

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Análise comparativa da pureza genética das leguminosas forrageiras *Stylosanthes capitata* Vog. e *Stylosanthes macrocephala* M.B Ferr. Et Sousa Costa utilizando marcadores moleculares

Letícia Gobett dos Santos

Dissertação apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
USP, como parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: BIOLOGIA COMPARADA

RIBEIRÃO PRETO / SP

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Análise comparativa da pureza genética das leguminosas forrageiras *Stylosanthes capitata* Vog. e *Stylosanthes macrocephala* M.B Ferr. Et Sousa Costa utilizando marcadores moleculares

Letícia Gobett dos Santos

Orientador: Carlos Alberto Martinez y Huaman

Dissertação apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
USP, como parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: BIOLOGIA COMPARADA

RIBEIRÃO PRETO / SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Gobett dos Santos, Letícia

Análise comparativa da pureza genética das leguminosas forrageiras *Stylosanthes capitata* Vog. e *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferr. et Sousa Costa utilizando marcadores moleculares

Ribeirão Preto, 2014.

49 p. il. ; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Área de concentração: Biologia Comparada; Botânica.

Orientador: Martinez y Huaman, Carlos Alberto

1. Forrageiras 2. Marcadores moleculares 3. Pureza Genética 4. *Stylosanthes*

Aos meus amados pais, Valéria e Sebastião, dedico

Agradecimentos

Inúmeras pessoas contribuíram neste trabalho, seja direta ou indiretamente. De qualquer forma, todas foram fundamentais para o seu desenvolvimento e para a minha formação. A todos agradeço imensamente. Em especial, agradeço:

À agência de fomento CAPES, pelo investimento em minha carreira acadêmica.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Martinez y Huaman do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, por me orientar com sabedoria e paciência, sendo um grande modelo de pesquisador.

À Profa. Dra. Ana Lília Alzate-Marin do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por ceder o espaço do Laboratório de Genética Vegetal e por ajudar na estruturação deste trabalho.

À toda a equipe do Laboratório de Fisiologia Vegetal: Andressa, Eduardo, Laís, Lucas, Maria Teresa, Matheus, Tathyana e Vitor; vocês são responsáveis por tornar momentos difíceis em momentos de alegria. Muito obrigada por esses anos de companheirismo. Vocês formam a melhor equipe de trabalho que eu poderia desejar.

À todos os membros do Laboratório de Genética Vegetal; Fernando, Paulo e Diana: muito obrigada por toda a ajuda, aprendizado e risadas. Nossos momentos juntos foram muito especiais pra mim. Marcela, obrigado por me ensinar a dar meus primeiros passos dentro da Genética Vegetal. Rômulo, sou extremamente grata por todos os momentos que você pacientemente ouviu minhas dúvidas e me guiou para as respostas. Este trabalho não teria acontecido se não fosse por cada um de vocês.

Ao meu pai, por ser muito mais que um exemplo de perseverança, mas por ser um pai carinhoso e dedicado e por sempre ter se sacrificado pela família.

À minha mãe, por sempre ter me educado e aconselhado com muita sabedoria, paciência e amor, sempre estando ao meu lado nos momentos mais difíceis.

À minha querida irmã, por ser minha melhor amiga, estando sempre presente, mesmo que em outro estado.

A todos os meus familiares, por sempre comemorarem comigo todas as minhas conquistas e por alegrarem todo segundo sábado do mês.

Ao meu namorado, Ricardo, por sempre me dar força e se preocupar com o meu bem-estar. Obrigado por ser tão carinhoso, atencioso e companheiro. Você me faz sentir muito amada. Eu te amo.

Aos amigos da 45ª Turma de Biologia, mas principalmente àqueles que se mantiveram mais próximos a mim: Cris, Amau, Guilherme, Angelo, Nil, João Marcelo, Gabriel, Felipe e Vinícius. Amo muito todos vocês.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, em especial ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de aprendizado e por estar preparada para formar grandes profissionais.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Biologia da FFCLRP, por serem ótimos profissionais que foram fundamentais na minha formação acadêmica.

À FAPESP, pelo apoio financeiro para o Projeto Temático 08/58075-8, coordenado pelo Prof. Carlos Alberto Martinez y Huaman, no qual esta pesquisa esteve associada.

Sumário

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. O Gênero <i>Stylosanthes</i> Sw.....	12
1.1.1. Características morfológicas do gênero <i>Stylosanthes</i>	14
1.1.2. <i>Stylosanthes capitata</i> Vog.: Descrição Botânica	15
1.1.3. <i>Stylosanthes macrocephala</i> M.B. Ferr. et S. Costa sp. N.: Descrição Botânica ..	17
1.2. A Cultivar Estilosantes Campo Grande (ECG)	19
1.3. Marcadores Moleculares	20
1.4. A Importância de Estudos de Pureza Genética.....	23
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Identificação e seleção de marcadores moleculares ISSR, RAPD e SSR para caracterizar a pureza genética de sementes que apresentam diferentes colorações	26
3.1.1. Plantio e Coleta do Material Biológico	26
3.1.2. Extração e Quantificação do DNA	27
3.1.3. Marcadores Moleculares Investigados.....	27
3.1.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	27
3.1.5. Eletroforese e Coloração dos Géis	29
3.1.6. Leitura dos Géis	29
3.2. Avaliação da pureza genética das plantas da espécie <i>S. capitata</i> plantadas em campo em sistema Trop-T-FACE, utilizando de marcadores moleculares previamente selecionados.	29
3.2.1. Plantio e Coleta do Material Biológico	29
3.2.2. Extração e Quantificação do DNA	31
3.2.3. Marcadores Moleculares Utilizados.....	31

3.2.4.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
3.2.5.	Eletroforese e Coloração dos Géis	31
3.2.6.	Leitura dos Géis	31
3.2.7.	Análise Estatística	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1.	Identificação e seleção de marcadores moleculares ISSR, RAPD e SSR para caracterizar a pureza genética de sementes que apresentam diferentes colorações	33
4.2.	Avaliação da pureza genética das plantas da espécie <i>S. capitata</i> plantadas em campo em sistema Trop-T-FACE, utilizando de marcadores moleculares ISSR	36
5.	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

RESUMO

Leguminosas do gênero *Stylosanthes* são amplamente utilizadas na pecuária Brasileira e por sua alta qualidade nutricional são importantes para pastagens em consórcio com gramíneas. Um dos materiais mais cultivados é o denominado “Campo Grande”, lançado pela EMBRAPA Gado de Corte e formado pela mistura das espécies *Stylosanthes capitata* Vog. (80%) e *Stylosanthes macrocephala* M.B Ferreira et Sousa Costa (20%). De ambas as espécies que formam essa mistura, a espécie *S. capitata* vem sendo utilizada na pesquisa do Projeto Temático FAPESP Nº 08/58075-8 “*Experimentos FACE para analisar os efeitos do elevado CO₂ e do aquecimento sobre a fotossíntese, expressão gênica, bioquímica, crescimento, dinâmica de nutrientes e produtividade de duas espécies forrageiras tropicais contrastantes*” que tem por objetivo determinar os efeitos do elevado nível de CO₂ e do aquecimento nas espécies forrageiras *S. capitata* e *Panicum maximum* crescendo em consórcio. Antes do plantio, foi observado que o lote de sementes de *S. capitata*, enviadas gentilmente pela EMBRAPA Gado de Corte, apresentava sementes de diversa coloração desde amarelas, vermelhas até pretas. Em vista que a análise da expressão gênica das plantas submetidas aos tratamentos de CO₂ e temperatura é um dos objetivos do projeto, surgiu a necessidade de fazer uma avaliação mais rigorosa das sementes a fim de determinar a pureza genética do lote de sementes de *S. capitata*, assim como determinar a presença de possíveis contaminações com *S. macrocephala*. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a pureza genética de plantas da espécie *S. capitata* em comparação a *S. macrocephala*, selecionando e utilizando marcadores moleculares ideais para essa análise. Para a etapa de seleção dos marcadores, foram plantadas separadamente as sementes de diferentes cores de cada uma das espécies *S. capitata* e *S. macrocephala*. Depois de germinadas, o DNA das folhas foi extraído e analisado com os três tipos de marcadores moleculares disponíveis, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) e ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat polymorphic DNA*). Os marcadores moleculares RAPD (OPB10), SSR (SC18-01B3, SC18-01E11, SC18-01TF11A) e ISSR (UBC1, UBC2, UBC834, UBC851, UBC862, UBC864, UBC885, UBC886) foram testados, dos quais os ISSR mostraram-se ideais, pois apresentaram claros perfis eletroforéticos diferenciando cada uma das espécies. Posteriormente à análise das sementes, foi realizada a análise de pureza genética de material vegetal de *S. capitata* plantado no campo para o referido projeto temático. Uma vez que *S. macrocephala* não foi objeto de pesquisa do projeto, sementes desta espécie foram plantadas separadamente em oito vasos, com vinte sementes cada. Após o crescimento das plantas, o DNA de folhas de ambas as espécies foi extraído e amplificado com os marcadores moleculares ISSR previamente selecionados. Através de análises estatísticas dos perfis de eletroforese, foi possível verificar que as sementes de diferentes cores pertencem à mesma espécie e que a diferente coloração estaria mais relacionada com o grau de amadurecimento das sementes do que com possíveis contaminações. No entanto, independentemente da cor, os lotes individuais de sementes de *S. capitata* e *S. macrocephala* apresentaram algum grau de contaminação. Assim, conclui-se que para a melhor caracterização da espécie em estudo e aumentar a confiabilidade das análises de expressão gênica diferencial é necessário avaliar a pureza genética de *S. capitata* usando marcadores moleculares. A análise da expressão gênica diferencial permitirá determinar os efeitos de elevada concentração de CO₂ e da elevada temperatura a nível molecular nas plantas forrageiras em estudo.

Palavras-chave: Forrageiras; Marcadores moleculares; Pureza Genética; *Stylosanthes*.

ABSTRACT

Legumes of the genus *Stylosanthes* are widely used in Brazilian cattle and for their high nutritional quality are important in consortium with grasses. One of the most cultivated materials is called "Campo Grande" released by EMBRAPA Gado de Corte and formed by the mixture of species *Stylosanthes capitata* Vog. (80%) and *Stylosantes macrocephala* MB Ferreira et Sousa Costa (20%). Of both species forming this mixture, the species *S. capitata* has been used in research of the Thematic Project FAPESP No. 08/58075-8 "FACE experiments to analyze the effects of elevated CO₂ and warming on photosynthesis, gene expression, biochemistry, growth, nutrient dynamics and productivity of two contrasting tropical forage species" that aims to determine the effects of high levels of CO₂ and warming on forage species *S. capitata* and *Panicum maximum* growing in consortium. Before planting, it was observed that the lot of seeds of *S. capitata*, kindly sent by EMBRAPA, presented seeds of different coloration from yellow, red to black. Given that the analysis of gene expression in plants exposed to elevated CO₂ and warming is one of the major objectives, we decided to make a more accurate assessment of the seeds in order to determine the genetic purity of the seeds of *S. capitata*, as well as determine the presence of possible contamination with *S. macrocephala*. Therefore, this study aimed to evaluate the genetic purity of the species *S. capitata* plants compared to *S. macrocephala*, selecting and using ideal molecular marker for this analysis. For the selection of markers, were separately planted in pots the seeds of different colors of each of the species *S. capitata* and *S. macrocephala*. Once germinated, DNA was extracted from leaves and analyzed with the three available types of molecular markers, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat) and ISSR (Inter-simple sequence Repeat Polymorphic DNA). The RAPD molecular markers (OPB10), SSR (SC18-01B3, SC18-01E11, SC18-01TF11A) and ISSR (UBC1, UBC2, UBC834, UBC851, UBC862, UBC864, UBC885, UBC886) were tested, of which the ISSR were the selected, because they showed clear electrophoretic profiles differentiating each species. After the seed analysis, the analysis of genetic purity of plant material of *S. capitata* planted in the field for the thematic project was held. Once *S. macrocephala* was not the object of the research project, seeds of this species were planted separately in eight pots, with twenty seeds each. After the growth of plants, DNA from leaves of both species was extracted and amplified with the preselected molecular ISSR. Through statistical analysis of electrophoretic profiles, we found that seeds of different colors belong to the same species and the different coloring would be more related to the degree of ripening of seeds than with possible contamination. However, regardless of color, individual seed lots of *S. capitata* and *S. macrocephala* showed contamination. Thus, it is concluded that for better characterization of this species and increase the reliability of the analysis of differential gene expression is necessary to assess the genetic purity of *S. capitata* using molecular markers. The analysis of differential gene expression will determine the effects of elevated CO₂ concentration and high temperature at the molecular level in forage plants under study.

