

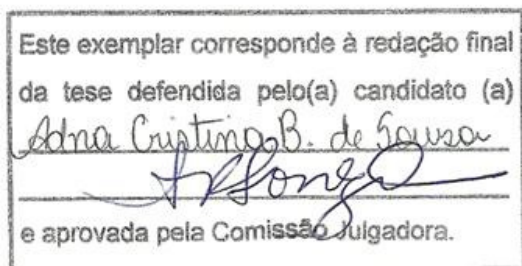
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia



Adna Cristina Barbosa de Sousa

**ESTUDOS GENÉTICO MOLECULARES EM FORRAGEIRAS
TROPICAIS**



Tese apresentada à banca examinadora do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientadora: Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Co-orientadora: Dra. Liana Jank

Campinas – São Paulo – Brasil

Agosto – 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

So85e	Sousa, Adna Cristina Barbosa de Estudos genético moleculares em forrageiras tropicais / Adna Cristina Barbosa de Sousa. – Campinas, SP: [s.n.], 2010. Orientadoras: Anete Pereira de Souza, Liana Jank. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Capim-guiné. 2. Guandu. 3. Centrosema. 4. Calopogônio. 5. Microssatélites (Genética). I. Souza, Anete Pereira de. II. Jank, Liana. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título. (rcdt/ib)
--------------	--

Título em inglês: Molecular genetic studies in tropical forages.

Palavras-chave em inglês: Guineagrass; Pigeonpea; Centrosema; *Calopogonium*; Microsatellite (Genetics).

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Anete Pereira de Souza, Cacilda Borges do Valle, Maria do Carmo E. Amaral, Maria Lúcia Carneiro Vieira, Michel Georges Albert Vincentz.

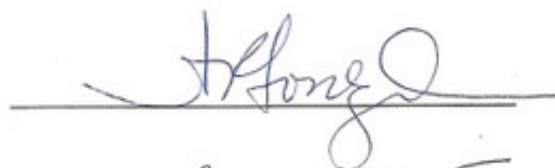
Data da defesa: 30/08/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

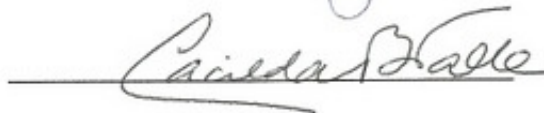
Campinas, 30 de agosto de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza



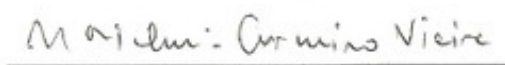
Dra. Cacilda Borges do Valle



Profa. Dra. Maria do Carmo E. Amaral



Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira



Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz



Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi



Prof. Dr. Sérgio Furtado Reis



Prof. Dr. José Baldin Pinheiro





Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
25 de maio de 2010.

CIBio: 04/2010

Projeto CIBio: 14/2003

Identificação:

03/2006 – **Doutorado:** Adna Cristina Barbosa de Sousa, CPG-GBM UNICAMP

Projeto: Estudos Genético Moleculares em Forrageiras Tropicais.

Parecer:

Projeto aprovado pela CIBio/CBMEG em 13/02/2003 sob número 14/2003

(em andamento)

Coordenador: Dra. Anete Pereira de Souza

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Presidente da CIBio/CBMEG - UNICAMP

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

Aos meus amados pais

SEVERINO ALVES DE SOUSA e

ISABEL CRISTINA BARBOSA DE SOUSA,

que sempre me estimularam a dar este grande passo.

Vocês com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória.

Amo vocês!

Com gratidão, satisfação e afeto

DEDICO

Às minhas extraordinárias irmãs
ANA CRISTINA DE SOUSA E SILVA e
NADJA BARBOSA DE SOUSA
pela união e alegria que nos sonda.

OFEREÇO

À Profa. Dra. ANETE PEREIRA DE SOUZA, com carinho.

“O verdadeiro mestre sente-se feliz quando percebe
que o caminho que Ele abriu tem sido trilhado por
muitos. O mestre tem a sua realização no aprendizado
do pupilo, da passagem e trocas de experiências... (Autor desconhecido)”.

É por isso que meras palavras não podem recompensar
a sua dedicação e inexaurível paciência.

Muito obrigada!

UMA HOMENAGEM

À Pesquisadora **Dra. LIANA JANK**, com estima.
Fazer ciência, além de ser algo desafiador,
significa colocar uma semente para germinar e, mesmo não
esperando o tempo para vê-la crescer,
possui a certeza da existência das raízes.
Pelo incentivo, apoio e confiança,

UMA HOMENAGEM

AGRADECIMENTOS

Exclusivamente a **DEUS**, essência da minha vida, quem deu-me a inspiração necessária para realização e conclusão desse trabalho.

À **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**, pela oportunidade oferecida na realização do Curso de Genética e Biologia Molecular, me proporcionando os alicerces necessários para o meu crescimento profissional durante os quatro anos de doutoramento.

À **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)** e ao **CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq)** pelo suporte financeiro e técnico-científico durante a realização desse trabalho.

Às unidades da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – **EMBRAPA GADO DE CORTE** (Campo Grande – Mato Grosso do Sul), **EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE** (São Carlos – São Paulo), **EMBRAPA CERRADOS** (Brasília – Distrito Federal) e ao **INSTITUTO DE ZOOTECNIA** (Nova Odessa – São Paulo), pelo acesso as instalações durante as coletas do material vegetal.

À minha orientadora, **Profa. Dra. ANETE P. DE SOUZA**, a quem muito estimo, pelas oportunidades e pela orientação segura e de grande relevância científica, fazendo com que meu interesse e dedicação nesse trabalho se intensificasse sempre mais.

À minha caríssima co-orientadora **Dra. LIANA JANK** pela acolhida e atenção calorosa todas as vezes que estive na Embrapa Gado de Corte e pelas informações disponibilizadas sempre com uma amplitude além da profissional.

Aos meus queridos pais, **SEVERINO A. DE SOUSA** e **ISABEL C. B. DE SOUSA**, pelo incansável apoio em toda minha formação acadêmica. Vossa dedicação, renúncia e carinho foram expressão de amor profundo e incondicional. Sinto-me duplamente privilegiada por contar com a ajuda de pai e mãe na parte introdutória desse manuscrito e por ter livre acesso a sua biblioteca.

Às minhas amadas irmãs, **ANA C. S. E SILVA, NADJA B. DE SOUSA** e ao meu cunhado **FELIPE CLÓVIS**, pela compreensão, incentivo e cuidado dos quais eu pude desfrutar.

Ao doutorando **JOÃO BARBOSA DE SOUZA FILHO**, uma pessoa especial e muito querida. Muito obrigada pela força, pela atenção e por muitas vezes, mesmo distante, tinha uma capacidade incomum de me deixar calma e confiante que tudo iria dar certo.

À amiga e colaboradora, **Dra. MARIA IMACULADA ZUCCHI** pelas inúmeras sugestões e pelo auxílio na execução das análises estatísticas.

Com estima agradeço aos pesquisadores da Embrapa **Dr. MARCELO AYRES DE CARVALHO** e **Dr. RODOLFO GODOY** pela gentil atenção, colaboração e doação do material vegetal para análise (*Centrosema pubescens*, *Calopogonium mucunoides* e *Cajanus cajan*).

Aos Membros da Pré-banca **Dr. OLIVEIRO GUERREIRO FILHO** e a **Dra. MARIA I. ZUCCHI** pelas valiosas sugestões e inestimáveis contribuições durante a avaliação desse trabalho, sempre estimulando o meu potencial.

Aos **MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA** por terem aceitado a participar da avaliação deste trabalho.

À todos amigos, em especial a **Dra. TATIANA DE CAMPOS** e ao doutorando **DANILO AUGUSTO SFORÇA** e demais colegas de curso pelo apoio, amizade sincera, cumplicidade e troca de experiência durante a realização dos experimentos, que foram fundamentais para que eu conseguisse seguir em frente a cada obstáculo.

Ao amigo **Dr. JUVERLANDE LUGLI** cujo incentivo e ajuda foram constantes.

Às estagiárias **LORENA BOAVENTURA** e **GLICIANE BORGES**, vossas contribuições foram significativas e indispensáveis nesse trabalho.

À técnica **PATRÍCIA ZAMBOM** pela amizade e pela ajuda prestada durante a condução dos experimentos.

Ao técnico **CARLOS CORONA** por cuidar com carinho de minhas plantinhas.

Às amigas **Dra. LUCIMARA CHIARI** e **GISELE O. C. LUGUIZAMON** pela ajuda durante a coleta do material vegetal de *P. maximum* no campo e a **Dra. LETÍCIA JUNGSMANN** pelas valiosas sugestões.

Aos amigos da **POUSADA DO SOL**, minha primeira casa aqui em Campinas - SP. Em especial a **Dra. JOELMA JULLY** e ao **Msc. ANDERSON GOMES SOUZA** pelo alegre convívio, eterna amizade, confiança e companheirismo que me proporcionaram ótimos momentos mesmo nas horas mais difíceis.

Aos **PROFESSORES** e **PESQUISADORES**, que em conversas informais ao longo destes quatro anos, contribuíram com idéias e opiniões que estarão presentes ao longo de toda a minha vida.

Às secretarias **SANDRA LIMA** e **TÂNIA ZAMBOM** do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp pela cordial atenção e boa vontade em me atender em todos os momentos que precisei.

Enfim, a todos aqueles que sonham em dar o melhor de si para ver a ciência atingir a sua essência. Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
PRÓLOGO	1
INTRODUÇÃO	4
REVISÃO DE LITERATURA	6
USO E CONSERVAÇÃO DO GERMOPASMA <i>EX SITU</i>	6
IMPORTÂNCIA DAS FORRAGEIRAS TROPICAIS.....	8
DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES.....	11
GRAMÍNEA.....	11
<i>Panicum maximum</i> Jacq	11
Apomixia	15
LEGUMINOSAS.....	17
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.....	17
<i>Centrosema pubescens</i> Benth.....	21
<i>Calopogonium mucunoides</i> Desv.....	24
MARCADORES MICROSSATÉLITES E APLICAÇÕES.....	27
SISTEMAS REPRODUTIVOS EM PLANTAS.....	31
OBJETIVOS	35

CAPÍTULO I

Development of microsatellite markers in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) and their transferability to other tropical forage grass species.36

CAPÍTULO II

Tropical forage germplasm (*Panicum maximum* Jacq.): diversity and genetic structure based on microsatellite markers.50

CAPÍTULO III

Genetic diversity analysis among pigeonpea genotypes adapted to South American regions based on microsatellite markers.....84

CAPÍTULO IV

Microsatellite markers in tropical legume (*Centrosema pubescens* Benth): development, characterization, and cross-species amplification in *Centrosema* sp.107

CAPÍTULO V

Transferability of microsatellite markers between *Centrosema* species and the mating system in *Centrosema pubescens* Benth.119

CAPÍTULO VI

Development and characterization of microsatellite loci for *Calopogonium mucunoides* Desv.149

CAPÍTULO VII

RESULTADOS DO ARTIGO “Mating system and molecular characterization of *Calopogonium mucunoides* Desv. germplasm based on microsatellite markers”158

CONSIDERAÇÕES FINAIS177

CONCLUSÕES GERAIS181

PERSPECTIVAS	186
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	187

Sousa, Adna Cristina Barbosa de. Estudos Genético Moleculares em Forrageiras Tropicais. 2010. 206p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Pós-graduação – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas – SP.

RESUMO

As pastagens cultivadas, utilizadas em pastejo, constituem a forma mais econômica de fornecer alimentação abundante e de qualidade aos animais. Entre as principais forrageiras cultivadas, está a gramínea *Panicum maximum* Jacq. que ocupa uma posição de destaque na pecuária brasileira por apresentar elevada produção e qualidade, ser facilmente propagada por sementes e altamente palatável ao gado. As leguminosas forrageiras também são importantes não só pela qualidade e quantidade de forragem produzida, mas também pela fixação de nitrogênio atmosférico e transferência às gramíneas associadas, reduzindo os custos de produção. Entre elas citamos, *Cajanus cajan* (L.) Millsp., *Centrosema pubescens* Benth. e *Calopogonium mucunoides* Desv. Apesar de estas forrageiras terem sido estudadas dos pontos de vista morfológico e agrônomo, conhecimentos genéticos ainda são limitados. A caracterização do sistema reprodutivo e o conhecimento da extensão da variabilidade genética contida dentro dos bancos de germoplasma podem auxiliar no planejamento de estratégias para maximizar os ganhos genéticos em programas de melhoramento. Nesse contexto, foram utilizados marcadores microssatélites para estimar a diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de *P. maximum*, *C. cajan*, *C. pubescens* e *C. mucunoides*. Foram desenvolvidos 75 marcadores microssatélites polimórficos para *P. maximum*, 26 para *C. pubescens*, 23 para *C. mucunoides* e para *C. cajan* foram selecionados 43 microssatélites da literatura. Os resultados mostraram a eficiência desses marcadores para estimar a diversidade genética intra e interespecífica, obtida através de similaridades genéticas. Foi possível observar a formação de grupos bem definidos entre os acessos dessas espécies e adicionalmente, a

transferibilidade desses marcadores específicos para outras espécies de forrageiras tropicais. Considerando o potencial de *C. pubescens* e *C. mucunoides* para as pastagens cultivadas brasileiras, o sistema reprodutivo dessas espécies foi caracterizado com os microssatélites desenvolvidos. A taxa de cruzamento encontrada para *C. pubescens* foi de 26% e para *C. mucunoides* foi de 16%, mostrando que ambas as espécies apresentam um sistema misto de reprodução com predominância de autogamia. Esses dados devem ser considerados durante a multiplicação de sementes para manutenção do banco de germoplasma, a fim de manter a integridade individual de cada acesso. O conhecimento da estrutura genética da população de uma espécie, aliado ao conhecimento de outras características biológicas de interesse, pode fornecer subsídios para programas de conservação do germoplasma, manejo sustentável, domesticação e melhoramento genético da espécie. Os marcadores microssatélites desenvolvidos nesse trabalho, a caracterização da diversidade genética e a taxa de cruzamento são resultados fundamentais, promissores e consistentes para uso no melhoramento, podendo contribuir de forma eficiente na seleção e uso dos recursos genéticos disponíveis.

Palavras chave: *Panicum*, Guandu, *Centrosema*, Calopogônio, Microssatélites.

Sousa, Adna Cristina Barbosa de. Molecular Genetic Studies in Tropical Forages. 2010. 206p. PhD thesis (PhD in Genetics and Molecular Biology) – Graduate School – State University of Campinas – UNICAMP – Campinas – SP.

ABSTRACT

Cultivated pastures used for grazing, are the most economical way to provide abundant high quality feed to animals. Among the main fodder crops, the grass *Panicum maximum* Jacq. occupies a prominent position in the Brazilian livestock industry by presenting high yield and quality, being easily propagated by seeds and highly palatable to livestock. The legumes also are important not only due to the quality and quantity of fodder produced, but also due to fixation of atmospheric nitrogen and transfer to the associated grasses, reducing production costs. Among them, *Cajanus cajan* (L.) Millsp., *Centrosema pubescens* Benth. and *Calopogonium mucunoides* Desv. Although these forages have been studied from the morphological and agronomic standpoint, genetic information is still limited. The characterization of the reproductive system and the knowledge of the extent of genetic variability contained within the germplasm banks can assist in planning strategies to maximize genetic gains. In this context, microsatellite markers were used to estimate the genetic diversity of germplasm banks of selected accessions of *P. maximum*, *C. cajan*, *C. pubescens* and *C. mucunoides*. Seventy-five polymorphic microsatellite markers were developed for *P. maximum*, 26 for *C. pubescens*, 23 for *C. mucunoides* and for *C. cajan* 43 microsatellites were selected from the literature. The results showed the efficiency of these markers to estimate the intra and interspecific genetic diversity obtained through genetic similarities. It was possible to observe the formation of well-defined clusters among the accessions within these species and in addition, the transferability of these specific markers to other species of tropical forages. Considering the potential of *C. pubescens* and *C. mucunoides* for the Brazilian cultivated pastures the reproductive system of

these species were characterized with the microsatellites developed. The outcrossing rate was 26% for *C. pubescens* and 16% for *C. mucunoides*, showing that both species have a mixed mating system with predominance of autogamy. This information should be considered during the multiplication of seeds for maintenance of the germplasm bank, in order to conserve the integrity of each individual genotype. Knowledge of the genetic structure, together with other biological characteristics of interest can provide support to germplasm conservation programs, sustainable management, domestication and breeding of the species. The microsatellite markers developed in this research, the characterization of the genetic diversity and crossing rates are fundamental results, both promising and consistent to be used in breeding and may contribute to the efficiency of selection and use of the available genetic resources.

Key words: Guineagrass, Pigeonpea, *Centrosema*, *Calopogonium*, Microsatellite.

PRÓLOGO

Os recursos genéticos vegetais disponíveis em bancos de germoplasma são os componentes de biodiversidade necessários ao desenvolvimento da agricultura sustentável. Portanto, a caracterização molecular do germoplasma busca revelar a diversidade genética disponível, sendo fundamental para auxiliar no estabelecimento de coleções-base, na seleção de parentais para cruzamentos, na identificação do modo de reprodução predominante em determinada espécie e na ampliação da base genética em programas de melhoramento.

Considerando a importância e o potencial que as forrageiras tropicais representam para as pastagens cultivadas brasileiras, este trabalho apresenta a caracterização genética molecular do germoplasma de *Panicum maximum* Jacq., *Cajanus cajan* (L.) Millsp., *Centrosema pubescens* Benth. e *Calopogonium mucunoides* Desv. baseada em marcadores microssatélites. Além disso, os marcadores microssatélites foram usados na caracterização dos sistemas reprodutivos de *C. pubescens* e *C. mucunoides*.

Os resultados obtidos durante esse trabalho de doutorado estão apresentados neste manuscrito no formato de artigos, num total de sete, dos quais quatro foram publicados (capítulos 1, 3, 4 e 6). O primeiro artigo intitulado “Development of microsatellite markers in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) and their transferability to other tropical forage grass species”, publicado na revista *Plant Breeding* (Online first, DOI 10.1111/j.1439-0523.2010.01779.x), refere-se ao desenvolvimento de vinte marcadores microssatélites polimórficos para *P. maximum* e a sua transferibilidade para *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf [= *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Webster], *B. humidicola* (Rendle) Schweick [= *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga], *Paspalum regnellii* Mez e *P. notatum* Flügge.

O segundo artigo “Tropical forage germplasm (*Panicum maximum* Jacq.): diversity and genetic structure based on microsatellite markers” será submetido à revista *Genome*. Esse artigo apresenta o desenvolvimento de 66 marcadores microssatélites e a caracterização molecular do germoplasma de *P. maximum*, estimada com 30 microssatélites. Esta coleção está sendo mantida no campo na Embrapa Gado de Corte em Campo Grande - MS, sendo composta por aproximadamente 396 acessos. Esta é a mais completa coleção de acessos da espécie, e pode ser considerada representativa da variabilidade natural existente devido à abrangência ecogeográfica das expedições de coleta realizadas no centro de origem da espécie (África Oriental).

O terceiro artigo “Genetic diversity analysis among pigeonpea genotypes adapted to South American regions based on microsatellite markers”, foi aceito para publicação na revista *Scientia Agricola*. Esse manuscrito reporta a utilização de marcadores microssatélites selecionados da literatura para estudar a diversidade genética de 77 genótipos de guandu, que estão inseridos no programa de melhoramento da Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos - SP) e a transferibilidade desses marcadores para *Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* L. Walp.

O quarto artigo “Microsatellite markers in tropical legume (*Centrosema pubescens* Benth): development, characterization, and cross-species amplification in *Centrosema* sp.”, foi publicado na revista *Conservation Genetics Resources* (1, 347-352, 2009, DOI 10.1007/s12686-009-9080-1) e reporta o desenvolvimento de 26 marcadores microssatélites polimórficos caracterizados em 15 acessos de *C. pubescens*, e a sua transferibilidade para 11 diferentes espécies do gênero *Centrosema*. Esses acessos pertencem ao banco de germoplasma da Embrapa Cerrados (Brasília - DF) e estão sendo conservados em câmaras frias.

O quinto artigo “Transferability of microsatellite markers among *Centrosema* species and mating system in *Centrosema pubescens* Benth.”, será submetido à revista *Hereditas*. Esse manuscrito mostra a porcentagem de marcadores microssatélites específicos de *C. pubescens*, transferidos entre 11 diferentes espécies do gênero *Centrosema* e a caracterização do sistema reprodutivo de *C. pubescens* usando seis locos microssatélites.

O sexto artigo “Development and characterization of microsatellite loci for *Calopogonium mucunoides* Desv.”, publicado na revista *Molecular Ecology Resources* (10, 576-579, 2010, DOI 10.1111/j1755-0998.2010.02851.x) mostra o desenvolvimento de 23 marcadores microssatélites polimórficos caracterizados em 60 acessos de *C. mucunoides* pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Cerrados (Brasília - DF) os quais estão sendo mantidos *in vivo* no campo.

O sétimo artigo “Mating system and molecular characterization of *Calopogonium mucunoides* Desv. germplasm based on microsatellite markers”, será submetido à revista *Euphytica*. Esse capítulo traz os resultados dos estudos genéticos de *C. mucunoides*. Ele reporta a caracterização do sistema reprodutivo usando seis locos microssatélites e a diversidade genética do germoplasma de *C. mucunoides* composto de 195 acessos. Essa coleção está sendo mantida *in vivo* no campo na Embrapa Cerrados, Brasília - DF.

Espera-se que os resultados aqui mostrados, possam contribuir na compreensão da base genética dessas coleções e que auxiliem no planejamento de estratégias mais eficazes na conservação do germoplasma das espécies e, que venham a maximizar os ganhos genéticos nos programas de melhoramento.

Adna C. B. Sousa

INTRODUÇÃO

As gramíneas forrageiras tropicais de grande importância no Brasil são, em sua maioria, exóticas. Estima-se uma área de cultivo de cerca de 120 milhões de hectares. Além de constituir a base de sustentação da pecuária de corte, elas têm um papel importante nos sistemas de agricultura sustentável. As maiores áreas de pastagens cultivadas no Brasil, empregam as gramíneas dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum*, devido à quantidade de sementes melhoradas comercializadas no país. Espécies de leguminosas também têm um papel irrefutável na sustentabilidade das pastagens, pois promovem aumento da produtividade animal nos cultivos consorciados com gramíneas e impacto ambiental positivo, principalmente por sua capacidade de fixar nitrogênio ao solo e seu repasse ao ecossistema de pastagens (Rao, 2002; Macedo, 2006; Veasey et al. 2007).

Apesar dessa importância significativa, são poucas as cultivares disponíveis no Brasil resultantes de programas de melhoramento genético propriamente dito. A maioria é resultado da seleção realizada sobre acessos introduzidos ou coletados no país, e em algumas, do trabalho de seleção em grandes coleções representativas da variabilidade natural (Jank, 1995).

De modo geral, as diferentes espécies de gramíneas e leguminosas tropicais são pouco conhecidas quanto à constituição genética, à estrutura de populações, ao sistema reprodutivo, à diversidade genética, à extensão da variabilidade e à composição dos bancos de germoplasma. A utilização de recursos genéticos contidos em bancos de germoplasma pode fornecer informações sobre novos alelos ou genes e auxiliar na seleção de acessos com características agronômicas desejáveis.

As espécies *Panicum maximum* Jacq. e *Cajanus cajan* (L.) Millsp., têm programas de melhoramento já em desenvolvimento no Brasil. As espécies *Calopogonium mucunoides* Desv.

e *Centrosema pubescens* Benth. mostram elevado potencial para uso em pastagens. Entretanto, a falta completa de informações genéticas para estas duas espécies tem dificultado até mesmo a implantação de programas de melhoramento continuado.

Desta forma, o desenvolvimento de marcadores microssatélites para essas espécies, possibilitará a obtenção de um conjunto de informações genéticas que são de grande importância para os programas de melhoramento genético. Marcadores microssatélites são altamente conservados, co-dominantes e multialélicos, fornecendo um elevado nível de informações genéticas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O melhor conhecimento genético destas espécies reduzirá os custos de desenvolvimento e aumentará a eficiência dos programas de melhoramento, reduzindo o tempo de lançamento de novas cultivares no mercado.

A utilização de marcadores moleculares trará novas perspectivas para o estudo de características biológicas de interesse, promovendo avanços em direção aos estudos de diversidade genética, mapeamento genético, identificação de híbridos obtidos por cruzamentos interespecíficos e caracterização de genótipos, visando sua aplicação no controle de pureza varietal para comercialização de sementes forrageiras. Neste contexto, o presente trabalho buscou desenvolver marcadores microssatélites para caracterizar a diversidade genética de acessos selecionados do germoplasma de *P. maximum*, *C. cajan*, *C. pubescens* e *C. mucunoides*. Esses marcadores microssatélites também foram utilizados para estimar as taxas de cruzamento de *C. pubescens* e *C. mucunoides*.

REVISÃO DE LITERATURA

USO E CONSERVAÇÃO DO GERMOPASMA *EX SITU*

A diversidade genética que existe na natureza e seu uso potencial em plantas cultivadas resultaram no estabelecimento, no mundo inteiro, dos centros de conservação de germoplasma. Durante as décadas de 1970 e 1980, principalmente, houve um grande esforço em coletar e conservar o germoplasma das principais espécies cultivadas, resultando no estabelecimento de grandes bancos de germoplasma (Van Hintum et al. 2000).

Bancos de germoplasma são unidades conservadoras de materiais genéticos, cujo objetivo é preservar e disponibilizar acessos que representem a diversidade genética de uma determinada espécie (Zimmerman & Teixeira, 1996). O estudo da diversidade genética dentro desses bancos de germoplasma gera informações que podem auxiliar a manutenção e o manejo das coleções básicas, facilitando o acesso dos melhoristas à novos conjuntos gênicos, e assim, aumentando a probabilidade de utilização dos recursos genéticos vegetais com mais eficiência (Queiroz & Lopes, 2007).

A preservação *ex situ* constitui a forma mais importante de conservação das espécies em locais diferentes daqueles aos quais estão adaptadas, por propiciar condições adequadas ao prosseguimento da evolução natural. A manutenção dessas coleções permite:

- a) O aumento das atividades de caracterização e de avaliação;
- b) A ampliação da base genética;
- c) A promoção do desenvolvimento e utilização das espécies subutilizadas e a sua comercialização;
- d) O apoio à produção e distribuição de sementes;

- e) A criação de novos mercados para variedades locais e produtos ricos em diversidade (Wetzel & Ferreira, 2007).

A avaliação e a caracterização do germoplasma são atividades primordiais na manutenção e na utilização dos recursos genéticos de qualquer espécie. Em termos gerais, a caracterização baseia-se em descrever variações fenotípicas e genotípicas entre acessos e entre populações, por meio de descritores quantitativos e qualitativos relacionados aos componentes de rendimento, aos fatores bióticos, abióticos e outros. Entretanto, muitas características vegetativas são influenciadas por fatores ambientais, apresentam variação contínua e alto grau de plasticidade, podendo muitas vezes, não refletir a real diversidade existente (Fukuda et al. 1996; Ferreira et al. 2007).

Além de proporcionar melhor conhecimento do germoplasma disponível, a avaliação e a caracterização apresentam três vantagens adicionais que são essenciais para o seu uso mais intenso em etapas subsequentes. São elas:

- a) Permitem a identificação de acessos duplicados.
- b) Permitem o estabelecimento de coleções nucleares, na qual é possível aglutinar o máximo de variabilidade, agrupada em um número reduzido de acessos.
- c) Permitem a identificação dos modos de reprodução predominantes nos acessos, bem como da ocorrência ou não de variabilidade intrínseca e acessos individuais.

Diferentes descritores têm sido usados para esses estudos, como os morfológicos, agronômicos, ecológicos, bioquímicos e moleculares. Essas informações, analisadas separadas ou em conjunto, permitem a formação de agrupamentos de acessos similares geneticamente, o que serve de base para o estabelecimento de coleções nucleares e de coleções de trabalho (Valois et al. 2001).

Com o advento das técnicas moleculares, houve um aporte significativo de informações genotípicas que tem permitido correlacionar aspectos genéticos moleculares com características fenotípicas. Através disso é possível caracterizar acessos, auxiliar os processos de cruzamentos e de seleção, orientar atividades de coleta e de conservação *ex situ*, podendo contribuir para a preservação das espécies (Esquinas-Alcázar, 1993).

IMPORTÂNCIA DAS FORRAGEIRAS TROPICAIS

O uso de pastagens tropicais são um dos recursos mais valorizados na produção animal, quando utilizadas de forma eficiente, em condições mais favoráveis à sua expansão natural. A utilização de pastagens com alto valor nutritivo é um dos fatores de maior importância para a redução de custos na produção agropecuária. Além da proteína e energia, as gramíneas provêm à fibra necessária nas rações para promover a mastigação, ruminação e saúde do animal (Leopoldino, 2000). Uma tecnologia simples para garantir esse potencial produtivo, é a utilização de pastagens consorciadas, que consiste no estabelecimento de gramíneas e leguminosas numa mesma área. O consórcio de gramíneas e leguminosas surgiu como uma alternativa para o aumento de produção de forragens, particularmente no período seco do ano e em sistemas orgânicos de produção animal. A associação das duas espécies tem melhorado o valor nutritivo da dieta animal, quando comparado às gramíneas tropicais em monocultura, e contribuído para a diminuição do processo erosivo das áreas produtivas (Souza, 2002; Diáz et al. 2004; Valle et al. 2004; Barcellos, 2008).

Dentre as vantagens da utilização de leguminosas em pastagens cultivadas nos sistemas de produção animal, destacam-se:

- a) A diversificação do sistema, reduzindo os riscos de pragas, doenças e degradação das pastagens;

- b) Capacidade de adicionar nitrogênio da atmosfera ao sistema solo-planta-animal, por meio da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*;
- c) Melhor proteção do solo, evitando a erosão e lixiviação de nutrientes, estimulando a ação microbiana, com impacto positivo nas condições físico-químicas do solo e na eficiência e reciclagem dos nutrientes;
- d) Aumento da produção de forragens, particularmente nos períodos secos. Consequentemente torna a dieta animal mais diversificada e rica em proteínas;
- e) Maior valor nutritivo quando comparadas com as gramíneas tropicais;
- f) Maior resistência à seca em algumas espécies, proporcionando melhor distribuição da produção de forragens durante o ano, em quantidade e qualidade adequadas aos requerimentos nutricionais de animais com alto potencial genético.

Isto resulta em aumento nos índices produtivos e reprodutivos do rebanho, redução de custos pela substituição de fertilizantes nitrogenados e pesticidas, além do aumento na rentabilidade e competitividade da pecuária. É possível também verificar benefícios ambientais em decorrência da redução da poluição ambiental com resíduos químicos e aumento da biodiversidade do solo (Greenland, 1981; Boumann, 1999; Aita, 2001; Almeida, 2003; Nascimento, 2003; Volpe, 2008).

Estratégias de manejo têm sido aplicadas com sucesso, para manter as leguminosas em pastagens consorciadas. Algumas leguminosas, dentre elas: *Calopogonium mucunoides* (Pizarro & Carvalho, 1997), *Centrosema* sp, *Pueraria phaseoloides* (Argel & Keller-Grein, 1996), *Arachis* sp (Lascano, 1994; Stür et al. 1996; Pizarro et al. 1998); *Glycine max* L (Perez et al. 1993); *Desmodium* sp (Van Heurck, 1990); *Stylosanthes* sp (Grof et al. 2001) e *Cajanus cajan* (Beltrame & Rodrigues, 2007) tem sido usadas em consorciações com algumas

gramíneas, entre elas: *Panicum maximum*, *Cynodon nlemfuensis*, *Hyparrhenia rufa*, *Paspalum* sp, *Setaria sphacelata* cv. *Nandi*, *Brachiaria* sp, *Chloris* sp, *Digitaria* sp e *Melinis minutiflora*, para avaliar características morfofisiológicas, adaptabilidade e quantidade de nitrogênio transferido ao ecossistema de pastagem específico, valor nutritivo, palatabilidade, e fatores associados de manejo.

O uso de *C. mucunoides*, *G. max*, *Mucuna aterrina* e Estilosantes Campo Grande (*S. capitata* e *S. macrocephala*) não se restringe apenas ao campo. Sua eficácia está presente também em rodovias do Brasil, através da hidrossemeadura. Este processo consiste na implantação de espécies vegetais por meio de jateamento de sementes sobre o solo em áreas íngremes, utilizando sementes consorciadas de gramíneas e leguminosas como contenção de encostas, não permitindo o deslizamento (Agronegócio, 2008).

A consorciação entre gramíneas e leguminosas é uma opção viável que concorre para melhorar a utilização do solo, para reverter os processos de degradação dos recursos produtivos, para aumentar a disponibilidade de alimentos para os animais, contribuindo, desse modo, para o manejo racional das áreas produtivas (Evangelista & Rocha, 1997).

DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES

GRAMÍNEA *Panicum maximum* Jacq.

Panicum maximum Jacq. (= *Megathyrsus maximus* (Jacq.) Simon BK & Jacobs SWL) é de origem africana (África do Leste), mais especificamente das regiões do Quênia e da Tanzânia (Bogdan, 1977b; Skerman & Riveros, 1990). Pertence à família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae*, tribo *Paniceae*, e forma um complexo agâmico com *P. infestum* Anders e *P.*

trichocladum K. Schum. Essas três espécies constituem um complexo agâmico por se intercruzarem naturalmente, o que é possível por exibirem o mesmo número cromossômico ($x=8$) e o mesmo nível de ploidia.

P. maximum é uma espécie apomítica, mas tipos sexuais foram encontrados na natureza, e permitem o cruzamento com genótipos apomíticos e assim a obtenção de híbridos. Os acessos apomíticos são autotetraplóides ($4n=32$) e os sexuais encontrados na natureza são diplóides ($2n=16$) (Combes & Pernès, 1970; Pernès, 1975; Savidan, 1982a), apesar de que alguns acessos com diferentes números cromossômicos foram encontrados no centro de origem (Combes, 1975; Bogdan, 1977b). São eles: triplóides ($2n=24$), pentaplóides ($2n=40$), hexaplóides ($2n=48$), octoplóides ($2n=64$), nonaplóides ($2n=72$) e com números irregulares de cromossomos ($2n=30, 31, 34, 36, 37$ e 38).

Uma metodologia simples para garantir esse potencial reprodutivo em *P. maximum* é a duplicação do número de cromossomos dos acessos diplóides sexuais com colchicina. Isso permite o cruzamento entre um acesso sexual e um apomítico tetraplóide, e consequentemente a obtenção de híbridos férteis. Na estratégia de cruzamento, a escolha de genitores sexuais e apomíticos é um importante passo para o melhoramento, podendo evitar problemas de incompatibilidade, fertilidade e recombinação genética (Savidan, 1982a; Hanna, 1995).

O comportamento cromossômico durante a meiose e a sua relação com a fertilidade do pólen dos progenitores e híbridos devem ser avaliados, visando o sucesso na obtenção de híbridos férteis e com uma adequada produção de sementes. Alguns parentais e híbridos foram avaliados quanto à viabilidade do pólen (Pessim et al. 2007). Foram observados de 29% a 33% de anormalidades nos híbridos e na progenitora feminina, a qual é um híbrido sexual selecionado a partir de cruzamentos entre acessos sexuais e apomíticos. Os dois genitores masculinos que foram coletados na África evidenciaram anormalidades de 11% e 13%.

P. maximum apresenta um ciclo vegetativo perene sendo propagado por sementes. Apresenta um hábito de crescimento cespitoso, porém algumas plantas podem ser estoloníferas podendo chegar até 1,78 m de comprimento. As folhas podem ser decumbentes e eretas. Suas inflorescências são do tipo panícula. Possui um sistema radicular bastante desenvolvido, o que possibilita ótima resistência à seca e a sobrevivência em situações adversas (Jank, 1995). É cultivado com sucesso, principalmente em solos arenosos de fertilidade média a alta. É utilizado na dieta animal como fonte de proteína e em consorciações com algumas leguminosas (Costa, 1998). A **Figura 1** mostra as estruturas reprodutivas e vegetativas de *P. maximum*.

O Brasil dispõe de uma coleção de 426 acessos apomíticos e várias plantas sexuais de *P. maximum*. Essa coleção foi introduzida no Brasil na década de 80, por meio de um acordo de cooperação com o Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), France, atualmente Institut de Recherche pour le Développement (IRD). O germoplasma está sendo mantido no campo na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Corte), Campo Grande em Mato Grosso do Sul. É composto por acessos apomíticos e sexuais, e pode ser considerado representativo da variabilidade natural existente, devido à abrangência ecogeográfica das expedições de coleta realizadas no centro de origem (África Oriental) da espécie (Savidan et al. 1989).

A caracterização do germoplasma de *P. maximum* no Brasil (1984 a 1988) demonstrou alta variabilidade disponível para seleção do ponto de vista agrônomo e morfológico (Jank et al. 1994; Jank, 1995; Jank et al. 1997). A partir dessa caracterização foram selecionados 25 acessos com base nas características agrônomicas, e posteriormente avaliados em uma rede de ensaios nacional, em diferentes Estados brasileiros (Acre, Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso do Sul, Pará, Distrito Federal e Bahia) (Jank et al. 1993). Os resultados dessa avaliação nacional (1990 a 1992) resultaram na seleção de sete acessos que foram avaliados

em piquetes pequenos com animais para avaliar os efeitos dos animais sobre os capins (Euclides et al. 1995). Posteriormente, os melhores acessos foram avaliados sob pastejo bovino para determinar o desempenho animal. Esses resultados levaram ao lançamento das cultivares *P. maximum* cv. Tanzania-1 (1990), *P. maximum* cv. Mombaça (1993) e *P. maximum* cv. Massai (2001). O sucesso da adoção comercial dessas três cultivares está fundamentado em duas premissas: são cultivares extremamente produtivas, robustas e rústicas e foram lançadas com orientações sobre o manejo e utilização (Jank et al. 2005).

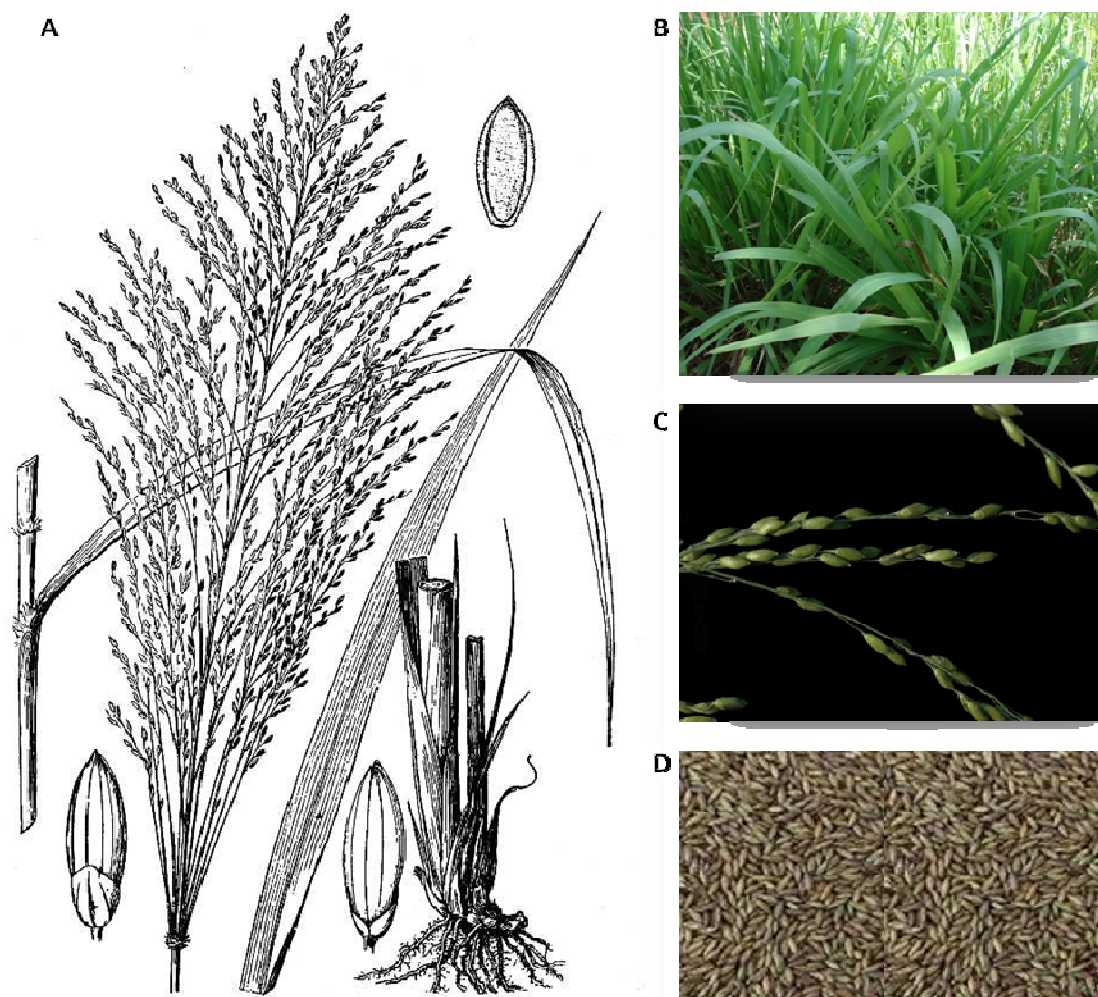


Figura 1: Aspectos reprodutivos e vegetativos de *Panicum maximum*. **A)** Ilustração da planta de *P. maximum* (extraída de Hitchcock AS. Manual of the grasses of the United States. 1950). **B)** Parte aérea da planta – folhas (Foto: Adna C. B. Sousa). **C)** Inflorescência (www.wikimedia.org). **D)** Sementes (Foto: Gerson Sobreira).

Apomixia

A apomixia é um modo de reprodução assexual por sementes. O embrião desenvolve-se a partir de divisões mitóticas do nucelo, levando à formação de sementes férteis, sem haver a união dos gametas femininos e masculinos como ocorre na reprodução sexual. Em espécies apomíticas pode ocorrer a reprodução sexual simultaneamente, numa mesma planta ou no mesmo óvulo (Nogler, 1982; Savidan, 2000; Dall'Agnol & Schifino-Wittmann, 2005). Em espécies apomíticas obrigatórias, a reprodução sexual está completamente excluída, e todas as sementes têm o genótipo da planta mãe (Koltunow et al. 1995).

Há dois tipos principais de apomixia: gametofítica e esporofítica. A apomixia gametofítica ocorre na maioria das gramíneas forrageiras de interesse econômico, tais como *Brachiaria*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum* e outras (Usberti Filho, 1981; Asker & Jerling, 1992). A apomixia gametofítica é caracterizada pelo desenvolvimento autônomo do embrião em um saco embrionário não reduzido, onde as células, incluindo o gameta, são diplóides. A partir da origem dos sacos embrionários, a apomixia gametofítica pode ocorrer por dois processos distintos: aposporia ou diplosporia (Nogler, 1982; Gauer et al. 2001).

Na apomixia apospórica, o embrião desenvolve-se a partir da célula somática do óvulo, diferente da célula-mãe do megásporo, formando um saco embrionário não-reduzido. Como o embrião apospórico se origina a partir de divisões mitóticas de uma célula somática, ele possui exatamente o mesmo complemento cromossômico e constituição genética da planta mãe. Devido a isto, a aposporia suprime a troca de genes, levando a heterozigose fixada (Hanna & Bashaw, 1987).

Na diplosporia a célula mãe do megásporo não entra em meiose, ou esta é incompleta, e, por mitoses, dá origem a um saco embrionário não reduzido. Em algumas formas de aposporia, ocorre a fecundação dos núcleos polares do saco embrionário por um núcleo do

grão de pólen levando à formação do endosperma, sem ocorrer a fecundação da oosfera, fenômeno denominado de pseudogamia. O caráter esporofítico da apomixia consiste na formação do embrião independente da formação de um saco embrionário (Koltunow, 1993). Na apomixia esporofítica, também designada embrionia adventícia, não há formação de sacos embrionários, mas os embriões diplóides desenvolvem-se diretamente a partir de células dos envoltórios do óvulo. Comumente, múltiplos embriões adventícios são observados e a reprodução sexual normalmente ocorre paralelamente à embrionia adventícia. Esse processo é comum em *Citrus* sp e *Mangifera* sp (Asker & Jerling, 1992; Koltunow et al. 1995).

O processo apomítico ultrapassa a meiose e a fertilização para formar sementes viáveis. Para isso ocorrer, são necessários três elementos básicos: a) ausência ou alteração da meiose evitando a redução (apomeiose); b) ativação da oosfera para formar um embrião na ausência da fertilização (partenogênese) e; c) iniciação do endosperma, tanto autonomamente ou pseudogamicamente (Spillane et al. 2001a; Spillane et al. 2001b).

