 indivíduos de 52 famílias de *S. guianensis* por meio de marcadores RAPD.



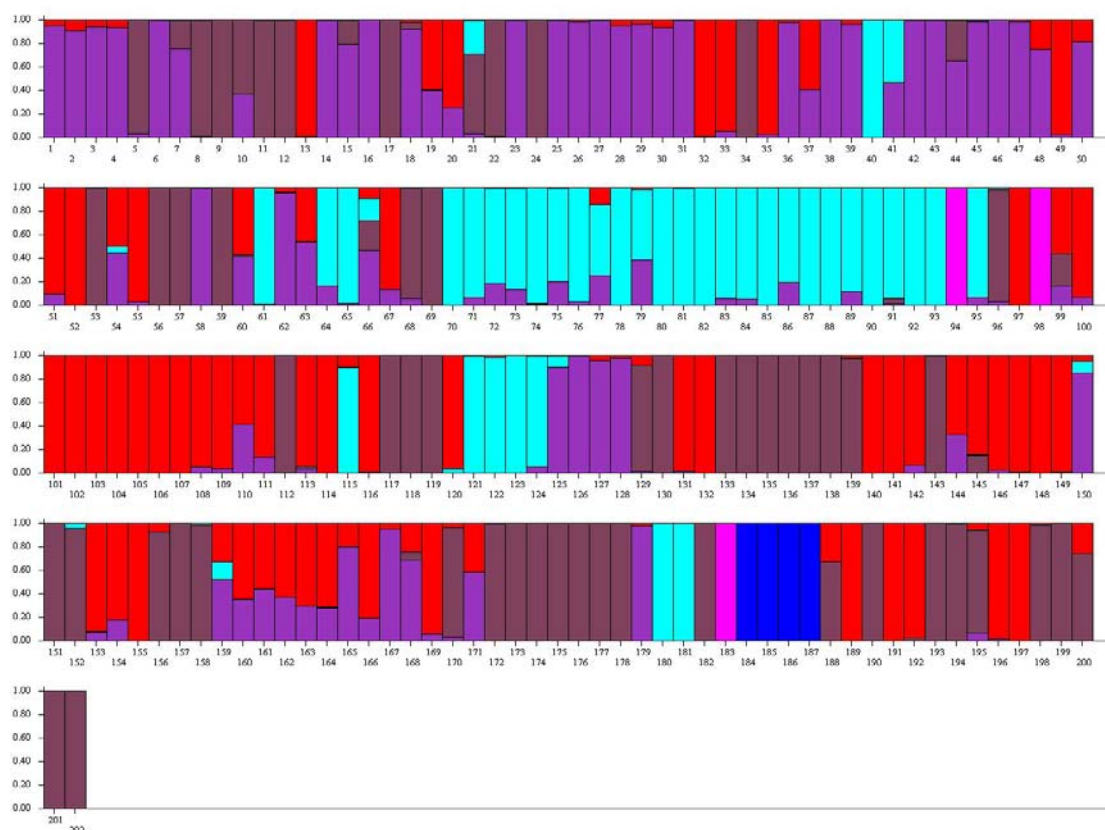


Figura 2. Plotagem dos 202 indivíduos de *S. guianensis*, na ordem original por famílias, como resultado da análise da diversidade genética por meio de marcadores RAPD.