Keywords: Forage; Molecular markers; Genetic Purity; *Stylosanthes*.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária é uma das principais atividades econômicas do Brasil. Segundo o balanço divulgado recentemente pela Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC), o país é o maior fornecedor de carne bovina, atingindo o valor recorde de 147,8 mil toneladas de carne bovina apenas no mês de outubro de 2013 (CNPIC, 2013). Uma parcela superior a 90% do rebanho produzido no Brasil é alimentada em sistemas baseados exclusivamente em pastagens, que ocupam uma área aproximada de 160 milhões de hectares. Em relação aos sistemas confinados, as pastagens apresentam menor produtividade, mas conferem grande vantagem competitiva, pois permite a obtenção de produtos com baixo custo e de boa qualidade (Barcellos et al., 2001; Euclides et al., 2001). No entanto, atualmente, estima-se que cerca de 80% das áreas com pastagens cultivadas no Brasil, estão degradadas ou em algum estágio de degradação (Karia, 2008). Assim, a perda da capacidade de produção das pastagens atribuída a diversos fatores, como o estabelecimento de cultivares não adaptadas para o local, o manejo inadequado das pastagens, insuficiência ou inexistência de correção e manutenção da fertilidade do solo (Barcellos et al., 2001; Vilela et al., 2004; Macedo, 2005), é um tema preocupante na pecuária brasileira.

O desenvolvimento de alternativas para a manutenção ou restabelecimento da capacidade produtiva das pastagens cultivadas é fundamental para alcançar a sustentabilidade e a intensificação da atividade pecuária no Brasil. A utilização de leguminosas para a incorporação de nitrogênio da atmosfera e a integração dos sistemas de produção de grãos com a pecuária apresentam-se, portanto, como opções potencialmente viáveis para atender essa demanda (Karia, 2008).

A utilização de leguminosas em pastagens, além da incorporação de nitrogênio, também contribui para melhorar a qualidade da dieta animal, pois essas plantas possuem maior teor proteico do que as gramíneas. Leguminosas são amplamente empregadas em pastagens em regiões de clima temperado, entretanto, em áreas tropicais, essa prática é ainda pouco difundida. As espécies do gênero *Stylosanthes* se encontram entre as mais

importantes leguminosas utilizadas em pastagens nas regiões tropicais e subtropicais devido à sua alta tolerância a seca e à sua capacidade adaptativa a solos de baixa fertilidade (Barros et al., 2005), sendo também cultivadas com a intenção de aumentar a qualidade do solo através da fixação de nitrogênio (Santos-Garcia et al., 2011).

O gênero *Stylosanthes* possui várias espécies, amplamente distribuídas pelo continente americano, e apresenta grande variação de formas e tipos, resultantes da evolução de ecótipos submetidos às diferentes condições de clima, solos e pressões bióticas (Burt, 1984; Barros et al., 2005). A maioria das espécies é colonizadora e tem como habitat regiões de baixa precipitação pluvial, com solos de baixa fertilidade natural, pobres em cálcio e fósforo e com elevado teor de alumínio (Karia, 2008). *Stylosanthes* sp. também possuem grande potencial de utilização em outros sistemas agrícolas, seja em consorcio com gramíneas, como adubo verde, planta de cobertura das entrelinhas em culturas perenes, ou como planta para proteção do solo e recuperação de áreas degradadas (Cameron & Chakraborty, 2004).

1.1. O Gênero *Stylosanthes* Sw.

A maioria das espécies do gênero *Stylosanthes* é distribuída em regiões tropicais, subtropicais e de temperaturas quentes da América Latina (Santos et al., 2009; Santos-Garcia et al., 2011), mas podem ser encontradas em um intervalo de 77° de latitude, entre 36°S a 41°N, ou seja, da Argentina aos Estados Unidos (Williams et al., 1984; Karia, 2008). Existem dois principais centros de diversidade do gênero na América; o primeiro situa-se no Brasil Central (Ferreira & Costa, 1979; Stacy & Cameron, 1984), onde se observa o maior endemismo e a maior variação fenotípica inter e intraespecífica e é onde podemos encontrar 45% de todas as espécies do gênero *Stylosanthes* (Karia, 2008; Santos et al., 2009; Santos-Garcia et al., 2011). O segundo centro de diversidade corresponde à região composta pelo México e Caribe, na América Central (Stace & Cameron, 1984). Na África, ocorrem quatro espécies: *S. erecta*, *S. suborbiculata*, *S. sundaica* e *S. fruticosa*, sendo que esta última também é encontrada na Península da Arábia, Índia, Sri Lanca e Madagascar (Karia, 2008). Na Indonésia, Malásia, Tailândia e Timor observa-se a ocorrência da espécie *S. sundaica* (Costa, 2006 apud. Karia, 2008).

Atualmente, são reconhecidas 48 espécies, das quais 44 são exclusivas do continente americano (Santos et al., 2009; Santos-Garcia et al., 2011). No Brasil, ocorrem 29 espécies, sendo que 13 delas são encontradas apenas em território nacional, porém, a utilização agrônômica se restringe as espécies *S. capitata*, *S. macrocephala* e *S. guianensis*, pois apresentam maior potencial agrônômico em avaliações conduzidas nos últimos 30 anos, especialmente na região do Cerrado (Karia & Andrade, 1996).

O gênero *Stylosanthes* pertence à subtribo *Stylosanthinae*, tribo *Aeschynomeneae*, subfamília *Papilionoideae*, família *Leguminosae* (Karia, 2008). Foi estabelecido, em 1788, por O. Swartz, com duas espécies: *S. procumbens* (= *S. hamata* (L.) Taub.) e *S. viscosa* Sw. Em 1938, Vogel reconheceu 15 espécies divididas em duas seções: *Stylosanthes* e *Styposanthes*. A primeira seção agrupa as espécies em que a flor não é sustentada por um eixo rudimentar e possui uma bractéola interna, como é o caso da *S. guianensis*. Na segunda seção, estão as espécies em que as flores apresentam um eixo rudimentar e uma ou duas bractéolas internas, como é visto nas espécies *S. capitata* e *S. macrocephala* (Ferreira & Costa, 1979; Karia, 2008). Na seção *Styposanthes* Vogel são encontradas espécies diploides ($2n=20$) como *S. macrocephala*, espécies tetraploides ($2n = 40$) como *S. capitata* ou hexaploides ($2n=60$) como *S. erecta*. Na seção *Stylosanthes* Vogel são encontrados somente diploides ($2n=20$) como *S. guianensis*. A exceção de *S. capitata*, acredita-se que todos os táxons poliploides são procedentes de hibridização entre diploides, seguida de poliploidização (Stace & Cameron, 1984; Gillies & Abbott, 1996).

A distinção das espécies dentro do gênero tem sido baseada em muitas características morfológicas, como, por exemplo: formato das brácteas, presença ou ausência de xilopódio, número de artículos férteis do lomento, pilosidade do artículo e do caule, tamanho e formato dos folíolos e das inflorescências, tipo de venação e presença ou ausência de pilosidade nas vagens, e tamanho do apêndice terminal no artículo superior das vagens (Ferreira & Costa, 1979; Marnette, 1984; Karia, 2008). Porém, a ausência de caracteres morfológicos estáveis significa que a classificação do gênero *Stylosanthes* no nível de espécie é extremamente difícil, o que resultou em duas “escolas de pensamento” principais sobre quais são os caracteres úteis para a classificação do gênero (Marnette, 1984; Ferreira & Costa, 1979). Marnette (1984) enfatiza o comprimento e o grau de curvatura do bico da vagem como característica classificatória, em combinação com a

largura e venação das brácteas florais exteriores. Em contrapartida, Ferreira & Costa (1979) considera classificatório o número de feixes vasculares, inervação do folíolo e hábito de crescimento. Uma contradição resultante dessas diferentes maneiras de classificar as espécies é como membros do complexo *S. guianensis* foram classificados. Enquanto Ferreira & Costa (1979) considera que grande parte dos membros desse complexo é de outra espécie, Marnette (1984) os classificaram todos como sendo variedades dentro da espécie *S. guianensis* (Gillies & Abbott, 1996).

Atualmente, uma série de outras técnicas, envolvendo análises citológicas e moleculares, estão sendo utilizadas para auxiliar na taxonomia do gênero: eletroforese de proteínas de sementes (Robinson & Megarrity, 1975); eletroforese de isoenzimas (Robinson et al., 1980); bem como marcadores moleculares dos tipos RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Liu & Musial, 1995); RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Vieira et al., 1997; Gillies & Abbott, 1998); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Sawkins et al., 2001); ITS (*Internal Transcribed Spacer Region*) (Vander Stappen et al., 1998) STMS (*Sequence-Tagged Microsatellites Sites*) ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Vander Stappen et al., 1999) e polimorfismo de cpDNA (sequência de DNA de cloroplasto) (Liu & Musial, 2001).

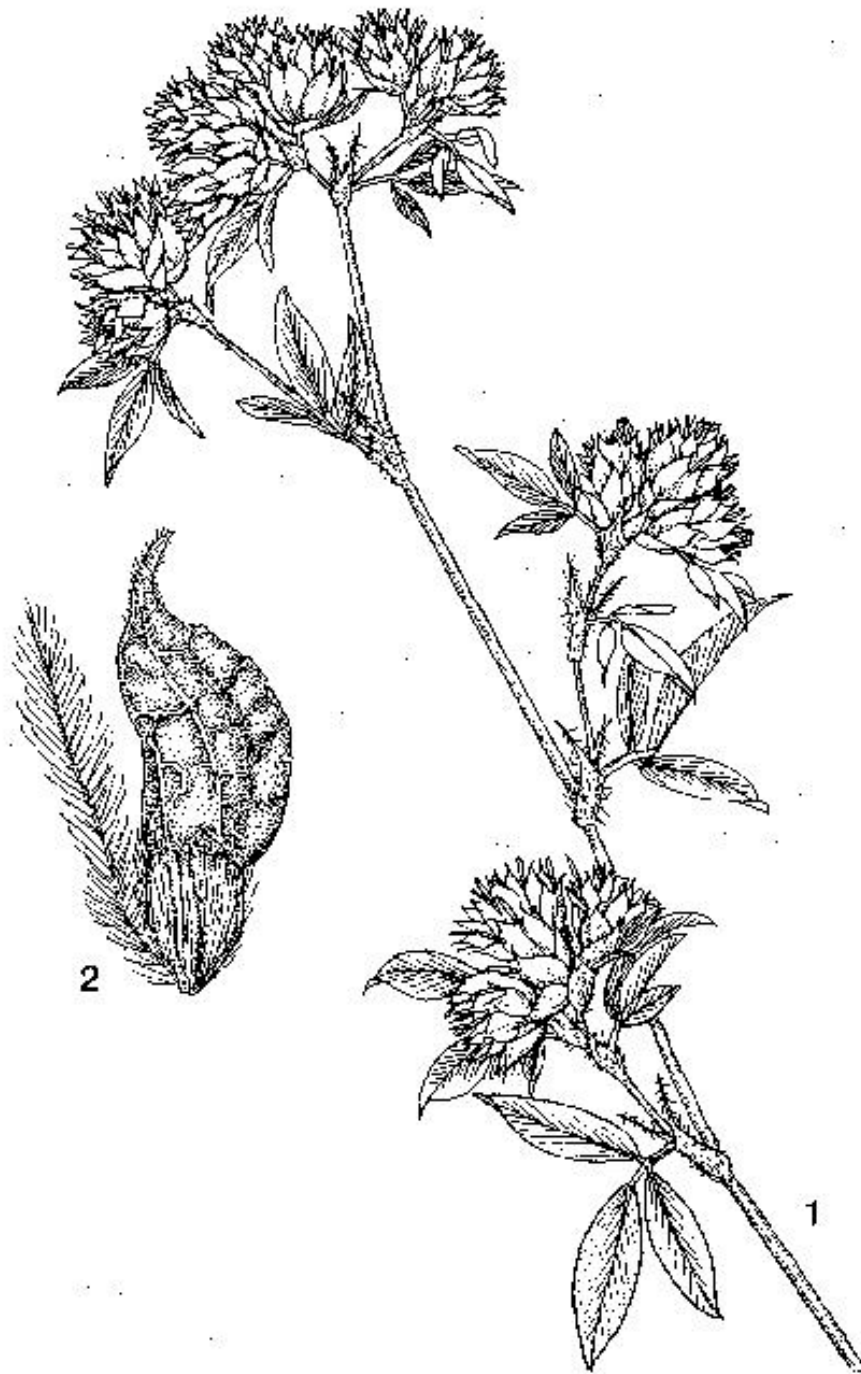
1.1.1. Características morfológicas do gênero *Stylosanthes*

O porte das plantas do gênero varia de herbáceo a subarborescente, podendo ser ereto, semiprostrado ou prostrado, com espécies anuais ou perenes. As folhas são trifolioladas e a inflorescência é do tipo espiga. As flores são protegidas por brácteas e bractéolas, com coloração que varia, geralmente, de amarelas a alaranjadas. Algumas espécies apresentam estrias púrpuras nas flores e outras podem possuir flores brancas. Como característica típica da subfamília *Papilionoideae*, a corola das flores apresenta pré-floração vexilar, composta de um estandarte, duas asas e uma quilha. O androceu é formado por dez estames monoadelfos e o gineceu por um ovário súpero, monocarpelar, com um ou dois óvulos, estilo alongado e glabro, dotado de estigma terminal. O fruto é uma vagem do tipo lomento, com um ou dois artículos férteis e um apêndice terminal persistente no ápice (estilete residual), que varia de tamanho conforme a espécie (Ferreira & Costa, 1979; Karia, 2008).