Estudos sobre a herança da apomixia conduz à hipótese desse caráter estar ligado a um gene dominante ou um grupo de genes muito próximos. Esta hipótese é apoiada através da análise de genética mendeliana em *Bothriochloa-Dichanthium*, *P. maximum*, *Pennisetum* sp, *Ranunculus auricomus*, *Cenchrus ciliaris* e *Brachiaria* sp (Valle & Savidan 1996; Savidan, 1975; Savidan, 2000). Em *P. maximum* estudos indicam que um único gene dominante está envolvido, ou seja, as progênes híbridas incluem plantas sexuais e apomíticas, na proporção de 1:1. Portanto, o cruzamento entre uma planta sexual e uma apomítica, qualquer que seja o grau de sexualidade, dará uma progênie, onde a metade dos híbridos serão apomíticos. Consequentemente os acessos fixados, poderão ser multiplicados e entrar no processo de seleção (Savidan, 1982a; Savidan, 1982b; Savidan, 1983).

A apomixia possui um potencial para revolucionar a produção agrícola, maximizando a produção por meio da fixação do vigor híbrido, evitando perdas devido a problemas de polinização e acelerando o processo de melhoramento. Além disso, simplificaria o processo de produção comercial de sementes híbridas, sem necessidades de linhas paternas, ou isolamento no campo, aumentando a produção em países onde as produções são baixas. O uso da apomixia em larga escala poderia aumentar a diversidade genética existente, uma vez que de cada cruzamento entre uma planta sexual e uma planta apomítica poderia resultar em uma combinação gênica única, independente da heterose ou homozigose dos pais. Assim, os métodos de melhoramento podem ser orientados para a exploração das propriedades especiais da apomixia, visando o desenvolvimento de novos cultivares apomíticos (Hanna, 1995; Pereira et al. 2001).

LEGUMINOSAS

***Cajanus cajan* (L.) Millspaugh**

O guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh; $2n=22$) pertence à subtribo *Cajaninae*, tribo *Phaseoleae*, subfamília *Papilionoideae* e família *Leguminosae* (Sharma & Green, 1980). A Índia é considerada o centro de origem primário, onde é encontrada a maior diversidade genética da espécie (Reddy et al. 1997). Essa cultura ocupa mundialmente o quinto lugar de importância e consumo entre as leguminosas, sendo que a Índia contribui com mais de 90% da produção mundial para forragens, produção de grãos e energia. Desenvolve-se satisfatoriamente em países de clima tropical, subtropical e semi-árido (Barcelos et al. 1999).

É uma leguminosa arbustiva pubescente e pode crescer até 3 metros de altura. O caule é lenhoso, contendo amido na fase vegetativa, que fica escasso na fase reprodutiva, quando as

reservas são mobilizadas para o preenchimento das vagens. As folhas são compostas por três folíolos. Os folíolos são lanceolados ou elípticos estreitos, pontiagudos, com pilosidade leve em ambas as superfícies. As flores são amarelas, laranjas ou vermelhas e nascem em ráceros terminais ou axilares. As vagens são pilosas, abundantes e têm aproximadamente de 5,0 a 7,5 cm. As sementes são normalmente marrons, arredondadas, com um lado achatado e com um pequeno hilo branco. Possui sistema radicular muito vigoroso e desenvolvido que lhe garante boa resistência à seca e tolerância à acidez do solo (ICRISAT, 1984) (**Figura 2**). É uma planta de ciclo curto, embora uma combinação de fotoperíodo e temperatura podem afetar o florescimento e a maturação (Singh & Oswalt, 1992). É uma espécie autógama, mas na presença de polinizadores (abelhas) a polinização cruzada pode variar de 3,0% a 26% (Reddy et al. 2004).

O guandu pode ser utilizado na recuperação de áreas degradadas, e pode contribuir para a restauração da fertilidade e descompactação do solo. Constitui-se de uma excelente fonte de proteína na alimentação animal e humana. Na alimentação humana pode ser consumido na forma de grão seco e legume verde. Além disso, pode ser utilizado em consorciações com algumas gramíneas e como adubo verde, com o potencial produtivo de 6,5 a 9,5 t ha⁻¹ de massa seca na parte aérea (Fernandes et al. 1999; Santos et al. 2004; Rodrigues et al. 2004).

Considerando o potencial de guandu para a agricultura brasileira, principalmente em sistemas de integração lavoura-pecuária e para recuperar áreas degradadas, a Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos – SP) vem desenvolvendo, desde 1988, um programa de avaliação e seleção de genótipos de guandu com características agronômicas desejáveis como: elevada produção, qualidade de forragens e com baixo teor de tanino (Godoy et al. 1995). Os genótipos selecionados a partir dessas avaliações apresentaram, em graus variáveis, misturas mecânicas e segregação fenotípica (Godoy et al. 1994; Godoy et al. 1997).

Por essa razão, os genótipos selecionados foram submetidos a processo de autofecundação e seleção, visando à obtenção de linhagens puras. Essas linhagens foram avaliadas quanto ao desempenho agrônômico e ciclo vegetativo (Godoy et al. 2003; Godoy et al. 2004).

O resultado dessa avaliação, após 20 anos de pesquisa, possibilitou o lançamento da cultivar *C. cajan* cv. BRS Mandarin (2009). Apesar de ter sido selecionada para uso em solos de baixa fertilidade, a nova cultivar responde bem à adubação. Além disso, ela apresenta alta produtividade de forragem, alta retenção de folhas no inverno e baixo teor de tanino (Portal DBO, 2010).

O lançamento de novas cultivares contribuirá para solucionar problemas relacionados a sistemas de produção sustentável de carne e leite, reduzindo os custos e a sazonalidade, melhorando a alimentação e aumentando a produção animal (Provazi et al. 2007).

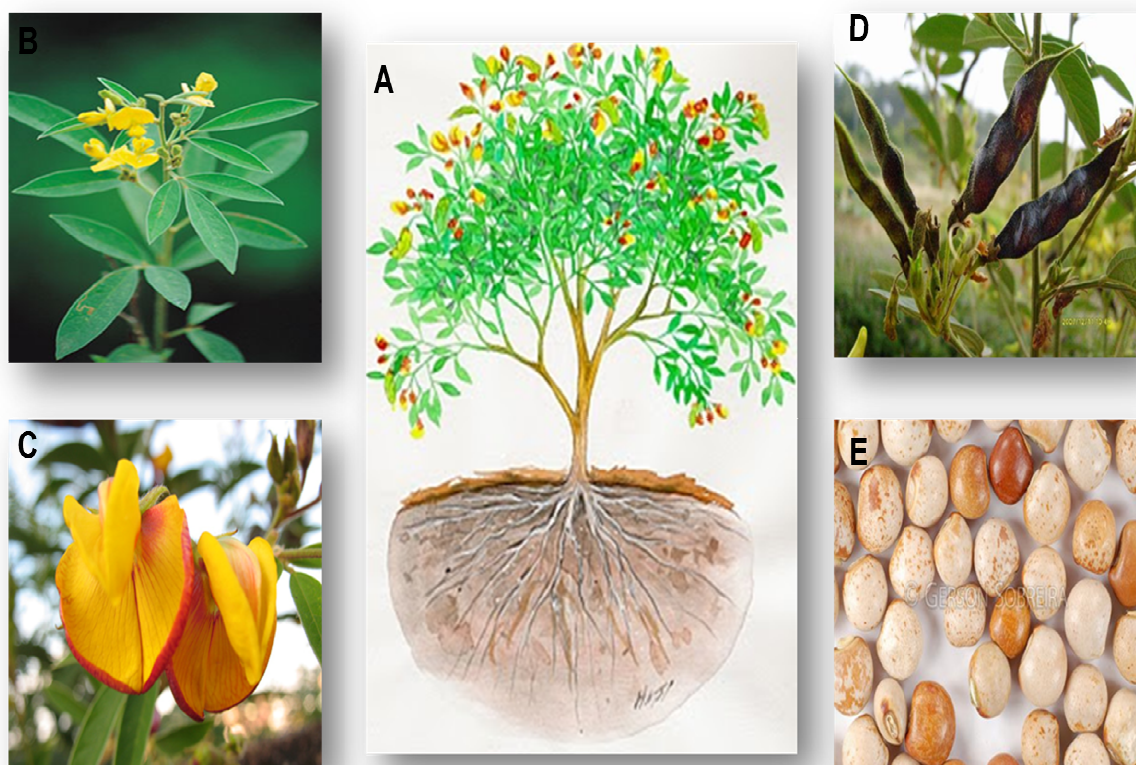


Figura 2: Aspectos reprodutivos e vegetativos de *Cajanus cajan*. **A)** Perfil arbustivo de *Cajanus cajan* (Foto: Hatsu Rio Apa). **B)** Inflorescência (Foto: Bennet). **C)** Flores (Foto: Anestor Mezzomo). **D)** Vagem (Foto: Forest Starr & Kim Starr). **E)** Sementes (Foto: Gerson Sobreira).

***Centrosema pubescens* Benth.**

O gênero *Centrosema* (DC.) Benth. pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Faboideae* e tribo *Phaseoleae*. Compreende 34 espécies e é nativo da América Central e da América do Sul (Williams & Clements, 1990). Várias espécies ocorrem naturalmente no Brasil, onde uma grande diversidade genética é encontrada (Schultze-Kraft et al. 1990).

C. pubescens (*Centrosema molle* Mart. Ex Benth) é uma planta rasteira, de habito trepador, perene, herbácea e apresenta raiz bem desenvolvida. Possui folhas compostas, trifoliadas e inflorescências plurifloras. As flores são violáceas, rosáceas ou brancas. As sementes são cilíndricas oblongas, marmoradas e negras quando estão secas (**Figura 3**). É uma espécie adaptável a condições áridas e resistentes a seca. Desenvolve-se bem onde a precipitação média anual é maior que 1270 mm e a temperatura média está entre 22°C e 30°C (Bogdan, 1977b). Ela é usada principalmente em pastoreio, adubação verde e em consorciações com algumas gramíneas (Nworgu & Fasogbon, 2007; Odeyinka et al. 2008).

Entre as espécies do gênero com potencial agrônômico, três recebem atenção especial para as áreas tropicais e subtropicais da América: *C. pubescens*, *C. acutifolium* e *C. brasilianum*. Essas três espécies conseguem se desenvolver em solos ácidos e de média fertilidade (Humphreys et al. 1990; Schultze-Kraft et al. 1990; Teitzel et al. 1990). O número de cromossomos para elas é de $2n=2x=22$ (Novaes & Penteado, 1993), enquanto $2n=2x=18$ e 20 têm sido relatados em outras espécies (Battistin & Vargas, 1989; Clements et al. 1983; Miles et al. 1990). As espécies do gênero *Centrosema* são caracterizadas como autógamas, embora a polinização cruzada tenha sido relatada em *C. brasilianum*, com taxas de cruzamento variando de 31% a 53% (Maass & Torres, 1992).

O gênero *Centrosema* inclui outras espécies promissoras para serem utilizadas como culturas de pastagem. Entretanto, o conhecimento genético é limitado, o que tem restringido

sua domesticação e a exploração em programas de melhoramento. Atualmente, apenas 26 marcadores microssatélites polimórficos foram relatados para *C. pubescens* (Sousa et al. 2009).

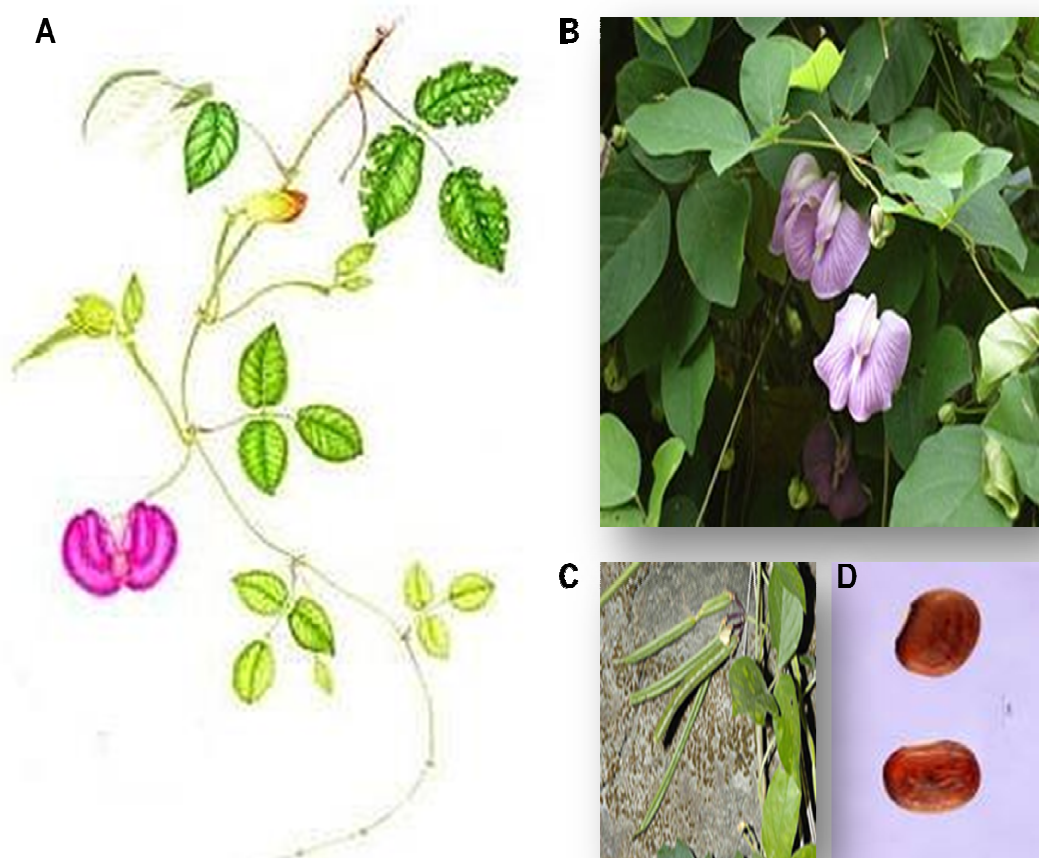


Figura 3: Aspectos reprodutivos e vegetativos de *Centrosema pubescens*. **A)** Ilustração da planta de *C. pubescens* (Foto: Ivani Coutinho). **B)** Folhas e flores (Foto: Tau'olunga). **C)** Vagem (<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Centrosemapubescens.jpg>). **D)** Sementes (Foto: Tracey Slotta).

***Calopogonium mucunoides* Desv.**

O calopogônio (*Calopogonium mucunoides* Desv.; 2n=36) é originário da América do Sul e da América Central, sendo encontrado do México até o norte da Argentina, e de forma frequente nas regiões tropicais do Brasil (Cruz Filho et al. 1983). Pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Faboideae* e Tribo *Phaseoleae* (Carvalho-Okano & Leitão Filho, 1985).

Essa espécie é caracterizada como uma leguminosa trepadora e vigorosa podendo alcançar 1,0 m de altura. As folhas têm três folíolos grandes e são pilosas em ambas as faces, com formato elíptico e ovalado. Apresentam de 4 a 10 cm de comprimento e de 2 a 5 cm de largura. O caule é herbáceo, coberto de pêlos de cor marrom, com capacidade de enraizamento nos nós que entram em contato com o solo. As flores têm corola azul e surgem em ráculos de 4 a 12 flores. As vagens são curtas e possuem um formato linear ou curvo, cobertas por uma densa pilosidade marrom. A cor das sementes varia de amarelo a marrom escuro (Loigier, 1994). As sementes apresentam baixa porcentagem de germinação, que é atribuída, principalmente, à impermeabilidade do tegumento a entrada de água, o que dificulta o estabelecimento uniforme no campo. A cultura apresenta um ciclo aproximado de 240 a 260 dias (Bewley & Black, 1982; Souza et al. 2000). A **Figura 4** mostra os aspectos reprodutivos e vegetativos de *C. mucunoides*.

É adaptada às condições tropicais úmidas com precipitações entre 1.500 e 2.500 mm anuais. Apresenta baixa resistência à seca, ao encharcamento do solo e ao fogo, porém moderada tolerância ao sombreamento. O calopogônio quando é submetido a uma estação seca longa e severa, poderá morrer, tornando-se uma cultura anual. Quando não há estação seca severa, o calopogônio é perene. Adapta-se bem em solos de baixo pH, argilosos e arenosos, sendo menos exigentes em fertilidade de que a maioria das leguminosas. Possui alta

capacidade de fixação de nitrogênio (McSweeney & Wesley-Smith, 1986; Seiffert & Zimmer, 1988).

O calopogônio pode ser utilizado sob a forma de feno, pastejo direto, fornecido puro ou misturado com as gramíneas, para a formação de banco de proteínas para suplementação na alimentação animal. Além disso, poder ser usada como adubo verde e em consorciações com algumas gramíneas (Varela & Gurgel, 2001). Constitui uma excelente fonte de proteína para os rebanhos, principalmente durante o período de estiagem, já que seus teores de proteína bruta variam de 14% a 18%, enquanto que uma gramínea, na sua fase ótima de utilização, apresenta de 8% a 10%. Seus teores de tanino são relativamente elevados, quando comparados com os de outras leguminosas forrageiras tropicais, o que pode resultar em menor consumo, devido a sua baixa palatabilidade, notadamente durante o período chuvoso (Veasey et al. 1999; Gama, 2007; Barcellos, 2008).

Apesar da importância e do grande potencial de *C. mucunoides* no Brasil, não existe um programa de melhoramento genético definido. Até o momento, apenas 23 marcadores microsatélites polimórficos foram relatados para *C. mucunoides* (Sousa et al. 2010). O banco de germoplasma presente na Embrapa Cerrados (Brasília – DF) compreende mais de 200 acessos procedentes do banco de germoplasma do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Esse banco foi avaliado do ponto de vista agrônomo e apresentou uma variação significativa na produção de matéria seca, na retenção de folhas durante a estação seca, alto valor nutritivo e produção de sementes (Pizarro & Carvalho, 1997).



Figura 4: Aspectos reprodutivos e vegetativos de *Calopogonium mucunoides*. **A)** Ilustração da planta de *C. mucunoides* (www.tropicalforages.info/index.html). **B)** Folhas (Foto: Canudas Lara EG). **C)** Flor (Foto: Masís A.). **D)** Vagem (www.webportalagropecuario.com.br). **E)** Sementes (Foto: Gerson Sobreira).

MARCADORES MICROSSATÉLITES E APLICAÇÕES

Marcadores microsatélites (*Simple Sequence Repeat* – SSR) são pequenas regiões compostas de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em *tandem*, distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariotos (Litt & Luty, 1989).

Apesar de apresentar altas taxas mutacionais (10^{-3} a 10^{-6}) quando comparados com marcadores de cópia única, os microsatélites são conservados em suas regiões flangeadoras entre genótipos de uma mesma espécie e de espécies relacionadas. Consequentemente, eles podem ser transferidos dentro de espécies do mesmo gênero ou de genes similares filogeneticamente (Goldstein & Schlotterer, 2001). Caracteriza-se por ser co-dominante, o que permite a discriminação entre homozigotos e heterozigotos em um único loco. Além de apresentar um padrão de herança mendeliana, essas regiões são multialélicas, altamente polimórficas e informativas. O alto polimorfismo encontrado deriva de variações no número de repetições, que podem ser provenientes do deslize (*strand - slippage*) da DNA polimerase durante a replicação do DNA ou do pareamento errôneo (*crossing-over* desigual) entre cromátides irmãs (Schlotterer & Tautz, 1992).

A amplificação dessas regiões é realizada via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) usando iniciadores (*primers*) específicos e complementares às regiões que flanqueiam essas repetições. A detecção do polimorfismo pode ser realizada em géis desnaturantes de poliacrilamida por meio de marcação radioativa ou corados com prata, e por marcação dos produtos amplificados com compostos fluorescentes (Rafalsy et al. 1996; Creste et al. 2001).

Os microsatélites podem ser isolados por meio de métodos tradicionais de construção de bibliotecas genômicas enriquecidas usando sondas complementares aos motivos. A metodologia consiste de quatro etapas primordiais: a) digestão de DNA; b) amplificação com os adaptadores; c) enriquecimento por hibridização utilizando estreptavidina magnética, onde os

fragmentos com microssatélites se hibridizam com oligonucleotídeos ligados a esferas magnéticas (*beads*), que são atraídas por um ímã; d) clonagem e; e) sequenciamento (Billotte et al. 1999) (**Figura 5**). A partir do isolamento dos clones contendo inserto com microssatélite e do sequenciamento, é possível desenhar *primers* específicos que flanqueiam essas regiões.

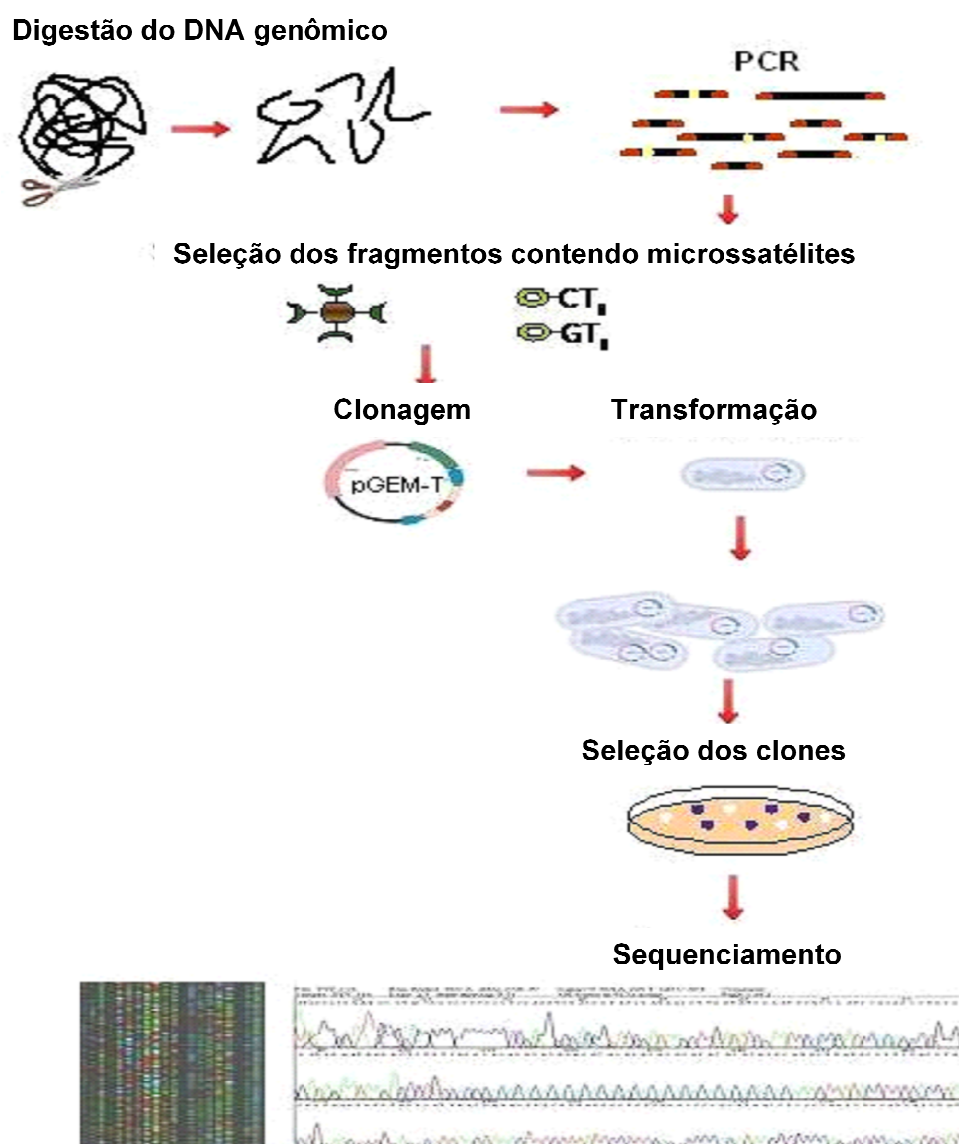


Figura 5: Construção da biblioteca genômica enriquecida. (Editado por Adna C. B. Sousa).

Quanto à composição das sequências, os microssatélites são classificados como perfeitos, imperfeitos ou compostos (Borém & Caixeta, 2006).

Os microssatélites perfeitos possuem uma única repetição sem interferência de um nucleotídeo diferente em sua sequência (**Figura 6**).

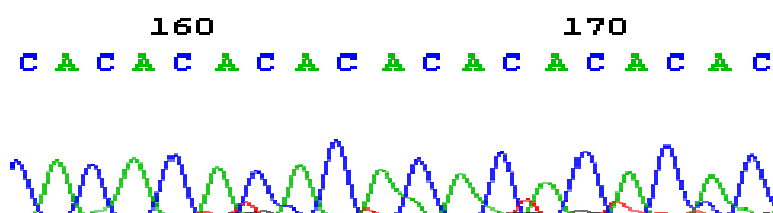


Figura 6: Sequência isolada do genoma de *Centrosema pubescens*. Microssatélite simples perfeito (CA)₉. (Adna C. B. Sousa).

Os microssatélites imperfeitos possuem um ou mais nucleotídeos que não correspondem à unidade de repetição (**Figura 7**).

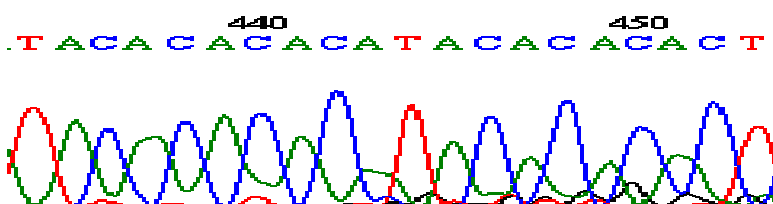


Figura 7: Sequência isolada do genoma de *Calopogonium mucunoides*. Microssatélite simples imperfeito (AC)₄T(AC)₄. (Adna C. B. Sousa).

Os microssatélites compostos são intercalados por dois ou mais motivos distintos (Figuras 8a e 8b).

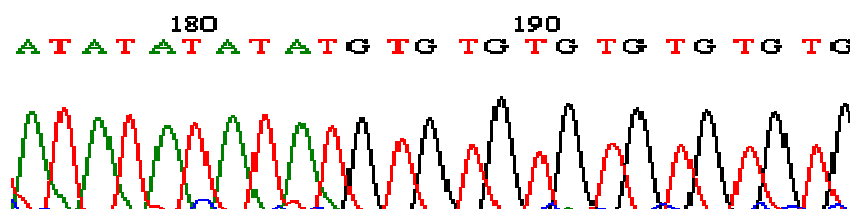


Figura 8a: Sequência isolada do genôma de *Panicum maximum*. Microssatélite composto perfeito (AT)₅(GT)₇ (Adna C. B. Sousa).

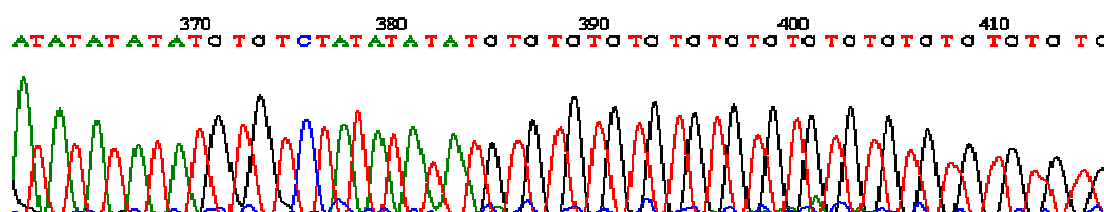


Figura 8b: Sequência isolada do genôma de *Panicum maximum*. Microsatélite composto imperfeito (AT)₅(TG)₂TC(TA)₄(TG)₁₆. (Adna C. B. Sousa).

A principal vantagem em utilizar essa tecnologia é a possibilidade de detectar o polimorfismo diretamente do DNA genômico, sem a influência da variação ambiental ou gênica. Devido a sua propriedade em revelar um alto grau de polimorfismo, os microssatélites tornaram-se ideais para: a) o mapeamento genético, principalmente para análise de ligação e de associação de genes a doenças; b) estudos populacionais; c) caracterização dos sistemas reprodutivos; d) seleção assistida e d) caracterização de banco de germoplasma (Wu & Tanksley, 1993; Van Oosterom & Ceccarelli, 1993; Olufowote et al. 1997; Collevatti et al. 2001).

Em bancos de germoplasma *ex situ* é possível:

- a) Analisar a identidade genética de cada acesso;
- b) Identificar duplicatas dentro do germoplasma;
- c) Estimar a similaridade genética entre os acessos;
- d) Conhecer a estrutura genética do banco de germoplasma;
- e) Estimar a riqueza alélica e;
- f) Avaliar a representabilidade da coleção em comparação com a diversidade da espécie cultivada e os seus parentes silvestres.

O conhecimento desses parâmetros genéticos abre perspectivas para os programas de melhoramento de plantas, cujos principais objetivos são obtenção da variabilidade genética, seleção de acessos superiores e avaliação de materiais genéticos promissores para lançamento comercial. Além de contribuir com estratégias de conservação e de manejo, maximizam a obtenção de ganhos genéticos significativos na seleção de características de interesse na maioria das espécies de importância econômica (Borém & Miranda, 2005).

SISTEMAS REPRODUTIVOS EM PLANTAS

Nas forrageiras tropicais existem poucas informações sobre o sistema de cruzamento. O conhecimento dos sistemas reprodutivos é de extrema importância, pois permite compreender os padrões de fluxo gênico e a diferenciação genética entre e dentro de populações (Hamrick, 1990).

A sequência de eventos na formação do saco embrionário de uma planta (megagametogênese) determinará o modo de reprodução e, conseqüentemente, a natureza da progênie resultante. Na parte masculina, a microsporogênese determinará a fertilidade de pólen e, assim, sua contribuição na constituição genética da progênie (Frankel & Galun, 1977).

De modo geral, as plantas se reproduzem por duas formas: assexuadamente e sexuadamente.

Na reprodução assexual ou vegetativa as plantas são formadas por meio de órgãos vegetativos especializados (raízes, tubérculos, estolões, colmos, rizomas, estacas ou por cultura de tecidos) e não envolve a fusão de gametas. Em algumas espécies as sementes são formadas sem a sequência normal da meiose e fecundação (apomixia ou apomixia facultativa).

A reprodução sexual é baseada no processo meiótico de divisão celular, em que o número de cromossomos das células reprodutivas é reduzido à metade para formar os gametas: oosfera e gametófitos. Essas plantas são classificadas como autógamas, alógamas ou mistas.

As plantas autógamas apresentam altas taxas naturais de autofertilização (acima de 95%). Apesar de preferencialmente realizarem autofecundações, pode ocorrer uma baixa taxa de fecundação cruzada nessas espécies. Porém a integridade genética dos genótipos homozigotos é mantida durante o processo reprodutivo. Conseqüentemente a variabilidade genética distribuída está em maior proporção, entre as populações. A frequência de polinização cruzada em espécies autógamas depende da população de insetos polinizadores, intensidade do vento, temperatura e umidade.

As plantas alógamas são aquelas que realizam preferencialmente polinização cruzada (acima de 95%). Nessas espécies ocorrem intensos intercâmbios de gametas com diferentes constituições gênicas entre diversos indivíduos de uma população. Conseqüentemente, a maior

parte da variabilidade genética distribuída é encontrada dentro das populações. Alguns mecanismos podem favorecer a polinização cruzada, como a monoícia (flores de sexos separados na mesma planta), dioícia (flores unisexuais em plantas diferentes), auto-incompatibilidade (o pólen é geneticamente incompatível com o óvulo da mesma planta), protândria (o pólen é liberado antes do estigma estar receptivo), protogínia (o pólen é liberado depois do estigma estar receptivo) e obstrução mecânica da autopolinização.

Na reprodução mista ou intermediária todas as espécies se reproduzem utilizando os sistemas sexuais alógamo e autógeno simultaneamente. Estas espécies apresentam taxas de cruzamento que variam de 5 até 95% dependendo das condições ambientais e da frequência de polinizadores (Hamrick & Godt, 1996; Kalisz et al. 2004; Borém & Miranda, 2005).

A determinação das taxas de cruzamento em populações naturais era limitada, devido à distância irregular entre as plantas, especialmente em espécies arbóreas, barreiras naturais entre plantas, a dificuldade de se identificar um bom marcador genético, e a expressão de dominância exibida, em maior parte, por esses marcadores (Paiva et al. 1993; Paiva et al. 1994). Contudo, Ritland & Jain (1981) enfatizaram a capacidade e a versatilidade das estimativas quando dados eletroforéticos eram empregados, considerando-se que muitos locos segregantes com alelos co-dominantes podiam ser, frequentemente, encontrados nas populações.

O surgimento dos marcadores moleculares possibilitou a obtenção de estimativas mais precisas das taxas de cruzamento. Além de quantificar o processo de transmissão de genes entre plantas, eles descrevem a transmissão de genes entre gerações. Tradicionalmente, as estimativas de cruzamentos eram realizadas a partir do polimorfismo isoenzimático. As principais vantagens do uso desses marcadores eram relacionadas ao fato de serem geralmente co-dominantes e permitirem a análise das espécies ainda no estágio de plântula

(Brown & Allard, 1970). Os marcadores microssatélites surgiram como uma alternativa. Por serem também, co-dominantes permitem a identificação do genótipo (homozigoto ou heterozigoto) sem a necessidade de testes de progênie. A possibilidade de caracterização das plântulas logo após a germinação diminui o tempo necessário para se obter informações a respeito do sistema de cruzamento. Além disso, é possível obter e comparar taxas de cruzamento verificadas a partir de locos individuais e de locos múltiplos para mais informações sobre a endogamia (Abdel-Ghani et al. 2004; Zucchi et al. 2004).

Os métodos de estimativas direta da taxa de cruzamento estão baseados em um modelo misto de cruzamento, pelo qual se determina a proporção de progênie provenientes de autofecundação (s) e de fecundação cruzada ($t = 1 - s$), através de pólen de diferentes plantas aleatoriamente disperso. Este modelo de análise permite estimar também a proporção de indivíduos de uma determinada progênie proveniente do cruzamento entre indivíduos aparentados, além da correlação de autofecundação, variação nas taxas de autofecundação entre famílias, e a correlação de paternidade de dois indivíduos, da mesma progênie, serem irmãos completos (Ritland & Jain, 1981; Ritland, 2002).

Esse conhecimento é determinante na amostragem para a coleta de germoplasma e na sua manutenção, na tomada de decisões pelo melhorista em termos de estratégias de melhoramento, nas estimativas de parâmetros genéticos, predição de valores genéticos dos genótipos candidatos à seleção e tipos de cultivares a serem obtidas (Vencovsky et al. 2001).

OBJETIVOS

GERAL

- Contribuir para o conhecimento genético de forrageiras tropicais com estimativas da taxa de cruzamento (*Centrosema pubescens* e *Calopogonium mucunoides*) e análise da diversidade genética do germoplasma de *Panicum maximum*, *Cajanus cajan*, *C. pubescens* e *C. mucunoides* utilizando marcadores microssatélites.

ESPECÍFICOS

- Isolar e sequenciar locos de microssatélites de *P. maximum*, *C. pubescens* e *C. mucunoides*;
- Desenhar *primers* específicos para amplificar os locos de microssatélites isolados e selecionados;
- Caracterizar cada loco de microssatélite com relação ao:
 - 1 - Tipo de repetição;
 - 2 - Número e tamanho dos alelos amplificados;
 - 3 - Temperatura de anelamento;
 - 4 - Heterozigosidade esperada e observada.
- Estimar a taxa de cruzamento em *C. pubescens* e *C. mucunoides*;
- Avaliar a diversidade genética em genótipos disponíveis no germoplasma de *P. maximum*, *C. cajan*, *C. pubescens* e *C. mucunoides*.

CAPÍTULO I

Development of microsatellite markers in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) and their transferability to other tropical forage grass species

A. C. B. Sousa¹ • L. Jungmann² • T. Campos¹ • D. A. Sforça¹ • L. R. Boaventura¹ •
G. M. B. Silva¹ • M. I. Zucchi³ • L. Jank² • A. P. Souza^{1,4}

¹ University of Campinas (UNICAMP), Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), CP 6010, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

² Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Beef Cattle, Forage Breeding Dept, CP 154, Campo Grande – MS, CEP 79002-970, Brazil.

³ Agronomic Institute of Campinas, Pólo Apta Centro Sul – Rod. SP 127 km 30, Piracicaba – SP, CP 28, CEP 13400-970, Brazil.

⁴ University of Campinas (UNICAMP), Biology Institute, Plant Biology Dept (DBV), CP6109, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

Keywords: Guineagrass, simple sequence repeat, molecular marker, genetic diversity.

***O trabalho foi publicado pela revista *Plant Breeding* (2010).**

DOI: 10.1111/j.1439-0523.2010.01779.x.

Abstract

The Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) is one of the most important tropical forage grasses, but genetic knowledge on this species is still limited. In this work, twenty novel polymorphic microsatellite markers were developed, validated and employed in estimating genetic relationships among twenty-five *P. maximum* accessions selected from a germplasm collection. In addition, they were tested for cross-species amplification in four other forage grass species. The number of alleles observed for each locus ranged from 4 to 12 (average 6.7). The values of polymorphism information content (PIC) varied from 0.41 to 0.83 (average 0.61) and the discriminating power (D) ranged from 0.53 to 0.98 (average 0.72). Cross-amplification demonstrated the potential transferability of these microsatellites to four tropical forage grass species. Cluster analysis based on the Unweighted Pair-Group Method revealed three distinct groups: two clusters consisted of *P. maximum* accessions and a third cluster, consisted of the other tropical forage grass species. The data demonstrated that the microsatellites developed herein have potential for germplasm characterization and genetic diversity analysis in *P. maximum* and other forage grass species.

Introduction

Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) is a tropical forage grass native to Africa. Genetic diversity is high among *P. maximum* populations of tropical, subtropical and warm temperate regions of the world, where it became an important forage grass. The *P. maximum* species belongs to the family *Poaceae*, subfamily *Panicoideae*, tribe *Paniceae*, and forms an agamic complex with the botanical species *P. infestum* Anders and *P. trichocladum* K. Schum. Aposporous apomixis with pseudogamy is the propagation mode of *P. maximum*. This asexual mode of propagation enables cloning of plants through the seed and can be used for fixing desirable accessions, as F_1 hybrids, and simplifying commercial hybrid seed production (Savidan 2000). In *P. maximum*, apomictic plants are tetraploid and have $2n=4x=32$ chromosomes (Savidan 1982).

The breeding of tropical forage grasses consists mainly of the evaluation and selection of natural ecotypes by exploiting the variability in centers of origin (Jank et al. 2005). This procedure is being successfully used in *P. maximum* and several *Brachiaria* species for improved livestock performance in Brazil. Guineagrass is a high yielding and nutritive forage adapted to soils of medium to high fertility and regions receiving over 600 mm of rainfall (Pereira et al. 2001). *P. maximum* is the most productive seed-propagated tropical forage grass and the second most cultivated grass in Brazil.

The limited genetic knowledge of guineagrass has restricted breeding programs. Genomics tools, as microsatellite markers, are required for *P. maximum* improvement. Microsatellites are short tandem repeat sequence motifs, consisting of repeat units of 1-6 base pairs (bp) that represent highly polymorphic DNA markers with discrete loci and co-dominant alleles (Tautz and Schlötterer 1994). They are effective for genetic diversity and genetic relationship estimation, as well as for prediction of genetic value in selected candidates derived

from intraspecific crosses and the performance of their hybrid progenies (Grupta and Varshney 2000, Varshney et al. 2005, Ebina et al. 2007). Therefore, the development of microsatellite markers for *P. maximum* could be extremely important in exploiting genetic diversity of this species in breeding programs.

The present work reports the isolation and characterization of 20 polymorphic microsatellite markers for *P. maximum* and cross-species amplifications in other four tropical forage grass species.

Material and Methods

Plant material and DNA extraction: Microsatellites were isolated from the accession *P. maximum* cv. Tanzânia (ORSTOM T58) and characterized in 25 *P. maximum* tetraploid apomictic accessions from the germplasm collection of EMBRAPA Beef Cattle, MS, Campo Grande, Brazil. The accessions were collected and introduced in Brazil by the Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), in France, and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), in Brazil, and were designated as: ORSTOM-T21 (MASSAI), ORSTOM-T110, ORSTOM-T24, ORSTOM-G21, ORSTOM-T84, ORSTOM-K214, ORSTOM-T46, ORSTOM-T62, ORSTOM-K191, ORSTOM-K193, ORSTOM-K64, ORSTOM-K68, ORSTOM-K190A (MONBAÇA), ORSTOM-T58 (TANZÂNIA), ORSTOM-K217, ORSTOM-KK8, ORSTOM-T60, ORSTOM-T72, ORSTOM-T91, ORSTOM-T95, ORSTOM-KK33, ORSTOM-T97, ORSTOM-T65, ORSTOM-K249 and ORSTOM-T77. In addition, cross-amplification tests were performed using DNA from other tropical forage grass species in order to investigate the transferability of the microsatellites developed herein. The genera *Brachiaria* and *Paspalum* were selected because of their impact at the forage market in Brazil and important contribution to the development of tropical pastures. The following species

were evaluated: *Brachiaria humidicola*-CIAT-26149 (BH16) and *B. brizantha*-CIAT-16114 (B105), from the germplasm collection of Embrapa Beef Cattle, and *Paspalum regnellii* (PR-019186) and *Paspalum notatum* (PN-023523) from the germplasm collection of Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brazil.

Genomic DNA was extracted from freeze-dried leaf samples following the CTAB method of Doyle and Doyle (1990). DNA samples were evaluated on a 1% agarose gel and quantified by comparison with known quantities of λ phage uncut DNA (Invitrogen, CA, USA).

Library construction and screening for microsatellite repeat sequences: A genomic enriched library was constructed for two dinucleotide repeat sequences following the protocol described by Billotte et al. (1999). Genomic DNA (20 μ g) was digested with *RsaI* restriction enzyme (Invitrogen, CA, USA) and the resulting fragments were linked to *RsaI* adapters. Dinucleotide (CT)₈ and (GT)₈ biotinylated probes were used for selection of *RsaI* restricted fragments linked to *RsaI* adapters which contained microsatellites. The selected DNA fragments were recovered with Streptavidine MagneShere Paramagnetic Particles (Promega, WI, USA) using a biotinylated probe, followed by magnetic selection as described by the manufacturer. Selected fragments were PCR amplified using primer sequences complementary to the adapters and ligated into the pGEM-T vector (Promega, WI, USA). *Escherichia coli* XL-1 Blue cells (Stratagene, CA, USA) were transformed with the recombinant plasmids and cultivated on Luria-Bertani agar plates containing 100 μ g mL⁻¹ ampicillin (Sigma, Germany), 50 μ g mL⁻¹ X-galactosidase, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (MBI Fermentas, MD, USA). Single white colonies were transferred onto microplates for long-term storage at -80 °C.

DNA Sequencing, primer designing and microsatellite polymorphisms: Of 576 recombinant colonies that were selected, 48 were sequenced on an ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, CA, USA) using the Big Dye terminator version 3.1 version

Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA). Primers were designed using LaserGene software, vs.5.03 (DNASar Inc.) at the following conditions: amplification size products from 150 bp to 300 bp; GC content between 40-60%; annealing temperature (Ta) between 45 and 60°C; primer length between 18 and 22 bp and with no hairpins or dimmers. The simple sequence repeat identification tool (SSRIT) (<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>) was used to identify microsatellites present in the non-redundant sequences (Temnykh et al. 2001). Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed in 25 µL final volume containing 10 ng of DNA template, 0.8 µM of each forward and reverse primers, 100 µM of each dNTP (MBI Fermentas, MD, USA), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, and 0.5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA). PCR reactions were performed using the following conditions: 94°C for 1 min followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, specific Ta for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 5 min. Amplification products were verified by electrophoresis on 3% agarose gels containing 0.1 mg ethidium bromide/ml in 1X TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.0) and 6% denaturing polyacrylamide gels in 1X TBE buffer, using a 10 bp ladder (Invitrogen, CA, USA) as a standard size. The DNA fragments were visualized by silver staining according to Creste et al. (2001).

Data analysis: The polymorphism information content (PIC) values were calculated for estimates of marker informativeness (Cordeiro et al. 2003). In order to compare marker efficiencies in varietal identification, a discriminating power (D) was estimated for each primer (Tessier et al. 1999). Genetic similarity for all the pairwise combinations were calculated according to Jaccard's similarity coefficient (Jaccard 1908) and clustered using the Unweighted Pair Group Method employing arithmetic averages (UPGMA) using the NTSYSpc v.2.1 software (Rohlf 2000). The reliability of the generated dendrogram was tested by bootstrap analysis using the BooD software with 1.000 interactions (Coelho 2002).

Results and Discussion

The 20 novel microsatellite loci were polymorphic in *P. maximum* and in the *Brachiaria* and *Paspalum* species examined (**Table 1**). A total of 135 putative alleles were obtained from the 20 microsatellite markers and used to assess genetic relationship among 25 *P. maximum* accessions and four tropical forage grass species. The number of alleles ranged from 4 to 12, with an average of 6.7. The PIC values of the 20 microsatellite loci ranged from 0.41 to 0.83 (average 0.61). The calculated D values ranged from 0.53 to 0.98 (average 0.72). The highest D value was found in 2PMc222.1 (0.91) and 1PMs11b (0.98), which were loci with the highest PIC values. The polyploid nature of *P. maximum* does not allow for estimation of the exact copy number of each allele. Therefore, standard tests for deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were not applied.

All polymorphic markers were tested for cross-amplification in *B. humidicola*, *B. brizantha*, *P. notatum* and *P. regnellii*. Eleven microsatellite loci amplified in these four species, but with different levels of transferability. Four loci (2PMc236, 1PMs11b, 2PMc226 and 2PMc144) amplified successfully in all species, indicating their absolute (100%) transferability. The markers 2PMc252 and 2PMc287 cross-amplified only in *Paspalum* sp and five markers (2PMc259, 2PMc308, 2PMc373, 2PM198.1 and 2PMc37) amplified only in *Brachiaria* sp. Moreover, non-specific amplification of the loci 1PMc61, 2PMc342, 2PMc125, 1PMc48, 2PMc239.2, 2PMc191, 2PMc224, 1PMc48.16 and 2PMc222.1 was observed in the four examined species. The results suggest considerable sequence conservation within the primer regions flanking microsatellite loci.

Genetic analysis of 25 accessions of *P. maximum* revealed three distinct clusters (**Figure 1**). Based on the Jaccard's similarity coefficient the 25 accessions were differentiated.

Table 1 Description of 20 microsatellite markers developed for *Panicum maximum* Jacq. and cross-species amplification in four forage grass species.

SSR locus	GenBank accession no.	Repeat motif	T _a (°C)	Primer sequences (5' - 3')	N	Characteristics in <i>P. maximum</i>		Transferability in tropical forage grass species				
						Size range(bp)	PIC	D	<i>Brachiaria humidicola</i>	<i>Brachiaria brizantha</i>	<i>Paspalum regnellii</i>	<i>Paspalum notatum</i>
1PMc61	FJ853735	(CA)5	60°	F: ACACACCAGTCCAGTCAT R: GCCACGCTCCACAG	11	100-115	0.77	0.82	-	-	-	-
2PMc259	FJ853736	(GT)8	60°	F: GGGCCGGGGAGTAGGTTAG R: GGTTCAAGGGGAGAGCAGAGTG	9	207-216	0.62	0.76	+	+	-	-
2PMc342	FJ853737	(TG)7	53.3°	F: GGGATCCGGTATGGTCA R: GTCGGCTGCGTGCTA	4	240-253	0.41	0.53	-	-	-	-
2PMc125	FJ853738	(TGT)9	55°	F: CTTTGCCATCTCTTATCCACA R: GCTGCCCATTTCTTAGTCCA	4	230-246	0.61	0.72	-	-	-	-
2PMc308	FJ853739	(CT)10(T)9	51.0°	F: GGAACCGTGTAACTAAATGAT R: TGATGAATGAACCAAAAGTCT	6	219-240	0.58	0.70	+	+	-	-
1PMc48	FJ853740	(CA)6	60°	F: GAAATCTGGTGCATCATCCT R: ATCCGGTTGGCAGAGTATC	4	240-253	0.51	0.63	-	-	-	-
2PMc239.2	FJ853741	(GT)6	53.0°	F: CAAACAATTCAAGCACAAACTA R: CTATGGAGAAATTAAGCAACCT	4	251-262	0.53	0.69	-	-	-	-
2PMc191	FJ853742	(GT)5	49.2°	F: ACACTCAACTGGCAACCT R: TTCACAATTTCTTTTCACAC	9	125-136	0.57	0.68	-	-	-	-
2PMc236	FJ853743	(TG)7	53°	F: AACTGTCACATATTTTCACTTT R: GGATCCCTCTTTCATTAG	4	302-316	0.42	0.55	+	+	+	+
1PMs11b	FJ853744	(CA)9	60°	F: CTGCTGCCCGCTAGGAAT R: TTAAATGCGTCAACCCCAACC	12	345-358	0.83	0.98	+	+	+	+
2PMc226	FJ853745	(AC)5	53°	F: TCGAATATGCAGGAGAAC R: GTAAAGTGTAACCCCAAGTG	4	340-349	0.61	0.73	+	+	+	+
2PMc144	FJ853746	(TG)14	55°	F: CAACCTCTCGTGTCTGCTC R: CTGTCCTGCCTGAAGTT	10	155-174	0.72	0.80	+	+	+	+
2PMc224	FJ853747	(CA)5	52°	F: AAGGGTGGGGTTCC R: TGGTCATGGTGGGTTCA	10	207-236	0.68	0.79	-	-	-	-
2PMc373	FJ853748	(AG)9	53.3°	F: CAGGCGAATGAGAGCAAAAA R: TTAAAGGCATTGCGGTGTCA	12	244-253	0.79	0.86	+	-	-	-
2PM198.1	FJ853749	(CT)7(TC)6	56.5°	F: CAGAAAGAAGGAAGGAAAGGAA R: TCTAGCTGCATGCATAAACTCT	4	232-248	0.60	0.72	+	+	-	-
2PMc37	FJ853750	(AG)7	50°	F: GATCTGTATATTCCTTCTC R: CAAAATCGTGATAAACTCTA	4	219-246	0.58	0.70	+	+	-	-
2PMc252	FJ853751	(CA)6	45°	F: GTAAAGCGCAAAACT R: ATCCGTATCTTAGGTGA	4	250-263	0.49	0.63	-	-	+	+
2PMc287	FJ853752	(GT)14	53.2°	F: CCCTGCACAGAGAAAAC R: GCACCTGAAGTCTGAA	4	261-292	0.57	0.69	-	-	+	+
1PMc48.16	FJ853753	(CA)6	60°	F: GAAATGTGGTGCATCATCCT R: ATCCGGTTGGCAGAGTATC	4	135-146	0.49	0.60	-	-	-	-
2PMc222.1	FJ853754	(CT)3(CT)4	50°	F: TAATCCCTTTGCCTTTTC R: CCCATTCATCTGCTGCTA	12	237-254	0.81	0.91	-	-	-	-

T_a annealing temperature; N number of alleles; PIC Polymorphism information content; D discriminating power; + successful amplification; - unsuccessful amplification.

The *P. maximum* apomictic tetraploid accessions were separated into two clusters (I and II). The cluster I consisted of two sub-clusters: IA (T21 – MASSAI and T110) and IB (T24, T46, T60, T62, T65, T72, T84, K64, K68, K191, K193, K214, K217, K249, KK8, KK33, G21, MOMBAÇA, TANZANIA, T97, T91 and T95). The cluster II contained only the T77 accession. The T21, T110 and T77 accessions are interspecific natural hybrids derived from crosses between *P. maximum* and *P. infestum*. The sub-clusters IA and IB contain three commercial varieties (Massai-T21, Tanzania and Mombaça), which were collected in Dar a Bagamoyo and Korogwe, in Tanzania. The *P. maximum* accessions that are preceded by T were collected in Tanzania (1969), KK in Kenya (1969), K in Kenya or Tanzania (1967) and G in research institutions (seeds and seedlings). The data confirmed that the Kenya and Tanzania accessions are closely related to each other. The forage grass species *B. humidicola*, *B. brizantha*, *P. notatum* and *P. regnellii* were grouped separately from *P. maximum*, forming an outgroup (cluster III). High bootstrap values (>65) at main nodes indicated the consistency of the clustering.

Genetic breeding has been largely responsible for advances in agriculture, including the development of superior cultivars either by an increase in productivity or improvement of adaptation to harsh environments. The success of a breeding program can be accelerated by the effective use of molecular markers. The *P. maximum* microsatellite loci described herein are potentially useful to conduct further genetic studies on population structure and could contribute to the development of strategies for germplasm conservation and breeding in this species and possibly in other related forage species.

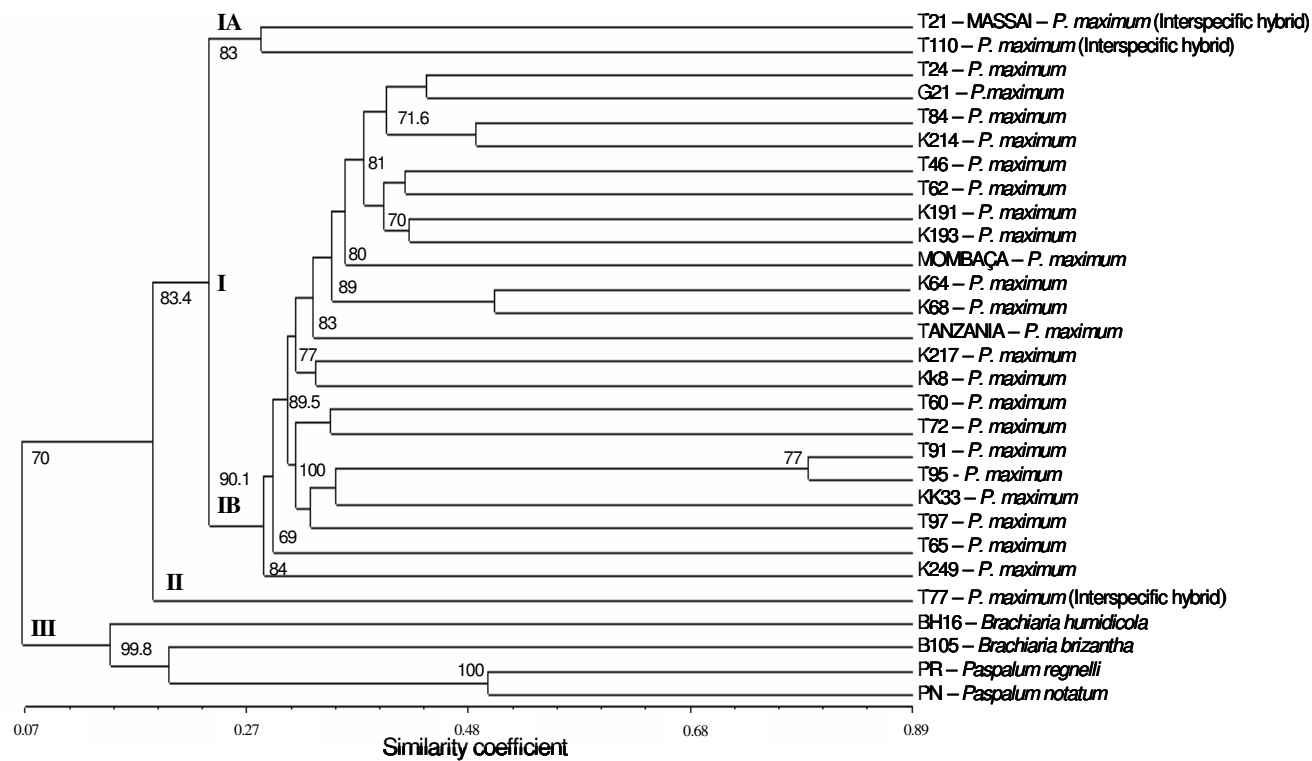


Figure 1 Cluster grouping of 25 accessions of *Panicum maximum* Jacq. and four species of forage grass, based on Jaccard's similarity coefficient. Bootstrap values (>65) are indicated as % at major and critical sub-nodes.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support (Project 05/51010-0) and for a graduate fellowship to Sousa, A. C. B. (06/52953-8) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a research fellowship awarded to Souza, A. P.

References

Billotte N., P. J. L. Lagoda, A. M. Risterucci, and F. C. Baurens, 1999: Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*. 54, 277 - 288.

Coelho, A. S. G. 2002. BooD: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de *bootstrap* com número variável de marcadores. Computer software distributed by the author. Laboratório de Genética Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil. [In Portuguese].

Cordeiro, G. M., G. O. Taylor, and R. J. Henry, 2003: Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species. *Plant Science*. 155, 161 - 168.

Creste, S., A. Tulmann Neto, A. Figueira, 2001: Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19, 299 - 306.

Doyle, J. J., and J. L. Doyle, 1990: Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12, 13 - 15.

Ebina, M., K. Kouki, S. I. Tsuruta, R. Akashi, T. Yamamoto, M. Takara, M. Takahara, M. Inafuku, K. Okumura, H. Nakagawa, and K. Nakajima, 2007: Genetic relationship estimation in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) assessed on the basis of simple sequence repeat markers. *Japan Soc. Grassl. Sci.* 53, 155 – 164.

Gupta, P. K., and R. K. Varshney, 2000: The development and use of microsatellite markers for genetics analysis and plant breeding with special emphasis on bread wheat. *Euphytica.* 113, 163 – 185.

Jaccard, P. 1908. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bulletin de La Société Vandoise des Science Naturelles.* 37, 547 – 579.

Jank, L., C. B. Valle, R. M. S. Resende, 2005a: Grass and forage plant improvement in the tropics and sub-tropics. In: MCGILLOWAY, D. A. (Ed). *Grassland: a global resource.* Wageningen: Wageningen Academic Publishers. 69 - 81.

Pereira, A. V., C. B. Valle, R. P. Ferreira, J. W. Miles, 2001: Melhoramento de forrageiras tropicais. In: Nass, L. L.; Valois, A. C. C.; Melo, I. S.; Valadares-Inglis M. C. (Ed.). Recursos Genéticos e Melhoramento: Plantas. Rondonópolis: Fundação MT. 549 - 601.

Rohlf, F. J. 2000. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.1.

Tautz, D. and C. Schlotterer, 1994: Simple sequences. Curr. Opinion Genetics and Development. 4, 832 - 837.

Tessier, C., J. David, P. This, J. M. Boursiquot, A. Charrier, 1999: Optimizations of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. Theoretical and Applied Genetics. 98, 171 - 177.

Temnykh, S., G. DeClerck, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Catinhour, S. McCouch, 2001: Computational and Experimental Analysis of Microsatellites in Rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, Length Variation, Transposon Associations, and Genetic Marker Potential. Genome, 11, 1441 - 1452.

Savidan, Y. H. 1982. Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. ORSTOM Travaux et Documentos, 153. ORSTOM, Paris.

Savidan, Y. H. 2000: Apomixis: genetics and breeding. Plant Breeding Reviews, Westpoint. 18, 10 - 86.

Varshney, R. K., A. Graner, and M. E. Sorrells, 2005: Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends Biotech. 23, 48 – 55.

CAPÍTULO II

Tropical forage germplasm (*Panicum maximum* Jacq.): diversity and genetic structure based on microsatellite markers

Adna Cristina Barbosa de Sousa¹ • Liana Jank² • Tatiana de Campos¹ • Danilo Augusto Sforça¹ • Maria Imaculada Zucchi³ • Anete Pereira de Souza^{1,4}

¹ University of Campinas (UNICAMP), Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), CP 6010, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

² Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Beef Cattle, Forage Breeding Dept, CP 154, Campo Grande – MS, CEP 79002-970, Brazil.

³ Agronomic Institute of Campinas, Pólo Apta Centro Sul – Rod. SP 127 km 30, Piracicaba – SP, CP 28, CEP 13400-970, Brazil.

⁴ University of Campinas (UNICAMP), Biology Institute, Plant Biology Dept (DBV), CP6109, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

Keywords: *Megathyrsus maximus*, tropical forages, microsatellite markers, genetic diversity, genetic resources.

***O trabalho será submetido à revista *Genome*.**

Abstract

Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) is one of the major forage grasses in tropical and subtropical regions. It is an apomictic and predominantly tetraploid species. The objective of this study was to evaluate genetic diversity in guineagrass germplasm. For this purpose, a collection of reproducible and informative microsatellite markers was developed. A total of 576 clones were sequenced from microsatellite-enriched (CT₈ and GT₈) libraries. Three hundred and twenty-three (61%) of the clones contained microsatellites. Flanking primers were designed for 116 microsatellite loci and screened using a panel of 25 guineagrass accessions. Fifty-five of the microsatellites were polymorphic. Based on estimates of polymorphism information content and discriminating power, 30 microsatellites were selected to characterize the guineagrass germplasm. A total of 192 alleles were obtained with an average of 6.4 alleles per locus. Using a model-based Bayesian approach implemented in STRUCTURE software, we identified 4 clusters in the germplasm. The STRUCTURE results were confirmed by an AMOVA analysis. The largest fraction of variation was found within groups (55.62%). The geographic distance and genetic similarity did not reveal a significant association between genetic and geographic variation. These microsatellites are ideal resources for use in managing guineagrass germplasm, conservation and exploitation of these genetic resources.

Introduction

Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq. = *Megathyrsus maximus* Jacq. Simon BK & Jacobs SWL) is an important tropical forage grass native to Africa (Kenya and Tanzania) where high genetic diversity is found (Burton et al. 1973). Because of its high yield, nutritional content and wide adaptability to diverse ecological niches, it has been introduced and exploited widely in Brazil, Japan, Puerto Rico, the USA and Australia (Nakajima 1978; Smith 1979; Savidan 1982; Duke 1983). It belongs to the family Poaceae, subfamily Panicoideae, and tribe Paniceae. The species is considered apomictic (gametophytic aposporous type) (Savidan 2000; Jain et al. 2006), and its apomictic genotypes are autotetraploid ($2n=4x=32$); however, some sexual genotypes have been found and identified as diploid ($2n=2x=16$) (Nakajima et al. 1979). *P. maximum* forms an agamic complex with the botanical species *P. infestum* Anders and *P. trichocladum* K. Schum (Muir and Jank 2004). As these three species possess the same chromosome number ($2n=4x=32$) and intercross freely, intermediate or hybrid types may be found in natural population in East Africa (Savidan and Pernès 1982).

The *P. maximum* germplasm used by the Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Beef Cattle (Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil) was introduced in 1982 by a cooperative agreement with the former Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), France (today Institut de Recherche pour le Développement-IRD). The germplasm includes apomictic and sexual accessions, and it may be considered representative of the existing natural variability of the species due to the eco-geographic scope of the collecting expeditions involved (Savidan et al. 1989).

The germplasm collection presents high phenotypic variability (Jank et al. 1997). However, the genetic diversity of the germplasm has not been evaluated at the molecular level. Knowledge of its genetic variability is important for the development of breeding strategies,

selection of genotypes and conservation of the genetic resources. With the development of molecular marker technologies, tools have become available to efficiently describe the structure of the genetic diversity in the germplasm or within cultivars, as well as the diversity among populations without the need of phenotyping (Bolaric et al. 2005). Among the available molecular markers, microsatellites are the most promising for genomic applications and are highly informative (Gupta and Varshney 2000). Microsatellite markers consist of short (1 - 6 bp) tandem repeat DNA sequences dispersed randomly throughout the genome. These regions are locus-specific, polymorphic and show a co-dominant segregation pattern (Gaitán-Solís et al. 2003). Allelic diversity at microsatellite loci caused by variation in the number of repeats of the core sequence is probably caused by polymerase *slippage* and a lack of repair during DNA replication (Field and Wills, 1996). They are quite effective for estimating genetic diversity and genetic relationships and in predicting the genetic value of selected genotypes derived from intraspecific crosses and the performance of their hybrid progenies (Varshney et al. 2005). This paper reports the genetic variation of 396 *P. maximum* accessions from the Embrapa Beef Cattle germplasm bank, using 30 microsatellite loci.

Material and Methods

Plant material and DNA extraction

A total of 396 *P. maximum* accessions were analyzed in this study (**Table 1**). They belong to the germplasm of the Brazilian Agricultural Research Corporation - Embrapa Beef Cattle at Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. The accessions were collected by the former Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), France (Combes and Pernès, 1970). The accessions were introduced into Brazil through a cooperative agreement with EMBRAPA (Savidan et al. 1989).

Table 1. Information for the 396 *Panicum maximum* Jacq. accessions.

Sample code	Accession ID	Origin	Sample code	Accession ID	Origin
1	K190A*	Tanzania, Korogwe	199	K214	Kenya, L. Lunga-Mombasa
2	T58*	Tanzania, Korogwe	200	K217	Kenya, L. Lunga-Mombasa
3	Colorado+	Unknown	201	K218	Kenya, Mombasa
4	Natsuyutakab	East Africa	202	K219	Kenya, Mombasa
5	C1	Africa	203	K220	Kenya, Mombasa-Voi
6	60	Congo, Brazzaville	204	K223	Kenya, Mombasa-Voi
7	77	Kenya	205	K224	Kenya, Mombasa-Voi
8	82	Cameroon, Nkol Bisson	206	K225	Kenya, Mombasa-Voi
9	87	Cameroon, Nlohelouem	207	K227	Kenya, Mombasa-Voi
10	93	Introduced from Brazil	208	K228	Kenya, Mombasa-Voi
11	174	Ivory Coast, Daloa	209	K237	Kenya, Voi
12	304	Zaire, Gandajika	210	K241	Kenya, Voi-Machakos
13	B2	Introduced in Brazil	211	K241D•	Kenya, Voi-Machakos
14	B6	Introduced in Brazil	212	K244	Kenya, Voi-Machakos
15	B7	Introduced in Brazil	213	K249	Kenya, Nairobi
16	B10	Introduced in Brazil	214	KK7	Kenya, Meru-Embu
17	B12	Introduced in Brazil	215	KK8	Kenya, Meru-Embu
18	B19	Introduced in Brazil	216	KK10	Kenya, Meru-Embu
19	B22	Introduced in Brazil	217	KK12	Kenya, Meru-Embu
20	B26	Introduced in Brazil	218	KK14	Kenya, Meru-Embu
21	78	Introduced in Angola	219	KK14E•	Kenya, Meru-Embu
22	S7•	Introduced in IRD	220	KK15	Kenya, Meru-Embu
23	S8•	Introduced in IRD	221	KK16	Kenya, Meru-Embu
24	S9•	Introduced in IRD	222	KK17	Kenya, Meru-Embu
25	S10•	Introduced in IRD	223	KK18	Kenya, Meru-Embu
26	S11•	Introduced in IRD	224	KK21	Kenya, Meru-Embu
27	S12•	Introduced in IRD	225	KK23	Kenya, Meru-Embu
28	S13•	Introduced in IRD	226	KK23E•	Kenya, Meru-Embu
29	S14•	Introduced in IRD	227	KK25	Kenya, Meru-Embu
30	S15•	Introduced in IRD	228	KK26	Kenya, Meru-Embu
31	S16•	Introduced in IRD	229	KK33	Kenya, Meru-Embu
32	S17•	Introduced in IRD	230	KK34	Kenya, Meru-Embu
33	S18•	Introduced in IRD	231	G1	Gabon, Irat
34	S19•	Introduced in IRD	232	G2	Uganda, Serere
35	S20•	Introduced in IRD	233	G3	Nigeria, Zaria
36	S21•	Introduced in IRD	234	G4	Botswana, Tuli
37	S22	Introduced in IRD	235	G5	Botswana, Nata
38	S23	Introduced in IRD	236	G6	Zimbabwe, Melsetter
39	T4	Tanzania, Dar-Bagamoyo	237	G7	Zimbabwe
40	T7	Tanzania, Dar-Bagamoyo	238	G8	Zimbabwe, Marandellas
41	T11	Tanzania, Dar-Bagamoyo	239	G9	Zimbabwe, Victoria Falls
42	T11D•	Tanzania, Dar-Bagamoyo	240	G10	Zimbabwe, Marandellas
43	T18	Tanzania, Dar-Bagamoyo	241	G11	Malawi
44	T19	Tanzania, Dar-Bagamoyo	242	G11E•	Malawi
45	T21*	Tanzania, Dar-Bagamoyo	243	G12	Introduced from Angola
46	T23	Tanzania, Dar-Bagamoyo	244	G13	Zimbabwe, Marandellas
47	T24	Tanzania, Dar-Bagamoyo	245	G14	Zimbabwe, Marandellas
48	T45	Tanzania, Korogwe	246	G15	Zimbabwe, Marandellas
49	T46	Tanzania, Korogwe	247	G16	Introduced from Brazil
50	T60	Tanzania, Korogwe-Kilosa	248	G17	Zimbabwe
51	T62	Tanzania, Korogwe-Mikume	249	G18	Kenya
52	T65	Tanzania, Korogwe-Kilosa	250	G19	Kenya, Machakos
53	T68	Tanzania, Korogwe-Kilosa	251	G20	Kenya
54	T72	Tanzania, Korogwe-Kilosa	252	G20E•	Kenya
55	T77	Tanzania, Kilosa-Mikume	253	G21	Kenya, Mac Kinnon Road
56	T81	Tanzania, Kilosa-Morogoro	254	G21E•	Kenya, Mac Kinnon Road
57	T84	Tanzania, Kilosa-Morogoro	255	G22	Tanzania, Tengeru
58	T86	Tanzania, Mts. Uruguru	256	G23	Malawi, Nchizi
59	T91	Tanzania, Morogoro	257	G26	Kenya
60	T92	Tanzania, Morogoro	258	G27	Introduced in Angola

Table 1. Continued.

Sample code	Accession ID	Origin	Sample code	Accession ID	Origin
61	T95	Tanzania, Morogoro	259	G27E•	Introduced in Angola
62	T96	Tanzania, Morogoro-Dar	260	G28	South Africa
63	T97	Tanzania, Morogoro-Dar	261	G28A•	Unknown
64	T98	Tanzania, Morogoro-Dar	262	G30	Introduced in Angola
65	T103	Tanzania, Morogoro-Dar	263	G31	Introduced in Angola
66	T104	Tanzania, Morogoro-Dar	264	G5E	Botswana, Nata
67	T108	Tanzania, Morogoro-Dar	265	G32	Introduced in Angola
68	T109	Tanzania, Morogoro-Dar	266	G33	Introduced in Angola
69	T110	Tanzania, Morogoro-Dar	267	G34	South Africa
70	T111	Tanzania, Morogoro-Dar	268	G35	Gabon, Irat
71	T113	Tanzania, Dar	269	G36	Zaire, Kinshasa-Nioki
72	T114	Tanzania, Dar	270	G38	Introduced in Sri-Lanka
73	T116	Tanzania, Dar	271	G39	Introduced in Sri-Lanka
74	T117	Tanzania, Dar	272	G40	Madagascar
75	T200	Tanzania	273	G41	Botswana, Mahalapye
76	T201	Tanzania	274	G42	Botswana, Ngamiland
77	15	Ivory Coast, Binao	275	G43	Botswana, Mahalapye
78	57	Ivory Coast, Daome, Niaouli	276	G45	South Africa
79	58	Central African Republic,	277	G46	South Africa
80	64D•	Introduced in Angola	278	G47	South Africa
81	65	Congo	279	G48	South Africa
82	69	Zimbabwe, Melsetter	280	G50	South Africa
83	73	Introduced in Costa Rica	281	G51	South Africa
84	74	Introduced in Angola	282	G52	Introduced in S. Vietnam
85	80	Cameroon, Yaounde	283	G54	Introduced in Morocco
86	81	Cameroon, Nkwonvone	284	G54E•	Introduced in Morocco
87	88	Introduced in Brazil	285	G56	Tanzania, Kilosa
88	88A•	Unknown	286	G56E•	Tanzania, Kilosa
89	88•	Unknown	287	G58	Nigeria, Nsukka
90	89	Introduced in Brazil	288	G58D•	Nigeria, Nsukka
91	89B•	Unknown	289	G59	Nigeria, Nsukka
92	90	Introduced in Brazil	290	G59•	Nigeria, Nsukka
93	92	Introduced in Brazil	291	G61	Introduced in Australia
94	92D•	Introduced in Brazil	292	G62	Zimbabwe
95	96	South Africa	293	G64	Kenya, Rumuruti
96	96E•	South Africa	294	G68	Introduced in Australia
97	97	South Africa	295	G68A•	Unknown
98	97E•	South Africa	296	G69	South Africa
99	102	Introduced in Guadalupe	297	G70	Zimbabwe
100	103	Introduced in Guadalupe	298	G71	Introduced in Australia
101	105	Introduced in Guadalupe	299	G71E•	Introduced in Australia
102	105D•	Introduced in Guadalupe	300	G73	Introduced in Australia
103	106	Introduced in Guadalupe	301	G74	Introduced in Australia, Brisbane
104	112	South Africa	302	G75	Introduced in Brazil
105	112D•	South Africa	303	G76	Introduced in Australia, Brisbane
106	114	South Africa	304	G76D•	Introduced in Australia, Brisbane
107	114D•	South Africa	305	G77	Introduced in Australia, Brisbane
108	116	Malawi, Lilongwe	306	G77E	Introduced in Australia, Brisbane
109	117	Unknown	307	G78	Introduced in Australia, Brisbane
110	118	Unknown	308	G78E•	Introduced in Australia, Brisbane
111	139	Tanzania, Tengeru-Moshi	309	G85	Introduced in Australia, Canberra
112	172	Nigeria, Lagos	310	G86	Introduced in Australia, Canberra
113	280	Kenya, Nanyuki	311	G88	Central African Republic, Bouar
114	309	Zaire, Gandajika	312	G89	Central African Republic, Bangui
115	353	Togo, Ganave	313	G89E•	Central African Republic, Bangui
116	354	Togo, Ganave	314	G90	Introduced in Jamaica, Mona
117	S22R•	Introduced from IRD	315	G90D•	Introduced in Jamaica, Mona
118	K4	Kenya, Nairobi	316	G91	Introduced in Jamaica, Mona
119	K8	Kenya, Nairobi	317	G93	Senegal, Dakar
120	K2	Kenya, Nairobi	318	G94	Ivory Coast, Tiantiebe

Table 1. Continued.

Sample code	Accession ID	Origin	Sample code	Accession ID	Origin
121	K4	Kenya, Nairobi	319	G95	Introduced in Venezuela
122	K5	Kenya, Nairobi	320	G96	Introduced in Venezuela
123	K15	Kenya, Rumuruti	321	G97	Introduced in Surinam
124	K23	Kenya, Rumuruti-Maralal	322	G98	Introduced in Brazil
125	K28	Kenya, Maralal	323	G99	Burundi, Bujumbura
126	K31	Kenya, Maralal-Rumuruti	324	G100	Introduced in Haiti
127	K32	Kenya, Maralal-Rumuruti	325	G109	Tanzania
128	K35	Kenya, Rumuruti-Nanyuki	326	87	Cameroon, Nlohelouem
129	K36	Kenya, Rumuruti-Nanyuki	327	Aries*	Introduced in Brazil
130	K38	Kenya, Rumuruti-Nanyuki	328	Atlas*	Introduced in Brazil
131	K39	Kenya, Nanyuki-Nyeri	329	Japa	Unknown
132	K39D•	Kenya, Nanyuki-Nyeri	330	3697=74•	Introduced in Angola
133	K42	Kenya, Nanyuki-Nyeri	331	3808=89•	Introduced in Brazil
134	K42D•	Kenya, Nanyuki-Nyeri	332	3816=90•	Introduced in Brazil
135	K47	Kenya, Meru	333	3859=94•	Unknown
136	K47D•	Kenya, Meru	334	3891=101•	Unknown
137	K48	Kenya, Meru	335	3905=102•	Unknown
138	K59	Kenya, Nkubu	336	3930=105•	Unknown
139	K59E•	Kenya, Nkubu	337	3981=114•	Unknown
140	K62	Kenya, Nkubu	338	4120=354•	Togo, Ganave
141	K63	Kenya, Nkubu	339	4316=G19	Kenya, Machakos
142	K64	Kenya, Nkubu	340	4316B=G1	Gabon, Irat
143	K65	Kenya, Nkubu	341	4375=G26	Kenya
144	K68	Kenya, Meru-Embu	342	4391=G28	South Africa
145	K71	Kenya, Meru-Embu	343	4405A=G3	Nigeria, Zaria
146	K83	Kenya, Meru-Embu	344	4405B=G3	Nigeria, Zaria
147	K88	Kenya, Meru-Embu	345	4499=G40	Madagascar
148	K89	Kenya, Meru-Embu	346	4464=G36	Zaire, Kinshasa-Nioki
149	K93	Kenya, Embu	347	4502A=G4	Botswana, Tuli
150	K98	Kenya, Forthall	348	4502B=G4	Botswana, Mahalapye
151	K98D•	Kenya, Forthall	349	4618=G58	Nigeria, Nsukka
152	K102	Kenya, Forthall-Nairobi	350	4634=G61	Unknown
153	K102R•	Kenya, Forthall-Nairobi	351	4651=G64	Kenya, Rumuruti
154	K103	Kenya, Forthall-Nairobi	352	4654	Africa
155	K104	Kenya, Forthall-Embu	353	4669=G68	Unknown
156	K105	Kenya, Forthall-Nairobi	354	4707=G73	Unknown
157	K105A•	Unknown	355	4723=G75	Introduced in Brazil
158	K106	Kenya, Forthall-Nairobi	356	4731=G76	Unknown
159	K112	Kenya, Nairobi-Arusha	357	4804=G80	Unknown
160	K115	Kenya, Nairobi-Arusha	358	4812=G91	Unknown
161	K116	Kenya, Nairobi-Arusha	359	4847=G96	Unknown
162	K117	Kenya, Nairobi-Arusha	360	4863=G98	Introduced in Brazil
163	K124	Tanzania, Arusha	361	4928=T93•	Tanzania, Morogoro
164	K124•D	Tanzania, Arusha	362	K209	Kenya, L. Lunga-Mombasa
165	K124R•	Tanzania, Arusha	363	K16	Kenya, Th. Falls-Rumuruti
166	K125	Tanzania, Arusha	364	5274=K39•	Kenya, Nanyuki-Nyeri
167	K126	Tanzania, Arusha	365	5282=K42•	Kenya, Nanyuki-Nyeri
168	K130	Tanzania, Tengeru	366	5321=K47•	Kenya, Meru
169	K138	Tanzania, Tengeru-Moshi	367	5932=K20	Tanzania, Tanga
170	K139	Tanzania, Tengeru-Moshi	368	5461=K13	Tanzania, Tengeru
171	K142	Tanzania, Tengeru-Moshi	369	5568=K14	Tanzania, Tengeru-Moshi
172	K145	Tanzania, Tengeru-Moshi	370	K159	Tanzania, Mts Pare Nord
173	K146	Tanzania, Tengeru-Moshi	371	K160	Tanzania, Mts Pare Nord
174	K146E•	Tanzania, Tengeru-Moshi	372	K162	Tanzania, Mts Pare Nord
175	K156	Tanzania, Mts Pare Nord	373	K172	Tanzania, Mts Pare Nord
176	K163	Tanzania, Mts Pare Nord	374	5819A=K1	Tanzania, Mts Pare Nord
177	K164	Tanzania, Mts Pare Nord	375	5819B=K1	Tanzania, Mts Pare Nord
178	K165	Tanzania, Mts Pare Nord	376	K176	Tanzania, Mts Pare Nord
179	K171	Tanzania, Mts Pare Nord	377	K177	Tanzania, Baron`s Falls
180	K173	Tanzania, Mts Pare Nord	378	K17	Kenya, Th. Falls-Rumuruti

Table 1. Continued.

Sample code	Accession ID	Origin	Sample code	Accession ID	Origin
181	K174	Tanzania, Mts Pare Nord	379	K25	Kenya, Rumuruti-Maralal
182	K174R•	Tanzania, Mts Pare Nord	380	K27	Kenya, Maralal
183	K175	Tanzania, Mts Pare Nord	381	6149=K28•	Kenya, Maralal
184	K175D•	Tanzania, Mts Pare Nord	382	K72	Kenya, Meru-Embu
185	K187B	Tanzania, Mombo-Korogwe	383	K74	Kenya, Meru-Embu
186	K190B	Tanzania, Korogwe-Tanga	384	K79	Kenya, Meru-Embu
187	K191	Tanzania, Korogwe-Tanga	385	K93	Kenya, Embu
188	K192	Tanzania, Korogwe-Tanga	386	K95	Kenya, Embu-Forthall
189	K193	Tanzania, Korogwe-Tanga	387	K99	Kenya, Forthall
190	K194	Tanzania, Korogwe-Tanga	388	K230	Kenya, Mombasa-Voi
191	K197	Tanzania, Korogwe-Tanga	390	K238	Kenya, Voi-Machakos
192	K201	Tanzania, Tanga	391	K240	Kenya, Voi-Machakos
193	K204	Tanzania, Mpirani-L. Lunga	392	K243	Kenya, Voi-Machakos
194	K205	Tanzania, Mpirani-L. Lunga	393	T106	Tanzania, Morogoro-Dar
195	K205E•	Tanzania, Mpirani-L. Lunga	394	T115	Tanzania, Dar
196	K206	Tanzania, Mpirani-L. Lunga	395	7676=KK18	Kenya, Meru-Embu
197	K211	Kenya, L. Lunga-Mombasa	396	KK20	Kenya, Meru-Embu
198	K212	Kenya, L. Lunga-Mombasa			

Note: Accession ID ORSTOM, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération. + *Panicum coloratum*. • cross-sexual. ▪ replicates. * Brazilian cultivar.

Genomic DNA was extracted from freeze-dried leaf samples using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Doyle and Doyle 1990). DNA samples were quantified by comparison with known quantities of λ phage DNA on a 1% agarose gel.

Library construction, screening for microsatellite repeat sequences, DNA sequencing and primer design

The microsatellite markers were developed from a genomic enriched library following the protocol described by Billotte et al. (1999). The extracted DNA (*P. maximum* cv. Tanzania ORSTOM -T58) was digested with the *RsaI* restriction enzyme (Invitrogen, CA, USA) and ligated to the adapters 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGA-3' and 5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'. The library was enriched for dinucleotide sequences using (CT)₈ and (GT)₈ biotinylated microsatellite primers with labeled probes. The selected DNA fragments were recovered with Streptavidin MagneShere Paramagnetic Particles (Promega, WI,

USA), using a biotinylated probe. After the DNA fragments were recovered, magnetic selection was performed according to the manufacturer specifications. Selected fragments were PCR amplified using primer sequences complementary to the adapters and ligated into the pGEM-T vector (Promega, WI, USA). *Escherichia coli* XL-1 Blue cells (Stratagene, CA, USA) were transformed with the recombinant plasmids and cultivated on Luria-Bertani agar plates containing 100 µg mL⁻¹ ampicillin (Sigma, Germany), 50 µg mL⁻¹ X-galactosidase, and isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (MBI Fermentas, MD, USA). Single white colonies were transferred to microplates for long-term storage at -80°C. A total of 576 recombinant colonies were selected and sequenced in both directions with the T7 and SP6 promoter primers on an ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, CA, USA) using the Big Dye terminator version 3.1 version Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA). The simple sequence repeat identification tool (SSRIT) (<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>) was used to identify microsatellites present in the non-redundant sequences (Temnykh et al. 2001). The sequences containing microsatellites were edited and clustered using LaserGene software, v. 5.03 (DNASTar Inc.). MICROSAT software was used to remove restriction sites in the sequences. PrimerSelect software (DNASTar Inc.) was used to design complementary primer pairs using the following conditions: expected size of the amplified product, ranging from 150 to 300 bp; GC content between 40% and 60%; melting temperature (T_m) from 45° to 60°C; primer length ranging from 18 to 22 bp and with no hairpin or dimmer formation predicted.

Polymerase chain reaction (PCR) amplifications and genotyping

PCR was carried out in a total reaction volume of 25 µL containing 0.5 ng of DNA template, 0.8 µM of each of the forward and reverse primers, 100 µM of each dNTP (MBI Fermentas, MD, USA), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, and 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, CA, USA). All PCR amplifications were performed in a PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA/USA) using the following conditions: 94°C for 1 min followed

by 30 cycles of 94 °C for 1 min, specific temperature for 1 min, and 72 °C for 1 min, with a final extension of 72 °C for 5 min. Amplification products were genotyped by electrophoresis on 6% denaturing polyacrylamide gels in 1X TBE buffer, using a 10 bp ladder (Invitrogen, CA, USA) to determine standard sizes. The DNA fragments were visualized by silver staining according to the method of Creste et al. (2001).

Data analysis

The polymorphism information content (PIC) values were calculated for estimates of marker informativeness according to the equation of Mateescu et al. (2005),

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

where p^i is the frequency of the i^{th} allele and, the summation extends over n alleles. To compare marker efficiencies in varietal identification, the discriminating power (D) was estimated for each primer based on the formula,

$$D_k = 1 - \sum_{j=1}^l p_j \frac{Np_j - 1}{N - 1},$$

where N is the number of individuals and p^j is the frequency of the j^{th} pattern (Tessier et al. 1999).

The molecular data were scored for each genotype based on presence and absence. These data were used to generate a binary matrix for all pairwise combinations and to calculate Jaccard's similarity coefficient (Jaccard 1908) using NTSYS-pc software version 2.1 (Rohlf 2000). This information was used for a principle components analysis (PCA) with DARwin v. 5.0.157 software (Perrier and Jacquemoud-Collet 2006). The reliability of the generated

dendrogram was also tested by bootstrap analysis using the BooD program with 1000 iterations (Coelho 2002). STRUCTURE software version 2.2 (Pritchard et al. 2000) was used to generate a Bayesian inference of the population structure. This method identifies clusters of genetically similar individuals from multilocus genotypes without prior knowledge of their population affinities. The model assumes K genetic clusters, each having a characteristic set of allele frequencies at each locus; a no-admixture model with correlated allele frequencies was assumed. As a preliminary step, the analysis was performed for a number of genetic clusters (K) ranging from 2 to 20. Consistent results across runs were obtained using a burning period of 100,000 followed by 200,000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) repeats. The most probable number for K was calculated based on Evanno et al. (2005) using an ad hoc statistic, ΔK , which represents the rate of change in log probability of the data between successive K values, rather than the log probability of the data. An analysis of molecular variance (AMOVA) was carried out using ARLEQUIN 1.1 software (Excoffier et al. 2005). The level of significance for variance component estimates was determined by non-parametric permutation procedures using 1,000 permutations. The geographic distribution of wild accessions was visualized with the DIVA-GIS program (Hijmans et al. 2001).

Results and Discussion

Sequence analysis and microsatellite loci polymorphism

The library enriched for dinucleotide repeat motifs (CT₈ and GT₈) showed high levels of microsatellite enrichment. A total of 576 clones were isolated and sequenced. Of these, 323 (61%) sequences contained microsatellites, and 236 (48.7%) were suitable for designing primers. Redundant sequences accounted for 23% of the microsatellite-containing clones. Insert size varied between 360 and 900 bp, with an average of 500 bp. Screening of the library

showed that 80% of the microsatellites were dinucleotide simple motifs (perfect and imperfect), and 20% were compound motifs. The maximum number of repeats among them was 23 (perfect GA). Trinucleotides were less frequent (15%) and showed a lower number of repeat units (three to five units). Tetranucleotides (3%) and hexanucleotides (2%) also appeared as simple repeats. The most common repeat motif was the $(TG)_n/(CA)_n$ group, which represents over 79.5% of all microsatellites.

Ultimately, a total of 116 primer pairs were designed and tested by PCR amplification. Previously, 20 microsatellite markers were characterized among 25 *P. maximum* accessions from the germplasm collection to investigate their polymorphism content (Sousa et al. 2010). Ninety six newly developed microsatellite were tested and, from these, 66 produced a product of the expected size. Fifty five microsatellite were polymorphic, and 11 were monomorphic (**Table 2**). Of the 66 microsatellites evaluated, 46 were dinucleotide repeats, one was a trinucleotide repeat, and 9 were compound repeats. There was no correlation between the types or length of repeats with the monomorphic marker behavior.

A total of 318 alleles were obtained from the 55 polymorphic microsatellite markers. The number of alleles ranged from 3 to 16, with an average of 5.8 alleles per locus. This confirms the high polymorphism of the markers. The number of alleles detected in each accession ranged from 1 to 4 (**Figure 1**). This confirms the autotetraploid nature of *P. maximum* (Combes 1975). In autotetraploids, there are four copies of each homologous chromosome. The resulting meiotic combinations may include quadrivalents, trivalents, bivalents and univalents. In nature, *P. maximum* exhibits diploid-tetraploid-haploid cycles (Savidan and Pernès, 1982) in crosses between apomictic and sexual genotypes. The allele frequencies and number of patterns were used to calculate the degree of polymorphism at each locus. The PIC values ranged from 0.19 to 0.89, with an average of 0.56. The D values ranged from 0.34 to 0.99, with an average of 0.68. The highest PIC and D values were found at locus 2PMc217, which contains 16 alleles. Of

the investigated loci, 70% had more than a 50% probability of discriminating between two accessions. The analysis of the D values revealed that the efficiency of a given marker does not depend only on the number of patterns it generated, as was reported by Tessier et al. (1999). For example, the loci 2PMc428, 2PMc40.1, 2PMc194, 1PMc39.b and 1PMc72 produced the same number of patterns and alleles (6 and 5, respectively), but they had different discriminatory powers. In contrast, the loci 2PMc52 and 2PMc103 with different numbers of patterns (7 and 6, respectively), had similar discriminatory powers. Based on the estimates of PIC and D, 30 microsatellite loci were selected to characterize the *P. maximum* germplasm, composed of 396 accessions. The 30 microsatellite markers selected are shown on **Table 2**.

Table 2. Characteristics of 66 microsatellite loci in 25 *Panicum maximum* Jacq. accessions: locus name, GenBank accession number, primer sequences (F: forward primer, R: reverse primer), repeat motif from sequenced clone, product length in base pairs, melting temperature (T_m), number of alleles (N_A), number of banding pattern, polymorphic information content (PIC) and discriminating power (D).