1.1.2. *Stylosanthes capitata* Vog.: Descrição Botânica

Subarbusto de ereto a prostrado, ramoso, sublenhoso, às vezes mostrando córtex suberoso na base dos caules; ramos cobertos com pelos claros densos e curtos, apresentando raras a muitas cerdas, sendo a pilosidade mais densa nos nós (Ferreira & Costa, 1979).

Folíolos de oblongos a elípticos, às vezes obovados, alcançando 30-40 mm de comprimento por 12-15 mm de largura, de ápice agudo ou mucronado, densamente piloso em ambas as faces; com 8-12 pares de nervuras conspícuas. Pecíolo com 2-6 mm de comprimento, densamente piloso, eixo de comprimento variável alcançando até 3,5 mm de comprimento; estípulas mais longas que largas, com 16-20 mm de comprimento (incluindo dentes) por 6-8 mm de largura; dentes com cerca de 1/3 de comprimento total, agudos; bainha pilosa-cerdosa com 2-3 pares de nervuras; espigas elípticas, mais longas que largas, de ovoides a oblongas, multifloras, com 20-40 mm de comprimento por 1,5-2,5 mm de largura; brácteas oblongas com 9-13 mm de comprimento da ponta dos dentes até a base e 6-9 mm de largura; dentes curtos e largos, pilosos, pelos claros; bainha com 3-4 pares de nervuras conspícuas e reduzido folíolo central, frequentemente de cor avermelhada; bractéolas 2, ciliadas com 2-3 mm de comprimento. Eixo rudimentar presente, densamente ciliado alcançando o comprimento do lomento. Flores amarelas; cálice com 4-6 mm de comprimento, com 4 lobos ciliados; estandarte de orbicular a obovado com 4-6 de comprimento, sem estrias, ala e carena oblongas, com 4-5 mm de comprimento, auriculadas, na base. Lomento com 3-3,5 mm de comprimento por 2,2-2,5 mm de largura, reticulado, com 2 artículos férteis e o inferior às vezes abortado; o superior glabro e o inferior levemente pubescente; estilete uncinado com cerca de 1 mm de comprimento, às vezes com raros pelos. Semente variando de quase preta a amarela, por vezes mosqueada, com 2 mm de comprimento (Ferreira & Costa, 1979) (**Figura 1**).



Stylosanthes capitata Vogel - 1, habit flowering and fruiting branch; 2, fruit with axis rudiment.

Figura 1. *Stylosanthes capitata* Vogel – 1. Hábito de floração e frutificação dos ramos; 2. Fruto com eixo rudimentar (Mannetje & Jones, 1992).

1.1.3. *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferr. et S. Costa sp. N.: Descrição Botânica

Subarbusto, ramoso com 20-60 cm de altura; caule piloso, com muitas cerdas, por vezes esparsas e pelos claros; espícula obovada; bainha da estípula com 5-6 mm de comprimento, estreitos. Pecíolo com 1-2 mm de comprimento, piloso; folíolos pubescentes a glabros, com 20-55 mm de comprimento por 10-19 mm de largura, nas extremidades. Espigas ovoides, com 20-30 flores de 14-18 mm de comprimento com 10-15 mm de largura; brácteas imbricadas, largas, elípticas, de ápice bifido, as externas uni folioladas, pubescentes a cerdas, com 10-12 mm de comprimento por 8-9 mm de largura. Eixo plumoso, bractéolas 2, hialinas a subpaleáceas, oblongas, de ápice ciliado. Flores amarelas, cálice tubuloso excerto, com 5-7 mm de comprimento, com 4 lobos ciliados; vexilo obovoide ou oblongo com 4-5 mm de comprimento, amarelo-claro, sem estrias; ala e carena oblongas, com 5 mm de comprimento. Lomento suborbiculado, com 2 artículos férteis, reticulado, glabro, às vezes com glândulas sesséis no ápice, o superior com 3-4 mm de comprimento e 2,2-5 mm de largura, e o inferior menor (Ferreira & Costa, 1979).

Distingue-se de *S. capitata* por apresentar porte mais baixo, com inflorescências mais curtas e ovoides; brácteas menores e maior número de nervuras; estípula e bainha mais largas e curtas; dentes mais compridos e estreitos, enquanto que *S. capitata* apresenta dentes mais curtos e de base alargada; sementes amarelas, enquanto que *S. capitata* apresenta sementes tanto amarelas como mosqueadas (Ferreira & Costa, 1979) (**Figura 2**).



Stylosanthes macrocephala M.B. Ferreira & N.M. Sousa Costa – 1, habit of flowering and fruiting branch; 2, fruit with axis rudiment.

Figura 2. *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferr. et S. Costa – 1. Hábito de floração e frutificação dos ramos; 2. Fruto com eixo rudimentar (Mannetje & Jones, 1992).

1.2. A Cultivar Estilosantes Campo Grande (ECG)

Em 2000, foi liberada a cultivar Estilosantes Campo Grande (ECG), desenvolvida pela Embrapa Gado de Corte. Essa cultivar é uma mistura física de sementes, com 80% (em peso) de linhagens de *S. capitata*, tolerantes à antracnose, e 20% de linhagens de *S. macrocephala*. Essa cultivar se originou de plantas sobreviventes de um antigo campo de seleção de acessos de *Stylosanthes*, localizado na fazenda Maracujá, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Embrapa Gado de Corte, 2000; Karia, 2008). Após vários anos, as plantas sobreviventes, selecionadas naturalmente, apresentaram-se altamente vigorosas e tolerantes à antracnose (Milles & Grof, 1997). Posteriormente, dez novos acessos de *S. capitata* e cinco de *S. macrocephala*, com alta resistência à antracnose, foram pré-selecionados (sementes colhidas na fazenda Maracujá) e semeados em linhas intercaladas, de modo a facilitar o cruzamento entre plantas da mesma espécie, na Embrapa Gado de Corte para produtividade de forragem e de sementes (Embrapa Gado de Corte, 2000; Karia, 2008). As sementes colhidas de cada espécie foram novamente semeadas no ano seguinte, repetindo-se o procedimento durante seis gerações. Após esse período, as sementes de cada espécie foram colhidas separadamente, e posteriormente reunidas na proporção 4:1 (*S. capitata* : *S. macrocephala*). Essa população de plantas foi, então, submetida às avaliações necessárias para atestar a sua superioridade, culminando no cultivar ECG (Embrapa Gado de Corte, 2000; Karia, 2008).

A estratégia de se utilizar conjuntamente várias linhagens teve como objetivo evitar a pressão de seleção do patógeno da antracnose sobre um genótipo único e, dessa forma, dificultar a quebra da resistência à doença (Karia, 2008). Apesar da cultivar ser composta por linhagens geneticamente diferentes, estas possuem certas características fenotípicas uniformes, como em altura de plantas, época de florescimento e produção de sementes (Karia, 2008).

O florescimento dessa cultivar ocorre a partir da segunda quinzena de abril, nas condições de Campo Grande, e a maturação das sementes, no final da segunda quinzena de maio. Após a maturação dos frutos, ocorre a queda das inflorescências e folhas (Embrapa Gado de Corte, 2000). Em geral, as plantas sobrevivem no máximo por dois anos, em condições de pastejo. Logo, a manutenção do cultivar na pastagem se dá pela ressemeadura natural, principalmente em solos arenosos, onde a sobrevivência das novas plantas, no início

do período chuvoso, é maior. Assim, o manejo do pastejo do consórcio deve ser feito de modo a beneficiar as plantas jovens, buscando-se minimizar a sua competição com a gramínea. Portanto, no período de outubro a dezembro, antes do plantio e estabelecimento de novas plantas, o pastoreio deve ser mais intenso, de forma a deixar maior espaço para as novas plantas da leguminosa (Karia, 2008).

No Brasil, a ECG é usada principalmente para o melhoramento de pastagens, onde se domina o capim, já que tem boa capacidade de se desenvolver em consórcio com espécies de *Brachiaria* sp., *Panicum maximum* e *Andropogon gayanus*. Possui ótima adaptação a solos arenosos e de baixa fertilidade além de ser resistente ao pastoreio. A ECG demonstrou melhor performance em regiões como o Cerrado brasileiro, onde as estações secas são menos severas, contribuindo para a fixação de nitrogênio no solo e nutrição animal. É um cultivar que produz semente em abundância, sendo este seu principal mecanismo de persistência. Sua excelente performance estimula a demanda do mercado (Fernandes et al., 2005). O interesse na variedade ECG vem aumentando devido a: Boa adaptação a solos de baixa fertilidade e arenosos; Produção de 12-15t matéria seca/ha/ano; Alta produção de sementes (250-500kg/ha); Suas sementes são mais baratas do que as de *S. guianensis* cv. Mineirão; Resistente a antracnose; Persiste mesmo após grande período (aproximadamente cinco anos) de pastoreio, quando manejada juntamente com o capim *Brachiaria decumbens*; Fixação de 180kg/ha de nitrogênio; Aumento de 18-27% no peso do gado nas pastagens em consórcio com *B. decumbens*, quando comparadas com pastagens de capim apenas e Aumento da atividade biológica do solo, tornando a plantação de pastagens mais sustentável.

Como as sementes de ambas as espécies são produzidas e comercializadas juntas, fica claro que há probabilidade de ocorrer a contaminação de lotes quando as sementes dessas espécies forem comercializadas separadamente, principalmente se considerarmos a grande semelhança morfológica que existe entre elas.

1.3. Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são definidos como todo fenótipo molecular originário de um gene expresso, como isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA que pode ou não corresponder a regiões expressas do genoma. Podem ser utilizados para identificação de

genótipos, avaliações de germoplasma, mapeamento genético e também com potencial para análise de pureza genética e varietal em lotes de sementes (Ramos, 2004).

Entre as primeiras técnicas estudadas, encontram-se as baseadas em proteínas e isoenzimas. Proteínas podem ser usadas como marcadores para os genes que elas codificam. Diferenças na mobilidade das mesmas quando submetidas a um campo elétrico resultam das sequências distintas de nucleotídeos que codificam tais proteínas; logo, assume-se que diferenças nos padrões eletroforéticos das proteínas possuem base genética e são herdáveis, podendo ser empregadas com sucesso na certificação de pureza genética (Ramos, 2004). Porém, observou-se que a estabilidade das isoenzimas presentes nos diversos tecidos vegetais varia quando estes são submetidos a condições ambientais distintas, como alteração de temperatura, fotoperíodo, nutrição mineral, injúria mecânica e associação com microrganismos, comprometendo os resultados. Como alternativa, foi proposto o uso de técnicas baseadas em polimorfismos de DNA, que praticamente não se alteram com o ambiente e permite uma análise mais precisa (Pierce & Brewbaker, 1975).

As técnicas envolvendo DNA apresentam alto poder de resolução, com as diferenças entre indivíduos detectadas nas sequências de nucleotídeos distribuídas pelo genoma, que permitem distinção entre genótipos de forma mais objetiva (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Entre as técnicas disponíveis, as baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) oferecem vantagens em relação a outros métodos, pois utilizam reduzidas quantidades de DNA de origem e os perfis eletroforéticos são obtidos com maior rapidez (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Ramos, 2004).

O uso da enzima termoestável *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimerase é a base da técnica da PCR, necessária para a utilização de diversos marcadores, como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) e ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*). Esses marcadores também podem ser classificados como dominantes ou codominantes. Nesse caso, dominância não se refere ao conceito clássico de interação gênica entre alelos do mesmo loco, mas sim da visualização dos fragmentos amplificados. Então temos que, para marcadores dominantes, não é possível distinguir se o segmento observado foi originado a partir de uma ou duas sequências amplificadas, no caso de indivíduos heterozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990) tornaram-se muito populares para avaliar a diversidade genética em plantas com genoma ainda não sequenciado, já que não exigem o conhecimento prévio da sequência alvo a ser amplificada, usa pequenas quantidades de DNA, e são aplicáveis a qualquer espécie. RAPD foi o primeiro marcador molecular desenvolvido que baseia-se na técnica da PCR, e também é o mais simples (Williams et al., 1990; Abdel-Mawgood, 2012). É um marcador dominante, constituído de *primers* curtos (aproximadamente 10 bases) que são selecionados arbitrariamente e randomicamente para amplificar regiões aleatórias do genoma (Abdel-Mawgood, 2012). Um grande número de *primers* RAPD estão disponíveis comercialmente e, portanto uma grande quantidade de dados pode ser gerada através desta técnica. A principal desvantagem desse tipo de marcador é a difícil reprodutibilidade entre as diferentes corridas, devido ao pequeno comprimento dos *primers* e à baixa temperatura de anelamento (Abdel-Mawgood, 2012).