Locus/ GenBank accession no.	Primer sequences (5' - 3')	Repeat motif	Product length (bp)	T_m (°C)	N_A	Banding pattern	PIC	D
2PMc8a* FJ039711	F: GCGTTGCTGCATGCGATACCT R: GGGGACAAATGCGTTGAAATTAATAAATA	(TG) ₈	266	60°	6	7	0.66	0.76
2PMc255 FJ039712	F: GCCGTGAAGACAAAGAGACC R: GGAGAGCGAAGGGAGACATT	(CA) ₅	229	60°	4	6	0.51	0.66
1PMs35.1 FJ039713	F: TACTACTACGCCATTTTG R: CTAATAGCTTCTCAGTAATAG	(TG) ₆	198	51.4°	4	5	0.43	0.59
1PMs43* FJ039714	F: ATGAAGCGGGCGTGTAGTATT R: TGGTGGGCGGTAAAGAGTAAAG	(TC) ₅	200	60°	6	6	0.60	0.72
2PMc428* FJ039715	F: CTCTCAGTCCACAGCACAC R: TATTTGGGATTGGGAGTAGTT	(CA) ₁₁	206	60°	6	5	0.57	0.70
2PMc35 FJ039716	F: AGCACTGTGCACTAACCATAATG R: CGTCTCCGTCCACCGATAG	(GT) ₇	211	58.8°	4	4	0.49	0.63
2PMc39* HM235410	F: AATGAGCTACCTTCTTG R: CATTTTAATTTTCCTGTC	(TA) ₅	180	55°	1	-	-	-
2PMc376* FJ039717	F: CACCCATAACTGTAAAGAA R: CTGGAGTAGCAAGAGTGTT	(GT) ₄ GC(GT) ₅ AT(GT) ₆	258	51.7°	12	12	0.87	0.98
1PMs96 FJ039718	F: ACAAGATGGGGCGTGAAGAC R: CTAGGTAGGCCGACAAACATGA	(CA) ₅ A(CA) ₂	252	60°	4	5	0.46	0.60
2PMc28 FJ039719	F: AACCCGCGCATTACTACA R: ATGGTTGCAGAGAAGAGATGAC	(AC) ₆	241	55°	4	5	0.44	0.52
2PMc52* FJ039720	F: AGAATGGCACCTGGAGATAG R: GGATAGGCCGAAAGAACAT	(TG) ₇	235	55°	6	7	0.67	0.82
2PMc216* HM235411	F: GGTTCATATCCCACAC R: ATCTCCACATTTAGTATCAA	(GT) ₈	196	50°	1	-	-	-
2PMc168* FJ039721	F: CCTCGCATTTTCTGGATTTA R: CATAGACGCACGCACTCAC	(TG) ₅	213	60°	12	10	0.79	0.86
2PMc40* FJ039722	F: ATATTTCCTCGAGATTTGTGTT R: AAGCTTTGGGATTAGTAGAA	(TG) ₅ CA(TG) ₄	254	55°	6	6	0.62	0.70
2PMc7.12 GU252057	F: TAAACTAGAGGACCCGTGTG R: TGTAGGCTCAAGAAAGGATT	(GT) ₇	269	60°	4	4	0.40	0.55
2PMc9.9* GU252058	F: GTGCGCGGCCAAGAAAAAGT R: CTCGAGGGGTGGATAGGACAGG	(GT) ₆	202	58°	7	8	0.66	0.78
2PMc9.17* GU252059	F: ATCAACGCTTTAATCCCTGTCC R: CATCGTCGCTCATCGTAGTC	(CA) ₅	230	60°	7	6	0.64	0.75
2PMc282* HM235417	F: CAGGAACATTATGAAAGTAT R: AAAAAGTTGCTCTAAAAAT	(CT) ₁₈	163	60°	1	-	-	-
2PMc14* GU252060	F: CAGCTCCGTCCCGTATCTCTAA R: CCGCAGGGAAGCACTATGGT	(GT) ₇	190	60°	4	5	0.55	0.69
2PMc19 GU252061	F: ATGGTTAAAGATGTTGTGAGTG R: GAGGCTGAGTTCTTGATAG	(AC) ₉	248	55°	3	3	0.22	0.37

Table 2. Continued.

Locus/ GenBank accession no.	Primer sequences (5' - 3')	Repeat motif	Product length (bp)	T _m (°C)	N _A	Banding pattern	PIC	D
2Pmc27 GU252062	F: AAAAGTAGAAGCATTATCCAT R: TTGCAAAGTGAAAACATTAG	(CA) ₉	217	60°	4	3	0.33	0.49
2Pmc34 GU252063	F: AGCACTGTGCACTAACCATAATG R: CGTCTCCGTCACCGATAG	(TG) ₇	211	58.8°	4	4	0.47	0.61
2Pmc40.1* GU252064	F: ATATTTCCCTCGAGATTTGTGTT R: AAGGTTTGGGATTAGTAGAA	(GT) ₄ CA(TG) ₅	254	52°	6	5	0.62	0.72
2Pmc48.2 GU252065	F: TTCTTTCTTTCCTGTC R: TTAGATGCTTGAGTTT	(CA) ₁₃	220	44°	4	3	0.30	0.44
2Pmc51 GU252066	F: TCAGCAAGAAACATCCTCA R: TTCCATAACCCAAATCCTG	(GA) ₂₃	244	60°	4	5	0.44	0.61
2Pmc256* HM235412	F: TGTTCATTATTGTGTT R: ACTTTGTATTGTGAGAA	(GA) ₉	215	60°	1	-	-	-
2Pmc55* GU252067	F: GGTAGCGCTCTGCTCTTG R: GACGGCCTTTCGCTTATTC	(AC) ₁₀	220	60°	6	7	0.67	0.80
2Pmc48* GU252068	F: CCTGTCAAAACTATGC R: GGGGAGACCTAACCA	(CA) ₁₃	231	55°	8	9	0.77	0.89
2Pmc60* GU252069	F: ACAGTTAGCTTAGTGGTTG R: TATGAAGGAGTAAAAAGACA	(CA) ₈	237	50°	4	6	0.55	0.71
2Pmc62* GU252070	F: TGCTGTTTCATACTCTCATT R: ACTGTCTGTTGCTTCACTG	(AG) ₁₀	228	51.2°	5	6	0.59	0.74
2Pmc73 GU252071	F: TAGTTATGTCATTATTTAGCA R: AAGTCTTATTTAGTCATTTTG	(CA) ₅	233	40°	4	4	0.31	0.44
2Pmc285* HM235420	F: ACTTGCACTGTTTTTAT R: TTGTTCCATCGCTCTAT	(GT) ₁₂	175	45°	1	-	-	-
2Pmc84 GU252072	F: GATCTATAAAGGAGGGAGCAG R: GGGGGTTACAAGCAGGTC	(CA) ₁₀	153	50°	4	4	0.42	0.57
2Pmc87* GU252073	F: CCGCTACCTTTTCTGTCTCCA R: CTCGGCGCAAGTTGAAGTTTT	(CT) ₅	248	60°	9	10	0.75	0.86
2Pmc90 GU252074	F: AACGGTAGCTGGTGAAGA R: ATGTCGATGTGGCAAGTG	(CA) ₈	178	53.7°	4	5	0.46	0.55
2Pmc103* GU252075	F: GCTACATTGGTCTTG R: GGCACCTTCTTAGGATA	(CT) ₁₆	282	60°	8	6	0.67	0.82
2Pmc143* GU252076	F: TTGATAGATACAGAGGAACCTG R: GGTGCCCATTAGATTGAA	(CT) ₁₀	171	60°	10	11	0.79	0.92
2Pmc247* HM235413	F: GCTCCTTGCTTCACTTTTAT R: ATCCCGTCATTATTCCATT	(CA) ₁₇	228	45°	1	-	-	-
2Pmc152* GU252077	F: GGCCCGTCATGTAAGAAC R: GAG GCTGAGACCGAGTGG	(CA) ₆	275	60°	5	6	0.59	0.73
2Pmc158* GU252078	F: GGAATAGCCCCAGATA R: GGCTACCTTCATTGTTT	(TC) ₆ (CA) ₇	227	50°	8	7	0.70	0.88

Table 2. Continued.

Locus/ GenBank accession no.	Primer sequences (5' - 3')	Repeat motif	Product length (bp)	T _m (°C)	N _A	Banding pattern	PIC	D
2Pmc172 GU252101	F: AAGCTAGCAGTTTGAT R: CGTAGGTATTGGAGTG	(CT) ₂₀	194	45°	4	3	0.22	0.36
2Pmc326.1A HM235419	F: GAAAGCATGGGCACAC R: TCGTCTCAAGGCATCC	(CT) ₁₅ AT(CT) ₃	244	55°	1	-	-	-
2Pmc173 GU252080	F: AAGGGTATTAGGTTCTGCT R: CATGACTGACTGGATTAGG	(GA) ₁₂	258	55°	4	2	0.19	0.34
2Pmc175 GU252081	F: TTCACGGTCAGATTCA R: TGCAGCTCATTGTTT	(CA) ₆	243	45°	4	4	0.44	0.62
2Pmc178* GU252082	F: ACCTGCTTGTTTTGCTTGTTG R: AGGGCTGGCTCTGATTGG	(CA) ₆	226	60°	12	13	0.85	0.94
2Pmc194* GU252083	F: CCACACGTCGCACTGATAAAAA R: CCCGAAGGCAGTAGGAGTAGAT	(CA) ₉	245	60°	6	5	0.64	0.78
2Pmc198 GU252084	F: CAGAAAGAAGGAAGGAAAGGAA R: TCTAGCTGCATGCATAAACA	(CT) ₇	255	56.5°	3	5	0.29	0.37
2Pmc433 HM235414	F: GCATGTAGAGCACCCAC R: TGTTGAAGTCAGCCTTAT	(CA) ₅	180	48.9°	1	-	-	-
2Pmc221 GU252085	F: GCACGATGGGCTAAGG R: GCGGCGGAACGATAA	(GAA) ₅	198	53.3°	4	4	0.39	0.52
2Pmc217* GU252087	F: TAACACGGGAGCTGAGGAACAT R: TGAACATAGCCAGGGAAGGTC	(GA) ₁₁	249	60°	5	6	0.68	0.77
2Pmc247* GU252088	F: GCTCCTTGCTTCACTTTTAT R: ATCCCGTCATTATTCCATT	(CA) ₁₇	228	53.2°	16	14	0.89	0.99
2Pmc302 GU252089	F: GGCCCTACCCAATCCA R: TTCCCTTAACCAATCACTT	(GT) ₅	210	51°	4	5	0.44	0.57
2Pmc326* GU252090	F: CAATTCGTCCCTCGTCTA R: GGTTCCATGCACAAATAA	(CT) ₁₅	254	51°	12	12	0.79	0.90
2Pmc340 HM235418	F: GGAGAATAAGAGAATG R: TAAGTAGGAGGTATGG	(GT) ₈	291	53.3°	1	-	-	-
2Pmc382* GU252091	F: ACCCATGATCAGGCAGACAAGA R: GCAGGCAGGAAAGCAGTAACAC	(CA) ₁₀	236	60°	6	7	0.76	0.82
2Pmc389* GU252092	F: CAGGTAACATCACAAGTA R: CTATAGGTAAGCCAGTA	(CA) ₉	177	50°	7	6	0.72	0.84
1Pmc1.1* GU252093	F: GGGGGCGAGAGGGGAGAC R: CGGGCGCAGTTTATGGTTGGT	(GT) ₂ CT (GT) ₅	233	60°	6	6	0.59	0.72
2Pmc96 HM235415	F: TCCTCCCTTCTTTGTA R: TCTCTTCAGGTCTCCAC	(CA) ₇	237	50°	1	-	-	-
1Pmc13a GU252094	F: TCGTCCGCTGAGCAT R: ACGGCGCACCCTGAC	(GT) ₉	209	57.7°	4	3	0.39	0.47
1Pmc32 GU252095	F: AACAGTTTGAGATGGTAG R: TTGAGGATTATGAGAAGTC	(CA) ₂ CG(CA) ₇	256	60°	4	5	0.41	0.57

Table 2. Continued.

Locus/ GenBank accession no.	Primer sequences (5' - 3')	Repeat motif	Product length (bp)	T _m (°C)	N _A	Banding pattern	PIC	D
1PMc35.2	F: AATTTTGTATCCTGCTCCAC	(GT) ₅	208	60°	3	4	0.33	0.47
GU252096	R: ACCCAAAGATAATTAGAACCTG							
1PMc39.b*	F: CCATCACTCGGGTCAG	(CA) ₈	242	60°	6	5	0.62	0.77
GU252097	R: TTTCGGCAAAACATACA							
1PMc53	F: AAAGGGGGTTACAAGCAGGTC	(GT) ₂ GA(GT) ₅	146	60°	4	4	0.45	0.59
GU252098	R: GATCTATAAAAGGAGGGAGCAGA							
2PMc239.1A•	F: TAACAAGAGAAATAAACAA	(GA) ₈	216	50°	1	-	-	-
HM235416	R: GGAGTAAAAGGACCAC							
1PMc55*	F: TCCCTCTAGAACCAAGCACA	(GT) ₁₃	160	60°	6	5	0.60	0.74
GU252099	R: ATCAAGACACATCAAGAACACAT							
1PMc72	F: GAAATCCGCCTCCACCAA	(CA) ₆	195	60°	4	5	0.57	0.67
GU252100	R: TCCGGCGCCACTTCAT							

Note: •monomorphic loci. *microsatellite loci selected to characterize the germplasm of *Panicum maximum* Jacq.

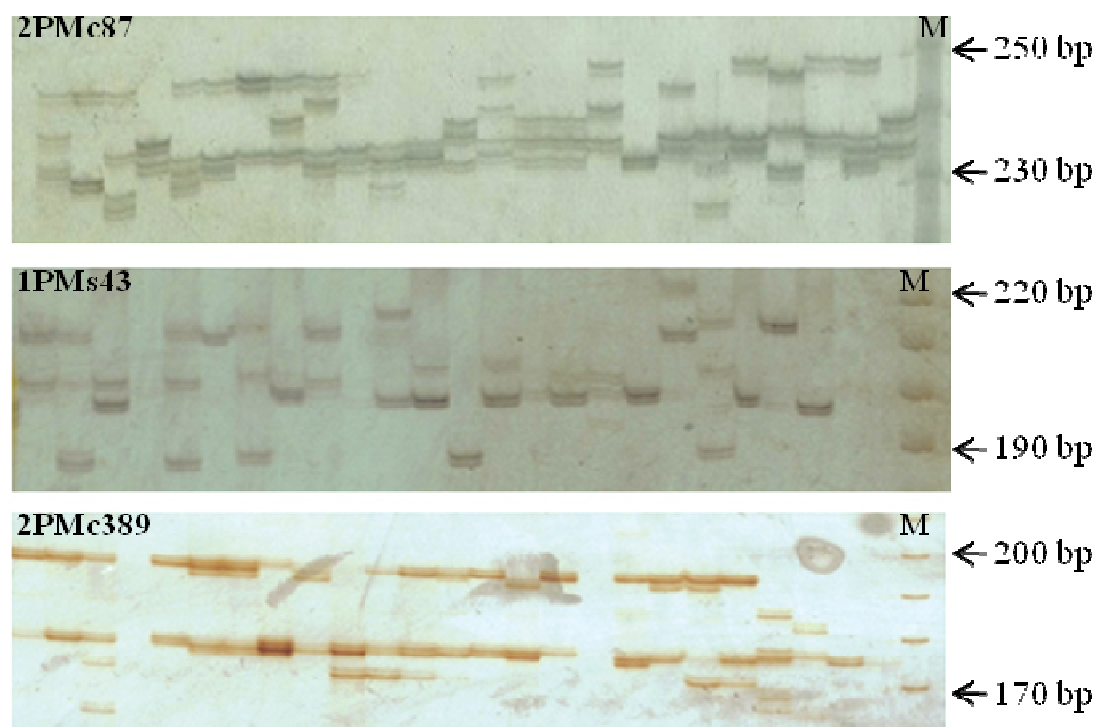


Figure 1. Allelic variation in 25 *Panicum maximum* accessions detected on silver-stained 6% polyacrylamide gels. M, Molecular size marker (10 bp DNA Ladder).

Molecular analysis of *Panicum maximum* germplasm

For the 30 microsatellite loci selected, a total of 192 alleles were obtained, with an average of 6.4 alleles per locus. Based on Jaccard's similarity coefficient, syntheses with low and high variation among the accessions were constructed. The similarity among the 396 accessions of *P. maximum* ranged from 0.16 to 0.86, with an average of 0.32. For the 15 sexual accessions (S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19, S20 and S21), the mean similarity among them was 0.63.

A typical STRUCTURE analysis assumes a model in which there are K populations, each of which is characterized by a set of allele frequencies at each locus. Genotypes are assigned (probabilistically) to a particular population, or jointly to two or more populations if their genotypes indicate that they are admixed. STRUCTURE analysis coupled with computation of Evanno ΔK statistics suggested a primary partition of the *P. maximum* accessions into 4 clusters ($K=4$), with a number of admixed accessions (**Figure 2a and b**). Thus, the subpopulations from the STRUCTURE analysis were grouped into 4 clusters (C1, C2, C3, and C4) (**Figure 3b; Figure 4**), with bootstrap values ranging from 49% to 99%, respectively. This indicates the robustness of the genetic relationship depicted by the dendrogram.

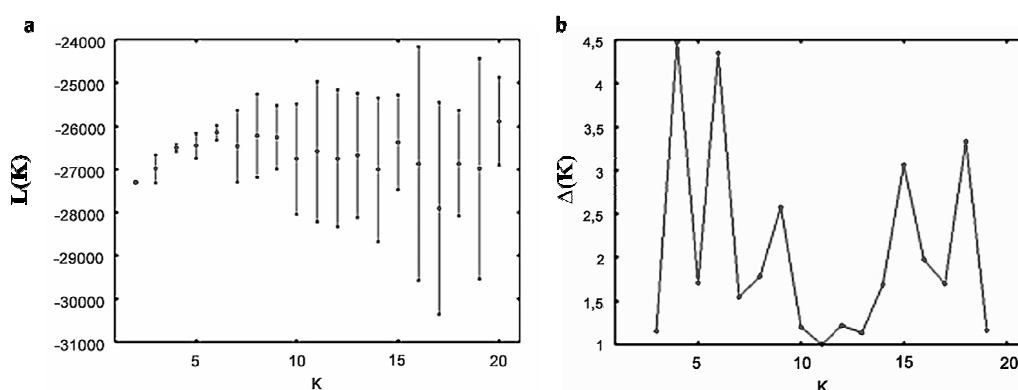


Figure 2. Determination of K , the most probable number of clusters, using STRUCTURE software, based on 396 *Panicum maximum* accessions. **a.** log probability of data, $L(K)$ as a function of K averaged over 20 replicates and, **b.** ad-hoc ΔK statistics as a function of K , calculated over 20 replicates.

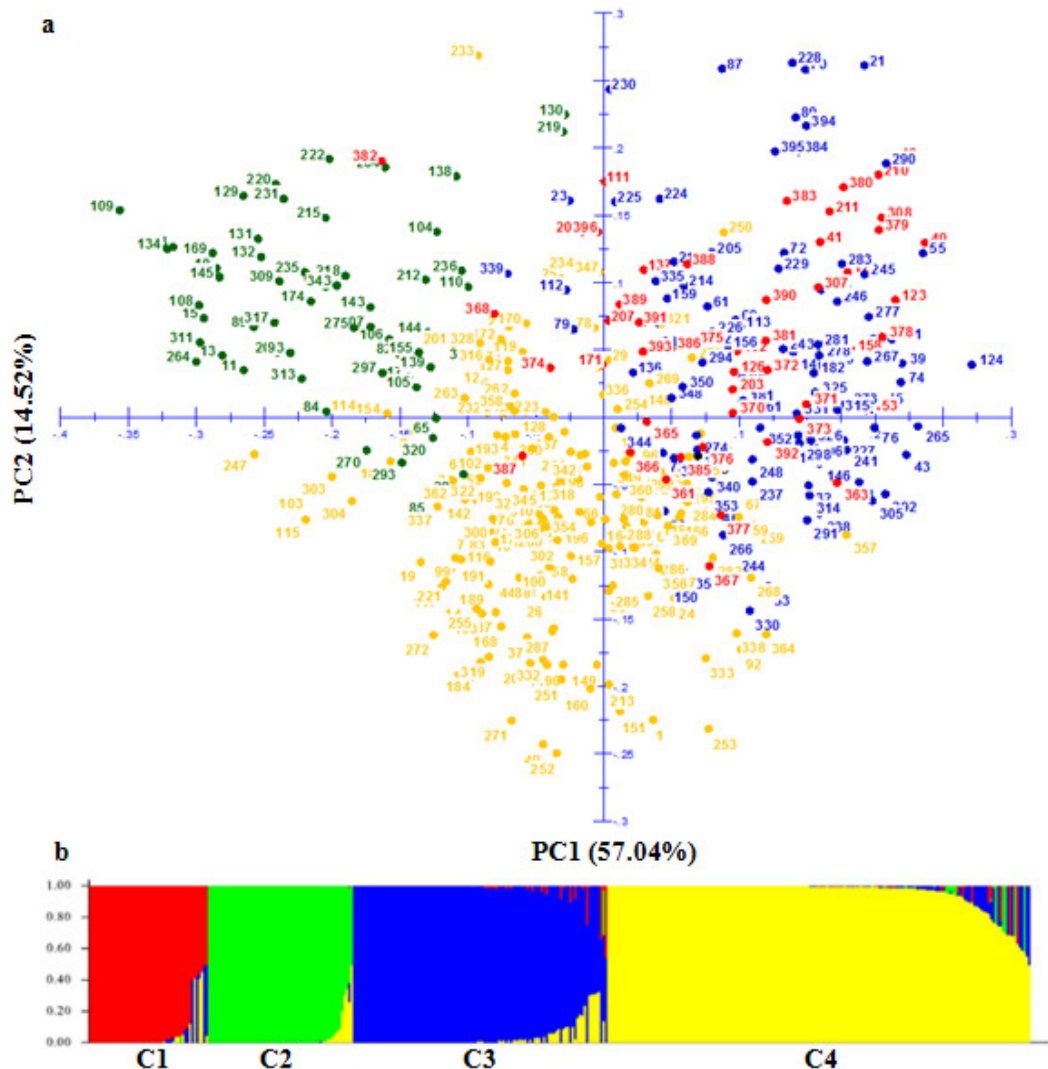


Figure 3. **a** Association among 396 *Panicum maximum* accessions revealed by principal component analysis (PCA) based on Jaccard's similarity coefficient calculated from 30 microsatellite markers. Samples are colour-coded based according to STRUCTURE results. **b** Population structure analysis. Each individual is represented by a thin vertical segment partitioned into K colored segments representing the estimated individual membership to the K cluster. The colors of the bar correspond to one of the 4 clusters identified with the STRUCTURE program (C1 = red, C2 = green, C3 = blue and C4 = yellow).

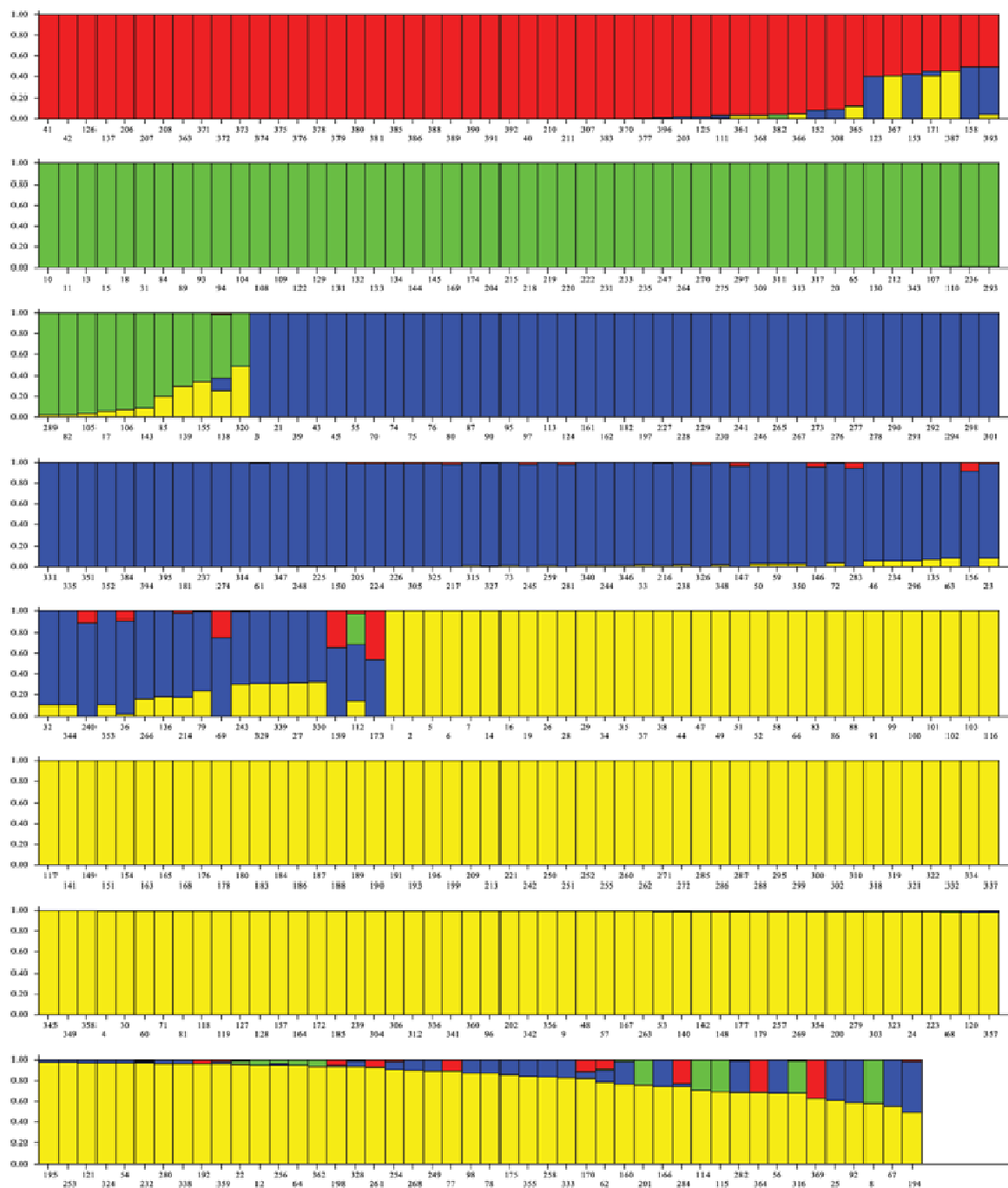


Figure 4: Population structure analysis. Each accession is represented by a thin vertical segment partitioned into K colored segments that represent the individual estimated membership to the K cluster.

Cluster C1 (red) contained 50 accessions; and cluster C2 (green) contained 61 accessions; while the other two clusters, C3 (blue) and C4 (yellow), contained 107 and 178 genotypes, respectively. This approach successfully discriminated all accessions tested with the exception of duplicate accessions. There were confirmed replicates in the germplasm based on genetic and morphological analyses (**Table 1**), which were grouped together in the same cluster. The sexual genotypes were grouped with apomictic tetraploids in clusters C2 (S16), C3 (S18, S17, S12 and S8) and C4 (S11, S13, S14, S19, S20, S21, S15, S9, S7 and S10). These sexual accessions were selected from crosses between tetraploid sexual and apomictic accessions. The tetraploid sexual accessions were obtained by artificially doubling of chromosomes with colchicines of diploid sexual plants found in the region of origin in East Africa and may be used in breeding programs (Savidan, 1982; Nakagawa and Hanna, 1992). For practical purposes, crosses among accessions with different chromosome numbers or with distinct meiotic behavior usually result in progeny infertility. In guineagrass, the chromosome duplication with colchicine allowed the crossing of sexual genotypes with tetraploid apomictic genotypes to obtain fertile hybrids (Combes and Pernès, 1970; Pernès et al. 1975).

The inheritance of apomixis in *P. maximum* is determined by a single dominant gene or a group of very close genes that result in sexual and apomictic progenies in a 1:1 ratio. Therefore, crosses between sexual and apomictic genotypes result in 50% apomictic hybrids and 50% sexual individuals, consequently obtaining fixed superior genotypes, which can be multiplied and enter the selection process, bringing new perspectives for breeding this species. Thus, the selection of superior genotypes may be carried out by crossing selected sexual and apomictic genotypes with promising characteristics and selection of the best apomictic genotypes from the germplasm (Savidan, 1975, 1982, 1983).

Cluster C4 includes the Brazilian cultivars “Tanzania-1” (ORTOM-T58), “Mombaça” (ORSTOM-K190A), “Atlas” and the Cuban cultivar “Likone (K.5829)” (ORSTOM-G26). The

Australian cultivar “green panic” (ORSTOM-G15) and Brazilian cultivars “Aries” and “Massai” (ORSTOM-T21) were found in cluster C3. The Massai cultivar is a natural hybrid derived from crosses between *P. maximum* and *P. infestum* collected in Tanzania, Dar-Bagamoyo. In Brazil, varieties “Tanzania-1”, “Mombaça” and “Massai” are the most widely cultivated. They were selected mainly based on the following 4 characteristics: leaf yield, leaf percentage, regrowth 7 days after harvest, and pure seed yield (Jank et al. 1993).

The STRUCTURE analysis showed that the clusters C1, C2, C3 and C4 had mixed ancestry origins (Kenya and Tanzania). The *P. maximum* accessions that are preceded by T were collected in Tanzania (1969), KK in Kenya (1969), K in Kenya or Tanzania (1967), and G were sent by African research institutions as seeds. Cluster C1 comprised 94% of the accessions from Kenya or Tanzania collected in 1967. Clusters C2, C3 and C4 include accessions collected from the two expeditions in East Africa (1967 and 1969) and from African research institutions. The STRUCTURE results were confirmed by AMOVA analysis (**Table 3**). The largest fraction of variation was found within groups (55.62%) and a smaller variation among groups (34.62%).

Table 3. Molecular analysis of variance (AMOVA) based on STRUCTURE results.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance component	Percentage of components	P-value
Among Clusters	3	177.494	3.949Va	34.62	0.0000
Within Clusters	21	537.143	9.354Vb	55.62	-

A principal components analysis (PCA) was applied to visualize individual accessions in a multivariate space based on genetic similarity values from the proportion of the accessions in the data. The graphical representation allows the evaluation of the population structure and geometric distances between all the accessions in the study. The first two principal coordinates in the PCA accounted for 57.04 and 14.52% of the total variation, respectively. As with the STRUCTURE results, the PCA produced 4 distinct distribution of accessions (**Figure 3a**), and these were colored in the figure according to STRUCTURE results. Furthermore, a strong tendency of correspondence between the Bayesian clusters in the PCA was observed. A scattergram of these two axes showed little origin correlation, in particular in the south of Kenya and north of Tanzania. This indicated a closer relationship between the accessions of *P. maximum*. One advantage of the PCA was that the relationships between each of the accessions could be evaluated, and this helps to visualize possible introgression between clusters.

The genetic relationships of the *P. maximum* accessions did not reveal association with their geographic distribution. All groups had a wide geographical distribution in Kenya and Tanzania (**Figure 5**). Some accessions collected in 1967 and others from the African research institutions were closely related genetically (Cluster C2, green), but they had a broad geographical distribution that includes regions in the south of Kenya and the north of Tanzania. These results show wide genetic variability in these regions. A small diploid sexual colony was discovered in the region of Korogwe in Tanzania (Combes and Pernès, 1970; Savidan, 1982). The wide distribution of the guineagrass genotypes strongly supports the assumption of intercrossing with the diploid sexual genotypes in natural habitats.

Microsatellite markers have become one of the most widely used molecular markers tools for genetic analysis. The enrichment of DNA fragments through the binding of microsatellite probes is simple and efficient for microsatellite isolation and has been successfully

applied to a number of plant genomes. In summary, molecular marker analysis revealed the distribution pattern of genetic diversity and population structure in *P. maximum* germplasm. It was observed that this germplasm collection is a rich source of genetic variability, providing the necessary raw material for breeding programs. In support of long-term germplasm conservation, microsatellite markers may be usefully employed to demonstrate that genotypes or cultivars are true to type, to help ensure proper maintenance, to determine the degree of relatedness among genotypes or groups of genotypes, to clarify the genetic structure or partitioning or variation among genotypes, populations and species, and to help determine the presence of a specific gene or gene complex in particular genotypes (Koh et al. 1996). Thus, development of these microsatellite markers is an important first step toward the development of a genetic linkage map and the use of marker-assisted selection programs for traits of agronomic importance in *P. maximum*.

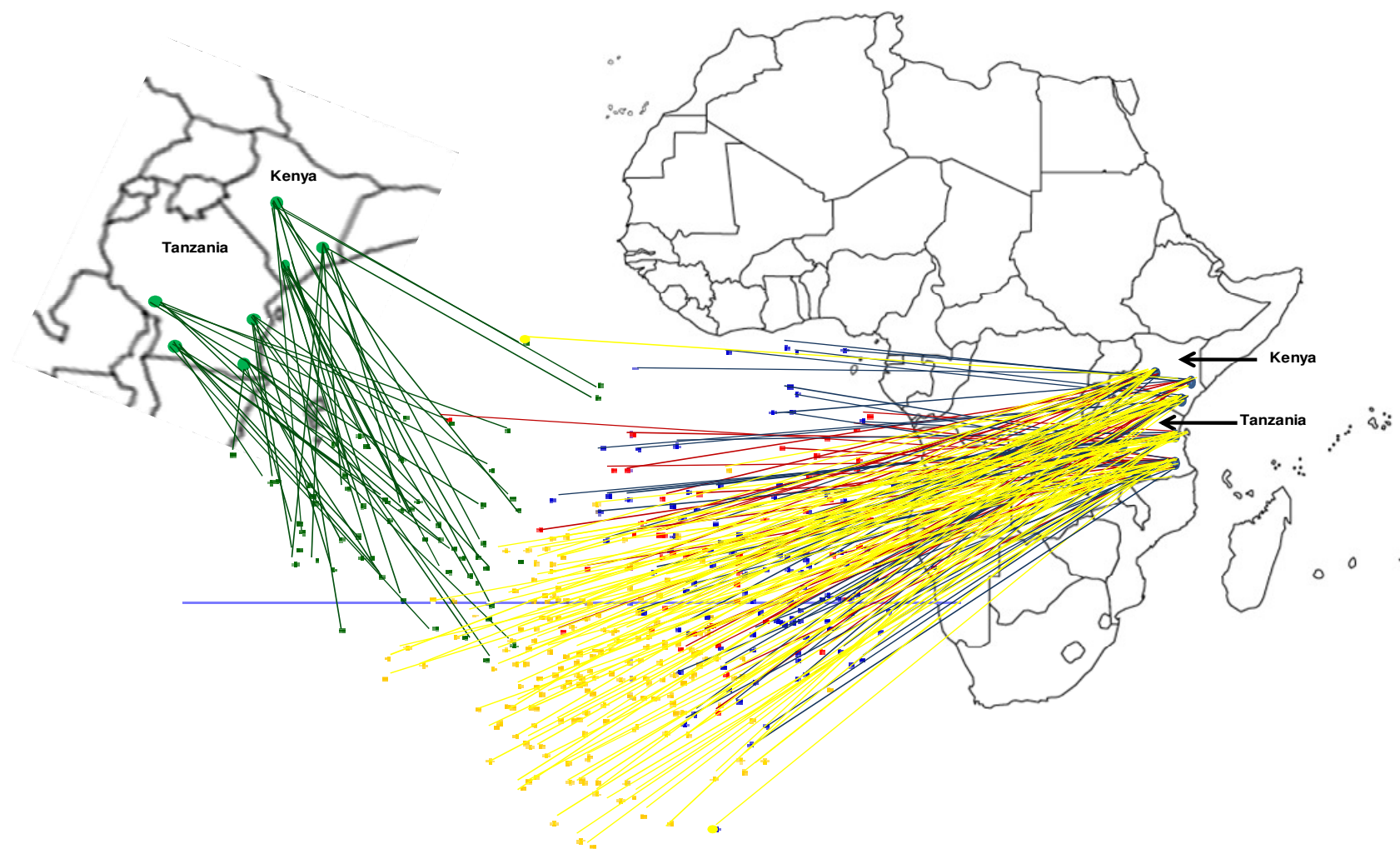


Figure 5. Geographical and genetic distributions of 396 *Panicum maximum* accessions. Lines link positions of accessions in the PCA graph and their geographic origin on the map. Colors indicate the accession membership identified using STRUCTURE.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support (Project 05/51010-0) and for a graduate fellowship to A. C. B. Sousa (06/52953-8) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research fellowships awarded to A. P. Souza and L. Jank.

References

Billotte, N., Lagoda, P. J. L., Risterucci, A. M., and Baurens, F. C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, **54**: 277-288.

Bolaric, S., Barth, S., Melchinger, A. E., and Posselt, U. K. 2005. Molecular genetic diversity within and among German ecotypes in comparison to European perennial ryegrass cultivars. *Plant Breeding*, **124**: 257-262.

Burton, G. W., Millot, J. C., and Monson, W. G. 1973. Breeding procedures for *Panicum maximum* Jacq. suggested by plant variability and mode of reproduction. *Crop Science*, **13**: 717-720.

Coelho, A. S. G. 2002. BooD: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável

de marcadores. Computer software distributed by the author. Laboratório de Genética Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil. [In Portuguese].

Combes, D., and Pernès, J. 1970. Variations dans le nombres chromosomiques du *Panicum maximum* Jacq. en relation avec le mode de reproduction. Comptes Rendues Academie des Sciences, **270**: 782-785.

Combes, D. 1975. Polymorphisme et modes de reproduction dans la section des *Maximae* du genre *Panicum* (Gramineae) en Afrique. Paris: Mémoires ORSTOM **77**: 1-99.

Creste, S., Tulmann-Neto, A., and Figueira, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Molecular Biology Reporter, **19**: 299-306.

Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, **12**: 13-15.

Duke, J. A. 1983. *Panicum maximum* Jacq. (Poaceae: Guineagrass, Hamilgrass). Center for new crops and plant products. Purdue University, West Lafayette, IN. Available at: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Panicum_maximum.html (accessed on March 20, 2009).

Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **18**: 2611-2620.

Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**: 47-50.

Field, D., and Wills, C. 1996. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings the Royal Society*, **263**: 209-215.

Gaitán-Solís, E., Duque, M. C., Edwards, K. J., and Tohme, J. 2003. Microsatellite in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Science*, **42**: 2128-2136.

Gupta, P. K., and Varshney, R. K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetics analysis and plant breeding with special emphasis on bread wheat. *Euphytica*, **113**: 163-185.

Hijmans, R. J., Guarino, L., Cruz, M., and Rojas, E. 2001. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. *Plant Genetic Resources*, **127**: 15-19.

Jaccard, P. 1908. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. Bulletin de la Société Vandoise des Science Naturelles, **37**: 547-579.

Jain, A., Roy, A. K., Kaushal, P., Malaviya, D. R., and Zadoo, S. N. 2006. Isoenzyme banding pattern and estimation of genetic diversity among guineagrass germplasm. Genetic Resources and Crop Evolution, **53**: 339-347.

Jank, L., Costa, J.C.G., Savidan, Y.H., Valle, C.B. 1993. New *Panicum maximum* cultivars for diverse ecosystems in Brazil. In: International Grassland Congress. Palmerston North. Proceedings... New Zealand Grassland Association. **17**: 509-511.

Jank, L., Calixto, S., Costa, J. C. G., Savidan, Y. H., and Curvo, J. B. E. Catalog of the characterization and evaluation of the *Panicum maximum* germplasm: morphological description and agronomical performance. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 1997. 53p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, **68**).

Koh, H. J., Heu, M. H., and McCouch, S. R. 1996. Molecular mapping of the *ges* gene controlling the super-giant embryo character in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics, **93**: 257-261.

Mateescu, R.G., Zhang, Z., Tsai, K., Phavaphutanon, J., Burton-Wurster, N.I., Lust, G., Quaas, R., Murphy, K., Acland, G. M., and Todhunter, R. J. 2005. Analysis of Allele Fidelity,

Polymorphic Information Content, and Density of Microsatellites in a Genome-Wide Screening for Hip Dysplasia in a Crossbreed Pedigree. *Journal of Heredity*, **96**: 847-853.

Muir, J. P., and Jank, L. 2004. Guineagrass. In: Moser, L. E., Burson, B. L., and Sollenberger, L. E. (eds), Warm-Season (C4) Grasses. *Agronomy Monography*, **45**: 589-621. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI.

Nakagawa, H., and Hanna, W. 1992. Induced sexual tetraploids for breeding guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Science Council of Japan and Japanese Society of Grassland Science*, **38**: 152-158.

Nakajima, K. 1978. Comparison of major agronomic characters in guineagrass and colored guineagrass. *Japan Agricultural Research Quarterly*, **12**: 145-151.

Nakajima, K., Komatsu, N., Mochizuki, N., and Suzuki, S. 1979. Isolation of diploid and tetraploid sexual plants in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Japanese Journal of Breeding*, **29**: 228-238.

Pernès, J. et al. 1975. Schéma d'amélioration génétiques des complexes agamiques du type *Panicum*. *Cahiers ORSTOM Série Biology*, **10**: 67-75.

Perrier, X., and Jacquemoud-Collet, J. P. 2006. DARwin software. Available from <http://www.darwin.cirad.fr/darwin>.

Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotypes data. *Genetics*, **155**: 945-959.

Rohlf, F. J. 2000. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1.

Savidan Y. 1975. Hérité de l'apomixie contribution a l'étude de l'hérité de l'apomixie sur *Panicum maximum* Jacq. (analysis des sacs embryonnaires). *Biology*, **10**: 91-95.

Savidan, Y. H. 1982. Nature et hérité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. ORSTOM Travaux et Documentos, 153. ORSTOM, Paris.

Savidan, Y., and Pernès, J. 1982. Diploid-tetraploid-haploid cycles and the evolution of *Panicum maximum* Jacq. *Evolution*, **36**: 596-600.

Savidan YH. 1983. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). In: Smith JA and Hays VW (ed.) Proc. Int. Grassl. Congr., 14th. Lexington, KY. 15-24. Westview Press, Boulder, CO. 182-184p.

Savidan, Y. H., Jank, L., Costa, J. C. G., and Valle, C. B. do. 1989. Breeding *Panicum maximum* in Brazil: 1. Genetic resources, modes of reproduction and breeding procedures. *Euphytica*, **41**: 107-112.

Savidan, Y. H. 2000. Apomixis: genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews*, **18**: 10-86.

Smith, R. L. 1979. Seed dormancy in *Panicum maximum* Jacq. *Tropical Agriculture*, **56**: 233-239.

Sousa, A. C. B., Jungmann, L., Campos, T., Sforça, D. A., Boaventura L. R., Silva, G. M. B., Zucchi, M. I., Jank, L., Souza, A. P. 2010. Development of microsatellite markers in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) and their transferability to ther tropical forage grass species. *Plant Breeding*. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2010.01779.x.

Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Catinhour, S., and McCouch, S. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome*, **11**: 1441-1452.

Tessier, C., David, J., Boursiquot, P., and Charrieir, A. J. M. 1999. Optimizations of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**: 171-177.

Varshney, R. K., Graner, A., and Sorrells, M. E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends in Biotechnology, **23**: 48-55.

CAPÍTULO III

Genetic diversity analysis among pigeonpea genotypes adapted to South American regions based on microsatellite markers

Adna Cristina Barbosa de Sousa¹ • Rodolfo Godoy² • Danilo Augusto Sforça¹ • Tatiana de Campos¹ • Maria Imaculada Zucchi³ • Liana Jank⁴ • Anete Pereira de Souza^{1,5}

¹ University of Campinas (UNICAMP), Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), CP 6010, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

² Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Cattle-Southeast, Rod. Washington Luiz (SP-310), Jardim São João Batista, CEP 13566-684, São Carlos - SP, Brazil.

³ Agronomic Institute of Campinas, Pólo Apta Centro Sul – Rod. SP 127 km 30, Piracicaba – SP, CP 28, CEP 13400-970, Brazil.

⁴ Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Beef Cattle, Forage Breeding Dept, CP 154, Campo Grande – MS, CEP 79002-970, Brazil.

⁵ University of Campinas (UNICAMP), Biology Institute, Plant Biology Dept (DBV), CP6109, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

Key words: legumes, transferability, genetic diversity, microsatellite, germplasm.

***O trabalho foi aceito para publicação na revista *Scientia Agricola*.**

Abstract

Microsatellite markers were used to estimate the genetic diversity of 77 pigeonpea genotypes selected from the germplasm collections at Embrapa Cattle-Southeast and, to evaluate their transferability to *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* species. The number of alleles per locus ranged from 2 to 12, with an average of 5.1 alleles. The PIC values ranged from 0.11 to 0.80 (average 0.49) and the D values ranged 0.23 to 0.91 (average 0.58). The averages of observed and expected heterozygosity were 0.25 and 0.47, respectively, showing a deficit in heterozygosity. A model-based Bayesian approach implemented in the software STRUCTURE was used to assign genotypes into clusters. The dendrogram was constructed based on the modified Roger's genetic distances using a neighbor-joining method (NJ). A total of 4 clusters were assembled in STRUCTURE and a strong tendency of correspondence between the Bayesian clusters in the NJ tree was observed. The genetic distance ranged from 0.09 to 0.62 (average 0.37), showing a low genetic diversity in the pigeonpea genotypes. Transferability of pigeonpea-specific microsatellites revealed a significant cross-amplification and the presence of polymorphic alleles in *P. vulgaris* and *V. unguiculata*.

Análise da diversidade genética entre genótipos de guandu adaptados às regiões da América do Sul com base em marcadores microssatélites

Resumo

Foram utilizados marcadores microssatélites para estimar a diversidade genética de 77 genótipos de guandu, selecionados do germoplasma da Embrapa Pecuária Sudeste e para avaliar sua transferibilidade em *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*. O número de alelos por loco variou de 2 a 12, com uma média de 5,1 alelos. Os índices de PIC variaram de 0,11 a 0,80 (média de 0,49) e os índices de D variaram de 0,23 a 0,91 (média de 0,58). As médias das heterozigosidades observada e esperada foram de 0,25 e de 0,47 respectivamente, mostrando um déficit em heterozigotos. O software STRUCTURE baseado em um modelo bayesiano foi utilizado para agrupar os genótipos. O dendrograma foi construído com base nas Distâncias Genéticas Modificadas de Rogers, usando o método Neighbor-Joining (NJ). Quatro grupos foram separados com o STRUCTURE os quais corresponderam aos agrupamentos gerados com o método NJ. A distância genética variou de 0,09 a 0,62 (média 0,39) mostrando baixa diversidade genética entre os genótipos de guandu. Os microssatélites específicos de guandu demonstraram transferibilidade a *P. vulgaris* e *V. unguiculata*, bem como revelaram polimorfismo nessas espécies.

Introduction

The pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) is one of the most important perennial legume crops in the tropic and subtropic regions of the world. Because of its multiple usages in food, fodder, soil conservation, crop-livestock integrated systems, reclaiming of degraded pastures and symbiotic nitrogen fixation, the pigeonpea plays an important role in subsistence agriculture (Reddy et al., 2005).

Because of the potential of pigeonpea as a forage legume, the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Cattle-Southeast, São Paulo) has germoplasm collections of selected genotypes with desirable agronomic traits such as high yield, quality of forage and lowest tannin content (Godoy et al., 1995). Over time, the selected genotypes showed phenotypic segregation in subsequent generations. Therefore, these genotypes were self-fertilized and subsequently selected in order to obtain inbred lines (Godoy et al., 1994; 1997). Several studies have been conducted to characterize genotypes and inbred lines of the pigeonpea and provide basic information for breeding. The genetic variability of a partial set of accessions from the Embrapa Cattle-Southeast pigeonpea germoplasm collection was assessed using Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) molecular markers. Results showed low genetic variability and the need to broaden the genetic base for use in crop-livestock integrated systems and reclaiming degraded pastures (Faleiro et al., 2005; Faleiro et al., 2006).

The knowledge of genetic variability is very important for the pigeonpea germplasm collections and pigeonpea breeding programs. Microsatellite markers are quite effective for estimating genetic diversity and genetic relationships and in predicting the genetic value of selected genotypes derived from intraspecific crosses and the performance of their hybrid progenies (Gaitán-Solís et al., 2002; Varshney et al., 2005). In this study, we used 43

microsatellite markers to evaluate the genetic diversity of 77 pigeonpea selected genotypes from Embrapa Cattle-Southeast germplasm collection. In addition, we studied cross-species amplification in *Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp.

Material and Methods

Selection of microsatellite and plant material

We have selected 43 microsatellite markers described in the literature (Burns et al., 2001; Odeny, 2006; Odeny et al., 2007) to analyze 77 genotypes of pigeonpea (**Table 1**). These genotypes belong to the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Cattle-Southeast) germplasm collection. Thirty-nine of the genotypes are Brazilian inbred lines, three are commercial cultivars and thirty-five are genotypes that came from the International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT) (**Table 2**). The inbred lines have distinct morphological characteristics such as color on the stem, flowers, seeds and pods. These inbred lines were obtained from selfing of genotypes introduced from ICRISAT and have been incorporated to the breeding programs at Embrapa Cattle-Southeast, São Carlos/SP, Brazil. In addition, cross-amplification evaluations were done using two other legume species: *Phaseolus vulgaris* (CAL-143, IAC-UNA, BAT-93 and JALO-EEP558 varieties) and *Vigna unguiculata* (“Fradinho” cultivar), both from the germoplasm collection of the Agronomic Institute of Campinas (IAC) (Campinas, SP, Brazil).

Table 1 - Characteristics of 43 pigeonpea microsatellite markers.

GenBank Accession no.	Repeat Motif	Primer Sequences (5' - 3')	⁽³⁾ T _a (°C)	Product Length (bp)	Polymorphic Markers	Monomorphic Markers	Source
CZ445531	(TA) ₁₁	⁽¹⁾ F: TGAATTGCTGAGAGGACGTTT ⁽²⁾ R: CTGTTCCAATTCCACGGTTT	56	234-238	+	-	Odeny et al. (2007)
CZ445540	(GGT) ₄	F: ACGCTTCTGATGCTGTGTTG R: CATCAGCATCATCGTTACCC	45	208-210	+	-	Odeny et al. (2007)
CZ445530	(TTC) ₅	F: CCATTGTGCGTCTTTGTGTT R: GCTTTTCCTCTTCCTTTCTCG	56	206-208	+	-	Odeny et al. (2007)
AJ306901	(CA) ₁₀	F: AAGGGTTGTATCTCCGCGTG R: GCAAAGCAGCAATCATTTCG	56	186-202	+	-	Burns et al. (2001)
AJ312887	(CA) ₂₁	F: CCATAATCCAATCCAAATCC R: AGAAGGCTTTTCATGTAAACGC	51	160-170	+	-	Burns et al. (2001)
AJ312891	(CA) ₆	F: ACAATGCTAGGGAACACCGC R: TACCTTAACCCACAATGGCC	45.5	180-206	+	-	Burns et al. (2001)
AJ312892	(CT) ₁₆	F: CAACATTGGACTAAAACTG R: AGGTATCCAATATCCAACCTG	56	150-158	+	-	Burns et al. (2001)
AJ312893	(CT) ₃₀	F: TGCCTTTGTAAAGCATTCCTCA R: ACTTGAGGCTGAATGGATTTG	50	126-150	+	-	Burns et al. (2001)
AJ312894	(CT) ₂₂	F: CACTTGGTTGGCTCAAGAAC R: GCCAATGAACACATCCTTC	45	152-180	+	-	Burns et al. (2001)
AJ312895	(CA) ₁₅	F: CCTTCTTAAGGTGAAATGCAAGC R: ATAACAATAAAAAGACCTTGAATGC	45	228-242	+	-	Burns et al. (2001)
CZ681930	(TC) ₈	F: GCGCTAAGGGAAAACAAAAA R: AACTCCCTTGTGTATATGGTG	56	164-174	+	-	(Odeny, 2006)
CZ681938a	(ATT) ₂₁	F: TCAGGGGTAAATGCGGTATC R: GAATTGCTTTTGTCTCCTCA	50	236-260	+	-	(Odeny, 2006)
CZ681938b	(ATT) ₂₁	F: TCAGGGGTAAATGCGGTATC R: GAATTGCTTTTGTCTCCTCA	50	212-234	+	-	(Odeny, 2006)
CZ682017a	(AAG) ₁₃	F: TGAATGAACAAACCTCAATGG R: TGTATTGCACATTGACTTGGCTA	45	200-222	+	-	(Odeny, 2006)
CZ682017b	(AAG) ₁₃	F: TGAATGAACAAACCTCAATGG R: TGTATTGCACATTGACTTGGCTA	45	174-182	+	-	(Odeny, 2006)
CZ681983	(TGA) ₁₁	F: GAGGAGGAGGAAGAAGAAGA R: TCGTCGCCGTATCACTACAA	45.5	73-79	+	-	(Odeny, 2006)
CZ445530	(TTC) ₅	F: CGGGCTTCCTTTTCTTCTCT R: AAAACCCCGAAAAACACCAT	46	200	-	+	Odeny et al. (2007)
CZ445525	(TTA) ₁₀	F: TTCTGGATCCCTTTTCATTTTTC R: TGACACCCCTTCTACCCATAA	45	196	-	+	Odeny et al. (2007)
CZ445522	(TA) ₈	F: CTTCCCCCACTAAGATCCA R: GTTCGTTCTCTTTAATTGACTTGC	46	212	-	+	Odeny et al. (2007)
CZ445538	(TTA) ₄	F: CCAAGAAAAGGTGCTCCAAGT R: TTGCTTCTTTTCTCGCTTGC	45.5	155	-	+	Odeny et al. (2007)
CZ445539	(CAT) ₄	F: TGATAGGACCAACGACA R: AGCGTTGACTCCTCCCTCTT	56	200	-	+	Odeny et al. (2007)

Table 1 - Continued.

GenBank Accession no.	Repeat Motif	Primer Sequences (5' - 3')	⁽³⁾ T _a (°C)	Product Length (bp)	Polymorphic Markers	Monomorphic Markers	Source
CZ445519	(CT) ₆ TT(CT) ₂	F: GACTCTTCACCTCAGACTCATCAC R: ACCTCATACAACAACCTAAGCAC	46	190	-	+	Odeny et al. (2007)
CZ445544	(TTAT) ₄	F: TACAGCAGCCACATCAAAGC R: TGAACCGTGAAAGTGGGATT	45.5	290	-	+	Odeny et al. (2007)
CZ445553	(TTA) ₄	F: ACCCATTATTGATTTGGGTA R: CCAAATTTACCCCAAGAAA	45.5	200	-	+	Odeny et al. (2007)
CZ445545	(AAT) ₄	F: TCTTCCATTGCATGGTGTT R: GCATGATATGAGATGATGACGA	56	202	-	+	Odeny et al. (2007)
CZ445554	(AAC) ₄	F: ATAGGCCCATCTCCAGGTTC R: TTAATGCCAGCCAATTCTT	47	158	-	+	Odeny et al. (2007)
CZ445521	(TA) ₄ ...(AT) ₄	F: CTACAATCCCAGGGAAAAGG R: ACAAACGTAATCTGTGTGATCTC	46	210	-	+	Odeny et al. (2007)
CZ681935	(TC) ₈	F: CATTTATTTCTCTCTGGCATTAC R: CGAGCTGCAAGCATAAACG	56	158	-	+	(Odeny, 2006)
CZ681923	(AAG) ₅	F: CATCGCCTACAATCATACAAAGA R: TCTTGTCTTTTTTCAGTCATCGT	54	106	-	+	(Odeny, 2006)
CZ681927	(GAA) ₁₆	F: CTCTTGCTTACGCGTGGACT R: CTTTTGCTTTTTCGCTGCTT	45.5	206	-	+	(Odeny, 2006)
CZ681929	(AGA) ₅	F: TCACAGAGGACCAACGAAG R: TGGACTAGACATTGCGTGAAG	50	200	-	+	(Odeny, 2006)
CZ681933	(AGA) ₄	F: AGAGGGAAAGGGAAGAGAAGA R: TCAAGCAACTCCAAGAAATTCA	54	200	-	+	(Odeny, 2006)
CZ681946	(CTT) ₄	F: TAATCCCATTCGTTGTCTGT R: CCCAGGAAGAGATGAGACCA	45	256	-	+	(Odeny, 2006)
CZ681968	(ATT) ₄	F: CAGGATTTAATGGATTCTGCAA R: GGGTGAATACTATTTAAAAGGATA	45.5	280	-	+	(Odeny, 2006)
CZ681969	(ACT) ₄	F: ATCCCAGACTTCATAGGGAGATAG R: GTCTAGTCCCAGGTACAAAGAGGT	57.5	200	-	+	(Odeny, 2006)
CZ681961	(AGA) ₁₀	F: ATGGGCATGGTAGAGGAGGT R: CGCTCATCATCGTCATCAAA	47	198	-	+	(Odeny, 2006)
CZ681943	(GAT) ₅ ...(GAT) ₄	F: TGGGCATGGTAGAGGAAGTT R: CGTCATGAAGCAACAGGAGA	46	186	-	+	(Odeny, 2006)
CZ681977	(CA) ₇	F: ACCTTGCTTGTTCGCTTTT R: AAGGGAGGTGGACTACAAGGA	46	148	-	+	(Odeny, 2006)
CZ681979	(GT) ₇	F: GTGAGTGAGAGTGAGTGATTTGT R: GCTCTGATGCCAATGTTGA	60	200	-	+	(Odeny, 2006)
CZ681998	(TC) ₆	F: ACAAAATCCGGTGACCCATAA R: CCGAGAACAACAAACATTGAACA	60	206	-	+	(Odeny, 2006)
CZ682005	(AC) ₆	F: TGTATGTTCTGTTAGAGGCTTCC R: GCCCTTTTCACTTTTCTCA	56	200	-	+	(Odeny, 2006)
CZ682009	(TG) ₇	F: AGCCACTTAATAACCAAGCCTTTT R: GTGTATGCTTTACTTGCTTTCTTT	60	258	-	+	(Odeny, 2006)
CZ682011	(GT) ₇	F: AAATTCACCACCATGATCCAA R: TCTTCACTTCCGAGACACAAC	45	196	-	+	(Odeny, 2006)

⁽¹⁾ F - Forward sequence. ⁽²⁾ R - Reverse sequence. ⁽³⁾ T_a - Annealing temperature.

Table 2 - Information of *Cajanus cajan*, *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* genotypes evaluated with microsatellite markers.

Sample Code	⁽¹⁾ Genotype ID	Genetic Origin	Sample Code	Genotype ID	Genetic Origin	Sample Code	Genotype ID	Genetic Origin
1	G1m-95	⁽²⁾ BGC	29	G106	India	57	G151	India
2	G3	Brazilian Cultivar	30	G108-99	BGC	58	G154	Bangladesh
3	G05-94	BGC	31	G109	BGC	59	G154-95	BGC
4	G06-95	BGC	32	G112	India	60	G158	India
5	G8-95	BGC	33	G114	India	61	G165	India
6	G9m	BGC	34	G115	India	62	G166	India
7	G10-94	BGC	35	G116	India	63	G167-97	BGC
8	G17c-94	BGC	36	G118	BGC	64	G168	India
9	G18-95	BGC	37	G119	BGC	65	G168-99	BGC
10	G19m-95	BGC	38	G120	India	66	G169	India
11	G21-99	BGC	39	G121-99	BGC	67	G171	India
12	G27	India	40	G123	BGC	68	G174	India
13	G27-94	BGC	41	G124	India	69	G176	n.a.
14	G29b-94	BGC	42	G124-95	BGC	70	G184-97	BGC
15	G29m-94	BGC	43	G126	India	71	G186-98	BGC
16	G30	India	44	G127	BGC	72	G197	India
17	G39-94	BGC	45	G128	India	73	G198	India
18	G40-95	BGC	46	G131	India	74	N0 314	⁽³⁾ Brazilian - IZ
19	G47-94	BGC	47	G135	India	75	INPA	Amazônia
20	G48-95	BGC	48	G137	India	76	FAVA LARGA	Brazilian Cultivar
21	G57-95	BGC	49	G137-99	BGC	77	ANÃO	Brazilian Cultivar
22	G58	BGC	50	G138	BGC	78	CAL-143	⁽⁴⁾ <i>P. vulgaris</i> - IAC
23	G59-95	BGC	51	G141	India	79	IAC-UNA	<i>P. vulgaris</i> - IAC
24	G66-95	BGC	52	G142	India	80	BAT-93	<i>P. vulgaris</i> - IAC
25	G100	Bangladesh	53	G142-95	BGC	81	JALO-EEP558	<i>P. vulgaris</i> - IAC
26	G101	India	54	G148	India	82	FRADINHO	<i>V. unguiculata</i> - IAC
27	G101-97	BGC	55	G149	India			
28	G104	India	56	G149-99	BGC			

⁽¹⁾Genotype ID: Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual (UEPAE). ⁽²⁾BGC: EMBRAPA Cattle-Southeast.

⁽³⁾IZ: Institute of Animal Husbandry. ⁽⁴⁾IAC: Agronomic Institute of Campinas.

DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) amplifications and genotyping

Genomic DNA was extracted from freeze-dried leaf samples using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method with modifications (Faleiro et al., 2003). DNA samples were quantified by comparison with known quantities of λ phage DNA on a 1% agarose gel.

The polymerase chain reaction (PCR) was carried out in a total reaction volume of 25 μ L containing 0.5 ng of DNA template, 0.8 μ M of each forward and reverse primers, 100 μ M of each dNTP (MBI Fermentas), 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl and 0.5 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen). All PCR amplifications were performed in a PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA/USA) using the following conditions: 94°C for 1 min followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, specific annealing temperature for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 5 min. Amplification products were genotyped by electrophoresis on 6% denaturing polyacrylamide gels in 1X TBE buffer using a 10 bp ladder (Invitrogen) as a standard size. The DNA fragments were visualized by silver staining according to Creste et al. (2001).

Data analysis

The polymorphism information content (PIC) values were calculated for estimates of marker informativeness according to the equation of Botstein et al. (1980),

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2f_i^2 f_j^2$$

where f_i is the frequency of the i^{th} allele, f_j is the frequency of the j^{th} allele and the summation extends over n alleles. In order to compare marker efficiencies in varietal identification, the discriminating power (D) was estimated for each primer based on the formula ,

$$D_s = 1 - \sum_{j=1}^l p_j \frac{Np_j - 1}{N - 1},$$

where N is the number of individuals and p_j is the frequency of the j^{th} pattern (Tessier et al., 1999).

The observed heterozygosity (H_o) and the expected heterozygosity (H_e) were analyzed using the GDA software (Lewis and Zaykin, 2002). Genetic distance was calculated from microsatellite marker data using modified Roger's genetic distances. A genetic distance matrix was estimated using tools for genetic population analysis (TFPGA v 1.3) (Miller, 1997). Cluster analysis was performed using the neighbor-joining (NJ) method with the DARwin v. 5.0.157 software (Perrier and Jacquemond-Collet, 2006). The reliability of the generated dendrogram was also tested by bootstrap analysis using the BooD program with 1000 iterations (Coelho, 2002). The software STRUCTURE version 2.2 (Pritchard et al., 2000) was used to generate a Bayesian inference of populations structure. By this method, a model of K populations is assumed and samples are grouped in order to minimize linkage disequilibrium and to maximize conformity to Hardy-Weinberg equilibrium across all analyzed loci. As a preliminary step, analysis was performed a single time for each K value ranging from 2 to 20. Each run was performed using the admixture model and 1000 replicates for burn-in and 10000 replicates during analysis. The most probable number of K was calculated based on Evanno et al. (2005) using an *ad hoc* statistic ΔK , which represents the rate of change in log probability of the data between successive K values rather than the log probability of the data.

Results and Discussion

Microsatellite loci polymorphism and transferability

Of the 43 microsatellite markers used, 16 were polymorphic (**Table 3**). A total of 83 putative alleles were obtained from the 16 microsatellite markers. The number of alleles ranged from 2 to 12, with an average of 5.1 alleles per locus. Screening of 77 pigeonpea genotypes with these 16 markers indicated low polymorphism information content. The PIC values ranged from 0.11 to 0.80 with an average of 0.49. The D values ranged from 0.23 to 0.91 with an average of 0.58. The highest PIC and D values were found in locus CZ681938a which contains 8 alleles. The observed (H_O) and expected heterozygosity (H_E) values ranged from 0.01 to 0.53 (average 0.25) and 0.01 to 0.82 (average 0.47), respectively, indicating high heterozygote deficiency. Low genetic variability of the collections of pigeonpea was also reported by Faleiro (2005, 2006 and 2007). The percentage of polymorphic RADP markers was less than 30%. These markers were evaluated in 13, 15 and 18 genotypes of pigeonpea in different years (2005, 2006 and 2007, respectively). The low variability in these collections may be due to a narrow genetic base of the original germplasm collection or pre-selection of these genotypes based on agronomic characteristic, mainly related to the production of dry matter (Faleiro, 2005).

All polymorphic markers were tested for cross-amplification in *P. vulgaris* (CAL-143, IAC-UNA, BAT-93 and JALO-EEP558) and *V. unguiculata* (Fradinho) (**Table 4**). Thirteen microsatellite markers (CZ445540, CZ445530, AJ306901, AJ312887, AJ312891, AJ312892, AJ312893, AJ312894, AJ312895, CZ681930, CZ681938a, CZ681938b and CZ681983) amplified in at least one bean species.

Table 3 - Characteristics of pigeonpea microsatellite loci, including number of alleles, PIC, D, H_O and H_E values.

GenBank Accession no.	⁽¹⁾ Allele number	⁽²⁾ PIC	⁽³⁾ D	⁽⁴⁾ H _O	⁽⁵⁾ H _E
CZ445531	2	0.29	0.36	0.01	0.01
CZ445540	2	0.29	0.35	0.33	0.27
CZ445530	2	0.11	0.23	0.01	0.10
AJ306901	2	0.32	0.41	0.19	0.30
AJ312887	4	0.51	0.62	0.20	0.52
AJ312891	4	0.32	0.43	0.29	0.25
AJ312892	5	0.49	0.56	0.28	0.51
AJ312893	12	0.61	0.72	0.42	0.55
AJ312894	7	0.69	0.73	0.36	0.72
AJ312895	5	0.60	0.75	0.29	0.66
CZ681930	6	0.66	0.78	0.29	0.70
CZ681938a	8	0.80	0.91	0.53	0.82
CZ681938b	8	0.68	0.78	0.32	0.71
CZ682017a	8	0.74	0.82	0.21	0.77
CZ682017b	2	0.26	0.35	0.01	0.01
CZ681983	4	0.48	0.57	0.23	0.54
Average	5.1	0.49	0.58	0.25	0.47

⁽¹⁾Number of alleles in *Cajanus cajan*. ⁽²⁾PIC - Polymorphism information content. ⁽³⁾D - Discriminating power. ⁽⁴⁾H_O - Observed heterozygosity. ⁽⁵⁾H_E - Expected heterozygosity.

Six markers (CZ445530, CZ681983, AJ312891, AJ312893, AJ312895 and CZ681930) were successfully amplified in *P. vulgaris* and *V. unguiculata*, indicating very good transferability. Non-specific amplification of the loci CZ445531, CZ682017a and CZ682017b was observed between species. Eight markers (AJ306901, AJ312891, AJ312892, AJ312893, AJ312894, CZ681930, CZ681938a and CZ681938b) revealed polymorphism between the *Phaseolus* and *Vigna* genotypes. These results suggest considerable sequence conservation within the primer regions flanking microsatellite loci. The high level of cross-species amplification and the polymorphic alleles observed suggest that they can be used for inter- and intraspecific studies. This level of amplification efficiency is similar to that observed by Gepts et al. (2008) and Gupta et al. (2008), where chickpea microsatellite markers were used to amplify DNA from other related legume species such as *Vigna* and *Phaseolus*.

Molecular analysis of pigeonpea germplasm

STRUCTURE analysis coupled with computation of Evanno ΔK statistics suggested a primary partition of pigeonpea and genotypes of the *P. vulgaris* and *V. unguiculata* into four clusters ($K=4$). STRUCTURE analysis can help to identify clusters of genetically similar accessions. Thus, the subpopulations from STRUCTURE analysis were grouped into four clusters (C): C1, C2, C3, and C4 (**Figure 1a**). Cluster C1 is comprised of the 28 pigeonpea genotypes, which were collected in India (G141, G142, G148, G149, G151, G165, G171, G174, G198, G176, NO 314, G168, G149, G166, G197, G158, G137, G126, G119 and G118), Bangladesh (G154) and the Brazilian inbred lines (G154-95, G142-95, G149-99, G184-97,

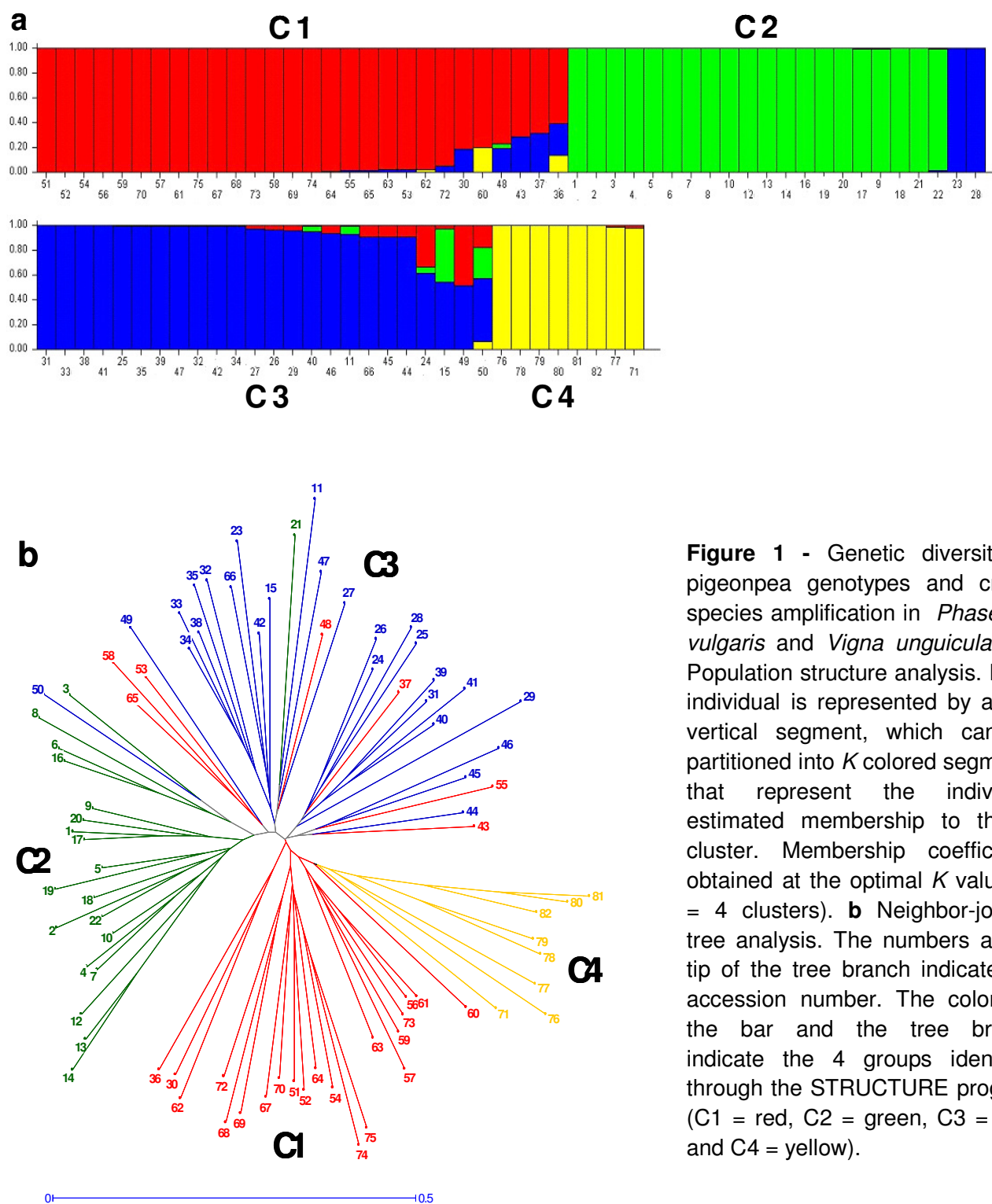
Table 4 - Characteristics of pigeonpea-specific microsatellite markers transferable to *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata*.

GenBank Accession no.	<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>			
	Fradinho	CAL-143	IAC-UNA	BAT-93	JALO-EEP558
CZ445531	-	-	-	-	-
CZ445540	208/208	208/208	208/208	208/208	208/208
CZ445530	208/208	208/208	208/208	208/208	208/208
AJ306901	200/200	198/198	186/200	200/200	200/200
AJ312887	160/160	-	160/160	160/160	160/160
AJ312891	180/206	206/206	206/206	206/206	206/206
AJ312892	-	154/154	154/156	154/156	-
AJ312893	130/130	128/128	128/146	128/146	130/130
AJ312894	166/166	-	166/166	166/166	166/168
AJ312895	242/242	242/242	242/242	242/242	242/242
CZ681930	164/164	166/166	166/166	172/172	164/164
CZ681938a	252/252	260/260	252/252	252/252	-
CZ681938b	220/228	228/228	228/228	224/228	-
CZ682017a	-	-	-	-	-
CZ682017b	-	-	-	-	-
CZ681983	73/73	73/73	75/75	75/75	73/73

Alleles observed for each locus are displayed in base pairs (bp). (-) No amplification.

G168-99, G167-97 and G108-99). Cluster C2 include 18 pigeonpea Brazilian inbred lines obtained from the breeding program of Embrapa Cattle-Southeast, São Carlos/SP, Brazil (G1m-95, G05-94, G06-95, G8-95, G9m, G10-94, G17c-94, G19m-95, G27-94, G29b-94, G47-94, G48-95, G39-94, G18-95, G40-94, G57-95 and G58) the cultivar G3-Guandu Mandarin and 2 pigeonpea genotypes from India (G30 and G27). These Brazilian inbred lines were selected for use in crop-livestock integrated systems and reclaiming degraded pastures. The field data confirmed that these genotypes are closely related. Cluster C3 consisted of 26 pigeonpea, which were collected in India (104, G114, G120, G124, G116, G135, G112, G115, G101, G106, G131, G169 and G128), Bangladesh (G100) and the Brazilian inbred lines (G124-95, G121-99, G101-97, G21-99, G137-99, G109, G123, G127, G138, G59-95, G66-95 and G29m-94). Clusters C1 and C3 had mixed origins (India, Bangladesh and Brazilian inbred lines). These results indicate the presence of different gene pools among these clusters. Cluster C4 contained two pigeonpea cultivars (Fava Larga and Anão), the inbred line G186-98 and the four varieties of *P. vulgaris* (CAL-143, IAC-UNA, BAT-93 and JALO-EEP558) and one *V. unguiculata* cultivar (Fradinho).

The phylogenetic NJ tree, which was constructed based on the modified Roger's genetic distance matrix, was colored according to STRUCTURE results (**Figure 1b**). Furthermore, a strong tendency of correspondence between the Bayesian clusters in the NJ tree was observed. Clusters C1 and C3 comprised the pigeonpea genotypes from India, Bangladesh and some Brazilian inbred lines. Cluster C1 include 18 Brazilian inbred lines. Cluster C4 includes the 2 cultivars, the G186-98 Brazilian inbred line of the pigeonpea and all genotypes of *Phaseolus* and *Vigna*. Genotypes of pigeonpea which were self-fertilized (by controlled pollination, and subsequently selected in order to obtain inbred lines) grouped together (G27 and G27-94, G168 and G168-99, G154 and G154-95, G149 and G149-99, G142 and G142-95, G124 and G124-95, G101 and G101-97), except G137 and G137-99. The pigeonpea genotype G137-99



presented a heterozygote profile. Although pigeonpea is considered an autogamous species, cross-pollination can occur in the presence of pollinators, ranging from 3% to 26%. Consequently, a percentage of heterozygous strains can be observed, even if it is a low percentage (Reddy et al., 2004). The bootstrap value of the center point of the group (82.0%) indicates the robustness of the genetic relationship depicted by the dendrogram. The genetic distances among the 77 genotypes of pigeonpea ranged from 0.09 to 0.62 with an average of 0.39. The lower at genetic distances were found among the genotypes of cluster C2, such as G06-95 and G9m (0.09). These two genotypes have similar stem color (green) and thickness (10mm) (Godoy et al., 2004; Provazi et al., 2007). The largest genetic distances were found among the genotypes G1m-95 (cluster 2) and G158 (0.62) (cluster 1). Genetic distances between clusters C1 and C3 were higher than the C2 cluster revealing moderate diversity among these genotypes. The cultivars Fava Larga and Anão were grouped in a distinct cluster (C4) with 0.42 genetic distance between them. The cluster analysis based on modified Roger's genetic distances shows the narrowing of the genetic basis among genotypes.

Knowledge of the genetic diversity in germplasm collections is fundamental for further breeding programs to fully exploit existing diversity by genotypes selection. As evident from the clustering of genotypes, it is clear that these microsatellite markers are efficient. The pigeonpea is an important crop of the Phaseoleae tribe, which has limited genomic resources. As microsatellite markers are highly polymorphic, reproducible, co-dominant in nature and distributed throughout the genome, they have become the ideal marker system for genetic analysis and breeding applications.

Conclusions

The microsatellite markers revealed low genetic diversity among genotypes of pigeonpea, especially between the Brazilian inbred lines selected for use in crop-livestock integrated systems and reclaiming degraded pastures. The modified Roger's genetic distances revealed the presence of genotypes genetically close. These results show the need to broaden the genetic variability of the collection in order to increase efficiency during the selection and breeding programs of pigeonpea.

Pigeonpea-specific microsatellite markers were transferable to *P. vulgaris* and *V. unguiculata*. The transferable loci exhibited polymorphism among some genotypes. Transferability studies of microsatellite loci from other cultures can be highly advantageous.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support (Project 05/51010-0) and for a graduate fellowship to Sousa, A. C. B. (06/52953-8) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a research fellowship awarded to Souza, A. P.

References

Burns, M.J.; Edwards, K.J.; Newbury, H.J.; Ford-Lloyd, B.V.; Baggott, C.D. 2001. Development of simple sequence repeat (SSR) markers for the assessment of gene flow and genetic diversity in pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Molecular Ecology Notes* 1: 283-285.

Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.

Coelho, A.S.G. BooD: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de *bootstrap* com número variável de marcadores. Computer software distributed by the author. Laboratório de Genética Vegetal, Instituto de Ciências biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil. [In Portuguese]. 2002.

Creste, S.; Tulmann Neto, A.; Figueira, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299-306.

Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 18: 2611-2620.

Faleiro, F.G.; Faleiro, A.S.G.; Cordeiro, M.C.R. 2003. Metodologia para operar a extração de DNA de espécies nativas de Cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados. (Comunicado Técnico No. 92) 62.

Faleiro, F.G.; Fernandes, F.D.; Amabile, R.F. 2005. Variabilidade genética de uma coleção de trabalho de guandu (*Cajanus cajan*) com base em marcadores moleculares. In: 42^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Goiânia.

Faleiro, F.G.; Fernandes, F.D.; Barcellos, A.O. 2006. Análise da variabilidade genética molecular de uma coleção de trabalho de guandu (*Cajanus cajan*) como apoio na seleção de acessos para testes agronômicos em sistemas de integração lavoura-pecuária e recuperação de pastagens degradadas. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 43, 2006, João Pessoa. Anais. João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia (CD-ROM).

Faleiro, F.G.; Amabili, R.F.; Fernandes, F.D.; Bellon, G.; Junqueira, K.P.; Godoy, R. 2007. Variabilidade genética de acessos de guandu (*Cajanus cajan*) do programa de melhoramento genético realizado na Embrapa Cerrados com base em marcadores RAPD. In: 44^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Jaboticabal. Anais.

Gaitàn-Solís, E.; Duque, M.C.; Edwards, K.J.; Tohme, J. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. Crop Science 42: 2128-2136.

Gepts, P.; Francisco, J.L.A.; Everaldo, B.; Matthew, W.B.; Rosana, B.; William, B.; Incoronata, G.; Gina, H.; James, K.; Patricia, L.; Phillip, M.; Maeli, M.; Peter, P.; Andrea, P.H.; Timothy, P.; Federico, S.; Francesa, S.; Kangfu, Y. 2008. Genomics of *Phaseolus* Beans, a major source of

dietary protein and micro-nutrients in the tropics. In: P.H. Moore and R. Ming (eds), Genomics of Tropical Crop Plants. Springer, NewYork, NY.

Gupta, S.K.; Souframanien, J.; Gopakrishna, T. 2008. Construction of a genetic linkage map of black gram, *Vigna mungo* (L.) Hepper, based on molecular markers and comparative studies. Genome 51: 628-637.

Godoy, R.; Fushita, A.T.; Dübbern De Souza, F.H. 2004. Caracterização de onze linhagens puras de guandu selecionadas em São Carlos, SP. Revista Brasileira de Zootecnia 33: 2206-2213.

Godoy, R.; Batista, L.A.R.; Negreiros, G.F. 1994. Avaliação agronômica e seleção de germoplasma de guandu forrageiro (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). Revista Brasileira de Zootecnia 23: 742-749.

Godoy, R.; Batista, L.A.R.; Negreiros, G.F. 1995. Avaliação agronômica de guandu forrageiro (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). Revista Brasileira de Zootecnia 23: 730-742.

Godoy, R.; Batista, L.A.R.; Negreiros, G.F. 1997. Avaliação agronômica e seleção de germoplasma de guandu forrageiro (*Cajanus cajan* (L.) Millsp proveniente da Índia. Revista Brasileira de Zootecnia 26: 447-453.

Lewis, P.; Zaykin, D. 2002. Genetic Data Analysis (GDA): Computer Program for the Analysis of Allelic Data (Software), version 1.1 (d12). <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/>.

Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

Odeny, D.A. Microsatellite Development and Application in Pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millisp.). 2006. 95f. Tese (Doutorado). Universität Bonn, Alemanha.

Odeny, D.A.; Ayashree, B.; Ferguson, M.; Hoisington, D.; Crouch, J.; Gebhardt. 2007. Development, characterization and utilization of microsatellite markers in pigeonpea. Plant Breeding 126: 130-136.

Perrier, X.; Jacquemoud-Collet, J.P. DARwin software. Available from <http://www.darwin.cirad.fr/darwin>. 2006.

Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.

Provazi, M.; Camargo, L.H.G.; Santos, P.M.; Godoy, R. 2007. Descrição botânica de linhagens puras selecionadas de guandu. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36: 328-334.

Reddy, L.J.; Chandra, S.; Pooni, H.; Brammel, P.J. 2004. Rate of outcrossing in pigeonpea under intercropped conditions. In: Bramel PJ (eds) *Assessing the risk of losses in biodiversity in traditional cropping systems: a case study of Pigeonpea in Andhra Pradesh*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India.

Reddy, L.J.; Upadhyaya, H.D.; Gorda, C.L.L.; Sube, S. 2005. Development of core collection in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh] using geographic and qualitative morphological descriptors. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 1049-1056.

Tessier, C.; David, J.; Boursiquot, P.; Charrieir, A.J.M. 1999. Optimizations of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 171-177.

Varshney, R.K.; Graner, A.; Sorrells, M.E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23: 48-55.

CAPÍTULO IV

Microsatellite markers in tropical legume (*Centrosema pubescens* Benth): development, characterization, and cross-species amplification in *Centrosema* sp.

**A. C. B. Sousa¹ • M. A. Carvalho² • L. R. Boaventura¹ • D. A. Sforça¹ • T. Campos¹ • L.
Jungmann³ • M. I. Zucchi⁴ • L. Jank³ • A. P. Souza^{1,5}**

¹ University of Campinas (UNICAMP), Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), CP 6010, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

² Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Cerrados, BR 020, Km 18. Planaltina – DF, CEP 73310-970, Brazil.

³ Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Beef Cattle, Forage Breeding Dept, CP 154, Campo Grande – MS, CEP 79002-970, Brazil.

⁴ Agronomic Institute of Campinas, Pólo Apta Centro Sul – Rod. SP 127 km 30, Piracicaba – SP, CP 28, CEP 13400-970, Brazil.

⁵ University of Campinas (UNICAMP), Biology Institute, Plant Biology Dept (DBV), CP6109, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

Keywords: Tropical legume, cross-amplification, molecular markers, genetic diversity,
germplasm conservation.

***O trabalho foi publicado pela revista *Conservation Genetics Resources* (2009) 1:
347-352. DOI 10.1007/s12686-009-9080-1.**

Abstract

Centrosema pubescens Benth. is a forage legume widespread in tropical America. Twenty-six polymorphic microsatellite markers were isolated and characterized in 15 genotypes of *C. pubescens* from the Cerrados Research Center Germplasm Bank of the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA). The number of alleles observed for each locus ranged from 2 to 5, with an average of 3 alleles per locus. The polymorphism information content (PIC) varied from 0.39 to 0.86 (average 0.57) and the discriminating power (D) ranged from 0.45 to 0.98 (average 0.68). The observed heterozygosity (H_O) and the expected heterozygosity (H_E) were 0.01-0.81 and 0.10-0.86, respectively. A cross-amplification test in 11 *Centrosema* species suggested potential transferability of these microsatellites. The data indicated that the polymorphic microsatellite markers developed in this work should be useful for assessing genetic diversity in further breeding programs and germplasm conservation.

The genus *Centrosema* comprises 34 species native to the New World tropics and subtropics (Williams and Clements 1990). Many *Centrosema* species are natural components of pastures and have nutritive values equal to or higher than those of other tropical pasture legumes. Several *Centrosema* species occur naturally in semiarid tropics, and some are tolerant to acid and high aluminum-saturated soils (Schultze-Kraft et al. 1990). Among those species, *Centrosema pubescens* Benth. (*C. molle* Mart. Ex Benth.) has attained a major economic importance as a cut-and-carry forage system in association with grass-legume for pasturelands, protein banks and cover crops (Teitzel et al. 1990). *C. pubescens* chromosome number is $2n=2x=20$ (Novaes and Penteado 1993) while $2n=2x=18$ and 22 have been reported in other species of this genus. *Centrosema* is assumed to be predominantly a self-pollinating genus, although insect cross-pollination has been reported in *C. brasilianum*, with outcrossing rates from 31.2 to 53.5% (Maass and Torres 1992).

In addition to currently cultivated species, the genus *Centrosema* includes other promising species to be used as pasture crops. However, genetic knowledge in *Centrosema* species is still limited, and that has restricted their domestication and exploitation in breeding programs. In this study, we developed microsatellite markers for *C. pubescens*, which are suitable to investigate the genetic diversity in this species. Additionally, the microsatellites were tested for cross-amplifications in 11 other *Centrosema* species.

Genomic DNA samples were extracted from fresh leaves of *C. pubescens* using the cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Doyle & Doyle, 1990). A microsatellite-enriched library was constructed according to the protocol described by Billotte et al. (1999). Genomic DNA samples were digested with *RsaI* restriction enzyme, and the resulting DNA fragments were linked to *RsaI* adapters. The library was enriched for dinucleotide sequences using (CT)₈ and (GT)₈ biotinylated microsatellite primers with labeled probes that were bound to Streptavidine MagneShere Paramagnetic Particles as described by the manufacturer.

Selected fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primer sequences complementary to the adapters and then ligated into a pGEM-T vector (Promega). Plasmids were transformed into competent XL-1 Blue *Escherichia coli* cells. Transformed cells were cultivated on agar medium containing 100 µg mL⁻¹ ampicillin, 50 µg mL⁻¹ X-galactosidase and Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Single white colonies were transferred onto microplates for long-term storage at -80°C. A total of 192 positive clones were bi-directionally sequenced in an automated sequencer ABI PRISM 377 (PerkinElmer, Applied Biosystems) using T7 and SP6 primers and the v3.1 Big Dye terminator 3.1 kit (Applied Biosystems). Sequences were assembled and edited using Seqman (DNASTar). The simple sequence repeat identification tool (SSRIT) was used to identify SSRs present in all non-redundant sequences (Temnykh et al. 2001). Eighty-two clones contained microsatellite sequences with more than five repeats and flanking regions suitable for primer design. The Primer Select (DNASTar) software was used to design 36 primer pairs.

A total of 15 genotypes of *C. pubescens* (Cerrados Research Center Germplasm Bank of the Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA) were used to evaluate SSR polymorphisms. PCR amplifications were performed in 25 µL total volume containing 10 ng of genomic DNA, 0.8 µM forward and reverse primers, 100 µM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, and 0.5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). A PTC – 200 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA/USA) was used for PCR amplifications using a touchdown cycling program according to Don et al. (1991). Amplification products were analyzed by electrophoresis on a) 3% agarose gels containing 0.1 mg ethidium bromide/ml in 1X TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.0), and b) 6% denaturing polyacrylamide gels in 1X TBE buffer, using the 10 bp DNA Ladder (Invitrogen) as size standard. Afterwards, gels were silver stained according to Creste et al. (2001).

Of the 36 developed microsatellites, 26 were polymorphic and the number of alleles per locus ranged from 2 to 5, with an average of 3 alleles per locus (**Table 1**). Polymorphism information content (PIC) was calculated in order to estimate marker informativeness (Botstein et al. 1980). PIC values ranged from 0.39 to 0.86, with an average of 0.57. The highest PIC value (0.86) was found in the CS21 locus, which presented the highest number of alleles (5). For the purpose of comparing the efficiency of markers in varietal identification, we estimated the discriminating power (D) of each primer (Tessier et al. 1999). The D values ranged from 0.45 to 0.98, with an average of 0.68. The descriptive statistics and the test for Hardy-Weinberg equilibrium were performed using tools for genetic population analysis (TFPGA) (Miller 1997). The observed heterozygosity (H_O) and the expected heterozygosity (H_E) were 0.01-0.81 and 0.10-0.86, respectively. Twelve loci showed a significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) after Bonferroni correction ($P: (5\%) \leq 0.0036$). The presence of null alleles was tested using Micro-checker ver. 2.2.3 (<http://www.microchecker.hull.ac.uk/>). The loci CS21, CS36, CS81 and CS154 were significant for the presence of a null allele. In this study, no linkage disequilibrium was detected among all loci, using the Popgene 1.32 software (Yeh and Boyle, 1998). All polymorphic markers were tested for cross-amplification in 11 different *Centrosema* species. Nineteen microsatellite loci were amplified for all the different species. Two loci (CS45 and CS71) were successfully amplified in all species. Non-specific amplification of CS53, CS68, CS98, CS99, CS125, CS127 and CS154 was observed in some *Centrosema* species (**Table 2**). The data on the developed *Centrosema* microsatellites indicated high potential for their use in comparative and phylogenetic studies.

The cross-species amplification data suggested that microsatellites developed for *C. pubescens* are potentially useful for genetic diversity studies of this species and of other species in the genus. In conservation programs, they should be useful for characterizing natural

populations and germplasm collections, as well as to determine the degree of relatedness among individuals or groups of accessions.