Os marcadores do tipo microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) são repetições em *tandem* de pequenas sequências nucleotídicas (de seis ou menos bases) (Reddy et al., 2002). São considerados os marcadores moleculares mais eficientes e mais informativos (Ashley, 2010), pois são codominantes, multialélicos e possuem elevado polimorfismo que fazem deles ideais para discriminação de genótipos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Além disso, têm-se demonstrado muito úteis em diferentes estudos genéticos de plantas e animais, mas ainda assim, o uso de microssatélites é limitado, pois o seu desenvolvimento requer o sequenciamento prévio do genoma da espécie a ser estudada, além de ser um marcador de alta complexidade e custo.

Os marcadores conhecidos como ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) amplificam regiões entre microssatélites que estão separados por um espaço de 100 a 3000 bp (Rakoczy-Trojanowska et al., 2004). O produto do PCR oriundo de *primers* de ISSR são loci indefinidos de SSR, ou seja, cada banda produzida corresponde a uma sequência de DNA delimitada por dois microssatélites (Abdel-Mawgood, 2012). Marcadores ISSR geralmente amplificam 25 a 50 fragmentos diferentes em uma reação de PCR, o que pode gerar um grande número de bandas (Rakoczy-Trojanowska et al., 2004), podendo dificultar a análise do gel. A maior vantagem dos ISSRs é o fato de que esses marcadores não exigem a construção prévia de uma biblioteca genômica, economizando tempo e dinheiro e, apesar

de ser um marcador dominante e randômico, estudos confirmaram que são eficientes em estudos filogenéticos, avaliação de diversidade genética e identificação de linhagens e espécies (Rakoczy-Trojanowska et al., 2004).

O uso de diferentes marcadores moleculares de natureza dominante e codominante é uma estratégia interessante para estudos de diversidade genética. Isto porque os primeiros apresentam uma ampla cobertura genômica e elevado índice de polimorfismos e os segundos são multialélicos e polimórficos, permitindo uma elevada resolução em estudos populacionais, embora a cobertura genômica seja limitada (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

1.4. A Importância de Estudos de Pureza Genética

A garantia de pureza genética é primordial em uma empresa produtora de sementes, sendo esta uma característica individual de cada semente e de controle muito delicado, pois pode ser afetada durante a produção, devido a polinizações não controladas. Além disso, a determinação de pureza genética é complexa, pois frequentemente as contaminações não provocam elevadas alterações fenotípicas, especialmente em plantas de polinização cruzada (Ramos, 2004).

A pureza genética é um dos requisitos para a comercialização de sementes, pois garante aos agricultores cultivares com as mesmas características desenvolvidas através do melhoramento genético. Assim, companhias de sementes e órgãos oficiais certificam a pureza genética das sementes para posterior comercialização (Vieira et al., 2001).

Segundo as regras da ISTA (1996) e o manual da AOSA (1991), a certificação da pureza genética pode ser realizada por meio de características morfológicas, fisiológicas, citológicas e bioquímicas (McDonald et al., 1994; Vieira et al., 2001), e no Brasil, muitos ainda adotam essa prática, como é o caso do feijão carioca, no qual os testes de pureza genética tem sido realizados principalmente por meio de marcadores morfológicos de sementes, plântulas e plantas na fase de florescimento e maturação (Vieira et al., 2001).

Entretanto, a maioria das características morfológicas é controlada por um número limitado de genes e as características bioquímicas e moleculares raramente têm efeito marcante no fenótipo, o que pode causar uma interpretação errada do genótipo (Gepts, 1991; Vieira et al., 2001). Neste sentido, ferramentas moleculares podem ser de grande

importância para a rápida identificação de cultivares e controle de possíveis contaminações em lotes de sementes. Assim, esta pesquisa foi realizada para testar a hipótese que Sementes de *Stylosanthes capitata* de diferente coloração mostram impureza genética detectada por meio de marcadores moleculares, e que os marcadores moleculares são ferramentas importantes para detectar a presença de híbridos em plantas de *S. capitata* e *S. macrocephala*.

2. OBJETIVOS

- Identificar e utilizar marcadores moleculares ISSR, RAPD e SSR para caracterizar a pureza genética e possível contaminação de lotes de sementes das espécies *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala* que apresentam diferentes colorações.
- Verificar a possível ocorrência de contaminação nas populações de plantas das espécies *S. capitata* e *S. macrocephala* utilizando marcadores moleculares selecionados;
- Avaliar a pureza genética das plantas da espécie *S. capitata* utilizado no Projeto Temático “*Experimento miniFACE para analisar os efeitos do elevado CO₂ e do aquecimento sobre a fotossíntese, expressão gênica, bioquímica, crescimento, dinâmica de nutrientes e produtividade de duas espécies forrageiras tropicais contrastantes*”, através do uso de marcadores moleculares previamente selecionados como ideais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Identificação e seleção de marcadores moleculares ISSR, RAPD e SSR para caracterizar a pureza genética de sementes que apresentam diferentes colorações

3.1.1. Plantio e Coleta do Material Biológico

Nesta pesquisa foram utilizados dois lotes de sementes individuais de cada uma das espécies *S. capitata* e *S. macrocephala*, que compõem a mistura “Estilosantes Campo Grande”, cedidas gentilmente pela EMBRAPA Gado de Corte.

No laboratório de fisiologia vegetal do Departamento de Biologia/FFCLRP as sementes de cada espécie foram separadas manualmente de acordo com sua coloração – vermelhas escuras, pretas e amarelas no caso de *S. capitata* (**Figura 3**) e sementes pretas e verdes no caso de *S. macrocephala* (**Figura 4**). Logo as sementes foram plantadas separadamente por cor e espécie em vasos contendo vermiculita. Dez dias após germinação foram amostradas folhas de 15 plântulas de *Stylosanthes capitata* (procedentes de 6 sementes de cor vermelha, 3 sementes de cor preta e 6 sementes de cor amarela) + 12 plântulas de *Stylosanthes macrocephala* (procedentes de 6 sementes de cor preta e 6 sementes de cor verde), as quais foram embaladas em papel alumínio e armazenadas em freezer à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da extração de DNA.



Figura 3. Sementes da espécie *Stylosanthes capitata* Vog. evidenciando as diferentes colorações de sementes de um mesmo lote: sementes pretas (A), sementes vermelhas (B) e sementes amarelas (C).



Figura 4. Sementes da espécie *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferr. et. S. Costa evidenciando as diferentes colorações de sementes de um mesmo lote: sementes pretas (A) e sementes verdes (B).

3.1.2. Extração e Quantificação do DNA

No laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética da USP/RP, 150 mg de DNA de cada amostra foi extraído, com base na metodologia desenvolvida por Alzate-Marin et al. (2009). A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop 1000), medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de tampão Tris-EDTA (TE), nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

3.1.3. Marcadores Moleculares Investigados

Para esta pesquisa foram testados um conjunto de vinte e cinco marcadores moleculares, sendo quinze marcadores ISSR de acordo com a lista oficial publicada pela universidade da Columbia Britânica em Canadá (UBC), seis marcadores RAPD e quatro marcadores microssatélites (SSR) desenvolvidos para *Stylosanthes capitata* por Santos et al. (2009) (**Tabela 1**).

3.1.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler® Eppendorf. Para os marcadores ISSR e RAPD, seguiram-se as seguintes condições: 1 ciclo 95°C por 10 minutos, 35 ciclos 95°C por 1 minuto, 50°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, 1 ciclo 72°C por 7 minutos, 4°C indefinidamente. Para cada reação de PCR, 1,0 ng/μL de DNA genômico foram utilizados em um volume total de 20 μL contendo 1x tampão de reação livre de MgCl₂ [75 mM Tris-HCl pH 9.0; 50mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄], 2,0 mM MgCl₂, 100 μM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,4 μM de cada *primer*

ISSR e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Para cada reação foi mantido um tubo contendo água MilliQ como controle negativo.

Tabela 1. Sequências dos marcadores moleculares testados

	Primer	Sequência 5' - 3'
RAPD	OPB03	CATCCCCCTG
	OPB04	GGACTGGAGT
	OPB05	TGCGCCCTTC
	OPB06	TGCTCTGCCC
	OPB09	TGGGGGACTC
	OPB10	CTGCTGGGAC
ISSR*	#UBC1	ACACACACACACACT
	#UBC2	GAGAGAGAGAGAGAGAT
	#UBC13	CTCTCTCTCTCTCTT
	#UBC820	GTGTGTGTGTGTGTGTC
	#UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
	#UBC845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG
	#UBC851	GTGTGTGTGTGTGTGTGYG
	#UBC858	TGTGTGTGTGTGTGTGRT
	#UBC860	TGTGTGTGTGTGTGTGRA
	#UBC862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC
	#UBC864	ATGATGATGATGATGATG
	#UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC
	#UBC885	BHBGAGAGAGAGAGAGA
	#UBC886	VDVCTCTCTCTCTCTCT
#UBC897	CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG	
SSR	SC18-01B3	F: TGGAGACAACACCCTTATG R: ATTCTATTACTCTTGCCTTTTCT
	SC18-01E11	F: GGCTAAAGAACGGCTAATG R: TCGAAAGATCCAAGAACAAA
	SC18-01C7	F: CTTCTTTATCCCCACCTTTTT R: AGCACACTCTTTGATGATGAG
	SC18-01TF11A	F: CCGACCAAGGGGGATGTC R: AAGTAGCAGCGGCGAGACC

*Nos ISSR N=(A,G,C,T), R=(A,G), Y=(C,T), B=(C,G,T), D=(A,G,T), H=(A,C,T), V=(A,C,G)

Para os marcadores SSR, seguiram-se as seguintes condições: 1 ciclo 94°C por 5 minutos, 30 ciclos 94°C por 1 minuto, 56-60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, 1 ciclo 72°C por 7 minutos, 4°C indefinidamente. Para cada reação de PCR, 2,5 ng/μL de DNA genômico foram utilizados em um volume total de 10 μL contendo tampão de reação 1X, livre de

MgCl₂ [75 mM Tris-HCl pH 9.0; 50mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄], 1,5 mM MgCl₂, 250 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µM de cada *primer* microsatélite (direto e reverso) e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Para cada reação foi mantido um tubo contendo água MilliQ como controle negativo.

3.1.5. Eletroforese e Coloração dos Géis

Os produtos de amplificação gerados com os marcadores moleculares foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida 8% não desnaturantes (ISSR e RAPD) e desnaturantes em géis de poliacrilamida 10% para os marcadores SSR. A visualização dos produtos de amplificação foi feita com nitrato de prata (20%) segundo protocolo de Sanguinetti et al. (1994). Fragmentos de diferentes mobilidades foram considerados alelos diferentes. Estimativas dos tamanhos dos produtos de amplificação em pares de bases foram feitas comparando-se com escalas alélicas de 50 pares de bases para marcadores RAPD e ISSR, e 10 pares de bases para SSR.

3.1.6. Leitura dos Géis

Para os marcadores dominantes (ISSR e RAPD), os indivíduos foram avaliados quanto à presença e ausência de bandas nos perfis eletroforéticos. Estimativas dos tamanhos dos produtos de amplificação em pares de bases foram realizadas comparando-se com um marcador de peso molecular de 50 pb (*Invitrogen*).

Para os marcadores microsatélites (SSR), fragmentos de diferentes mobilidades foram considerados alelos diferentes para os loci SSR. Estimativas dos tamanhos dos produtos de amplificação em pares de bases foram realizadas comparando-se com um marcador de peso molecular de 10 pb (*Invitrogen*).

3.2. Avaliação da pureza genética das plantas da espécie *S. capitata* plantadas em campo em sistema Trop-T-FACE, utilizando de marcadores moleculares previamente selecionados.

3.2.1. Plantio e Coleta do Material Biológico

Sementes de *S. capitata* foram plantadas em campo para o experimento Trop-T-Face e submetidas a quatro tratamentos: controle: C (CO₂ e temperatura ambiental); elevado CO₂:

eC (600 ppm) e temperatura ambiente; elevada temperatura: eT (+ 2 °C) e CO₂ ambiente; e a combinação de elevado CO₂ (600 ppm) e elevada temperatura (eC + eT), com quatro repetições totalizando 16 parcelas.