Table 1. Characteristics of the twenty-six microsatellite markers of *Centrosema pubescens* Benth.

SSR locus	GenBank Accession no.	Repeat motif	TD (°C)	Primer sequences (5' - 3')	A	Size range(bp)	PIC	D	H _O	H _E	P-HWE
CS10	GQ293042	(GT)8	60 - 45	F: 5'ATACTGTTTTCTCATTG3' R: 5'AACCTGTCTCTTCACTG3'	3	305 - 320	0.47	0.58	0.37	0.65	0.000*
CS20	GQ293043	(CA)3CG(CA)5	60 - 45	F: 5ACACCATACATGCGAAAGAT3' R: 5' CCATATGAAAATTGTTGTGA3'	3	98 - 107	0.71	0.87	0.42	0.55	1.000 ^{NS}
CS21	GQ293044	(AG)15	60 - 45	F: 5' TTCACATAAAATCAAACCAA3' R: 5'AACCACATTCTTCTATCCTT3'	5 ^a	207 - 236	0.86	0.98	0.81	0.86	0.679 ^{NS}
CS35	GQ293045	(CA)6	60 - 45	F:5'GCATATAGTAAATCTGTTGTGG 3' R:5'AGAGTGAAAGAAAAGAAAAG3'	3	231 - 242	0.76	0.82	0.29	0.70	0.000*
CS36	GQ293046	(CA)5	60 - 45	F:5'TTGGTTATTAATTTGGTGAAG3' R:5'TTAAAAATCTAGCAGGAAAGTT3'	2 ^a	137 - 146	0.44	0.51	0.08	0.37	0.558 ^{NS}
CS37	GQ293047	(GA)2GT(GA)12	60 - 45	F:5'TCAAACTATCTACATCCA3' R:5'TCTAATAACAACGCAATAA 3'	2	127 - 150	0.41	0.52	0.29	0.66	0.328 ^{NS}
CS39	GQ293048	(GT)7AT(GA)9AA(GA)4	60 - 45	F:5'ACACAACAACATAAAAGTA3' R:5'TATGGAGTAAGACAAACAA3'	2	214 - 242	0.39	0.47	0.01	0.10	0.032 ^{NS}
CS45	GQ293049	(CA)5	60 - 45	F:5'CAGAAATGCAAATGCTACAAAA3' R:5'GTGGGCCAGAATCAGGAA3'	2	196 - 205	0.45	0.53	0.20	0.52	0.587 ^{NS}
CS53	GQ293050	(GT)7	60 - 45	F:5'TGCAAAAAGAGAAATAAAATGA3' R:5'ATGACCAAAAGTGAGTGAGAAT3'	3	243 - 256	0.55	0.63	0.53	0.82	0.326 ^{NS}
CS61	GQ293051	(CA)7	60 - 45	F:5'TTTTTATGCTTCCTGTTCA3' R:5'TTAAATTTCAAAAGACCACTG3'	3	196 - 209	0.76	0.81	0.32	0.71	1.000 ^{NS}
CS62	GQ293052	(CT)2(GT)6	60 - 45	F:5'CTGATGTGGATGATGAGG3' R:5'TTCTGACACTTATAAAAACAAC3'	2	192 - 203	0.42	0.55	0.21	0.77	1.000 ^{NS}
CS68	GQ293053	(GT)5	60 - 45	F:5'TGGGTTAATTCAATGTAGCAG3' R:5'AAGGTCGAATCTCAGCAAAAT3'	2	260 - 271	0.50	0.63	0.19	0.30	0.001*
CS70	GQ293054	(CA)10	60 - 45	F: 5'CCATACCCTCACCAATCC3' R: 5'CCATCACAAGTTATACCATCAG3'	4	167 - 186	0.79	0.86	0.36	0.72	0.002*
CS71	GQ293055	(CT)9	60 - 45	F: 5'ATACCTGATGAAATGTGGAT3' R: 5'AATAATTTCTGCAGTGTGTTG3'	2	279 - 296	0.49	0.63	0.28	0.51	0.000*
CS81	GQ293056	(AG)6GG(AG)7	60 - 45	F:5'CATGGGTCTTGGGTTTGG3' R:5'AATAGGGTCTGCATCTGTTCA3'	2 ^a	102 - 129	0.41	0.56	0.23	0.23	0.058 ^{NS}
CS86	GQ293057	(AC)5	60 - 45	F:5'ACTTGCTGCACTTGTACC3' R:5'GTCCCTTTCTTTTCGTTATCAC3'	2	365 - 376	0.52	0.68	0.05	0.60	0.000*

Table 1. Continued.

SSR locus	GenBank Accession no.	Repeat motif	TD (°C)	Primer sequences (5' - 3')	A	Size range(bp)	PIC	D	H _O	H _E	P-HWE
CS89	GQ293058	(GT)4...(GT)5	60 – 45	F:5'AATTTCTTCACTTTTGTTC3' R:5'AATTTCTTTCTTTTCACTCA3'	3	204 – 213	0.58	0.69	0.05	0.72	0.001*
CS98	GQ293059	(CA)7	60 – 45	F:5'ACAAAGCAGGTGATGGAAGTCT3' R:5'TCTCTGTTGCTCTGGACTTACTC3'	3	120 – 133	0.79	0.85	0.55	0.71	0.662 ^{NS}
CS99	GQ293060	(GA)9	60 – 45	F:5'TTCATACTAATACCCCTTTTCT3' R:5'CTCCACTTCAACCACTCA3'	2	321 – 340	0.41	0.55	0.18	0.40	0.002*
CS120	GQ293061	(GT)11	60 – 45	F:5'TTTGAAGTGACCAAGGAGGATTT3' R:5'AAGACCATGTGGAAGAGGATTG3'	4	435 – 458	0.81	0.92	0.06	0.81	0.000*
CS125	GQ293062	(GT)6	60 – 45	F:5'GATTACAGAGTTGGGATTTT3' R:5'CCATTCTCTTCACTTACC3'	2	117 – 130	0.61	0.77	0.21	0.39	1.000 ^{NS}
CS127	GQ293063	(AC)7	60 – 45	F:5'GGAAGGGAAGTCAAGAAAGAAA3' R:5'GTGATTATAGGGGGAACAGGAG3'	2	102 – 115	0.33	0.45	0.33	0.46	0.369 ^{NS}
CS128	GQ293064	(GT)8	60 – 45	F:5'CACTTGCCCTTCTTGTATC3' R:5'GCTGTGCGTATGTTGTGT3'	2	268 – 283	0.42	0.57	0.18	0.40	0.000*
CS154	GQ293065	(GA)13	60 – 45	F:5'CCCAGTCAGTTGAGTTGTAG3' R:5'AAGGTATCCATGGTTTATCT3'	4 ^a	120 – 145	0.70	0.83	0.06	0.79	0.289 ^{NS}
CS156	GQ293066	(GA)9	60 – 45	F:5'ATAGAAAAAAGAAAGAAA3' R:5'ACAAGCATAAATGATAAGTG3'	2	135 – 152	0.58	0.71	0.29	0.52	0.003*
CS102	GQ293067	(CA)6	60 – 45	F:5'TTCATGCATGCACCTTCAAT3' R:5'CCCTTCCCATACGTTACTTACT3'	4	289 – 300	0.82	0.96	0.21	0.83	0.000*

F, forward sequence; R, reverse sequence;

TD, *touchdown PCR* with temperatures ranging from 60 °C to 45 °C;

A, total number of alleles per locus;

a, the presence of a null allele was detected by Micro-checker ver. 2.2.3 (<http://www.microchecker.hull.ac.uk/>);

PIC, polymorphism information content;

D, discriminating power;

H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity;

P-HWE, *P* values for the HWE test, significance threshold adjusted using Bonferroni correction: $P(P\%) \leq 0.0036$;

^{NS}, not significant; *, significant.

Table 2. Cross-species amplification of *Centrosema pubescens* Benth microsatellite markers in 11 *Centrosema* species.

	Microsatellite loci													
<i>Centrosema</i> Species	CS10	CS20	CS21	CS35	CS36	CS37	CS39	CS45	CS53	CS61	CS62	CS68	CS70	CS71
<i>C. pascuarum</i> *	+	−	−	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+
<i>C. brachypodium</i> *	+	−	−	−	+	−	−	+	−	+	−	−	+	+
<i>C. brasilianum</i> *	−	−	+	−	+	−	−	+	−	−	−	−	+	+
<i>C. rotundifolium</i> *	−	−	+	−	+	−	−	+	−	−	−	−	+	+
<i>C. acutifolium</i> *	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+
<i>C. terezae</i> ¹ *	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+	+	−	−	+
<i>C. arenarium</i> *	+	+	−	+	−	+	+	+	−	+	+	−	−	+
<i>C. tetragonolobum</i> *	−	−	−	+	−	−	−	+	−	−	+	−	+	+
<i>C. macrocarpum</i> *	−	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+
<i>C. plumieri</i> *	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	+
<i>C. sagittatum</i> *	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−	+

	Microsatellite loci													
<i>Centrosema</i> Species	CS81	CS86	CS89	CS98	CS99	CS120	CS125	CS127	CS128	CS154	CS156	CS102	n	
<i>C. pascuarum</i> *	+	−	+	−	−	+	−	−	+	−	+	−	3	
<i>C. brachypodium</i> *	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−	3	
<i>C. brasilianum</i> *	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	+	−	3	
<i>C. rotundifolium</i> *	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	3	
<i>C. acutifolium</i> *	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	3	
<i>C. terezae</i> ¹ *	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	1	
<i>C. arenarium</i> *	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	2	
<i>C. tetragonolobum</i> *	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	2	
<i>C. macrocarpum</i> *	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	3	
<i>C. plumieri</i> *	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	1	
<i>C. sagittatum</i> *	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	1	

¹ nomen nudum (Not described species);

* PCR, product amplified using touchdown PCR (temperature range provide in Table 1);

+, successful amplification; -, unsuccessful amplification;

n, number of individuals tested for amplification.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support (Project 05/51010-0) and for a graduate fellowship to Sousa, A. C. B. (06/52953-8) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a research fellowship awarded to Souza, A. P.

References

Billotte N, Lagoda PJR, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.

Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19:299-306.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, and Mattick JS (1991): "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008.

Maass BL and Torres AM (1992). Outcrossing in the tropical forage legume *Centrosema brasilianum* (L) Benth. Book of Poster Abstracts XIIIth Eucarpia Congress. Angers, France 465-466.

Miller MP (1997) Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

Novaes IM and Penteado MIO (1993). Chromosomic observations in *Centrosema*. Ver. Brazil Genet 16:441-447.

Schultze-Kraft R and Clements RJ (1990). Biology, agronomy, and utilization. Cali, Colombia: CIAT publication no. 92.

Teitzel JK, Cameron DG, Anning P and Stockwell TG (1990) Regional experience with *Centrosema*: Australia. In: Schultze-Kraft R and Clements RJ (eds) *Centrosema*: Biology, Agronomy and Utilization. CIAT publication. Cali, Columbia. pp.517-541.

Tessier C, David J, This P, Boursiquot JM, Charrier A (1999). Optimizations of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. Theoretical and Applied Genetics, 98:171-177.

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Catinhour S, McCouch S (2001) Computational and Experimental Analysis of Microsatellites in Rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, Length Variation, Transposon Associations, and Genetic Marker Potential. *Genome* 11:1441-1452.

Yeh FC, Rong-Cai Y, Boyle T (1998) POPGENE version 1.31. Edmonton, Alberta, Canada: University of Alberta, Center for International Forestry Research.

Williams RJ and Clements RJ (1990) Taxonomy of *Centrosema*. In: Schultze-Kraft R and Clements RJ (eds) *Centrosema: biology, Agronomy, and Utilization*. (Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT): Cali, Columbia. pp. 1-27.

CAPÍTULO V

Transferability of microsatellite markers between *Centrosema* species and the mating system in *Centrosema pubescens* Benth

A. C. B. Sousa¹ • M. A. Carvalho² • A. K. B. Ramos² • T. Campos¹ • D. A. Sforça¹ • M. I. Zucchi³ • L. Jank⁴ • A. P. Souza^{1,5}

¹ University of Campinas (UNICAMP), Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), CP 6010, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

² Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Cerrados, BR 020, Km 18. Planaltina – DF, CEP 73310-970, Brazil.

³ Agronomic Institute of Campinas, Pólo Apta Centro Sul – Rod. SP 127 km 30, Piracicaba – SP, CP 28, CEP 13400-970, Brazil.

⁴ Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Beef Cattle, Forage Breeding Dept, CP 154, Campo Grande – MS, CEP 79002-970, Brazil.

⁵ University of Campinas (UNICAMP), Biology Institute, Plant Biology Dept (DBV), CP6109, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

Keywords: Tropical legume, microsatellites, transferability, mating system, autogamy.

***O trabalho será submetido à revista *Hereditas*.**

Abstract

Microsatellite markers are highly informative and widely used in genetic studies. Currently, only 26 microsatellite markers are available for *Centrosema pubescens*. In this study, we evaluated the transferability of these 26 microsatellite loci across 11 different *Centrosema* species and estimated the outcrossing rate in *C. pubescens*. Nineteen of the 26 tested microsatellites (78%) were successfully transferable across the *Centrosema* species. The transferable microsatellite loci exhibit polymorphism in *Centrosema*, with an average of 7.5 alleles per locus. The polymorphism information content and discriminating power values calculated ranged from 0.22 to 0.89 (average 0.64) and 0.47 to 0.99 (average 0.77), respectively. A model-based Bayesian approach implemented in the software STRUCTURE was used to cluster the accessions. A dendrogram was constructed based on the modified Roger's genetic distances using a neighbor-joining method (NJ). A total of three clusters were assembled to demonstrate the genetic relationships between *Centrosema* species. Six microsatellites were used to characterize the mating system in *C. pubescens*. The outcrossing rate was estimated in open-pollinated populations of 10 progenies consisting of 20 genotypes each. The multilocus outcrossing rate (t_m) was 0.269 (27%), suggesting a mixed mating system with a predominance of autogamy. The single locus outcrossing rate (t_s) was 0.129 (13%), and the difference ($t_m - t_s$) was 0.040, indicating that only 4% of outcrossing occurs in related individuals. The paternity correlation (r_p) was 0.139, suggesting that there is a low probability of finding full sibs in the progeny. The transferable microsatellite markers identified here should be useful for exploiting the genetic resources of *Centrosema*.

Introduction

The genus *Centrosema* (DC.) Benth. belongs to the family *Fabaceae* (alt. *Leguminosae*), subfamily *Faboideae* and tribe *Phaseoleae*. The genus comprises 34 species (Williams and Clements 1990) that are native to Central and South America. Several *Centrosema* species occur naturally in Brazil, where wide genetic diversity is found (Schultze-Kraft and Clements 1990). *Centrosema* includes species that can adapt to diverse habitats, such as the dry tropics, high-altitude tropics, subtropics, poorly drained and seasonally flooded areas, and acidic, low-fertility soils (Keller-Grein et al. 2000). As such, *Centrosema* has been agronomically evaluated in Brazil (Novaes et al. 1994; Fariñas et al. 1997; Borges, 2006), Nigeria (Nworgu and Fasogbon, 2007; Odeyinka et al. 2008), Columbia (Grof, 1982; Keller-Grein et al. 2000) Australia (Schultze-Kraft et al. 1997), Asia (Humphreys et al. 1990) and Peru (Reategui et al. 1985). Of the promising fodder crop species of *Centrosema*, three are of interest in the tropical and subtropical areas of America: *C. pubescens* (*Centrosema molle* Mart. Ex Benth), *C. acutifolium* and *C. brasilianum*. The chromosome number for these three species is $2n=2x=22$ (Novaes and Penteado 1993) while $2n=2x=18$ and 20 have been reported in other species of this genus (Battistin and Vargas 1989; Clements et al. 1983; Miles et al. 1990).

In addition to the currently cultivated species, the genus *Centrosema* includes other promising species that may be used as pasture crops. However, genetic knowledge in *Centrosema* is still limited, and that has restricted their domestication and exploitation in breeding programs. Advancing knowledge in this area will require the application of genomic tools, such as molecular markers. In *C. pubescens*, only twenty-six polymorphic microsatellite markers have been reported (Sousa et al. 2009).

Microsatellite markers are short (1 – 6 bp) tandem repeat DNA sequences that are dispersed randomly throughout the genome (Litt and Luty 1989). Replication slippage or

unequal crossing over events produce variation in the number of repeat motifs, and thus, these loci represent hypervariable regions of the genome. These regions are highly polymorphic, co-dominant and can result in high rates of transferability across species (Gaitán-Solís et al. 2002).

The transferability of microsatellite loci among closely related species depends on the extent of homology and sequence conservation in the regions flanking the simple-sequence repeats. A high rate of transferability has already been documented for plant species. The cross-amplification of microsatellites in closely related *Oryza* species has been reported (Wu and Tanksley 1993). Choumane et al. 2000 reported the conservation of microsatellite loci in different taxa of *Fabaceae*. In legumes, several reports have shown that microsatellites can be transferred from one genera/species to another (Pandian et al. 2000, Eujayl et al. 2004, Gutierrez et al. 2005). In addition to being applicable to genetic diversity, genetic mapping, and marker-assisted selection, they are useful for estimating mating systems in plants (Varshney et al. 2005; Karasawa et al. 2007; Azevedo et al. 2007).

Centrosema is assumed to be predominantly a self-pollinating genus, although insect cross-pollination has been reported in *C. brasilianum* with outcrossing rates ranging from 31.2 to 53.5% (Maass and Torres 1992). However, the reproductive system of other *Centrosema* species has not been clearly elucidated. This information is essential for establishing strategies for selection and improvement and for proposing effective approaches for conservation (Endels et al. 2007). In this study, we used *C. pubescens*-specific microsatellite markers to assess cross-transferability in 11 different *Centrosema* species and to estimate the outcrossing rate in *C. pubescens*.

Material and Methods

Plant materials

Twelve *Centrosema* species (*C. pubescens*, *C. pascuorum*, *C. brachypodium*, *C. brasilianum*, *C. rotundifolium*, *C. acutifolium*, *C. terezae*, *C. arenarium*, *C. tetragonolobum*, *C. macrocarpum*, *C. plumieri* and *C. sagitatum*) were used in this study (**Table 1**). These accessions were obtained from the Cerrados Research Center Germplasm Bank of the Brazilian Agricultural Research Corporation – EMBRAPA, Distrito Federal – Brasília, Brazil and the Instituto de Zootecnia, São Paulo – Nova Odessa, Brazil.

Microsatellite markers

Twenty-six microsatellite markers were selected for this study based on the primer sequences used earlier in *C. pubescens* (Sousa et al. 2009). The lengths of these markers vary from 18 to 22 nucleotides, and the product lengths vary from 165 to 298 base pairs (bp). Primers were synthesized by Invitrogen, CA, USA.

DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) amplification and genotyping

Genomic DNA was extracted from freeze-dried leaf samples using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method of Doyle and Doyle (1990). DNA samples were quantified by comparing with known quantities of λ phage DNA on a 1% agarose gel.

PCR was carried out in a total reaction volume of 25 μ L containing 0.5 ng of DNA template, 0.8 μ M of each forward and reverse primers, 100 μ M of each dNTP (MBI Fermentas, MD, USA), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, and 0.5 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA). All PCR amplifications were performed in a PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA/USA) using *touchdown PCR* parameters 94°C for 2 min; 2x [15 cycles of 94°C for 1 min, 60°C (-1°C/cycle) for 1 min and 72°C for 2 min]; 30 cycles of 94°C for 1 min,

Table 1. *Centrosema* species and their respective accession numbers.

Name species	Accession no.
1 <i>Centrosema pubescens</i> *	CPAC 4205
2 <i>Centrosema pubescens</i> *	CPAC 4247
3 <i>Centrosema pubescens</i> *	CPAC 4250
<i>Centrosema pubescens</i> *	CPAC 4251
<i>Centrosema pubescens</i> *	CPAC 4252
<i>Centrosema pubescens</i> *	CPAC 4253
<i>Centrosema pubescens</i> *	CPAC 4254
<i>Centrosema pubescens</i> *	CPAC 4255
<i>Centrosema pubescens</i> *	CPAC 4256
<i>Centrosema pubescens</i> *	CPAC 4257
4 <i>Centrosema pascuarum</i>	CPAC 2945
5 <i>Centrosema pascuarum</i>	CPAC 2955
6 <i>Centrosema. brachypodum</i>	CIAT 5833
7 <i>Centrosema. brachypodum</i>	CIAT 5850
8 <i>Centrosema brasilianum</i>	CIAT 5234
9 <i>Centrosema brasilianum</i>	CIAT 5178
10 <i>Centrosema rotundifolium</i>	CIAT 2560
11 <i>Centrosema rotundifolium</i>	CPAC 2661
12 <i>Centrosema acutifolium</i>	CIAT 15086
13 <i>Centrosema acutifolium</i>	CIAT 15448
14 <i>Centrosema terezae</i> *	CPAC 4526
15 <i>Centrosema arenarium</i>	CIAT 5236
16 <i>Centrosema arenarium</i>	CIAT 5599
17 <i>Centrosema tetragonolobum</i>	CIAT 15087
18 <i>Centrosema tetragonolobum</i>	CIAT 15440
19 <i>Centrosema macrocarpum</i>	CIAT 5593
20 <i>Centrosema macrocarpum</i>	CIAT 5447
21 <i>Centrosema plumieri</i>	NO 2418
22 <i>Centrosema sagittatum</i>	BRA 7595
23 <i>Centrosema sagittatum</i>	BRA7864

*maternal plants selected for the progeny array; *nomen nudum (Not described species); CPAC: Brazilian Agricultural Research Corporation – Embrapa Cerrados; NO: Nova Odessa; BRA: Genotype number of Brazilian Agricultural Research Corporation; CIAT: International Center for Tropical Agriculture.

48°C for 1 min and 72°C for 2 min; and 72°C for 5 min (Don et al. 1991). Amplification products were genotyped by electrophoresis on 6% denaturing polyacrylamide gels in 1X TBE buffer, using a 10 bp ladder (Invitrogen, CA, USA) as a size standard. The DNA fragments were visualized by silver staining according to Creste et al. (2001).

Allele scoring and data analysis

Polymorphism information content (PIC) values were calculated to estimate marker informativeness (Botstein et al. 1980). To compare marker efficiencies in varietal identification, the discriminating power (D) was estimated for each primer (Tessier et al. 1999). The observed heterozygosity (H_o) and the expected heterozygosity (H_E) were analyzed using the GDA software (Lewis and Zaykin, 2002). Genetic distance was calculated from microsatellite marker data using modified Roger's genetic distances. A genetic distance matrix was estimated using tools for genetic population analysis (TFPGA v 1.3) (Miller, 1997). Cluster analysis was performed using the neighbor-joining (NJ) method with the DARwin v. 5.0.157 software (Perrier and Jacquemoud-Collet, 2006). The reliability of the generated dendrogram was also tested by a bootstrap analysis using the BooD program with 1000 iterations (Coelho, 2002). The software STRUCTURE version 2.2 (Pritchard et al. 2000) was used to cluster individuals according to distinct allele frequency sets. As a preliminary step, the software was run once for each K value ranging from 2 to 20. Each run was performed using the admixture model and 1.000 replicates for burn-in and 10,000 replicates during analysis. The most probable number of K was calculated based on Evanno et al. (2005) using an *ad hoc* statistic ΔK , which perceives the rate of change in log probability of the data between successive K values rather than the log probability of the data.

Mating system determination

Fifteen accessions of *C. pubescens* from the Germplasm Collection of Embrapa Cerrados, were grown in the field under natural conditions to obtain maternal progenies (**Table 1**). From these 15 accessions, 10 were randomly chosen for the progeny array. Pollinated seeds from the 10 maternal plants were grown in the year of 2009, and 20 plants per progeny were evaluated, totalizing 200 accessions for each species.

The mating system was analyzed according to the mixed mating model of Ritland and Jain (1981) using MLTR software (Ritland 2002), with the following assumptions: a) each mating event is due to random outcrossing (t) or self-fertilization (with probability $s = 1 - t$); b) the probability of outcrossing is independent of the maternal genotypes; c) the pollen pool is homogeneous over all maternal plants; d) there is no selection between fertilization and the time of assay for progeny genotypes; e) alleles at different loci segregate independently (Ritland and Jain 1981). The following parameters were estimated: multilocus outcrossing rate (t_m), single-locus outcrossing rate (t_s), outcrossing rate between related individuals ($t_m - t_s$), correlation of paternity (r_p) or proportion of full sibs among outcrossed progeny, correlation between outcrossing rates of different loci (r_{ia}) and normalized variation of outcrossing rates among progenies (r_i). All parameters were estimated using maximum likelihood procedures. The number of contributing pollen donors for each progeny was estimated to be $1/r_p$ (Ritland 1989). The inbreeding coefficient of maternal parents (F_m) was also calculated using the MLTR software (Ritland 2002). The standard errors of the reported estimates were calculated based on 10,000 bootstrap resamplings of the progenies.

Results and discussion

Cross amplification and polymorphism of microsatellite markers in *Centrosema* species

To evaluate the cross-species amplification, we screened 20 accessions of 11 different *Centrosema* species. Of the 26 *C. pubescens*-specific microsatellite markers that were assessed, 19 amplified in at least 1 *Centrosema* species, while 7 did not amplify in any of the 11 *Centrosema* species. **Table 2** displays the name of the locus, GenBank accession number, repeat motif, primer sequences (forward and reverse), annealing temperature, number of alleles, product length and the source for these microsatellite markers. We observed that the transferability of these markers across species varied. Two microsatellite markers (CS45 and CS71) amplified in all *Centrosema* species (**Table 3**). Transferability among *Centrosema* species was measured to be 55% for two markers (CS70 and CS128), 33.3% for four markers (CS35, CS36, CS37 and CS156), 25% in another seven markers (CS10, CS20, CS39, CS61, CS62, CS86 and CS120), 16% in three markers (CS21, CS81 and CS89) and 8.3% in one marker (CS102). Seven markers (CS53, CS68, CS98, CS99, CS125, CS127 and CS154) did not show positive amplification in any *Centrosema* species. However, these results show a considerable level of conserved sequences in the flanking regions of microsatellite loci. All of the transferable markers that were amplified are simple di-nucleotide simple and compound repeat motifs with (GT)_n and (AG)_n, being the most abundant repeat. A total of 149 alleles were identified for the 19 transferable markers in the different *Centrosema* species.

Extensive polymorphism in the genotypes of the *Centrosema* species is apparent in the wide variation of size and number of amplification products. The number of alleles per locus ranged from 2 to 20, with an average of 7.52. The PIC values ranged from 0.22 (CS102) to 0.89

Table 2. Microsatellite markers used in the cross amplification of *Centrosema* species and in the estimation of the outcrossing rate in *Centrosema pubescens*.

Locus/ Accession no.	Repeat motif	TD (°C)	Primer sequences (5' - 3')	A	Product Length	Source
CS10 GQ293042	(GT)8	60 - 45	F: ATACTGTTTCTCATTG R: AACTCTGTCTCTTCACTG	9	298bp	Sousa et al. (2009)
CS20 GQ293043	(CA)3CG(CA)5	60 - 45	F: ACACCATACATGCGAAAGAT R: CCATATGAAAATTGTTGTGA	6	267bp	Sousa et al. (2009)
CS21* GQ293044	(AG)15	60 - 45	F: TTCACATAAAATCAAAACCA R: AACACATTCTTCTATCCTT	3	229bp	Sousa et al. (2009)
CS35 GQ293045	(CA)6	60 - 45	F: GCATATAGTAAATCTGTTGTGG R: AGAGTGAAAGAAAGAAAGAAAG	8	253bp	Sousa et al. (2009)
CS36 GQ293046	(CA)5	60 - 45	F: TTGGTTATTAAATTGGTGAAG R: TTAATACTAGCAGGAAAGTT	9	176bp	Sousa et al. (2009)
CS37 GQ293047	(GA)2GT(GA)12	60 - 45	F: TCAAACTATCTACATCCA R: TCTAATAACAACGCAATAA	9	165bp	Sousa et al. (2009)
CS39 GQ293048	(GT)7AT(GA)9AA(GA)4	60 - 45	F: ACACAACAACATAAAAGTA R: TATGGAGTAAGACAAACAA	4	268bp	Sousa et al. (2009)
CS45 GQ293049	(CA)5	60 - 45	F: CAGAAATGCAATGCTACAAAA R: GTGGGCCAGAAATCAGGAA	16	216bp	Sousa et al. (2009)
CS53 GQ293050	(GT)7	60 - 45	F: TGCAAAAAGAGAAATAAAATGA R: ATGACCAAAAGTGAGTGAGAAT	-	232bp	Sousa et al. (2009)
CS61 GQ293051	(CA)7	60 - 45	F: TTTTATGCTTCCTGTTCA R: TTAATTTCAAAAGACCACTG	5	241bp	Sousa et al. (2009)
CS62 GQ293052	(CT)2(GT)6	60 - 45	F: CTGATGTGGATGATGAGG R: TTCTGACACTTATAAAACAAAC	6	227bp	Sousa et al. (2009)
CS68 GQ293053	(GT)5	60 - 45	F: TGGGTTAATTCATGTAGCAG R: AAGGTCGAATCTCAGCAAAAT	-	189bp	Sousa et al. (2009)
CS70* GQ293054	(CA)10	60 - 45	F: CCATACCCCTACCAATCC R: CCATCACAAAGTTATACCATCAG	8	253bp	Sousa et al. (2009)
CS71 GQ293055	(CT)9	60 - 45	F: ATACCTGATGAAATGTGGAT R: AATAATTTCTGCAGTGTTTTG	20	226bp	Sousa et al. (2009)
CS81 GQ293056	(AG)6GG(AG)7	60 - 45	F: CATGGGTCTTGGGTTTTG R: AATAGGGTCTGCATCTGTTCA	4	243bp	Sousa et al. (2009)
CS86 GQ293057	(AC)5	60 - 45	F: ACTTGCTGCACCTGTCCACC R: GTCCCTTTCTTTTCGTATCAC	6	184bp	Sousa et al. (2009)
CS89 GQ293058	(GT)4...(GT)5	60 - 45	F: AATTTCCTTCACTTTTGTTCC R: AATTTCTTCTTTTCACTTCA	5	242bp	Sousa et al. (2009)
CS98* GQ293059	(CA)7	60 - 45	F: ACAAGCAGGTGATGGACTCT R: TCTCTGTTGCTCTGGACTTACTC	-	204bp	Sousa et al. (2009)
CS99 GQ293060	(GA)9	60 - 45	F: TTCATACTAATACCCCTTTTCT R: CTCCTTCAACCACTCA	-	273bp	Sousa et al. (2009)
CS120* GQ293061	(GT)11	60 - 45	F: TTTGAAGTGACCAGGAGGATTT R: AAGACCATGTGGAAGAGGATTG	6	286bp	Sousa et al. (2009)
CS125 GQ293062	(GT)6	60 - 45	F: GATTACAGAGTTGGGATTTT R: CCATTCTCTCATACTTACC	-	254bp	Sousa et al. (2009)
CS127 GQ293063	(AC)7	60 - 45	F: GGAAAGGGACTCAAGAAAGAAA R: GTGATTATAGGGGGAACAGGAG	-	204bp	Sousa et al. (2009)
CS128 GQ293064	(GT)8	60 - 45	F: CACTTGCCCTTCTTGTATC R: GCTGTGCGTATGTTGTGT	8	247bp	Sousa et al. (2009)
CS154* GQ293065	(GA)13	60 - 45	F: CCCAGTCAGTTGAGTTGTAG R: AAGGTATCCATGGTTTATCT	-	226bp	Sousa et al. (2009)
CS156 GQ293066	(GA)9	60 - 45	F: ATAGAAAAGAAAGAAAGAAA R: ACAAGCATAAATGATAAGTG	9	206bp	Sousa et al. (2009)
CS102* GQ293067	(CA)6	60 - 45	F: TTCATGCATGCACTTCAAAT R: CCCTTCCCATACGTTACTTACT	2	236bp	Sousa et al. (2009)

Locus/Accession no, name locus and GenBank accession number; F, forward sequence; R, reverse sequence; TD, *touchdown PCR* with temperatures ranging from 60°C to 45°C; A, allele number in *Centrosema*; *, microsatellite used to estimate the outcrossing rate.

Table 3. Cross-species amplification of 26 microsatellite markers in 11 *Centrosema* species.

<i>Centrosema</i> Species	Microsatellite markers ¹												
	CS10	CS20	CS21	CS35	CS36	CS37	CS39	CS45	CS53	CS61	CS62	CS68	CS70
4 <i>C. pascuorum</i>	200	-	-	250	176	165	-	192	-	-	-	-	-
5 <i>C. pascuorum</i>	200	-	-	250/256	172/186	160/170	-	192	-	-	-	-	-
6 <i>C. brachypodium</i>	220/236	-	-	-	200	-	-	200	-	240	-	-	198
7 <i>C. brachypodium</i>	228/240	-	-	-	202/216	-	-	200	-	230/240	-	-	198
8 <i>C. brasilianum</i>	-	-	180	-	190/200	-	-	192/202	-	-	-	-	198/206
9 <i>C. brasilianum</i>	-	-	180	-	190	-	-	196	-	-	-	-	206
10 <i>C. rotundifolium</i>	-	-	220/228	-	208/216	-	-	210/222	-	-	-	-	200
11 <i>C. rotundifolium</i>	-	-	228	-	210/216	-	-	210	-	-	-	-	200/210
12 <i>C. acutifolium</i>	-	192/204	-	-	-	-	-	215	-	-	-	-	-
13 <i>C. acutifolium</i>	-	204	-	-	-	-	-	215	-	-	-	-	-
14 <i>C. terezae</i> *	-	210	-	-	-	-	220	192/206	-	208/216	192	-	-
15 <i>C. arenarium</i>	204/210	250/262	-	190	-	190/202	212/222	216	-	216	192/212	-	-
16 <i>C. arenarium</i>	204/216	250/256	-	190	-	200	-	216	-	210/216	192/210	-	-
17 <i>C. tetragonolobum</i>	-	-	-	200/212	-	-	-	210/218	-	-	220	-	206/212
18 <i>C. tetragonolobum</i>	-	-	-	212/216	-	-	-	218/228	-	-	220/230	-	214/226
19 <i>C. macrocarpum</i>	-	-	-	220	-	-	-	215	-	-	-	-	232
20 <i>C. macrocarpum</i>	-	-	-	220/226	-	-	-	198/215	-	-	-	-	232
21 <i>C. plumieri</i>	-	-	-	-	-	202	-	202	-	-	-	-	-
22 <i>C. sagittatum</i>	-	-	-	-	-	172/186	220/228	190	-	-	-	-	-
23 <i>C. sagittatum</i>	-	-	-	-	-	170/180	228	188/192	-	-	-	-	-
Transferability (%)	25.0	25.0	16.0	33.3	33.3	33.3	25.0	100	-	25.0	25.0	-	55.0
PIC	0.86	0.71	0.47	0.76	0.51	0.68	0.39	0.87	-	0.76	0.67	-	0.79
D	0.98	0.87	0.68	0.82	0.69	0.83	0.47	0.99	-	0.81	0.86	-	0.86

Table 3. Continued.

Centrosema Species	Microsatellite markers ¹												
	CS71	CS81	CS86	CS89	CS98	CS99	CS120	CS125	CS127	CS128	CS154	CS156	CS102
4 <i>C. pascuorum</i>	180	240	-	230	-	-	206/214	-	-	240	-	200	-
5 <i>C. pascuorum</i>	178/188	240	-	232/242	-	-	214	-	-	242/248	-	200	-
6 <i>C. brachypodum</i>	200/212	-	-	-	-	-	240	-	-	-	-	186/200	-
7 <i>C. brachypodum</i>	206/218	-	-	-	-	-	242/252	-	-	-	-	186	-
8 <i>C. brasilianum</i>	180/186	-	-	-	-	-	240/256	-	-	232	-	190/206	-
9 <i>C. brasilianum</i>	180/190	-	-	-	-	-	256	-	-	230/240	-	194/208	-
10 <i>C. rotundifolium</i>	212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	196/216	-
11 <i>C. rotundifolium</i>	212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	214	-
12 <i>C. acutifolium</i>	200	232/242	180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	222/236
13 <i>C. acutifolium</i>	200	238	182/196	-	-	-	-	-	-	-	-	-	222
14 <i>C. terezae*</i>	206/212	-	200/206	-	-	-	-	-	-	240/252	-	-	-
15 <i>C. arenarium</i>	200/220	-	180/190	-	-	-	-	-	-	252	-	-	-
16 <i>C. arenarium</i>	220	-	190	-	-	-	-	-	-	252	-	-	-
17 <i>C. tetragonolobum</i>	202/214	-	-	-	-	-	-	-	-	246/258	-	-	-
18 <i>C. tetragonolobum</i>	210/218	-	-	-	-	-	-	-	-	258	-	-	-
19 <i>C. macrocarpum</i>	216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 <i>C. macrocarpum</i>	216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21 <i>C. plumieri</i>	214	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22 <i>C. sagittatum</i>	220/228	-	-	200/210	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23 <i>C. sagittatum</i>	218/230	-	-	210	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Transferability (%)	100	16.0	25.0	16.0	-	-	25.0	-	-	55.0	-	33.3	8.3
PIC	0.89	0.41	0.52	0.58	-	-	0.71	-	-	0.62	-	0.78	0.22
D	0.99	0.56	0.68	0.69	-	-	0.86	-	-	0.79	-	0.89	0.49

*, nomen nudum (Not described species); 1, alleles observed for each locus are displayed in bp; -, indicates no amplification. PIC, polymorphism information content; D, discriminating power.

(CS71), with an average of 0.64, and the D values ranged from 0.47 (CS102) to 0.99 (CS71 and CS45), with an average of 0.77.

Several microsatellite loci displayed complex allele patterns with minor alleles that amplified poorly; these were not considered for further analysis. The size of the alleles produced by the transferable microsatellite was highly variable in *Centrosema* species, indicating that there could be additional amplification products of *C. pubescens*-specific microsatellites unpredicted products. The occurrence of multiple alleles has been reported earlier as a result of the amplification of more than one locus for each microsatellite (Holton et al. 2002). The generation of amplification products from a defined locus requires that the 3' terminal nucleotides of the target sequence be perfectly complementary to the primers (Choumane et al. 2004). If amplification across the species boundary is possible, the respective loci should be conserved between the two species. The amplification of a microsatellite locus in one species with primers recognizing the microsatellite from another species does not necessarily confirm the conservation and identity of the locus. We observed here that some *C. pubescens* microsatellite markers cannot be amplified in either all or one particular species of *Centrosema*. This result could be due to mutation in the microsatellite binding site or to the absence of the locus in certain species.

Genetic relationships among *Centrosema* species

Using the 149 alleles obtained, we assessed the genetic relationships among *Centrosema* species. STRUCTURE analysis coupled with computation of Evanno ΔK statistics suggests a primary partition of *Centrosema* species into four clusters ($K=3$) (**Figure 1a and 1b**). STRUCTURE can help to identify clusters of genetically similar accessions. Thus, the subpopulations from the STRUCTURE analysis were grouped into three clusters (C): C1, C2

and C3 (**Figure 2**). Cluster C1 (red) includes the species *C. rotundifolium* (10 and 11 accessions), *C. acutifolium* (12 and 13 accessions), *C. terezae* (14 accession) and *C. macrocarpum* (19 and 20 accessions). Cluster C2 (green) includes the species *C. tetragonolobum* (17 and 18 accessions), *C. brasilianum* (8 and 9 accessions), *C. brachypodum* (6 and 7 accessions), *C. arenarium* (15 and 16 accessions) and *C. plumieri* (21 accession). Cluster C3 (blue) includes the three *C. pubescens* accessions (1, 2 and 3), as well as the species *C. pascuorum* (4 and 5 accessions) and *C. sagittatum* (22 and 23 accessions).

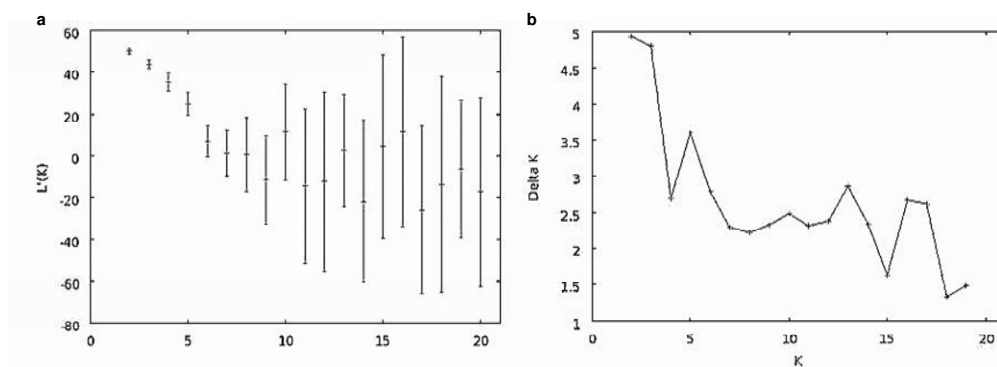


Figure 1. Determination of K , the most probable number of clusters, using STRUCTURE software, based on 12 different *Centrosema* species. **a.** log probability of data, $L(K)$, as a function of K averaged over 20 replicates. **b.** ad-hoc ΔK statistics as a function of K calculated over 20 replicates.

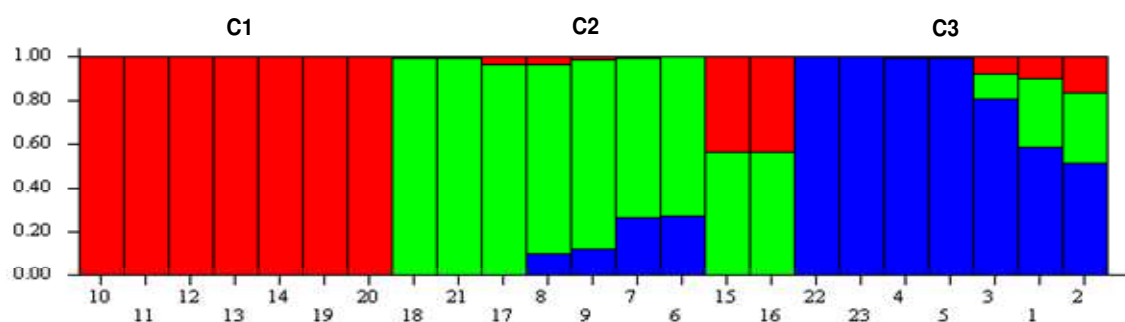


Figure 2. Hierarchical organization of genetic relatedness in *Centrosema* species STRUCTURE analysis ($K = 3$). The proportion of membership (y-axis) assigned to the inferred genetic clusters is indicated for each individual (x-axis). The species are: 1, 2 and 3 - *C. pubescens*; 4 and 5 - *C. pascuorum*; 6 and 7 - *C. brachypodum*; 8 and 9 - *C. brasilianum*; 10 and 11 - *C. rotundifolium*; 12 and 13 - *C. acutifolium*; 14 - *C. terezae*; 15 and 16 - *C. arenarium*; 17 and 18 - *C. tetragonolobum*; 19 and 20 - *C. macrocarpum*; 21 - *C. plumieri*; 22 and 23 - *C. sagittatum*.

The phylogenetic NJ tree constructed based on the modified Roger's genetic distance matrix, was colored according to the STRUCTURE results (**Figure 3**). We observed a strong tendency for correspondence between the Bayesian clusters in the NJ tree. Clusters C1 (red) comprised of the species *C. rotundifolium*, *C. acutifolium*, *C. terezae* and *C. macrocarpum*. Cluster C2 (green) includes *C. tetragonolobum*, *C. brasilianum*, *C. brachypodum*, *C. arenarium* and *C. plumieri*. Cluster C3 (blue) includes the three *C. pubescens* accessions, *C. pascuorum* and *C. sagittatum*. In these two analyses, the species that were used as male parents in the crosses with *C. pubescens* (*C. acutifolium* and *C. macrocarpum*) were grouped together in cluster C1. The genetic distance among *Centrosema* species ranges from 42% to 95%. The bootstrap values (> 45) at the cluster and sub-clusters indicated the robustness of the genetic relationships depicted in the dendrogram.