Em cada uma das 16 parcelas, foram coletadas seis amostras de *S. capitata*, totalizando 96 amostras (Tabela 2). As plantas utilizadas foram devidamente marcadas e numeradas para uma adequada identificação das mesmas e assim evitar o risco da utilização de plantas híbridas ou contaminantes nas coletas posteriores para análises da expressão gênica propostas no projeto temático.

Para fins de comparação, vinte sementes de *S. macrocephala* foram plantadas em oito vasos, contendo 300mL de terra e 100mL de vermiculita. Aproximadamente 30 dias depois, amostras de folhas de 48 indivíduos foram coletadas aleatoriamente, os quais foram numerados de 1 à 48 e logo estocadas em microtubos no freezer à -20°C até o momento da extração do DNA.

Tabela 2. Identificação das amostras de *Stylosanthes capitata* utilizadas para a análise de pureza genética das plantas do experimento Trop-T-FACE. Tratamentos: Controle; eC (elevado CO₂); eT (elevada temperatura), eC+eT (elevado CO₂ e elevada temperatura).

	AMOSTRA		AMOSTRA		AMOSTRA		AMOSTRA
PARCELA 1 (eC)	P1.1	PARCELA 5 (eT)	P5.1	PARCELA 9 (eC)	P9.1	PARCELA 13 (eT)	P13.1
	P1.2		P5.2		P9.2		P13.2
	P1.3		P5.3		P9.3		P13.3
	P1.4		P5.4		P9.4		P13.4
	P1.5		P5.5		P9.5		P13.5
	P1.6		P5.6		P9.6		P13.6
PARCELA 2 (Controle)	P2.1	PARCELA 6 (eCeT)	P6.1	PARCELA 10 (Controle)	P10.1	PARCELA 14 (eCeT)	P14.1
	P2.2		P6.2		P10.2		P14.2
	P2.3		P6.3		P10.3		P14.3
	P2.4		P6.4		P10.4		P14.4
	P2.5		P6.5		P10.5		P14.5
	P2.6		P6.6		P10.6		P14.6
PARCELA 3 (eC)	P3.1	PARCELA 7 (eT)	P7.1	PARCELA 11 (eC)	P11.1	PARCELA 15 (eT)	P15.1
	P3.2		P7.2		P11.2		P15.2
	P3.3		P7.3		P11.3		P15.3
	P3.4		P7.4		P11.4		P15.4
	P3.5		P7.5		P11.5		P15.5
	P3.6		P7.6		P11.6		P15.6
PARCELA 4 (Controle)	P4.1	PARCELA 8 (eCeT)	P8.1	PARCELA 12 (Controle)	P12.1	PARCELA 16 (eCeT)	P16.1
	P4.2		P8.2		P12.2		P16.2
	P4.3		P8.3		P12.3		P16.3
	P4.4		P8.4		P12.4		P16.4
	P4.5		P8.5		P12.5		P16.5
	P4.6		P8.6		P12.6		P16.6

3.2.2. Extração e Quantificação do DNA

No laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética da USP/RP, o DNA de aproximadamente 150 mg das amostras foliares congeladas foi extraído com base na metodologia de Alzate-Marin et al. (2009). A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop 1000), medindo-se a absorvância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda 260/280 nm.

3.2.3. Marcadores Moleculares Utilizados

Dentre aqueles marcadores moleculares listados na Tabela 1, foram selecionados aqueles do tipo ISSR que melhor diferenciaram as espécies *S. capitata* e *S. macrocephala*.

3.2.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler® Eppendorf Vapoprotect. Seguiram-se as seguintes condições: 1 ciclo 95°C por 10 minutos, 35 ciclos 95°C por 1 minuto, 50°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, 1 ciclo 72°C por 7 minutos, 4°C indefinidamente. Para cada reação de PCR, 1,0 ng/ μ L de DNA genômico foram utilizados em um volume total de 20 μ L contendo 1X tampão de reação livre de MgCl₂ [75 mM Tris-HCl pH 9.0; 50mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄], 2 μ L de cada *primer* ISSR, contendo 0,4 μ M; 5 μ L de água livre de nucleases e 5 μ L de GoTaq® Colorless Mastermix (Promega).

3.2.5. Eletroforese e Coloração dos Géis

Os produtos de amplificação gerados com os marcadores moleculares foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida 8 % não desnaturantes. A visualização dos produtos de amplificação foi feita com nitrato de prata (20%) segundo protocolo de Sanguinetti et al. (1994). Fragmentos de diferentes mobilidades foram considerados alelos diferentes. Estimativas dos tamanhos dos produtos de amplificação em pares de bases foram feitas comparando-se com escalas alélicas de 10 pares de bases.

3.2.6. Leitura dos Géis

Os indivíduos foram avaliados quanto à presença e ausência de bandas e perfis eletroforéticos. Estimativas dos tamanhos dos produtos de amplificação em pares de bases foram realizadas comparando-se com um marcador de peso molecular de 50 pb (*Invitrogen*).

3.2.7. Análise Estatística

O polimorfismo obtido pela técnica ISSR foi tabulado segundo presença (1) ou ausência (0) de bandas. Cada banda ISSR polimórfica foi considerada como um loco bialélico, com um alelo amplificável e um alelo nulo. O Software GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2006), foi utilizado para gerar a matriz de distância genética segundo Nei (1972) e a partir destes dados foi gerado um gráfico de dispersão (GenAlex). A Diversidade Genética de Nei (\hat{H}_e), e os parâmetros Heterozigosidade total (Ht) e Heterozigosidade média intrapopulacional (Hs) foram obtidos pelo software POPGEN32 (Yeh et al., 1999). A relação de ancestralidade entre os indivíduos das duas espécies foi gerada pelo programa STRUCTURE, assumindo-se um valor de $K = 2$ (Pritchard et al., 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação e seleção de marcadores moleculares ISSR, RAPD e SSR para caracterizar a pureza genética de sementes que apresentam diferentes colorações

Dos seis *primers* RAPD testados, apenas quatro apresentaram produtos de amplificação – OPB05, OPB06, OPB09 e OPB10 – sendo que somente o marcador OPB10 apresentou perfis eletroforéticos distinguíveis entre as espécies (**Figura 5**).

Como resultado das análises com os quinze *primers* ISSR, foi observado que nove (UBC#1, UBC#2, UBC#834, UBC#851, UBC#860, UBC#862, UBC#864, UBC#885, UBC#886) apresentaram produtos de amplificação, sendo que os marcadores UBC#885 UBC#886, UBC#862 e UBC#864, geraram perfis interespecíficos claros (**Figura 6**).

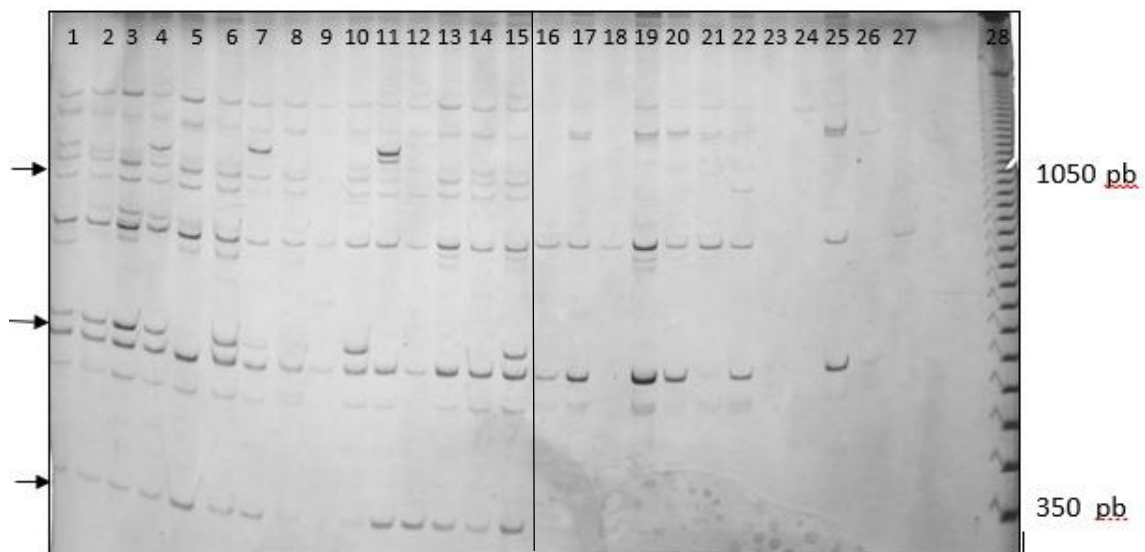


Figura 5. Gel de poliacrilamida 8% não desnaturante, mostrando os produtos de amplificação referentes ao marcador RAPD OPB10 em *S. capitata* (canaletas 1 – 15, sendo 1 – 6 DNA de plântulas de sementes vermelhas, 7 – 9 DNA de plântulas de sementes pretas e 8 – 15 DNA de sementes amarelas) e *S. macrocephala* (canaletas 16 – 27, sendo 16 – 21 DNA de plântulas de sementes pretas e 22 – 27 DNA de plântulas de sementes verdes). A canaleta 28 corresponde ao marcador de peso molecular (50 pb). Em destaque, observa-se as bandas que separaram as espécies.

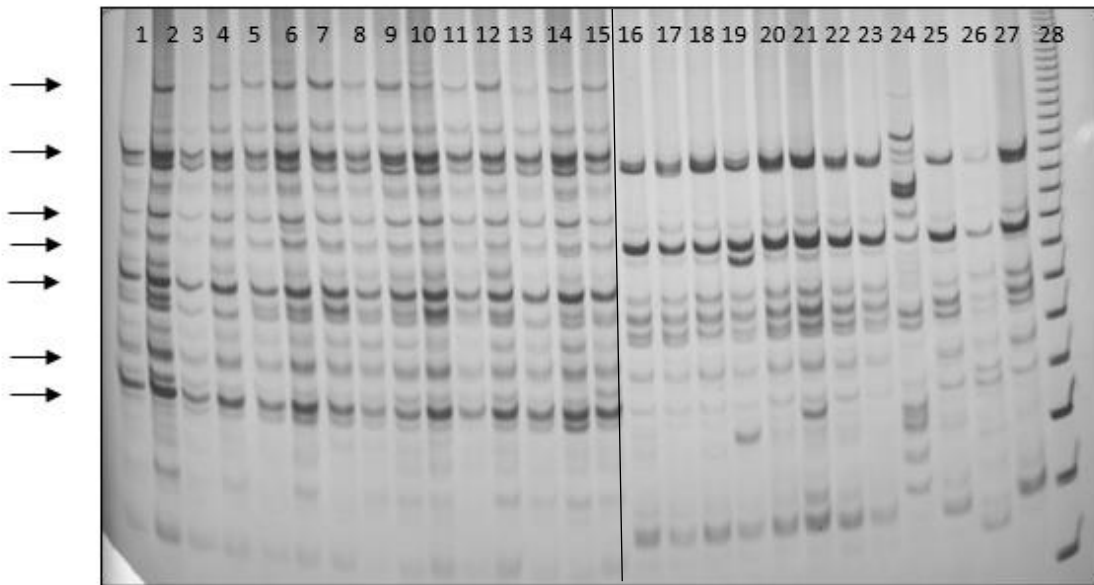


Figura 6. Gel de poliacrilamida 8% não desnaturante, mostrando os produtos de amplificação referentes ao marcador ISSR UBC#885 em *S. capitata* (canaletas 1 – 15, sendo 1 – 6 DNA de plântulas de sementes vermelhas, 7 – 9 DNA de plântulas de sementes pretas e 10 – 15 DNA de sementes amarelas) e *S. macrocephala* (canaletas 16 – 27, sendo 16 – 21 DNA de plântulas de sementes pretas e 22 – 27 DNA de plântulas de sementes verdes). A canaleta 28 corresponde ao marcador de peso molecular (50 pb *Invitrogen*). Em destaque, observam-se as bandas que separam as espécies.

Finalmente, foram testados quatro SSR, contudo apenas três – SC18-01 B3, SC18-01 E11 e SC18-01 F11A – amplificaram, os quais foram informativos para a identificação das espécies. Com o marcador SC18-01 B3 observou-se produtos de amplificação de aproximadamente 230 pb para *S. capitata* e 250 pb para *S. macrocephala* (**Figura 7**). Já os marcadores SC18-01 E11 e SC18-01 F11A amplificaram para a espécie *Stylosanthes capitata*, mas não amplificaram para *Stylosanthes macrocephala* (**Figura 7**), o que era esperado desde que estes marcadores são espécie-específicos para *S. capitata*.