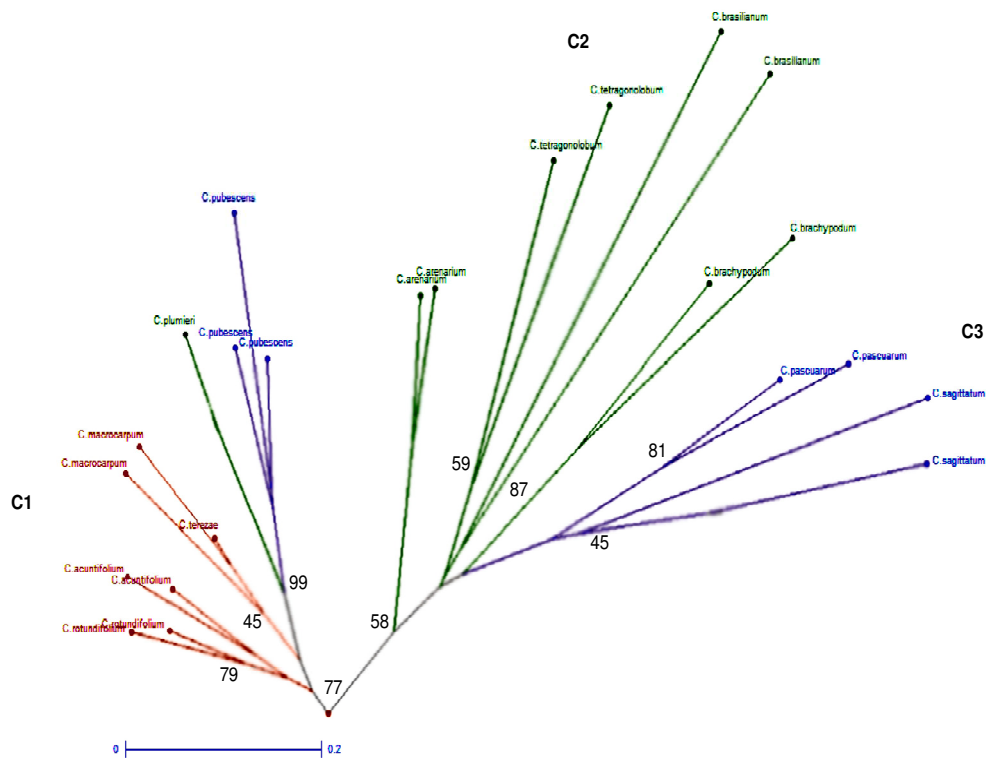


Figure 3. Neighbor-joining tree of *Centrosema* species based on the Rogers modified genetic distance. Each branch is color-coded according to membership in the $K = 3$ clusters identified by STRUCTURE. Bootstrap values (>45) at nodes indicated the significance of clustering.

Several studies have shown that the microsatellites developed for one species can be used in related plant species (Dayanandan et al. 1997). The success of cross-species amplification is likely to depend not only on the evolutionary distance between the source and target species, but also on the rate of evolution in the genomic sequence where the microsatellite is located (Datta et al. 2007). A high transferability of microsatellite markers has been observed in many other genera and species. Gaitán-Solís et al. (2002) developed 68 *Phaseolus vulgaris* microsatellite loci and found that the transferability rate to other *Phaseolus* species was almost 50%. Choi et al. (2004) showed that *Medicago truncatula* microsatellite loci could be transferred to multiple legumes.

The microsatellite loci used in this study were efficient for analyzing genetic relationships in *Centrosema* species because they presented high transferability to related species without the development of specific microsatellite markers. These loci may thereby be useful for genetic studies in the cross-amplified species.

Outcrossing rate in *Centrosema pubescens*

The outcrossing rate in *C. pubescens* was estimated with six microsatellite loci (**Table 2**), using 10 field-grown plants as maternal parents and 20 accessions per progeny (**Table 1**).

For the 6 microsatellite loci, the number of alleles per locus varied from 2 to 6, with an average of 3.8. The observed heterozygosity varied from 0.09 to 0.42 (0.23 in average) and the expected heterozygosity ranged from 0.43 to 0.74 (0.58 in average). The loss of heterozygotes could indicate some level of autogamy (Barkley et al. 2006). The calculated PIC values varied from 0.39 to 0.61, with an average of 0.48 (**Table 4**).

Table 4. Number of alleles per locus (A), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_E) and polymorphism information content (PIC) of *Centrosema pubescens* families.

Loci	A	H_o	H_E	PIC
CS21	4	0.09	0.53	0.53
CS70	5	0.32	0.61	0.61
CS98	3	0.18	0.74	0.45
CS120	2	0.23	0.69	0.38
CS154	6	0.16	0.43	0.56
CS102	3	0.42	0.51	0.39

The estimate of the multilocus outcrossing rate (t_m) was 0.269(0.069), indicating a mixed mating system (**Table 5**). This result shows that 73.1% of the plants were derived by self-fertilization and 26.9% by outcrossing. The single locus outcrossing rate (t_s) was 12% [0.129(0.043)]. The difference in outcrossing rate ($t_m - t_s$) is significantly different from zero (4%) [0.040(0.043)], indicating that crosses occur between related individuals. The difference between multilocus and single locus outcrossing rates represents an estimate of the degree of biparental inbreeding. In its presence, t_s will be smaller than t_m because outcrossing events that are not detected at a single locus have a higher probability of being detected as more loci are examined (Ritland 1996).

The paternity correlation (r_p) was 0.139(0.052). This parameter provides information about the probable number of plants contributing pollen to a given seed parent. When r_p is small, we expect that the number of plants contributing pollen is large. Quantifying $1/r_p$ is an

Table 5. Mating system parameters in *Centrosema pubescens*: multilocus outcrossing rate (t_m), single locus outcrossing rates (t_s), multilocus correlation of paternity (r_p), correlation of t estimate among loci (r_{ta}), correlation of t within progenies (r_t) and parental coefficient of inbreeding (F_m).

Parameters	Estimates (standard error)
t_m	0.269 (0.069)
t_s	0.129 (0.043)
$t_m - t_s$	0.040 (0.023)
r_p	0.139 (0.052)
$1/r_p$	7.19
r_{ta}	0.86 (0.042)
r_t	0.362 (0.09)
F_m	0.139 (0.076)

estimate of the effective number of pollen parents per family. Even though the progenies were derived from 10 parental plants, 7.1 ($1/0.139$) contributed as pollen donors in *C. pubescens* experiments. A high correlation was found in t estimates across all loci (r_{ta}) [0.86(0.042)], supporting the estimates of t . The correlation of t within progenies (r_t) was low [0.362(0.09)], indicating that there is a small but significant difference in outcrossing rates among progenies. The correlation of t within progenies or the normalized variation of t among progenies (r_t) measures the extent to which the outcrossing rate differs between different progenies.

The outcrossing rate can be inferred from the inbreeding coefficient or the Fixation Index of the maternal generation (F_m) (Parzies et al. 2008). In this study, F_m was 0.139(0.076), corresponding to 14% inbreeding in the maternal generation.

The genus *Centrosema* is considered to be autogamous, but cross-pollination can occur under natural conditions in the presence of pollinators. The outcrossing rates estimated for two accessions of *C. brasilianum* (31.2% and 53.5%) using flower color as a marker (Maass and Torres, 1992). The multilocus estimations of outcrossing from family arrays, a statistically robust method, indicates that *C. acutifolium* should be included in the category of mixed self-mating plant species. The estimated outcrossing (t) obtained for the three lines were 0.27, 0.35 and 0.41, respectively (Shaw et al. 1981).

While the indirect estimation of outcrossing from the fixation index is less precise than other methods, the estimations of outcrossing rates that were obtained from F values indicate that the other species should also be considered mixed mating species. For the six populations of *C. acutifolium*, the estimation of t ranged from 0.33 to 0.59, with an average of 0.40. In *C. brasilianum* the range was from 0.15 to 0.47, with an average of 0.33. Finally, in *C. pubescens* these values were 0.33 to 0.56, with an average of 0.41 (Penteado et al. 1996).

Outcrossing rates can vary widely in plant species according to population and environmental conditions. Climate variation can change the behavior of pollinators and the phenology of flowering plants (Degen et al. 2004). The reproductive system plays a crucial role in the amplification and recombination of the variability within species populations. Consequently, the random mating deviations observed in *C. pubescens* have important consequences for conservation and breeding.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support (Project 05/51010-0) for a graduate fellowship to Sousa ACB.

(06/52953-8) and, to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a research fellowship awarded to Souza AP. The Embrapa Cerrados, Brasília-DF and Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP provided the plant material for the study.

References

Azevedo, V.C., Kanashiro, M., Ciampi, A.Y. and Grattapaglia, D. 2007. Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev., a heavily logged Amazonian timber species. *Journal of Heredity*. 98: 646 - 654.

Battistin, A. and Vargas, M. G. 1989. A cytogenetic study of seven species of *Centrosema* (DC) Benth. (Leguminosae-Papilionoideae). *Revista Brasileira de Genética*. 12: 319 – 329.

Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a *citrus* germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSR). *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 1519 - 1531.

Borges, H. B. N. 2006. *Centrosema pubescens* Benth. (Fabaceae) reproductive biology. *Ciências Naturais*. 1: 31 - 38.

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetic.* 32: 314 - 331.

Choi, H.K., Mun, J.H., Kim, D.J., Zhu, H., Baek, J.M., Mudge, B.R., Ellis, N., Doyle, G.B. and Kiss, N.D., Cook, D.R. 2004. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proceeding of the National Academy of Sciences.* 101: 15389-15394.

Choumane, W., Winter, P., Weigand, P. and Kahl, G. 2000. Conservation and variability of sequence-tagged microsatellite sites (STMSs) from chickpea (*Cicer arietinum* L.) within the genus *Cicer*. *Theoretical and Applied Genetics.* 101: 269 – 278.

Choumane, W., Winter, P., Weigand, P. and Kahl, G. 2004. Conservation of microsatellite flanking sequences in different taxa of Leguminosae. *Euphytica.* 138: 239 – 245.

Clements, R. J., Williams, R. J., Grof, B. and Hacker, J. B. 1983. *Centrosema*. In: The role of *Centrosema*, *Desmodium* and *Stylosanthes* in improving tropical pastures (Burt R. L. Rotar P. P. Walker, L. M. W. Silvey, eds). Boulder, Colorado. Westview Press. 69 – 96.

Coelho, A. S. G. 2002. BooD: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores. Computer software distributed by the author. Laboratório de Genética Vegetal,

Instituto de Ciências biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil. [In Portuguese].

Creste, S., Tulmann Neto, A. and Figueira A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 299 - 306.

Datta, S.R., Rai, K., Tiwari, M. and Kumar, S. 2007. Phylogenetic analysis of pulse crops using RAPD markers. *Journal Food Legumes* 20: 9 - 11.

Dayanandan, S., Bawa, K.S. and Kesseli, R.V. 1997. Conservation of microsatellite among tropical trees (Leguminosae). *American Journal of Botany*. 84: 1658 - 1663.

Degen, B., Bandou, E. and Caron, H. 2004. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. *Heredity*. 93: 585 – 591.

Don, R.H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. and Mattick, J. S. 1991. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*. 19, 4008.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13 - 15.

Endels, P., Jacquemyn, H., Brys, R., Hermy, M. 2007. Genetic erosion explains deviation from demographic response to disturbance and year variation in relic population of perennial *Primula vulgaris*. *Journal of Ecology*. 95: 960 – 972.

Eujayl, I., Sedge, M. K., Wang, L., May, G. D., Chekhovskii, K., Zwonitzer, J. C. and Mian, M. A. R. 2004. *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 414 – 422.

Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 18: 2611 – 2620.

Fariñas, J. M., Sanabria, D. V. and Silva-Acuña, R., 1997. Escarificación química de semillas de tres especies de *Centrosema* para sabanas bien drenadas. *Zootecnia Tropical*. 15: 221 – 237.

Gaitán-Solís, E., Duque, M. C., Edwards, K. J. and Tohme, J. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* spp. *Crop Science*. 42: 2128 – 2136.

Grof, B. 1982. Breeding *Centrosema pubescens* in tropical South America. *Tropical Grasslands*. 16: 80 – 83.

Gutierrez, M. V., Vaz Patto, M. C., Huguet, T., Cubero, J. L., Moreno, M. T. and Torres, A. M. 2005. Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellite across three major pulse crops. Theoretical and Applied Genetics. 110: 1210 – 1217.

Holton, T. A., Christopher, J. T., Clure, L. M., Harker, N. and Henry, R. J. 2002. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. Molecular Breeding. 9: 63 – 71.

Humphreys, L. R., Ivory, D. A., Wong, C. C. and Topark-Ngarm, A. 1990. Regional experience with *Centrosema*: Tropical Asia and Pacific. In: Schultze-Kraft, R. and Clements, R. J. (eds) *Centrosema*: biology, Agronomy, and Utilization. Pp. 543 – 558. (Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT]: Cali, Columbia).

Karasawa, M., Vencovsky, R., Silva, C., Zucchi, M., Oliveira, G. and Veasey, E. 2007. Mating system of Brazilian *Oryza glumaepatula* populations studies with microsatellite markers. Annals of Botany. 99: 245 - 153.

Keller-Grein, G., Schultze-Kraft, R., Franco, L. H. and Ramirez, G. 2000. Multilocal agronomic evaluation of selected *Centrosema pubescens* germplasm on acid soils. - Tropical Grasslands. 34: 65 – 77.

Lewis, P. and Zaykin, D. 2002. Genetic Data Analysis (GDA): Computer Program for the Analysis of Allelic Data (Software), version 1.1 (d12). <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/>.

Litt, M., and Luty, A. 1989. Hyper variable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetic.* 44: 397 – 401.

Maass, B. L. and Torres, A. M. 1992. Outcrossing in the tropical forage legume *Centrosema brasilianum* (L) Benth. Book of Poster Abstracts XIIIth Eucarpia Congress. Angers, France. 465 - 466.

Miles, J. W., Clements, R. J., Grof, B. and Serpa, A. 1990. Genetics and breeding of *Centrosema*. In: *Centrosema: biology, agronomy, and utilization* (Schultze-Kraft R. and Clements R. J, eds). Cali, Colombia: CIAT publication. 92: 245 – 270.

Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

Novaes, N. J., Godoy, R., Primavesi, A. C. P. A. and Negreiros, G. F. 1994. Avaliação de leguminosas forrageiras (*Centrosema* spp.) em solos distróficos. *Scientia Agricola.* 51: 58 – 68.

Novaes, I. M. and Penteado, M. I. O. 1993. Chromosomic observations in *Centrosema*. Revista Brasileira de Genética. 16: 441 - 447.

Nworgu, F. C. and Fasogbon, F. O. 2007. *Centrosema* (*Centrosema pubescens*) Leaf meal as protein supplement for pullet chicks and growing pullets. International Journal of Poultry Science. 6: 255 – 260.

Odeyinka, S. M., Oyedele., O. J., Adeleke, T. O. and Odedire, J. A. 2008. Reproductive performance of rabbits fed *Moringa oleifera* as a replacement for *Centrosema pubescens*. Reproduction. 10: 411 – 415.

Pandian, A., Ford, R. and Taylor, W. J. 2000. Transferibility of sequence tagged microsatellite sites (STMS) primers across major pulses. Plant Molecular Biology Report. 18: 395a – 395h.

Parzies, H. K., Fosung Nke, C., Abdel-Ghani, A. H., Geiger, H.H. 2008. Outcrossing rate of barley genotypes with different floral characteristics in drought-stressed environments in Jordan. Plant Breeding. 127: 536 – 538.

Penteado, M. I. O., García, P. and Pérez de La Veja, M. 1996. Genetic variability and mating system in three species of the genus *Centrosema*. Journal of Heredity. 87: 124 – 130.

Perrier, X. and Jacquemound-Collet, J.P. 2006. DARwin software. Available from <http://www.darwin.cirad.fr/darwin>. 2006.

Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945 – 959.

Reátegui, K., Ara, M. and Schaus, R. 1985. Evaluación bajo pastoreo de asociaciones de gramíneas y leguminosas forrageiras en Yurimaguas, Perú. *Pasturas Tropicales*. 7: 11 – 14.

Ritland, K. and Jain, S. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. *Heredity*. 47: 35 - 52.

Ritland, K. 1989. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. *Evolution*. 43: 849 - 859.

Ritland, K. 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetic Resources*. 67: 175 – 185.

Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating system using n independent loci. *Heredity*. 88: 221 - 228.

Shaw, D. V., Kahler, A. L. and Allard R. W. 1981. A multilocus estimator of mating system parameters in plants populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 78: 1298 – 1302.

Schultze-Kraft, R. and Clements, R. J. Biology, agronomy, and utilization. Cali, Colombia: CIAT publication no. 92, 1990.

Schultze-Kraft, R., Clements, R. J. and Keller-Grein, G. (eds) 1997. *Centrosema*: Biología, Agronomía y Utilización. (Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT]: Cali, Columbia).

Sousa, A. C. B., Carvalho, M. A., Boaventura, L. R., Sforça, D. A., Campos, T., Jungmann, L., Zucchi, M. I., Jank, L. and Souza, A.P. 2009. Microsatellite markers in tropical legume (*Centrosema pubescens* Benth.): development, characterization, and cross-species amplification in *Centrosema* sp. Conservation Genetics Resources. 1: 347 - 352.

Tessier, C., David, J., Boursiquot, P. and Charrier, A. 1999. Optimizations of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. Theoretical and Applied Genetics. 98: 171 - 177.

Varshney, R. K., Graner, A. and Sorrells, M. E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends in Biotechnology. 23: 48 – 55.

Williams, R. J. and Clements, R. J. 1990. Taxonomy of *Centrosema*. In: Schultze-Kraft R and Clements RJ (eds) *Centrosema*: Biology, Agronomy and Utilization. (Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT): Cali, Columbia. pp. 1 - 27.

Wu, K. S. and Tanksley, S. D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular Genetics and Genomics*. 241: 225 – 235.

CAPÍTULO VI

Development and characterization of microsatellite loci for *Calopogonium mucunoides* Desv.

A. C. B. Sousa¹ • M. A. Carvalho² • A. K. B. Ramos² • D. A. Sforça¹ • T. Campos¹ • L. Jungmann³ • M. I. Zucchi⁴ • L. Jank³ • A. P. Souza^{1,5}

¹ University of Campinas (UNICAMP), Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), CP 6010, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

² Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Cerrados, BR 020, Km 18. Planaltina – DF, CEP 73310-970, Brazil.

³ Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Beef Cattle, Forage Breeding Dept, CP 154, Campo Grande – MS, CEP 79002-970, Brazil.

⁴ Agronomic Institute of Campinas, Pólo Apta Centro Sul – Rod. SP 127 km 30, Piracicaba – SP, CP 28, CEP 13400-970, Brazil.

⁵ University of Campinas (UNICAMP), Biology Institute, Plant Biology Dept (DBV), CP6109, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

Keywords: Tropical forage legume, microsatellite markers, polymorphism, genetic diversity.

***O trabalho foi publicado pela revista *Molecular Ecology Resources* (2010). 10: 576-579. DOI 10.1111/j.1755-0998.2010.02851.x.**

Abstract

Twenty-three microsatellite markers were developed and optimized for *Calopogonium mucunoides*. The markers were used to analyze 60 genotypes from a germplasm collection. Polymorphism information content (*PIC*) values ranged from 0.23 to 0.89 and discriminating power (*D*) values varied from 0.48 to 0.99. The observed (H_O) and expected heterozygosity (H_E) values ranged from 0.05 to 0.88 and 0.33 to 0.97, respectively. Of the 23 loci, 17 did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium and were not significant for the presence of null alleles. These microsatellite markers could be useful for future genetic studies of *C. mucunoides*.

Calopogonium mucunoides Desv. (*Fabaceae*) is a diploid ($2n=36$) perennial herbaceous plant native to South America and Central America. It is used as a grazing legume, green manure, pioneer legume and soil cover crop (Varela & Gurgel 2001). *C. mucunoides* has high nitrogen fixing capability, being cultivated in soils with low pH and poor fertility. This species is characterized by moderate resistance to drought, but it does not tolerate low temperatures (McSweeney & Wesley-Smith 1986). In Brazil, *C. mucunoides* is one of the most widely used legumes, with annual seed production around 600 to 800 t year⁻¹ (Pizarro & Carvalho 1997).

Despite of the importance and great potential of the *C. mucunoides* species in Brazil, genetic knowledge on this tropical forage legume is still limited. A large germplasm collection that comprises more than 200 accessions is available in the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) – Cerrados (*C. mucunoides* germplasm bank), Brasília/DF Brazil. Pizarro and Carvalho (1997) evaluated this germplasm collection and reported significant variation in dry matter yield (DMY), dry season leaf retention, nutritive value and seed yield. Here we report twenty-three polymorphic microsatellite markers that shall increase alternatives for exploiting the genome of this species providing novel tools for genetic studies in *C. mucunoides*.

In the present work, microsatellites were developed for *C. mucunoides* from a genomic enriched library, following the protocol described by Billotte et al. (1999). Genomic DNA samples were extracted from leaf tissues using the cetyltrimethyl ammonium bromide method, as described by Doyle & Doyle (1990). The DNA samples were digested with the *RsaI* restriction enzyme and ligated into the adapters 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' and 5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'. The genomic library was enriched for dinucleotide sequences using (CT)₈ and (GT)₈ biotinylated microsatellite primers with labelled probes, which were bound to Streptavidine MagneSphere Paramagnetic Particles, as described by the manufacturer. Selected fragments were amplified by PCR using primer sequences

complementary to the adapters and then ligated into the pGEM-T vector (Promega). Plasmids were introduced into *Escherichia coli* XL-1 Blue competent cells. Transformed cells were cultivated on agar plates containing 100 µg mL⁻¹ of ampicillin, 50 µg mL⁻¹ of X-galactosidase and Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).

A total of 96 clones were selected and bidirectionally sequenced in an ABI PRISM® 377 Automated Sequencer using the T7 and SP6 primers and the Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3. (PerkinElmer Applied Biosystems). Sequences containing microsatellites were assembled and edited in Seqman (DNASTar). Restriction sites in the DNA sequences were removed using the MICROSAT software (A. M. Risterucci, personal communication). The simple sequence repeat identification tool (SSRIT) was used to identify perfect microsatellites in the raw sequences (Temnykh *et al.* 2001). Sixty-two of these clones contained microsatellite sequences with more than five repeats and flanking regions suitable for primer design. The Primer Select software (DNASTar) was used to design 23 primer pairs.

The 23 selected microsatellite loci (**Table 1**) were characterized in 60 accessions of *C. mucunoides* from the germplasm collection of Embrapa Cerrados Research Center. Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were carried out in 25 µL total volume containing 10 ng of DNA template, 0.8 µM forward and reverse primers, 100 µM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, and 0.5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). All PCR amplifications were performed in a PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA/USA) using a touchdown cycling program described by Don *et al.* (1991). Amplification products were separated by electrophoresis on 3% agarose gels containing 0.1 mg ethidium bromide/ml in 1X TBE buffer, and 6% denaturing polyacrylamide gels in 1X TBE buffer. After each run, gels were silver stained according to Creste *et al.* (2001). A 10-bp DNA ladder (Invitrogen) was used as size standard.

Table 1. Characteristics of the twenty-three microsatellite markers of *Calopogonium mucunoides* Desv.

SSR locus	GenBank Accession no.	Repeat motif	TD (°C)	Primer sequences (5' - 3')	A	Size range(bp)	PIC	D	H _O	H _E	P-HWE	Null allele frequency
CL09	GQ398753	(GT) ₆	60 - 45	F:ATTGCCAAGCGAGATTATTA R:CCTTTCACGCTTTTCCTTTT	4	255bp	0.66	0.81	0.83	0.94	0.051 ^{NS}	0.000
CL11	GQ398754	(GT) ₉ ...(TC) ₆	60 - 45	F:TTAAATTAGCAGAGTGAAAA R:TTGAGGGGGAATAAAGT	5	189bp	0.72	0.88	0.75	0.95	0.000*	0.065 ^a
CL12	GQ398755	(TG) ₁₁	60 - 45	F:AGTGTTTTTGTTTTCTTTTAC R:GTGCTTTTCTCTATTGATTTT	6	284bp	0.88	0.96	0.07	0.90	0.329 ^{NS}	0.000
CL19	GQ398756	(AC) ₈	60 - 45	F:ATTATTTCTGTTTTCTTTGGTAT R:TGTAGTTAGCTTTGTTGTCTTG	10	217bp	0.89	0.99	0.77	0.97	0.002*	0.012 ^a
CL23	GQ398757	(GT) ₅ ...(TG) ₈	60 - 45	F:GTTAGAACCGACACTGA R:AACACCAATTACCACAT	8	254bp	0.82	0.96	0.68	0.94	0.548 ^{NS}	0.000
CL24	GQ398758	(CA) ₈	60 - 45	F:ATTGGGATTAAGAAAGGAC R:CTAAAGAAACGAAAATGTG	10	212bp	0.87	0.98	0.88	0.96	0.282 ^{NS}	0.000
CL26	GQ398759	(GT) ₆	60 - 45	F:CACTTATCATTAGCCTTGTA R:AATTTGACTCTTCTTGGTG	3	279bp	0.44	0.59	0.88	0.91	0.042 ^{NS}	0.000
CL27	GQ398760	(AG) ₁₆	60 - 45	F:AGAAAAAGACAGGAGTAG R:ATCAAGAAAGAAATAGAC	6	177bp	0.75	0.88	0.13	0.33	0.177 ^{NS}	0.000
CL29	GQ398761	(TG) ₇	60 - 45	F:TGCAGAGCTCCATAGTCAAA R:CTCTCCGTCTGCATCTTCAA	4	285bp	0.67	0.79	0.57	0.95	0.246 ^{NS}	0.000
CL33	GQ398762	(CA) ₈	60 - 45	F:GCAAGAAAATAGCAGTCAAA R:AGGGAAGGGAAAAATCATAG	5	245bp	0.83	0.94	0.88	0.95	1.000 ^{NS}	0.000
CL41	GQ398763	(AG) ₅ ...(GT) ₆	60 - 45	F:AAAGGTCAGTGCCAAAATA R:CCTCACATCACAAGAACA	4	298bp	0.52	0.69	0.31	0.74	1.000 ^{NS}	0.000
CL45	GQ398764	(AC) ₅	60 - 45	F:CCACACTCAACCCAAAACCTTA R:AAAACAACCTCCCTCATCAACAA	5	220bp	0.66	0.81	0.36	0.84	0.001*	0.000
CL50	GQ398765	(TG) ₁₁	60 - 45	F: AAAGGGCACAATTAAGAGGTT R: TGATGGAGAAGCAGAGAATGTA	4	240bp	0.60	0.82	0.79	0.93	0.002*	0.014 ^a
CL61	GQ398766	(CA) ₉	60 - 45	F:GTAAAGGAGAGGCTGAGGAAG R:TGAAGAGCAAGGAGGTATTA	4	249bp	0.59	0.76	0.59	0.93	0.088 ^{NS}	0.000
CL69	GQ398767	(TC) ₆	60 - 45	F:ACATGTTTCTAGATTGTTGTCT R:CTGCCGTAAGAATGGTAG	3	276bp	0.51	0.65	0.43	0.85	0.069 ^{NS}	0.000

Table 1. Continued.

SSR locus	GenBank Accession no.	Repeat motif	TD (°C)	Primer sequences (5' - 3')	A	Size range(bp)	PIC	D	H _O	H _E	P-HWE	Null allele frequency
CL71	GQ398768	(AC) ₈	60 - 45	F:TGTTCAACCTTGTGTCAGTCATTT R:CCCCCTCCCCATTTATTT	4	223bp	0.62	0.81	0.65	0.93	0.000*	0.024 ^a
CL93	GQ398769	(CA) ₇ ...(CT) ₅	60 - 45	F:AATGCATGCTGAACCACTTT R:TGACTCATGCCTAATAACCAC	5	247bp	0.58	0.71	0.05	0.72	0.001*	0.011 ^a
CL49.1	CQ906418	(CA) ₈	60 - 45	F:CATTTTTCCTTGTGGTGT R:TTGCTAAACTCGTGTATGTG	2	204bp	0.42	0.61	0.36	0.64	1.000 ^{NS}	0.000
CL100	CQ906419	(TG) ₆	60 - 45	F:AACCACAACACCCGAACCTT R:CCAGGGACACCATACACAT	2	234bp	0.44	0.69	0.43	0.67	1.000 ^{NS}	0.000
CL114	CQ906420	(TA) ₆ (GT) ₈ (TG) ₅	60 - 45	F:TTTTTAAATCACCACCTT R:ATCTTGAATGAAAATACTCTTA	2	245bp	0.23	0.55	0.29	0.68	0.132 ^{NS}	0.000
CL121	CQ906421	(TGT) ₄	60 - 45	F:CGTTTTTCGTCGTCGTTATCGTC R:CACAAATCCTCAATCCCCTTCC	2	260bp	0.45	0.67	0.48	0.66	0.256 ^{NS}	0.000
CL124	CQ906422	(CT) ₉ (CA) ₈	60 - 45	F:TTGAAAGAAAAGGAAAGT R:CCCATGAGGTGAAGAT	2	273bp	0.33	0.48	0.36	0.68	0.096 ^{NS}	0.000
CL104	CQ906423	(AGCCT) ₃	60 - 45	F:CGTGCGGTGAGTTGTGGA R:GGTTGGCTTAAGCTGGTTTTG	2	252bp	0.47	0.63	0.41	0.69	0.102 ^{NS}	0.000

F, forward sequence; R, reverse sequence;

TD – *touchdown PCR* with temperatures ranging from 60°C to 45°C;

A, total number of alleles per locus; PIC, polymorphism information content; D, discriminating power;

H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity;

P-HWE, P values for the HWE test, significance threshold adjusted using Bonferroni correction: $P(P\%) \leq 0.0029$;

^{NS}, not significant, *, significant;

^a, the presence of a null allele was detected by Micro-checker ver. 2.2.3 (<http://www.microchecker.hull.ac.uk/>).

The number of alleles per locus ranged from 2 to 10, with an average of 4.0 alleles per locus. Polymorphism information content (*PIC*) values were calculated for the purpose of assessing marker informativeness (Botstein *et al.* 1980). The *PIC* values ranged from 0.23 to 0.89 and averaged 0.60. The discriminating power (*D*) of each locus was estimated in order to compare the efficiency of markers in varietal identification (Tessier *et al.* 1999). The *D* values ranged from 0.48 to 0.99, with an average of 0.77. The highest *PIC* and *D* values were found in the CL19 and CL24 loci, which presented the highest number of alleles (10). The tools for genetic population analysis (TFPGA) (Miller 1997) was used to estimate the expected and observed heterozygosities and to evaluate the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). The observed and expected heterozygosity values ranged from 0.05 to 0.88 and 0.33 to 0.97, respectively. Six loci (CL11, CL19, CL45, CL50, CL71 and CL93) showed significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) after Bonferroni correction ($P\ 0.05 \leq 0.0029$). The loci CL11, CL19, CL50, CL71 and CL93 were significant for the presence of a null allele, as tested using the Micro-checker 2.2.3 (<http://www.microchecker.hull.ac.uk/>) software. The linkage disequilibrium (LD) was analyzed using the GDA software (Lewis & Zaykin 2002). No significant linkage disequilibrium was detected among all loci, according to the chi-squared test ($P < 0.001$).

The polymorphic microsatellite loci developed for *C. mucunoides* and described herein are potentially useful for genetic studies of this species, including analysis of population structure.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

Billotte N, Lagoda PJR, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54, 277-288.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32, 314-331.

Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep*, 19, 299-306.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.

Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, and Mattick JS (1991): "*Touchdown*" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, 19, 4008.

Lewis P, Zaykin D (2002) Genetic Data Analysis (GDA): Computer Program for the Analysis of Allelic Data (Software), version 1.1 (d12). <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/>.

McSweeney CS, Wesley-Smith RN (1986) Factors affecting the intake by sheep of the tropical legume, *Calopogonium mucunoides*. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 26, 659-664.

Miller MP (1997) Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

Pizarro EA, Carvalho MA (1997) Evaluation of a collection of *Calopogonium mucunoides* Desv. for the Cerrado Ecosystem, Brazil. *Agronomists*, 15, 17-21.

Tessier C, David J, This P, Boursiquot JM, Charrier A (1999) Optimizations of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 98,171-177.

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Catinhour S, McCouch S (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations and genetic marker potential. *Genome*, 11, 1441-1452.

Varela VP, Gurgel ESC (2001) Tratamentos pré-germinativos em sementes de Calopogônio (*Calopogonium mucunoides* Desv.) – Leguminosae, *Papilionoideae*. *Revista Ciências Agrárias*, 35, 89-96.

CAPÍTULO VII

RESULTADOS DO ARTIGO “Mating system and molecular characterization of *Calopogonium mucunoides* Desv. germplasm based on microsatellite markers”

A. C. B. Sousa¹ • M. A. Carvalho² • A. K. B. Ramos² • T. Campos¹ • D. A. Sforça¹ • M. I. Zucchi³ • L. Jank⁴ • A. P. Souza^{1,5}

¹ University of Campinas (UNICAMP), Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), CP 6010, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

² Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Cerrados, BR 020, Km 18. Planaltina – DF, CEP 73310-970, Brazil.

³ Agronomic Institute of Campinas, Pólo Apta Centro Sul – Rod. SP 127 km 30, Piracicaba – SP, CP 28, CEP 13400-970, Brazil.

⁴ Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Beef Cattle, Forage Breeding Dept, CP 154, Campo Grande – MS, CEP 79002-970, Brazil.

⁵ University of Campinas (UNICAMP), Biology Institute, Plant Biology Dept (DBV), CP6109, Campinas - SP, CEP 13083-970, Brazil.

Keywords: Microsatellite markers, mixed mating system, tropical forage legume, genetic diversity.

***O trabalho será submetido à revista *Euphytica*.**

RESULTADOS DO ARTIGO “Mating system and molecular characterization of *Calopogonium mucunoides* Desv. germplasm based on microsatellite markers”

Material vegetal

O banco de germoplasma é composto de 195 acessos procedentes da coleção do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (**Tabela 1**). Esses acessos estão sendo mantidos no campo, no Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrado (CPAC) em Brasília-DF.

Tabela 1. Origens dos 195 acessos de *Calopogonium mucunoides* Desv.

Código	*Número do acesso	Origem	Código	*Número do acesso	Origem
1	7983	Brasil	99	8353	Brasil
2	911	Brasil	100	8985	Brasil
3	825	Brasil	101	884	Brasil
4	8514	Brasil	102	8043	Brasil
5	8404	Brasil	103	9104	Brasil
6	8518	Brasil	104	8980	Brasil
7	8983	Brasil	105	18564	Brasil
8	8405	Brasil	106	7982	Brasil
9	8365	Brasil	107	9111	Brasil
10	19812	Pest Sumaria	108	8510	Brasil
11	18299	Colômbia	109	896	Brasil
12	7981	Brasil	110	7104	Panamá
13	8513	Brasil	111	8374	Brasil
14	8509	Brasil	112	887	Brasil
15	18065	Hainan	113	8129	Colômbia
16	18568	Brasil	114	826	Brasil
17	4035	Colômbia	115	7105	Panamá
18	20847	Brasil	116	2084	Brasil
19	7980	Brasil	117	8706	Venezuela
20	20846	Brasil	118	18107	Venezuela
21	18066	Hainan	119	18108	Venezuela
22	8544	Brasil	120	18109	Venezuela
23	8131	Colômbia	121	18997	Venezuela
24	18295	Colômbia	122	18998	Venezuela
25	7115	Panamá	123	18999	Venezuela
26	729	Colômbia	124	19000	Venezuela
27	17934	Colômbia	125	7303	Venezuela
28	18296	Colômbia	126	9187	Venezuela
29	17995	Colômbia	127	18099	Venezuela
30	7113	Panamá	128	20341	Venezuela

Tabela 1. Continuação.

Código	*Número do acesso	Origem	Código	*Número do acesso	Origem
31	17546	Colômbia	129	18102	Venezuela
32	9905	Colômbia	130	709	Venezuela
33	7116	Panamá	131	710	Venezuela
34	7117	Panamá	132	793	Venezuela
35	7114	Panamá	133	7299	Venezuela
36	17886	Colômbia	134	18100	Venezuela
37	18767	Colômbia	135	18101	Venezuela
38	18298	Colômbia	136	7300	Venezuela
39	7123	Panamá	137	7302	Venezuela
40	7120	Panamá	138	8705	Venezuela
41	7119	Panamá	139	8515	Brasil
42	7106	Panamá	140	19240	Panamá
43	8350	Brasil	141	17376	Terenggand
44	8125	Colômbia	142	7109	Panamá
45	7108	Panamá	143	8118	Colômbia
46	20124	Colômbia	144	830	Colômbia
47	18567	Brasil	145	9332	Belize
48	8208	Colômbia	146	19249	Panamá
49	7121	Panamá	147	741	Colômbia
50	18297	Colômbia	148	8120	Colômbia
51	20709	Colômbia	149	8115	Colômbia
52	18302	Colômbia	150	19248	Panamá
53	20710	Colômbia	151	7367	Não identificado
54	20123	Colômbia	152	20673	Se Sulawesi
55	18301	Colômbia	153	19509	Se Sulawesi
56	17513	Colômbia	154	20675	Se Sulawesi
57	8116	Colômbia	155	19506	Se Sulawesi
58	18471	Colômbia	156	19510	Se Sulawesi
59	7107	Panamá	157	943	Peru
60	18294	Colômbia	158	17785	Peru
61	8839	Colômbia	159	17786	Peru
62	7111	Panamá	160	20567	Peru
63	858	Colômbia	161	17856	Peru
64	20156	Colômbia	162	20324	México
65	17887	Colômbia	163	20329	México
66	7110	Panamá	164	20335	México
67	831	Colômbia	165	20337	México
68	20914	Colômbia	166	20338	México
69	8075	Colômbia	167	20340	México
70	18300	Colômbia	168	9450	México
71	8707	Venezuela	169	19513	Cent. Sulawesi
72	8117	Venezuela	170	951	Não identificado
73	17512	Colômbia	171	19513	Cent. Sulawesi
74	17851	Colômbia	172	19519	Cent. Sulawesi
75	7124	Panamá	173	19520	Cent. Sulawesi
76	18103	Venezuela	174	19522	Cent. Sulawesi
77	879	Bolívia	175	19523	Cent. Sulawesi
78	8709	Venezuela	176	9342	Esquintca
79	9185	Venezuela	177	17372	Perak
80	8708	Venezuela	178	18104	Venezuela
81	18106	Venezuela	179	770	Colômbia
82	17374	Johor	180	19245	Panamá
83	8113	Colômbia	181	19244	Panamá
84	7112	Panamá	182	19246	Panamá
85	17375	Pahang	183	20676	Se Sulawesi
86	7122	Panamá	184	19250	Panamá
87	7416	Brasil	185	17373	Negeri Sembil
88	891	Brasil	186	739	Não identificado
89	7722	Brasil	187	19532	Não identificado
90	18559	Brasil	188	9901	Não identificado
91	892	Brasil	189	20159	Não identificado
92	8133	Colômbia	190	18105	Venezuela
93	18557	Brasil	191	19505	Se Sulawesi
94	8978	Brasil	192	19504	Se Sulawesi
95	4043	Colômbia	193	19511	Se Sulawesi
96	20845	Brasil	194	19243	Panamá
97	893	Brasil	195	7118	Panamá
98	8517	Brasil			

* Número do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).

Seleção dos marcadores microsatélites e genotipagem

Para caracterização molecular do germoplasma de *C. mucunoides*, foram selecionados 17 marcadores microsatélites com os maiores índices de polimorfismo (PIC - *Polymorphism information content*) (Sousa et al. 2010). Os locos selecionados, suas respectivas temperaturas de anelamento, número de alelos/loco e o conteúdo de polimorfismo estão apresentados na **Tabela 2**.

Os produtos amplificados foram genotipados em géis de poliacrilamida a 6% corados com prata (Creste et al. 2001). A partir da genotipagem foi possível observar um total de 93 alelos. O número de alelos/loco variou de 4 a 8 com uma média de 5,5. Foram calculados os índices de PIC de cada loco. Essa estimativa fornece o conteúdo de polimorfismo de cada loco, levando em consideração o número de alelos por loco e suas frequências relativas (Botstein et al. 1980). Para estabelecer melhores combinações de marcadores microsatélites que permitissem a discriminação dos acessos selecionados, foi utilizada a metodologia de Tessier et al. (1999) para calcular o D (*Discriminating power*). Os índices de PIC variaram de 0,44 a 0,88, com uma média de 0,69. Os índices do D variaram de 0,59 a 0,96 com média de 0,82. O maior índice de PIC e D foi observado no loco CL88 (0,88), o qual apresentou 8 alelos.

Tabela 2. Marcadores microssatélites utilizados para caracterizar o germoplasma de *Calopogonium mucunoides* Desv.

Locos/ Número GenBank	Motivos	TD (°C)	Sequência dos primers (5' - 3')	A	Tamanho do produto	PIC	D
CL09 GQ398753	(GT) ₆	60 - 45	F:ATTGCGAACGCGAGATTATTA R:CCTTTTCACGCTTTTCCTTTTT	6	255bp	0,76	0,89
CL11 GQ398754	(GT) ₉ ...(TC) ₆	60 - 45	F:TTAAATTAGCAGAGTGAAAA R:TTGAGGGGGAATAAAAGT	4	189bp	0,62	0,78
CL12 GQ398755	(TG) ₁₁	60 - 45	F:AGTGTTTTTGTTTTCTTTTAC R:GTGCTTTTCTCTATTGATTTT	8	284bp	0,88	0,96
CL19 GQ398756	(AC) ₈	60 - 45	F:ATTATTTTCGTTTTCTTTGGTAT R:TGTAGTTAGCTTTGTTGCTTG	6	217bp	0,79	0,90
CL23 GQ398757	(GT) ₅ ...(TG) ₈	60 - 45	F:GTTAGAACCGACACTGA R:AACACCAATTACCAT	8	254bp	0,81	0,90
CL24 GQ398758	(CA) ₈	60 - 45	F:ATTGGGATTAAGAAAGGAC R:CTAAAGAAACGAAAATGTG	4	212bp	0,67	0,81
CL26 GQ398759	(GT) ₆	60 - 45	F:CACTTATCATTAGCCTTGTA R:AATTTGACTCTTCTTGGTG	3	279bp	0,44	0,59
CL27 GQ398760	(AG) ₁₆	60 - 45	F:AGAAAAGACAGAGTAG R:ATCAAGAAAGAAATAGAC	6	177bp	0,75	0,88
CL29 GQ398761	(TG) ₇	60 - 45	F:TGCAGAGCTCCATAGTCAAA R:CTCTCCGTCTGCATCTTCAA	6	285bp	0,77	0,89
CL33 GQ398762	(CA) ₈	60 - 45	F:GCAAGAAATAGCAGTCAAA R:AGGGAAGGGAAAAATCATAG	5	245bp	0,63	0,79
CL41 GQ398763	(AG) ₅ ...(GT) ₆	60 - 45	F:AAAGGTCAGTGCCAAAATA R:CCTCACATCACAAGAACA	4	298bp	0,55	0,70
CL45 GQ398764	(AC) ₅	60 - 45	F:CCACACTCAACCCAAAACCTTA R:AAAACAACCTCCCTCATCAACAA	6	220bp	0,83	0,94
CL50 GQ398765	(TG) ₁₁	60 - 45	F:AAAGGGCACAATTAAGAGATT R:TGATGGAGAAGCAGAGAATGTA	5	240bp	0,67	0,83
CL61 GQ398766	(CA) ₉	60 - 45	F:GTAAGGAGAGGCTGAGGAAG R:TGAAAGAGCAAGGAGGTATTA	4	249bp	0,53	0,75
CL69 GQ398767	(TC) ₆	60 - 45	F:ACATGTTTCTAGATTGTTGTCT R:CTGCCGTAAGAATGGTAG	6	276bp	0,71	0,85
CL71 GQ398768	(AC) ₈	60 - 45	F:TGTTCAACCTTGTCAGTCATTT R:CCCCCTCCCATTATTT	4	223bp	0,62	0,73
CL93 GQ398769	(CA) ₇ ...(CT) ₅	60 - 45	F:AATGCATGCTGAACCACTTT R:TGACTCATGCCTAATAACCAC	8	247bp	0,78	0,89

F, sequência *forward*; R, sequência *reverse*;

TD – *touchdown PCR* com temperatura variando de 60 °C a 45 °C;

A, número total de alelos por loco;

PIC, *Polymorphism information content*;

D, *Discriminating power*.

Caracterização molecular do germoplasma de *Calopogonium mucunoides*

Para análise da estruturação da diversidade genética sem hierarquização *a priori*, foi utilizada a abordagem bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). Foram testados os índices de K variando de 1 a 10. Para cada índice de K foram realizadas 10 corridas, 200,000 *burn-ins* e 300,000 simulações de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC). O número real de K foi selecionado a partir dos índices de ΔK , seguindo a metodologia descrita por Evanno et al. (2005). A partir dessa metodologia, o valor ideal de $k = 6$ foi identificado (**Figura 1**).

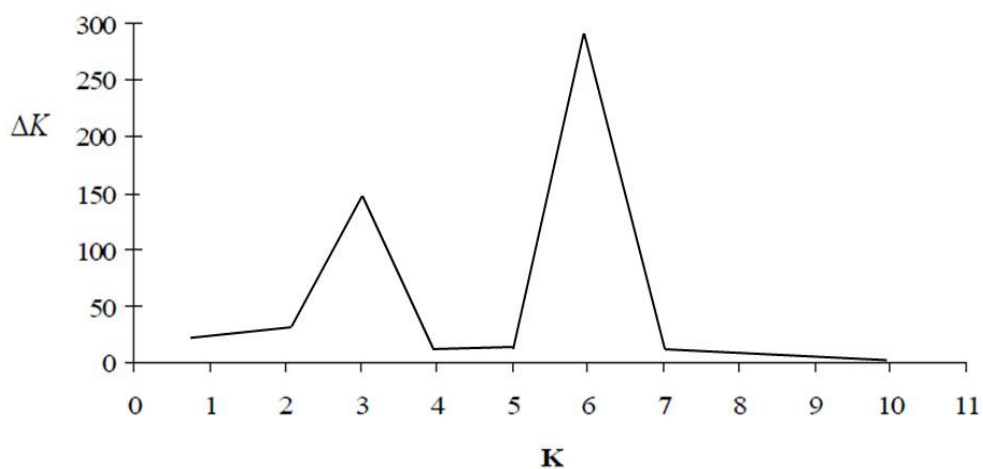


Figura 1. Melhor K de acordo com a metodologia de Evanno et al. (2005). O maior ΔK corresponde ao melhor agrupamento ($k = 6$).