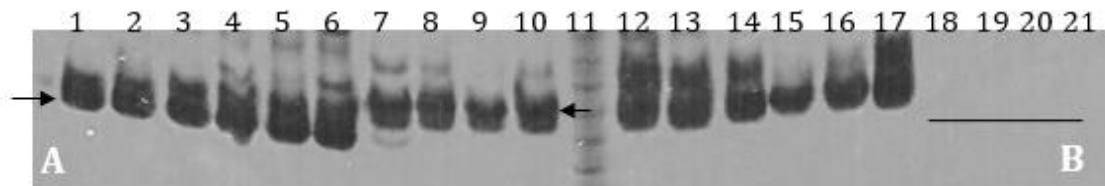


Figura 7. Gel de poliacrilamida 10% desnaturante, mostrando os produtos de amplificação referentes aos marcadores SSR SC18-01 B3 (A) em *S. capitata* (canaletas de 1 – 6) e *S. macrocephala* (canaletas de 7 – 10) e SSR SC18-01 E11 (B) em *S. capitata* (canaletas de 12 – 17) e *S. macrocephala* (canaletas de 18 – 21). A canaleta 11 corresponde ao marcador de

peso molecular (10 pb). As setas destacam a diferença de peso molecular entre os fragmentos produzidos pelo primer SSR SC18-01 B3 para ambas as espécies.

Diferentes tipos de marcadores possuem diferentes utilidades dentro de estudos de diversidade genética de indivíduos e populações. Assim, para análise de pureza genética de lotes de sementes, consideramos um bom marcador aquele altamente informativo, de baixo custo e facilmente reproduzido em diferentes ensaios e com baixa probabilidade de interpretação errônea ou ambígua (Abdel-Mawgood, 2012).

Marcadores ISSR apresentam vantagens semelhantes aos RAPD, pois ambos são rápidos e fáceis de manusear. Em contrapartida, marcadores ISSR tem maior reprodutibilidade que os marcadores RAPD. Neste trabalho os produtos de amplificação de primers ISSR se mostraram mais informativos para as duas espécies do gênero *Stylosanthes* estudadas, observando-se altos níveis de polimorfismo, o que faz desse marcador ideal para análises de detecção de híbridos (Abdel-Mawgood, 2012), como também já relatado em outras espécies como trigo (Abdel-Mawgood, 2012), arroz (Rakoczy-Trojanowska et al., 2004), algumas plantas frutíferas, como maçã e morango (Korbin et al., 2002), dedo painço, sorgo e milho (Godwin et al., 1997).

Para este trabalho, marcadores SSR ou microssatélites não seriam a melhor opção devido ao seu caráter codominante. Apesar dessa característica tornar o marcador mais informativo, ela dificulta a análise dos dados em espécies poliploides, como é o caso da *Stylosanthes capitata*, uma espécie alotetraploide. Outra razão pertinente para descartarmos os microssatélites das análises deste trabalho é a falta de informação da sequência genômica da espécie *Stylosanthes macrocephala*, a qual é requerida para o desenho do primer, além de aumentar o custo da análise.

Considerando todas essas características, foi decidido que a melhor opção de marcador a ser utilizado na análise de pureza genética desta pesquisa seriam os marcadores moleculares ISSR selecionados.

4.2. Avaliação da pureza genética das plantas da espécie *S. capitata* plantadas em campo em sistema Trop-T-FACE, utilizando de marcadores moleculares ISSR

Sete marcadores ISSR foram selecionados para as análises de pureza genética das plantas – UBC#2, UBC#834, UBC#851, UBC#862, UBC#864, UBC#885, UBC#886 (Tabela 3). Como resultados das análises, os sete primers utilizados na análise geraram 172 loci para ambas as espécies, sendo que 159 são polimórficos. O número de fragmentos amplificados por primer variou de 15, para o primer UBC#2, a 35 para o primer UBC#885, sendo a média de loci polimórficos por primer igual a 22,7. A porcentagem de polimorfismo por primer variou de 68,18 até 100, chegando a uma média de 92,1 (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros de diversidade genética por *primer* para as espécies *S. capitata* e *S. macrocephala*. Na: Número observado de alelos; Ne: Número efetivo de alelos; He: Diversidade genética de Nei; P: Número de loci polimórficos; %P: Porcentagem de loci polimórficos.

Primer	Sequência 5'-3'*	Na	Ne	He	P	%P
UBC#2	GAGAGAGAGAGAGAT	1,8665	1,308	0,187	14	93,33
UBC#834	AGAGAGAGAGAGAGYT	1,352	1,257	0,1575	27	100
UBC#851	GTGTGTGTGTGTGTGYG	1,3095	1,2	0,126	21	100
UBC#862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	1,659	1,187	0,1245	15	68,18
UBC#864	ATGATGATGATGATGATG	1,741	1,3285	0,1995	24	88,89
UBC#885	BHBGAGAGAGAGAGAGA	1,7715	1,2795	0,1775	33	94,29
UBC#886	VDVCTCTCTCTCTCTCT	1,4	1,191	0,1225	25	100

*B=(C,G,T), D=(A,G,T), H=(A,C,T), V=(A,C,G), Y=(C,T)

Como resultado da leitura dos géis (Figura 8) e análise de diversidade genética dos indivíduos, foi possível observar que a população de *S. macrocephala* (He: 0.176) apresenta maior diversidade genética do que a população de *S. capitata* (He: 0,139) (Tabela 4), o que é coerente, já que a população de *S. macrocephala* apresentou uma maior porcentagem de loci polimórfico (78,49%), quando comparada com *S. capitata* (63,37%) (Tabela 4). Ainda observou-se que um dos indivíduos dentro da população de *Stylosanthes capitata* – P8.2 – é geneticamente diferente dos demais, já que se encontra afastado do *cluster* de sua população (Figura 9). Através da análise pelo programa STRUCTURE (Pritchard Lab, Stanford University) (Figura 10), foi observado que apenas 22,7% do genótipo de P8.2 apresenta a

mesma ancestralidade dos demais membros da população de *S. capitata*, enquanto que os outros 77,3% é semelhante à população de *S. macrocephala*.

Tabela 4. A – Parâmetros de diversidade genética para as populações de *S. capitata* (Pop1) e *S. macrocephala* (Pop2). Na: Número observado de alelos; Ne: Número efetivo de alelos; He: Heterozigiosidade esperada; uHe: Heterozigiosidade esperada imparcial, B – Porcentagem de loci polimórficos (%P). EP= erro padrão.

		Na	Ne	He	uHe
Pop1 (<i>S. capitata</i>)	Média	1,500	1,215	0,139	0,140
	EP	0,055	0,022	0,012	0,012
Pop2 (<i>S. macrocephala</i>)	Média	1,669	1,288	0,176	0,178
	EP	0,052	0,026	0,014	0,014
População	%P				
Pop1 (<i>S. capitata</i>)	63,37%				
Pop2 (<i>S. macrocephala</i>)	78,49%	B			

Já é reconhecido que as espécies *S. capitata* e *S. macrocephala* possuem alta relação de parentesco, devido à grande semelhança morfológica que existe entre elas (Ferreira & Costa, 1979). Em um trabalho conduzido por Liu (1999), no qual investigaram as relações de parentesco de 24 espécies do gênero *Stylosanthes* através da análise de marcadores moleculares RFLP e STS, observou-se que mais de 80% dos fragmentos de DNA do genótipo de *S. capitata* eram homólogos aos genótipos das espécies *S. macrocephala* ou *S. pilosa*. Como acredita-se que, dentro do gênero *Stylosanthes*, os táxons poliploides são procedentes de hibridização entre espécies diploides (Gillies & Abbott, 1996; Vander Stappen et al., 2002), é possível que a espécie alotetraploide *Stylosanthes capitata* tenha surgido da hibridização entre indivíduos das espécies *S. macrocephala* e *S. pilosa*, o que justificaria o fato de encontrarmos indivíduos *S. capitata* que são geneticamente tão semelhantes a indivíduos *S. macrocephala*, como é o caso da amostra P8.2 observada neste trabalho.

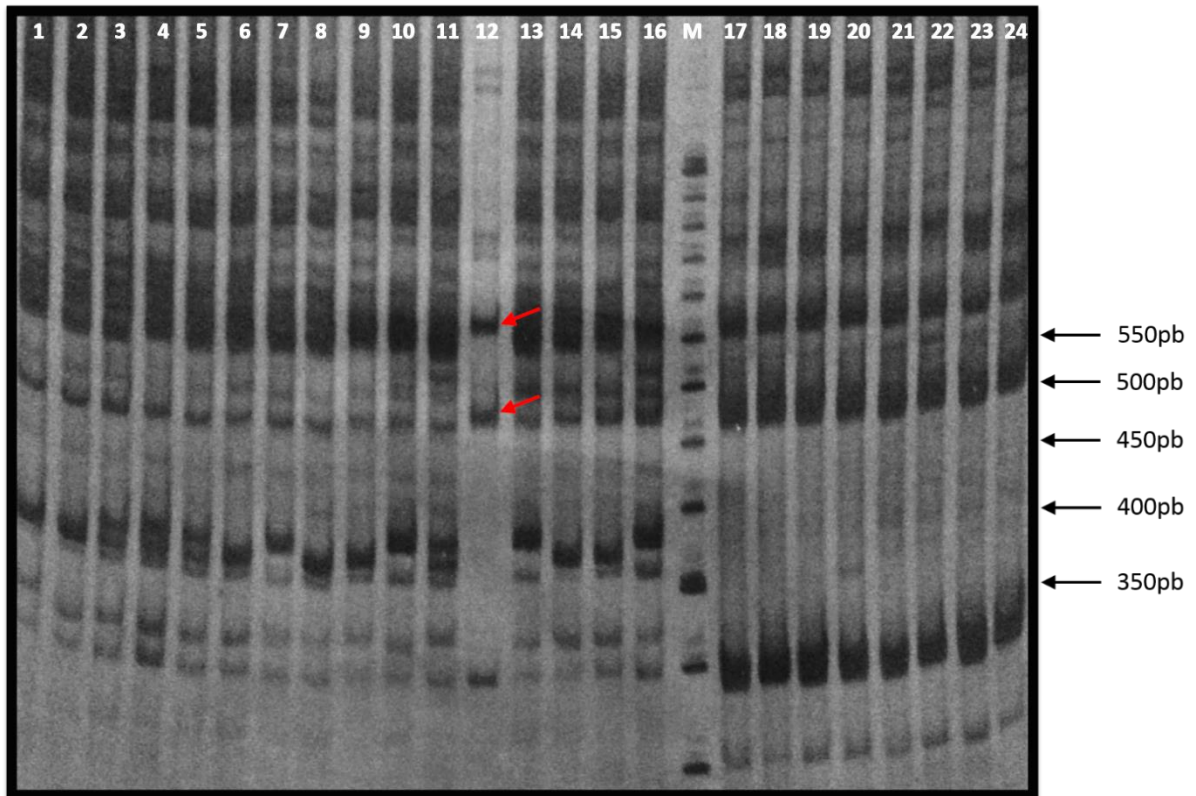


Figura 8. Gel de poliacrilamida 8% não desnaturante, mostrando os produtos de amplificação referentes ao primer ISSR#UBC864 nos indivíduos P6.3 a P8.6 de *S. capitata* (canaletas 1 – 16) e nos indivíduos 17 a 24 de *S. macrocephala* (canaletas 17 – 24). As setas vermelhas destacam as regiões no genoma do indivíduo P8.2 (canaleta 12) que evidenciam a diferença genética entre ele e os demais membros da população de *S. capitata*. Ainda fica claro que as regiões em destaque se assemelham àquelas amplificadas nos indivíduos da população de *S. macrocephala*. A canaleta M representa o marcador de peso molecular de 50 bp.

A hibridização entre duas espécies diploides do gênero *Stylosanthes*, formando uma nova espécie tetraploide, já foi evidenciada. Um trabalho realizado no México postulou que uma nova espécie, denominada *Stylosanthes* aff. *calcicola*, foi originada da hibridização de dois genomas divergentes, derivados de linhagens das espécies *Stylosanthes calcicola* e *Stylosanthes viscosa* (Vander Stappen et al., 2002).

Apesar da alta relação de parentesco existente entre as espécies, as análises de variância molecular mostraram uma distância genética considerável entre as espécies (Figura 9), além de relativamente baixa proporção do genótipo de *S. macrocephala* dentro da população de *S. capitata* – apenas 0,9% (Tabela 5). Observou-se que quando comparamos as duas populações, o cluster de *S. macrocephala* (população 2) é mais influenciado pelo cluster de *S. capitata* (população 1) do que o cluster da população 1.

Finalmente, as análises do presente trabalho detectaram três indivíduos de *S. macrocephala* – 2, 11 e 12 – muito distantes do cluster da população de sua espécie, e mais próximo do cluster da população de *S. capitata* (**Figura 9**). Os padrões de amplificação desses três indivíduos foram idênticos aos padrões de amplificação dos indivíduos de *S. capitata* para os sete primers utilizados (**Figura 11**). A análise pelo STRUCTURE mostrou que o genótipo dos indivíduos 2, 11 e 12 apresentam 95,1%, 93,4% e 94,0%, respectivamente, de ancestralidade com relação aos indivíduos da população de *S. capitata*, o que significa que esses indivíduos muito provavelmente são contaminações presentes no grupo de plantas da espécie *Stylosanthes macrocephala* (**Figura 10**).

Tabela 5. Proporção de parentesco de cada população de *S. capitata* (Pop 1) e *S. macrocephala* (Pop 2) para os dois clusters inferidos. Cluster 1 para *S. capitata*. Cluster 2 para *S. macrocephala*

População	Clusters Inferidos		N° de Indivíduos
	1	2	
<i>S. capitata</i> (1)	0,991	0,009	95
<i>S. macrocephala</i> (2)	0,063	0,937	48

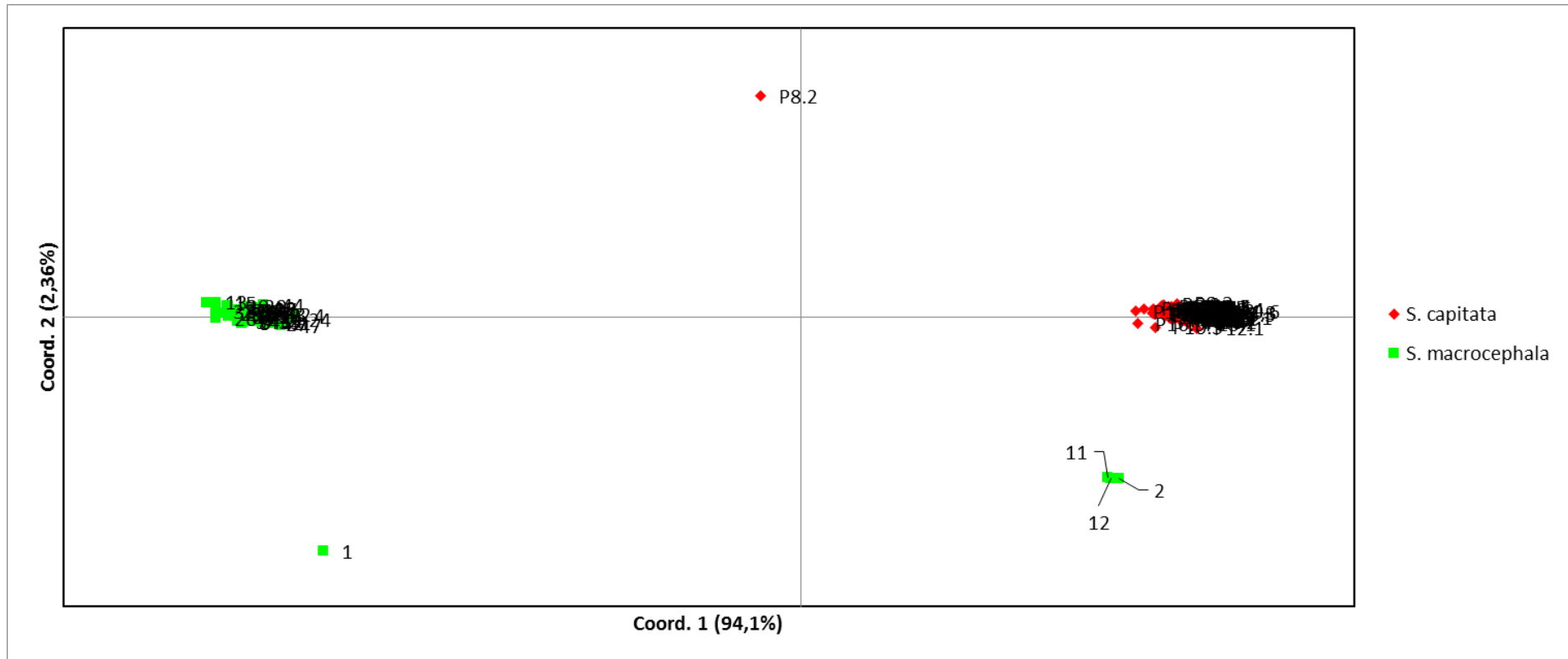


Figura 9. Agrupamentos dos indivíduos das espécies de *S. capitata* (em vermelho) e *S. macrocephala* (em verde). No gráfico, é possível perceber que um indivíduo da espécie *S. capitata* – marcado como P8.2 – se encontra em uma posição intermediária entre os *clusters* das populações, o que indica que este indivíduo possivelmente é um híbrido das espécies. Também observamos três indivíduos da espécie de *S. macrocephala* – marcados como 2, 11 e 12 – estão mais próximos do *cluster* de *S. capitata* do que daquele de *S. macrocephala*, o que indica uma provável contaminação do lote de sementes de *S. macrocephala*. Gráfico gerado pelo programa *GenALEx* (*Genetic Analysis in Excel*).

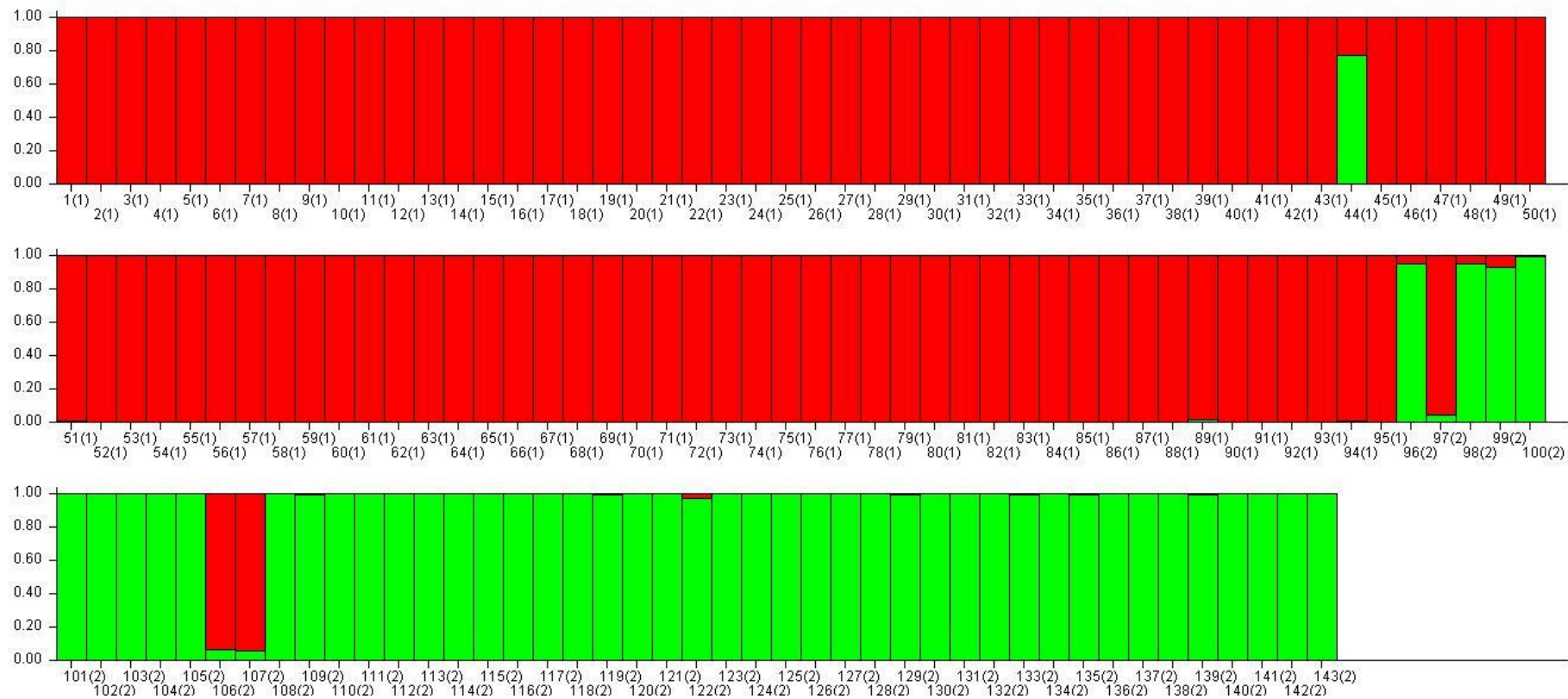


Figura 10. Relação de ancestralidade para indivíduos das duas populações analisadas. A cor vermelha representa a proporção de ancestralidade para o *cluster* genético da espécie *S. capitata* (*cluster 1*), e a cor verde representa o mesmo para a espécie *S. macrocephala* (*cluster 2*). Nele vemos o indivíduo P8.2 de *S. capitata* representado pela barra 44(1) e os indivíduos 2, 11 e 12 de *S. macrocephala* representados pelas barras 97(2), 106(2) e 107(2), respectivamente. Gráfico gerado pelo programa STRUCTURE (Pritchard Lab, Stanford University).

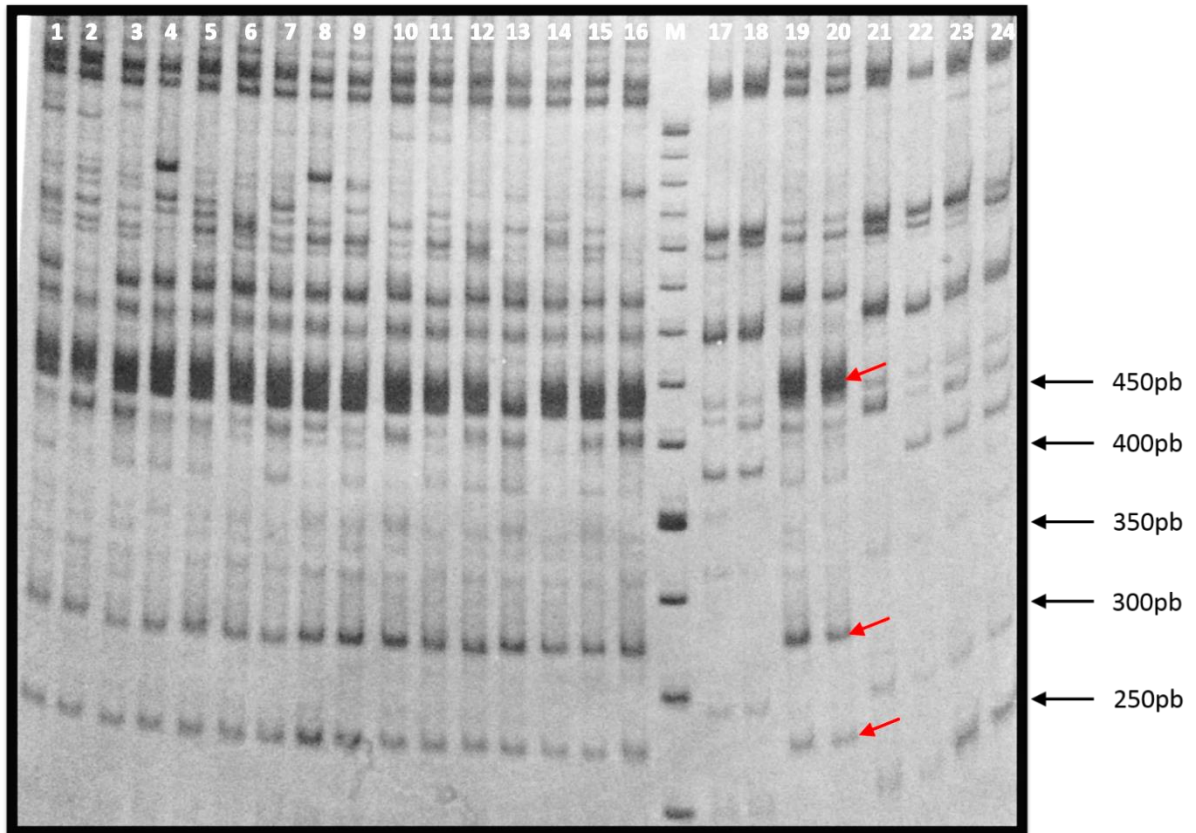


Figura 11. Gel de poliacrilamida 8% não desnaturante, mostrando os produtos de amplificação referentes ao primer ISSR#UBC886 nos indivíduos P3.5 a P6.2 de *S. capitata* (canaletas 1 – 16) e nos indivíduos 9 a 16 de *S. macrocephala* (canaletas 17 – 24). As setas vermelhas destacam as regiões no genoma dos indivíduos 11 e 12 (representados pelas canaletas 19 e 20, respectivamente) que evidenciam a diferença genética entre eles e os demais membros da população de *S. macrocephala*. Observa-se que as regiões em destaque se assemelham àquelas amplificadas nos indivíduos da população de *S. capitata*. A canaleta M representa o marcador de peso molecular de 50 bp.

Ao considerarmos os indivíduos 2, 11 e 12 como sendo da espécie *S. capitata*, temos que de uma população de 48 sementes de *S. macrocephala*, 3 aparentemente correspondiam a *S. capitata*, o que equivale a 6,25% de contaminação por sementes de outra espécie. O principal motivo que pode ter causado a contaminação desse lote é o fato das sementes dessas espécies serem produzidas e, tradicionalmente, comercializadas em conjunto (Embrapa Gado de Corte, 2000). Além disso, a alta semelhança morfológica entre essas espécies dificulta a identificação dos indivíduos e, conseqüentemente, a separação das sementes.

5. CONCLUSÕES

- O conjunto de marcadores moleculares SSR (SC18-01B3, SC18-01E11 e SC18-01TF11A), ISSR (UBC1, UBC2, UBC834, UBC851, UBC860, UBC862, UBC864, UBC885, UBC886) e RAPD (OPB10) podem ser utilizados para a identificação e controle de possíveis contaminações em lotes de sementes de *S. capitata* e *S. macrocephala*. No entanto, a melhor opção de marcador a ser utilizado na análise de pureza genética desta pesquisa foram os marcadores moleculares ISSR selecionados.
- Através dos perfis de eletroforese, foi possível verificar que as sementes de diferentes cores pertencem à mesma espécie e que a diferente coloração estaria mais relacionada com o grau de amadurecimento das sementes.
- O lote de sementes da espécie *S. capitata* plantado no campo não apresentou contaminação por sementes de outra espécie, porém foi detectado um indivíduo dentro da população – P8.2 – com apenas 22,7% de seu genótipo apresentando a mesma ancestralidade dos demais membros da população de *S. capitata*, enquanto que os outros 77,3% foi semelhante à população de *S. macrocephala*. Isso pode ser explicado pela possível participação da espécie *S. macrocephala* como espécie genitora de *S. capitata*;
- Uma população de 48 indivíduos de *S. macrocephala* apresentou uma contaminação de 6,25% por sementes da espécie *S. capitata*, que pode ter ocorrido devido ao fato de as sementes dessas espécies serem produzidas e, tradicionalmente, comercializadas em conjunto;
- Ressalta-se a necessidade da realização de análises da pureza genética usando marcadores moleculares para a melhor caracterização da espécie *S. capitata* a fim de aumentar a confiabilidade das análises de expressão gênica diferencial realizadas para determinar os efeitos de elevada concentração de CO₂ e da elevada temperatura no projeto temático “*Experimento miniFACE para analisar os efeitos do elevado CO₂ e do aquecimento sobre a fotossíntese, expressão gênica, bioquímica, crescimento, dinâmica de nutrientes e produtividade de duas espécies forrageiras tropicais contrastantes*” ao qual este trabalho está vinculado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MAWGOOD, A.L. DNA based techniques for studying genetic diversity. Livro: **Genetic Diversity in Microorganisms**, 2012. Editora InTech.
- ALZATE-MARIN, A.L.; GUIDUGLI, M.; SORIANI, H.H; MARTINEZ, C.A.H.; MESTRINER, M.A. A DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1217-1224, 2009.
- AOSA – ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS. **Cultivar purity testing**, 1991. 371p.
- ASHLEY, M.V. Plant parentage, pollination, and dispersal: How DNA microsatellite have altered the landscape. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 29, p. 148-161, 2010.
- BARCELLOS, A. de O.; ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T.; VILELA, L. Potencial do uso de leguminosas forrageiras do gênero *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. **A planta forrageira no sistema de produção**, v. 1, p. 365-426, 2001.
- BARROS, A.M.C.; FALEIRO, F.G.; KARIA, C.T.; SHIRATSUCHI, L.S.; ANDRADE, R.P.; POLES, G.K.B. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 9, p. 899-909, 2005.
- BURT, R.L. Natural variation in *Stylosanthes*. Livro: **The biology and agronomy of Stylosanthes**, p. 103-123, 1984. Editado por STACE, H. M. e EDYE, L. A.
- CAMERON, D.F.; CHAKRABORTY, S. Forage potencial of *Stylosanthes* in diferente production systems. **High-yielding anthracnose-resistant Stylosanthes for agricultural systems**, p. 27-38, 2004.
- CNPC. CONSELHO NACIONAL DA PECUÁRIA DE CORTE. Balanço da pecuária bovina de corte. São Paulo, CNPC, 2013. Disponível em <<http://www.cnpc.org.br/news1.php?ID=6745>>. Acesso em: 18 março 2014.
- COSTA, N.M.S. Tese: Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw. Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2006

- EMBRAPA GADO DE CORTE. Estilosantes Campo Grande: estabelecimento, manejo e produção animal. Campo Grande: **Embrapa Gado de Corte**, 2000 (Embrapa Gado de Corte, Comunicado Técnico, 61).
- EUCLIDES, V.P.B.; EUCLIDES FILHO, K.; COSTA, F.P.; FIGUEREDO, G.R. Desempenho de novilhos F1s angus-nelore em pastagens de *Brachiaria decumbens* submetidos a diferentes regimes alimentares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 470-481, 2001.
- FERNANDES, C.D.; GROF, B.; CHAKRABORTY, S.; VERZIGNASSI, J.R. Estilosantes Campo Grande in Brazil: a tropical forage legume success story. Livro: **20th International Grassland Congress**, 2005.
- FERREIRA, M.B.; COSTA, N.M.S. Livro: O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil. **EPAMIG**, 1979.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa-CENARGEN**, 1998.
- GEPTS, P. Biotechnology sheds light on bean domestication in Latin America. **Diversity**, v. 7, n. 1-2, p. 49-50, 1991.
- GILLIES, A.C.M.; ABBOTT, R.J. Phylogenetic relationships in the genus *Stylosanthes* (Leguminosae) based upon chloroplast DNA variation. **Plant Systematics and Evolution**, v. 200, p. 193-211, 1996.
- GILLIES, A.C.M.; ABBOTT, R.J. Evaluation of random amplified polymorphic DNA for species identification and phylogenetic analysis in *Stylosanthes* (Fabaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 211, p. 201-216, 1998.
- GODWIN, I.D.; AITKEN, E.A.B.; SMITH, L.W. Application of inter simple sequence repeats (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, n. 18, p. 1524-1528, 1997.
- ISTA – INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Rules for seed testing**, 1996. 44p.
- KARIA, C.T.; ANDRADE, R.P. Avaliação preliminar de espécies forrageiras no Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrado: perspectivas futuras. In: Simpósio sobre o Cerrado, 8; **International Symposium on Tropical Savannas**. Anais. p. 471-475, 1996.

- KARIA, C.T. Tese: Caracterização genética e morfoagronômica de germoplasma de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Universidade Federal de Goiás – **Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos**, Goiânia, 2008.
- KORBIN, M.; KURAS, A.; ZURAWICZ, E. Fruit plant germplasm characterization using molecular markers generated in RAPD and in ISSR-PCR. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 7(2B), p. 785-794, 2002.
- LIU, C.J.; MUSIAL, J.M. Restriction fragment length polymorphism detected by cDNA and genomic DNA clones in *Stylosanthes*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 8, p. 1210-1213, 1995.
- LIU, C.J.; MUSIAL, J.M.; THOMAS, B.D. Genetic relationships among *Stylosanthes* species revealed by RFLP and STS analyses. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 1179-1186, 1999.
- LIU, C.J.; MUSIAL, J.M. The application of chloroplast DNA clones in identifying maternal donos for polyploidy species of *Stylosanthes*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, n. 1, p. 73-77, 2001.
- MACEDO, M.C.M. Pastagens no ecossistema cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 42. Anais. p. 56-84, 2005.
- MANNETJE, L.T. Considerations on the taxonomy of the genus *Stylosanthes*. Livro: **The biology and agronomy of *Stylosanthes***, p. 1-23, 1984. Editado por STACE, H. M. e EDYE, L. A.
- MANNETJE, L.T.; JONES, R.M. Livro: Plant resources of South-East Asia. No 4. Forages. 1992.
- McDONALD, M.B.; ELLIOT, L.J.; SEENEY, P.M. DNA extration from seed for RAPD analysis in varietal identification studies. **Seed Science and Technology**, v. 22, n.1, p. 171-176, 1994.
- MILES, J.D.; GROF, B. Recent advances in studies of anthracnose of *Stylosanthes*. **Tropical Grasslands**, St. Lucia, v. 31, n. 5, p. 430-434, 1997.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENEALEX 6: genetics analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006.

- PIERCE, L.C.; BREWBAKER, J.L. Applications of isoenzyme analysis in horticultural Science. **Hortiscience**, v. 8, n. 1, p.17-22, 1975.
- PRITCHARD J. K.; STEPHENS M.; DONNELLY P., Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 9, p. 221-238, 2004).
- RAMOS, N.P. Tese: Determinação da pureza varietal em lotes de sementes de milho através de marcadores morfológicos e microssatélites. Universidade de São Paulo – **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, 2004.
- REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.
- ROBINSON, P.J.; MEGARRITY, R.G. Characterization of *Stylosanthes* introductions by using seed protein patterns. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 26, n. 3, p. 467-479, 1975.
- ROBINSON, P.J.; BURT, R.L.; WILLIAMS, W.T. Network analysis of genetic resources data. II. The use of isozyme data in elucidating geographical relationships. **Agroecosystems**, v. 6, n. 2, p. 111-118, 1980.
- SANGUINETTI, C. J.; DIAS, E. N.; SIMPSON, A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, p. 914 -921, 1994.
- SANTOS, M. O.; SASSAKI, R.P.; FERREIRA, T.H.S.; RESENDE, R.M.S.; CHIARI, L.; KARINA, C.T.; FALEIRO, F.G.; JUNGSMANN, L.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. Polymorphic microsatellite loci for *Stylosanthes macrocephala* Ferr. et Costa, a tropical forage legume. **Conservation Genetic Resources**, v. 1, p. 481-485, 2009.
- SANTOS-GARCIA, M.O.; RESENDE, R.M.S; CHIARI, L.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. Mating systems in tropical forages: *Stylosanthes capitata* Vog. and *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. **Euphytica**, v. 178, p. 185-193, 2011.
- SAWKINS, M.C. MAASS, B.L.; PENGELLY, B.C.; NEWBURY, H.J.; FORD-LLOYD, B.V.; MAXTED, N.; SMITH, R. Geographical patterns of genetic variation in two species of *Stylosanthes*

- Sw. using amplified fragment length polymorphism. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 8, p. 1947-1958, 2001.
- STACE, H.M.; CAMERON, D.F. Cytogenetics and the evolution of *Stylosanthes*. Livro: **The biology and agronomy of *Stylosanthes***, p. 49-72, 1984. Editado por STACE, H. M. e EDYE, L. A.
- VANDER STAPPEN, J.; van CAMPENHOUT, S.; GAMA, S.; VOLCKAERT, G. Sequencing of the internal transcribed spacer region ITS1 as a molecular tool detecting variation in the *Stylosanthes guianensis* complex. **Theoretical Applied Genetics**, v. 96, n. 6-7, p. 869-877, 1998.
- VANDER STAPPEN, J.; WELTJENS, I.; VOLCKAERT, G. Microsatellite markers in *Stylosanthes guianensis*. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 3, p. 514-517, 1999.
- VANDER STAPPEN, J.; LOPEZ, S.G.; DAVILA, P.; VOLCKAERT, G. Molecular evidence for the hybrid origin of a new endemic species of the *Stylosanthes* Sw. (Fabaceae) from the Mexican Yucatán Peninsula. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, p. 1-13, 2002.
- VIEIRA, E..S.N.; VON PINHO, E.V.R.; VIEIRA, M.G.G.C.; MANN, R.S. Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores moleculares de proteínas e enzimas visando a certificação da pureza genética. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 35-42, 2001.
- VIEIRA, M.L.C.; FUNGARO, M.H.P.; JUBIER, M.F.; LEJEUNE, B. Determination of taxonomic relationships among Brazilian taxa of *Stylosanthes* Sw., *Leguminosae*, using RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n.3, p. 305-310, 1997.
- VILELA, L.; MARTHA Jr., G.B.; BARIONI, L.G. Adubação na recuperação e na intensificação da produção animal em pastagens. In: **Simpósio sobre o Manejo da Pastagem**, 21. Anais... p. 425-427, 2004.
- WILLIAMS, R.J.; REID, R.; SCHULTZE-KRAFT, R.; COSTA, N.M.S.; THOMAS, B.D. Natural distribution of *Stylosanthes*. Livro: **The biology and agronomy of *Stylosanthes***, p. 73-101, 1984. Editado por STACE, H. M. e EDYE, L. A.

WILLIAMS, R.J.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Researches**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T. POPGEN, version 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. **University of Alberta/CIFOR**, Edmonton, 1999.