Os 195 acessos de *C. mucunoides* foram atribuídos a seis grupos diferentes: G1 (vermelho), G2 (verde), G3 (azul), G4 (amarelo), G5 (rosa) e G6 (ocre) (**Figura 2**). Os acessos da Venezuela foram inseridos em um único grupo (G1), com distância genética média de 29% entre eles. Dos 45 acessos brasileiros analisados, 95% foram inseridos no mesmo grupo (G2). Esses acessos brasileiros compartilham *pools* gênicos com acessos da Colômbia (G6) e do Panamá (G3). Os acessos do Peru e do México compartilham *pools* gênicos muito semelhantes. Eles foram atribuídos ao mesmo grupo (G4). O único acesso da Bolívia foi inserido no grupo G1 e mostrou-se muito próximo dos acessos da Venezuela. Os acessos do Se Sulawesi foram agrupados em um único grupo (G5), revelando-se mais distintos dos demais grupos.

A análise de variância dos dados moleculares (AMOVA) foi realizada no software ARLEQUIN v.2.0 (Schneider et al. 2000), baseada no agrupamento do STRUCTURE. Essa análise é realizada através da decomposição da variação total nos componentes entre e dentro dos grupos, por meio das distâncias ao quadrado (Excoffier et al. 1992). A partir desse resultado foi possível verificar que a maior variância genética está entre os grupos (64,62%) dos genótipos provenientes de diferentes países (**Tabela 3**). Esses resultados confirmam o agrupamento do STRUCTURE.

As distâncias genéticas entre os 195 acessos de *C. mucunoides* foram geradas no software TFGA (*Tools for Population Genetic Analysis*) (Miller, 1997), utilizando o coeficiente de Rogers Modificado. O agrupamento foi gerado com o software DARwin v. 5.0.157 (Perrier and Jacquemoud-Collet, 2006), empregando o método Neighbor Joining (NJ). O gráfico foi pintado. As cores representam e correspondem ao agrupamento do STRUCTURE (**Figura 3**). Foi possível observar a formação de seis grupos distintos, com os índices de *bootstrap* variando de 53% a 99%. Isso revela a consistência entre esses agrupamentos. As distâncias genéticas entre esses acessos variaram de 0,22 a 0,92, com média de 0,42. Esses resultados

demonstram que existem acessos muito próximos entre si em determinadas regiões. O teste de atribuição (STRUCTURE) e o agrupamento NJ foram consistentes. Ambos formaram seis grupos bem definidos e representados pelos mesmos acessos.

A análise dos componentes principais (PCA) foi aplicada para visualizar os acessos individuais em um espaço multivariado, baseado nas distâncias genéticas entre cada acesso (**Figure 4**). A representação gráfica demonstrou que a relação genética entre os 195 acessos refletiu na sua distribuição geográfica (**Figura 5**). Ou seja, as origens desses acessos foram determinantes para formação de grupos. A distribuição geográfica dos acessos foi localizada com o auxílio do programa DIVA-GIS (Hijmans et al. 2001).

Os marcadores microssatélites desenvolvidos nesse trabalho, foram eficientes para diferenciar os acessos e caracterizar a diversidade genética do germoplasma de *C. mucunoides*.

Tabela 3. Resultados da AMOVA baseados nos agrupamentos do STRUCTURE.

Varição	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem	P-valor
Entre os grupos	5	211,994	5,843Va	64,62	0.0000
Dentro dos grupos	34	673,341	11,435Vb	35,62	-

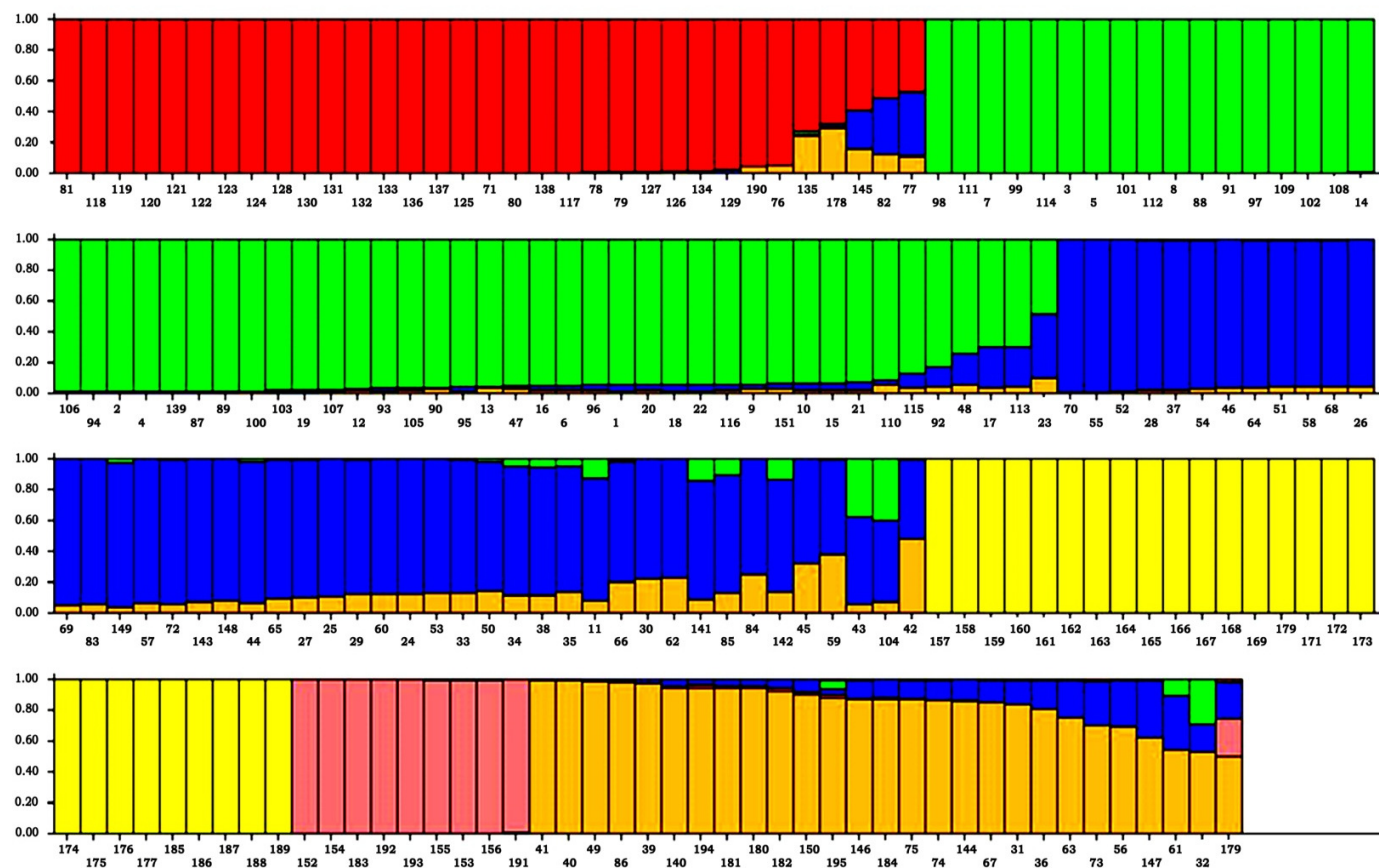


Figura 2. Teste de atribuição para os 195 acessos de *Calopogonium mucunoides* avaliados ($K=6$). Os acessos estão representados pelas barras verticais coloridas. A mesma cor em acessos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo acesso indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo.

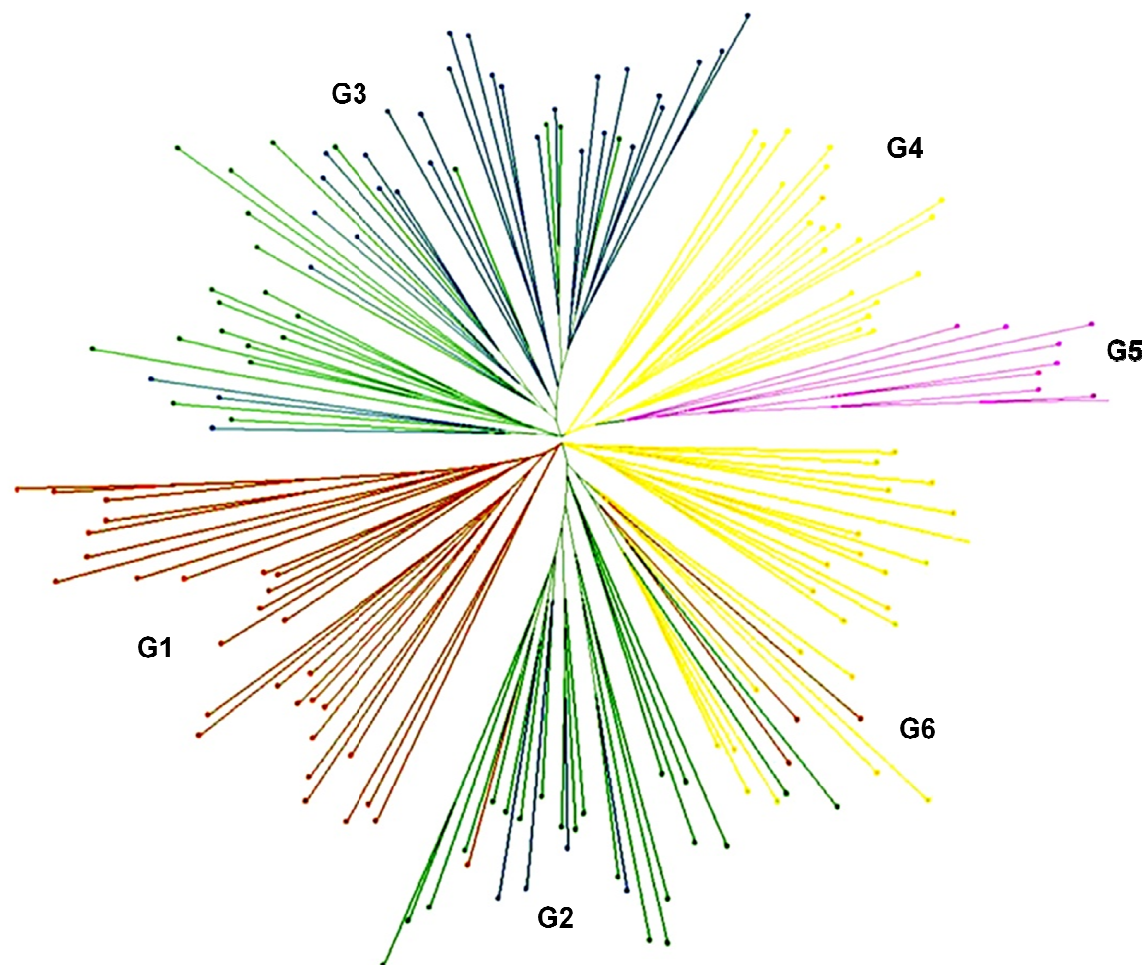


Figura 3. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de Rogers Modificada entre os 195 acessos de *Calopogonium mucunoides*. Agrupamento gerado pelo método Neighbor Joining (DARwin). As cores correspondem aos grupos obtidos na análise do STRUCTURE.

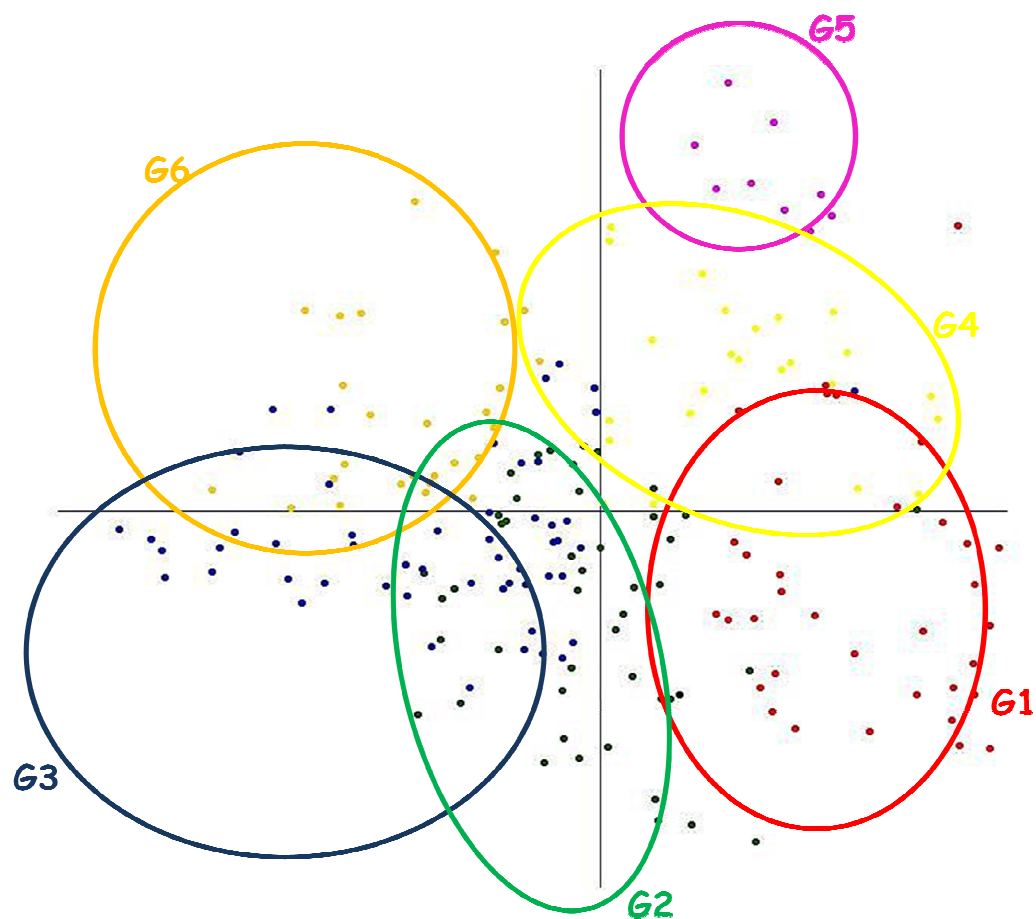


Figura 4. Distribuição genética dos 195 acessos de *Calopogonium mucunoides* obtida a partir dos componentes das coordenadas principais (PCA). As cores correspondem aos grupos obtidos na análise do STRUCTURE.

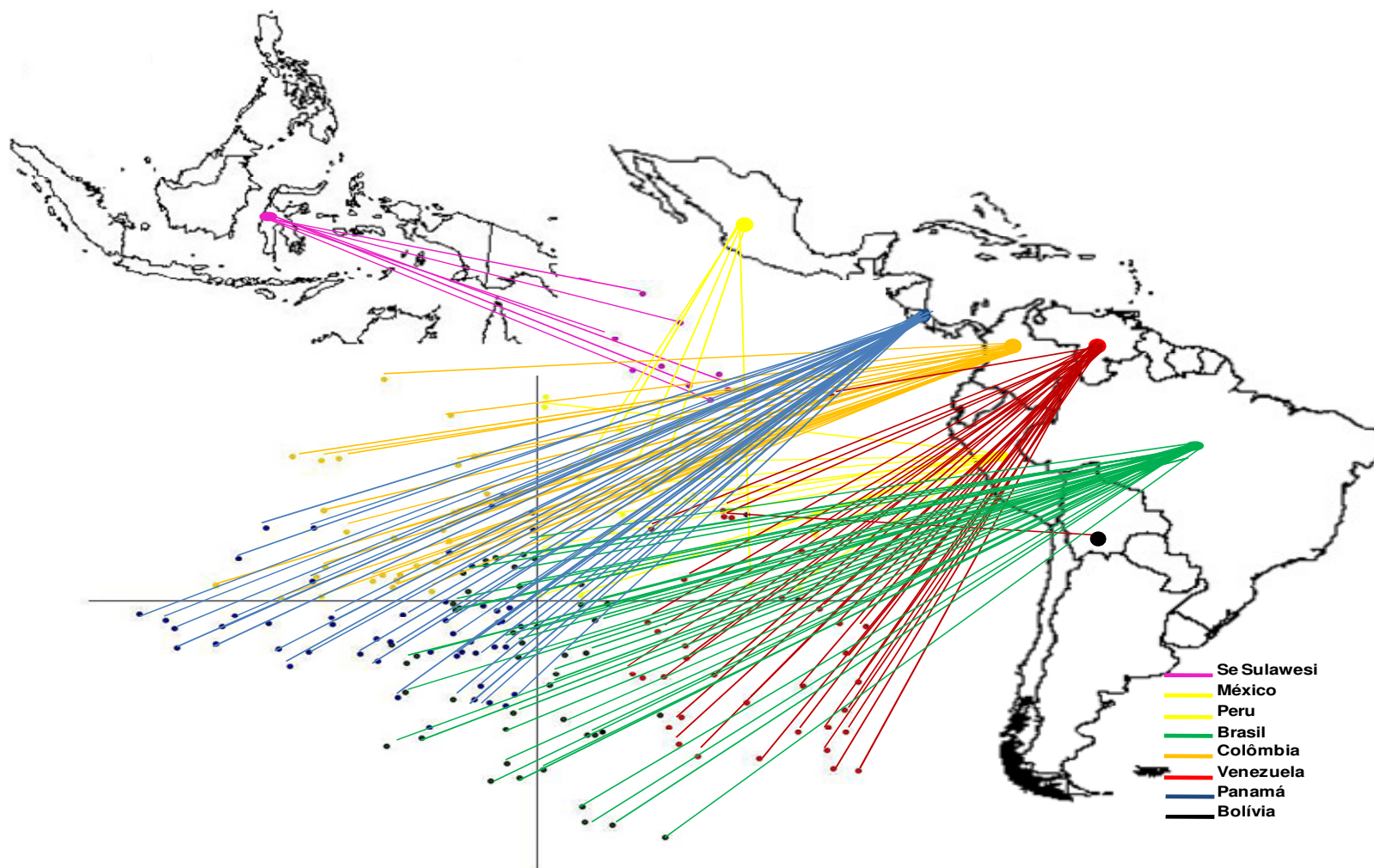


Figura 5. Distribuições geográficas e genéticas dos 195 acessos de *Calopogonium mucunoides*. As linhas indicam as posições dos acessos as suas respectivas origens geográficas no mapa. As cores correspondem aos grupos obtidos na análise do STRUCTURE.

Taxa de cruzamento

Para caracterização do sistema reprodutivo de *C. mucunoides* foram selecionadas aleatoriamente 10 plantas-mãe (**Tabela 4**), que estavam mantidas no campo (Embrapa Cerrados – Brasília - DF) sob condições naturais. Dessas 10 plantas foram coletadas 30 sementes e colocadas para germinação em caixas com vermiculita. Após germinação foram selecionadas 20 plantas por progênie, totalizando 200 plantas.

Table 4. Genótipos (plantas-mãe) selecionados para estimar a taxa de cruzamento em *Calopogonium mucunoides*.

Número do Genótipo	Origem
CIAT19522	Cent.
CIAT20845	Brasil
CIAT831	Colômbia
CIAT19511	Se Sulawesi
CIAT7107	Panamá
CIAT8980	Brasil
CIAT20335	México
CIAT7722	Brasil
CIAT19244	Panamá
CIAT19509	Se Sulawesi

Foram coletadas folhas jovens para extração do DNA, seguindo o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990). Dos marcadores microssatélites desenvolvidos para essa espécie (Sousa et al. 2010), foram selecionados 6 para genotipagem da população (**Tabela 5**).

Table 5. Marcadores microssatélites usados para estimar a taxa de cruzamento em *Calopogonium mucunoides*. A – número de alelos, H_o – heterozigosidade observada, H_E – heterozigosidade esperada e PIC (*Polymorphism information content*).

Nome do Loco	Número do Acesso/GenBank	A	H_o	H_E	PIC
CL09	GQ398753	4	0,23	0,62	0,63
CL12	GQ398755	3	0,32	0,27	0,41
CL19	GQ398756	3	0,17	0,32	0,39
CL23	GQ398757	2	0,09	0,43	0,28
CL93	GQ398769	3	0,18	0,53	0,46
CL45	GQ398764	2	0,32	0,61	0,14

Nas famílias, o número de alelos por loco variou de 2 a 4, com média de 2,8. Os índices de polimorfismo variaram de 0,14 a 0,63, com média de 0,38. A heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_o) foi calculada usando o programa GDA (*Genetic Data Analysis*) (Lewis & Zaykin, 2002). As H_E e H_o variaram de 0,27 a 0,62 e de 0,09 a 0,32, com média de 0,46 e 0,21, respectivamente. Esses resultados revelam a presença de poucos heterozigotos, indicando algum nível de endogamia.

O sistema reprodutivo de *C. mucunoides* foi analisado com base no modelo de cruzamento misto (Ritland & Jain, 1981), com o auxílio do programa Multilocus MLTR (*Multilocus Mating System Program*) (Ritland, 2002). Os parâmetros estimados foram:

- Taxa populacional de cruzamento multilocos (t_m);
- Taxa populacional de cruzamento loco simples (t_s);
- Taxa de cruzamento entre aparentados ($t_p = t_m - t_s$);
- Coeficiente de endogamia na geração maternal (F_m);
- Correlação de paternidade (r_p);
- Correlação de t entre progênies (r_t);
- Correlação de t entre os locos (r_{ta}).

O número de doadores de pólen para cada progênie ($1/r_p$) foi estimado seguindo a metodologia descrita por Ritland (1989). As variâncias das estimativas foram encontradas pelo método *Bootstrap*, cujas plantas dentro das famílias foram as unidades de reamostragens, obtendo-se, então, os desvios padrão a 95% de intervalo de confiança e, com isso, a significância dos índices das taxas de cruzamento.

As estimativas dos parâmetros analisados evidenciaram que *C. mucunoides* é uma espécie de reprodução mista e que nesse ciclo reprodutivo 83,7% das plantas foram originadas por autofecundação e 16,3% por cruzamentos (**Tabela 6**). A taxa de cruzamento loco simples foi de 11% (0,109). A diferença nas taxas de cruzamentos $t_m - t_s$, significativamente diferente de zero (5%), indica ocorrência de cruzamentos entre genitores aparentados. A correlação de paternidade foi de ($r_p = 0,339$) indicando que poucos pais contribuíram para a formação de famílias. O número de doadores de pólen ($1/r_p$) que contribuíram com cada família foi de 2,94. A correção de t estimada entre os locos foi alta (0,79) e a correção de t entre as progênies foi de 0,213, demonstrando que a taxa de cruzamento não variou entre locos, mas foi significativa entre as famílias. O coeficiente de endogamia (F_m) estimado para os genitores maternos foi de 0,049, o que indica uma baixa endogamia em cada genitor.

As estimativas da taxa de cruzamento mostradas nesse trabalho são os primeiros dados obtidos com marcadores microssatélite para *C. mucunoides*. Eles podem contribuir para domesticação, manutenção e conservação do germoplasma dessa espécie.

Tabela 6: Estimativas dos parâmetros associados ao modo de cruzamento de *Calopogonium mucunoides*.

Parâmetros estimados	Estimativas (erro padrão)
t_m	0,163 (0,051)
t_s	0,109 (0,041)
$t_m - t_s$	0,054 (0,033)
r_p	0,339 (0,042)
$1/r_p$	2,94
r_{ta}	0,79 (0,036)
r_t	0,213 (0,113)
F_m	0,049 (0,016)

(t_m), taxa populacional de cruzamento multilocos;

(t_s), taxa populacional de cruzamento loco simples;

($t_p = t_m - t_s$), taxa de cruzamento entre aparentados;

(r_p), correlação de paternidade;

(r_{ta}), correlação de t entre os locos;

(r_t), correlação de t entre progênies;

(F_m), coeficiente de endogamia na geração maternal.

Referências bibliográficas

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32: 314-331.

Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 299-306.

Doyle JJ & Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.

Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 18: 2611-2620.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes – application to human mitochondrial – DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.

Hijmans RJ, Guarino L, Cruz M, Rojas E. 2001. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. *Plant Genetic Resources*. 127: 15-19.

Lewis P & Zaykin D. 2002. Genetic Data Analysis (GDA): Computer Program for the Analysis of Allelic of allelic Data (Software), version 1.1 (d12). <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/>.

Miller MP. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

Perrier X & Jacquemound-Collet JP. 2006. DARwin software. Available from <http://www.darwin.cirad.fr/darwin>.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.

Ritland K & Jain S. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using an independent loci. *Heredity*. 47: 35-52.

Ritland K. 1989. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. *Evolution*. 43: 849-859.

Ritland K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating system using an independent loci. *Heredity*. 88: 221-228.

Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. ARLEQUIN: software for population data analysis, versão 2.0. University of Geneva.

Sousa ACB, Carvalho MA, Ramos AKB, Sforça DA, Campos T, Jungmann L, Zucchi MI, Jank L. Souza AP. 2010. Development and characterization of microsatellite loci for *Calopogonium mucunoides* Desv. Molecular Ecology Resources. 10: 576-579.

Tessier C, David J, This P, Boursiquot JM, Charrier A. 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. Theoretical and Applied Genetics. 98: 171-177.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A impotência das pastagens cultivadas vem diminuindo em área, mas aumentando em produtividade devido ao padrão de produção que se firmou nos últimos anos, exigindo cultivares mais produtivas e adaptadas a diferentes ecossistemas. O melhoramento genético tem sido responsável por esse avanço na agricultura, com o desenvolvimento de cultivares superiores. O sucesso desse avanço depende inicialmente do conhecimento da variabilidade genética existente em bancos de germoplasma, onde estão localizados valiosos recursos genéticos, os quais em sua maioria não são explorados por falta de conhecimentos genéticos básicos.

O conjunto de dados obtidos no presente trabalho demonstra um panorama inicial da diversidade e da estrutura genética encontrada no germoplasma de quatro espécies de forrageiras tropicais (*P. maximum*, *C. cajan*, *C. pubescens* e *C. mucunoides*) baseada em dados genotípicos, obtidos por meio de marcadores microssatélites. Esses resultados podem contribuir diretamente para o desenvolvimento de estratégias de conservação, manejo, identificação e seleção de acessos superiores mais precocemente e com maior confiabilidade. Consequentemente pode garantir a obtenção de ganhos genéticos superiores, principalmente para as espécies que tem um programa de melhoramento genético definido (*P. maximum* e *C. cajan*).

Elevados índices de diversidade genética foram encontrados no germoplasma de *P. maximum*, utilizando marcadores microssatélites desenvolvidos nesse estudo (Capítulos I e II). A estruturação da diversidade genética molecular interespecífica foi consistente nos diferentes métodos de análises (NJ, PCA e STRUCTURE). A análise bayesiana realizada com o programa STRUCTURE atribuiu os 396 acessos de *P. maximum* a quatro *clusters* bem

definidos. Para definição de como a diversidade está estruturada, o procedimento da AMOVA foi utilizado e demonstrou maior variação dentro dos *clusters* (55,62%).

O padrão de distribuição da diversidade genética encontrado nessa coleção reflete as evidências biológicas (apomixia) e históricas disponíveis para essa espécie (Combes & Pernès 1970; Savidan 1982a). A coleção brasileira de *P. maximum* é a mais completa da espécie, e pode ser considerada representativa da variabilidade natural existente devido à abrangência ecogeográfica das expedições de coleta, realizadas no centro de origem da espécie (África). *P. maximum* é uma espécie apomítica com uma ampla variação fenotípica. Os resultados obtidos nesse estudo indicam valiosos recursos genéticos que poderá garantir a variabilidade genética dessa espécie.

De modo tradicional, a seleção é realizada com base nas características fenotípicas de interesse para uma produção animal mais eficiente. Essa estratégia tem obtido sucesso para característica de alta herdabilidade, ou seja, quando o fenótipo reflete a constituição genética do indivíduo. Porém, para características de baixa herdabilidade, na qual o fenótipo não reflete o genótipo, o ganho é reduzido.

Uma consequência dessa caracterização foi encontrada no germoplasma de *C. cajan* (Capítulo III). A baixa média de marcadores microssatélites polimórficos evidenciaram uma estreita variabilidade genética entre os 77 genótipos analisados. As análises moleculares realizadas no presente trabalho revelaram a presença de genótipos muito próximos geneticamente, principalmente entre os que foram selecionados e submetidos a sucessivas autofecundações para obtenção de linhagens. A baixa variabilidade genética pode ser devido à seleção com base nas características agronômicas de interesse, principalmente relacionadas à produção de matéria seca. A seleção de genótipos para essa exclusiva finalidade pode ter afunilado a variabilidade genética da coleção de trabalho da Embrapa Pecuária Sudeste. A caracterização do germoplasma com marcadores microssatélites revelou diferenças genéticas

entre os genótipos, com maior precisão e sem o obscurecimento causado pelo efeito ambiental. Esses resultados revelam a necessidade de ampliar a base genética para aumentar a chance de sucesso na seleção e no melhoramento genético dessa espécie.

De modo geral, existem várias leguminosas forrageiras em pastagens naturais e em áreas de cultivo, pouco estudadas. Entre elas estão *C. pubescens* e *C. mucunoides* que poderão contribuir para a produção animal através de sua utilização mais intensa.

Nesse manuscrito foram desenvolvidos os primeiros marcadores microsatélites para essas duas espécies (Capítulos IV e VI). Os marcadores microsatélites específicos de *C. pubescens* foram transferidos para 11 diferentes espécies do gênero *Centrosema* (*C. pascuorum*, *C. brachypodium*, *C. brasilianum*, *C. rotundifolium*, *C. acutifolium*, *C. terezae*, *C. arenarium*, *C. tetragonolobum*, *C. macrocarpum*, *C. plumieri* e *C. sagitatum*). Esse gênero abriga outras espécies com potencial forrageiro e esses marcadores podem ser utilizados na caracterização da diversidade genética dessas espécies.

A caracterização molecular do germoplasma de *C. mucunoides* permitiu quantificar a divergência genética entre 195 acessos e correlacionar com as informações geográficas (Capítulo VII). O germoplasma é composto de acessos procedentes da Venezuela, Brasil, Colômbia, Bolívia, Panamá, Peru, México e de algumas regiões da Indonésia. A análise bayesiana (programa STRUCTURE) atribuiu esses acessos a seis *clusters* diferentes. Esse agrupamento refletiu em suas respectivas distribuições geográficas (programa DIVA-GIS). Ou seja, as origens desses acessos foram determinantes para formação de *clusters*. A estruturação dessa distribuição foi confirmada pela AMOVA, a qual revelou 64,62% de variação entre os *clusters*. Tais informações além de permitirem a identificação de combinações gênicas adaptativas de interesse, podem orientar atividades de coleta e conservação *ex situ*.

Considerando o potencial dessas duas espécies (*C. pubescens* e *C. mucunoides*) a taxa de cruzamento foi estimada com os marcadores microsatélites desenvolvidos no presente

trabalho (Capítulos V e VII). Os diferentes sistemas de cruzamento e, conseqüentemente, o fluxo gênico, têm um grande efeito na composição genética e na fertilidade de populações naturais. Tais aspectos estão também relacionados a questões evolutivas e de conservação das espécies em geral. Embora *C. pubescens* e *C. mucunoides* sejam consideradas autógamas, a taxa de fecundação cruzada foi de 26% e 16%, respectivamente.

Os resultados observados nesse estudo caracterizam essas duas espécies com um sistema misto de cruzamento com predominância de autogamia. Esses resultados são os primeiros relatos de estimativas da taxa de cruzamento, ao nível de família, obtidos com marcadores microssatélites para essas duas espécies. As estimativas da taxa de cruzamento para outras espécies do gênero *Centrosema* obtidas a partir de caracteres morfológicos, também apontaram um sistema misto de reprodução (Shaw et al. 1981; Maass and Torres, 1992). Em espécies autógamas, a taxa de cruzamento pode ser influenciada pela presença de insetos polinizadores, intensidade do vento, temperatura e umidade. Essa condição representa uma garantia de manutenção da variabilidade em condições naturais.

CONCLUSÕES GERAIS

A metodologia empregada na construção da biblioteca genômica enriquecida em microssatélites [(CT)₈ e (GT)₈] foi eficiente nas três espécies de forrageiras tropicais (*P. maximum*, *C. pubescens* e *C. mucunoides*). Foi possível isolar locos de microssatélites específicos polimórficos e transferi-los entre diferentes espécies. Os marcadores microssatélites foram eficazes na avaliação da diversidade genética do germoplasma (*P. maximum*, *C. cajan*, *C. pubescens* e *C. mucunoides*) e na caracterização dos sistemas reprodutivo de *C. pubescens* e *C. mucunoides*.

Os resultados obtidos no presente trabalho a partir dessas análises, permitem concluir para:

a) *Panicum maximum* Jacq.

- O germoplasma de *P. maximum* foi coletado em duas regiões específicas da África (Quênia e Tanzânia), as quais não foram determinantes para a formação de grupos. A distribuição desses acessos por componentes principais mostrou o grau de relacionamento desses acessos nessas duas regiões. A ampla distribuição mostrou a importância da segunda coleta em regiões mais específicas. Essa delimitação ampliou a variabilidade genética nessa coleção;
- Os 396 acessos de *P. maximum* (apomíticos e sexuais) avaliados com 30 marcadores microssatélites, foram atribuídos a quatro grupos distintos (STRUCTURE), evidenciando uma ampla diversidade genética. Esse conhecimento é um pré-requisito para o

melhoramento e pode orientar o melhorista na seleção de acessos candidatos com mais eficiência;

➤ Os acessos sexuais foram agrupados entre os apomíticos autotetraplóides. Eles tiveram seus cromossomos duplicados artificialmente com colchicina para obtenção de acessos tetraplóides sexuais, para uso em programas de melhoramento;

➤ Essa análise permitiu a caracterização e a discriminação das variedades comerciais brasileiras e estrangeiras;

➤ Foi possível identificar acessos duplicados dentro do germoplasma por meio da análise molecular e dos caracteres morfológicos;

➤ Os microsatélites polimórficos específicos de *P. maximum* foram transferidos para 4 diferentes espécies de forrageiras tropicais (*Brachiaria humidicola*, *B. brizantha*, *Paspalum regnelli* e *P. notatum*). A menor porcentagem de transferibilidade foi observada nas duas espécies de *Paspalum* por serem mais distantes filogeneticamente. Esses dois gêneros foram selecionados devido ao impacto no mercado de forrageiras no Brasil e a sua importante contribuição para o desenvolvimento de pastagens tropicais.

b) *Cajanus cajan* (L.) Millsp.

➤ Os marcadores microsatélites selecionados da literatura foram úteis na avaliação da diversidade genética entre 77 genótipos de *C. cajan*, selecionados do programa de melhoramento da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos-SP;

- O polimorfismo detectado nos locos de microssatélites foi baixo. Esse resultado pode ser justificado devido à base genética estreita da coleção que foi introduzida no Brasil, ou a pré-seleção desses genótipos com base em características agrônômicas de interesse, principalmente relacionadas à produção de matéria seca;
- O padrão de agrupamento do STRUCTURE e do DARwin (método Neighbor Joining) baseado nos dados genotípicos e na distância genética (Coeficiente de Rogers Modificado) revelou a presença de genótipos muito próximos do ponto de vista genético. Isso ocorre, principalmente, entre os genótipos que foram selecionados e inseridos no programa de melhoramento da Embrapa Pecuária Sudeste, para serem utilizados em sistemas de integração lavoura-pecuária e na recuperação de áreas degradadas. Esses resultados evidenciaram a necessidade de ampliar a base genética da coleção para aumentar os ganhos genéticos na seleção e no melhoramento;
- Os marcadores microssatélites específicos de *C. cajan* foram transferidos para *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*. Os locos que foram transferidos exibiram polimorfismos em alguns genótipos. Essa metodologia pode ser vantajosa por diminuir o custo de desenvolvimento de marcadores específicos para espécies filogeneticamente próximas.

c) *Centrosema pubescens* Benth.

- Os microssatélites polimórficos específicos de *C. pubescens* foram transferidos para outras 11 diferentes espécies do gênero *Centrosema*. Alguns locos amplificaram em todas as espécies, indicando a presença de regiões conservadas entre essas espécies;

➤ A estimativa da taxa de cruzamento em *C. pubescens* indicou a presença de um sistema misto de cruzamento (26%) com predominância da autogamia. Essa condição representa uma garantia de manutenção da variabilidade genética, que é necessária para se manter no ambiente diante das pressões ambientais naturais tão comuns em áreas tropicais.

c) *Calopogonium mucunoides* Desv.

➤ O teste de atribuição (STRUCTURE) e o padrão de agrupamento Neighbor Joining (DARwin) baseados em dados genotípicos, refletiu o grau de diversidade genética do germoplasma de *C. mucunoides*. Os 195 acessos avaliados foram inseridos em seis diferentes grupos, os quais estão relacionados com as suas respectivas origens;

➤ A caracterização molecular revelou pouca variabilidade genética dentro dos grupos, embora tenha sido possível identificar alguns acessos mais divergentes. A maior variação foi observada entre os grupos;

➤ Os 17 marcadores microssatélites utilizados foram suficientes para caracterizar grupos de acessos de origem geográfica comum. A discriminação desses acessos fornece uma melhor compreensão sobre a estrutura genética e a localização da variabilidade. Esses resultados promovem subsídios para a conservação e uso dos recursos genéticos disponíveis no germoplasma dessa espécie;

➤ A estimativa da taxa de cruzamento em *C. mucunoides* também indicou a presença de um sistema misto de cruzamento (16%) com predominância da autogamia. O conhecimento da taxa de cruzamento fornece subsídios para estratégias de coleta, domestificação, manejo e conservação do germoplasma. Além disso, esse conhecimento é importante na multiplicação de sementes, prevenindo misturas entre diferentes genótipos e consequentemente, garantindo a integridade de cada acesso.

PERSPECTIVAS

O germoplasma de *P. maximum* é composto por valiosos recursos genéticos, porém grande parte dele permanece inexplorado por falta de conhecimentos genéticos básicos. Nesse contexto, os resultados moleculares obtidos a partir da caracterização do germoplasma de *P. maximum* com os marcadores microssatélites, serão analisados juntos com os dados morfológicos e agronômicos. A partir daí espera-se identificar genótipos apomíticos superiores candidatos a novas cultivares e selecionar genitores elites para novos cruzamentos nessa espécie.

A avaliação agronômica do germoplasma de *C. mucunoides* apresentou materiais com potencial agronômico superior ao *C. mucunoides* utilizado no Brasil. As características morfológicas estão sendo avaliadas na Embrapa Cerrados em Brasília – DF. Buscando contribuir com esse estudo, os resultados moleculares obtidos nesse trabalho serão analisados em conjunto com dados agronômicos e morfológicos.

Além disso, os marcadores microssatélites desenvolvidos nesse trabalho poderão ser utilizados na:

- Na identificação de híbridos, de apomíticos, de clones e de variedades;
- Seleção de genitores;
- Construção de mapa genético;
- Seleção assistida;
- Identificação de um marcador ligado a apomixia (*P. maximum*) e;
- Redução do número de acessos avaliados no programa de melhoramento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Abdel-Ghani AH, Parzies HK, Omary A, Geiger HH. 2004. Estimating the outcrossing rate of barley landraces and wild barley populations collected from ecologically different regions of Jordan. *Theoretical and applied genetics*. 109: 588-595.

Agronegócio. 2008. O emprego das leguminosas resulta em significativas melhorias nas características do solo e na nutrição animal: quanta utilidade. Disponível em: http://www.facholi.com.br/boletins/agroeponto_02.pdf. Acessado em 09/06/2010.

Aita C. 2001. Plantas de cobertura de solo como fonte de nitrogênio ao milho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 25: 157-165.

Almeida RG. 2003. Disponibilidade, composição botânica e valor nutritivo da forragem de pastos consorciados, sob três taxas de lotação. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 32: 36-46.

Argel P & Keller-Grein G. 1996. Regional experience with *Brachiaria*: Tropical America-Humid Lowlands. In: Miles, J. W., Maass, B. L. and do Valle C. V. B. (eds) *Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement*. Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT. Cali, Colômbia. 205-224p.

Asker SE & Jerling L. 1992. *Apomixis in plants*. Boca Raton: CRC. 298p.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Barcellos AO. 2008. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteínas, nos trópicos brasileiros. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 37: 51-67.

Barcelos MFP, Tavares DQ, Silva MAAP. 1999. Technological and sensorial aspects of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) canned at different stages of maturation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* (online). 19 (1): 73-83.

Battistin A & Vargas MG. 1989. A cytogenetic study of seven species of *Centrosema* (DC) Benth. (Leguminosae-Papilionoideae). *Revista Brasileira de Genética*. 12:319-329.

Beltrame TP & Rodrigues E. 2007. Guandu bean (*Cajanus cajan* (L.) Millisp) on tropical forest restoration. *Semina: Ciências Agrárias*. 28 (1): 19-28.

Bewley JD & Black M. 1982. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination, viability, dormancy and environmental control. Berlin: Springer-Verlag, volume 2.

Billotte N, Lagoda PJL, Risterucci AM, Baurens FC. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*. 54: 277-288.

Bogdan AV. 1977a. *Panicum maximum* Jacq. In: Bogdan AV. Tropical pasture and fodder plants: grasses and legumes. Tropical Agriculture Series. 181-193p.

Bogdan AV. 1977b. Tropical pasture and fodder plants – Grasses and legumes. London and New York. 475p.

Borém AB & Miranda GV. 2005. Melhoramento de plantas. 4 ed. Viçosa: Editora UVF. 525p.

Borém A & Caixeta ET. 2006. Marcadores moleculares. Viçosa: Editora UFV, 374p.

Boumann BA. 1999. Pasture degradation and restoration by legumes in humid tropical Costa Rica. *Tropical Grasslands*. 33 (20): 98-110.

Brown AHD & Allard RW. 1970. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. *Genetics*. 66: 133-145.

Carvalho-Okano RM & Leitão Filho HF. 1985. Revisão taxonômica do gênero *Calopogonium* Desv. (*Leguminosae – Lotoideae*) no Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 8: 31-45.

Clements RJ, Williams RJ, Grof B, Hacker JB. 1983. *Centrosema*. In: The role of *Centrosema*, *Desmodium* and *Stylosanthes* in improving tropical pastures (Burt RL, Rotar PP, Walker LMW. Silvey, eds). Boulder, Colorado. Westview Press. 69-96p.

Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*. 10(2):349-356.

Combes D & Pernès J. 1970. Variations dans le nombres chromosomiques du *Panicum maximum* Jacq. en relation avec le mode de reproduction. *Comptes Rendues Academie des Sciences*. 270: 782-785.

Combes D. 1975. Polymorphisme et modes de reproduction dans la section des Maximae du genre *Panicum* (Graminées) en Afrique. Paris: ORSTOM. (Mémoires ORSTOM, 77). 99p.

Costa NL. 1998. Avaliação agronômica de *Panicum maximum* cv. Tobiatã em consorciações com leguminosas forrageiras tropicais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 33:39p.

Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 299-306.

Cruz Filho AB, Jorge EMP, Alvin MJ. 1983. Comparação entre populações de *Calopogonium mucunoides* Desv. *Revista de Zootecnia*. 21 (1): 61-70.

Dall'Agnol M & Schifino-Wittmann MT. 2005. Apomixis, Genetics and Plant Breeding. *Revista Brasileira de Agrociências*. 11: 127-133.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Diáz M, Echenique V, Schrauf G, Cardone S, Polci P, Lutz B, Spangenberg G. 2004. Biotecnología y mejoramiento genético de espécies forrajeras. Ria-INTA. Argentina. 33:77-104.

Esquinas-Alcázar JT. 1993. Plant genetic resources. In: Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa I. Plant Breeding: principles and prospects. London: Chapman Hall. 33-51p.

Euclides VPB, Macedo MCM, Oliveira MP. 1995. Avaliação de ecotipos de *Panicum maximum* sob pastejo em pequenas parcelas. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Brasília: SBZ. Anais... 33: 97-99.

Evangelista AR & Rocha GP. 1997. Forragicultura. Lavras: UFLA/FAEPE. 246p.

Fernandes MF, Barreto AC, Emídio Filho J. 1999. Fitomassa de adubos verdes e controle de plantas daninhas em diferentes densidades populacionais de leguminosas. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 34 (9): 1593-1600.

Ferreira ME & Grattapaglia D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília.

Ferreira ME, Moretzsohn MC, Buso GSC. 2007. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: Nass LL (ed.). Recursos Genéticos Vegetais. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 377-420p.

Frankel R & Galun E. 1977. Pollination mechanisms, reproduction, and plant breeding. Berlin: Springer-Verlag. Monographs on theoretical and applied genetics. Volume 2.

Fukuda WMG, Costa IRS, Vilarinhos AD, Oliveira RP. 1996. Banco de germoplasma de mandioca: manejo, conservação e caracterização. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMPF. (Embrapa- CNPMPF. Documento, 68). 103p.

Gama TCM. 2007. Avaliação de leguminosas forrageiras lenhosas como banco de proteínas para a suplementação de ruminantes. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 34p.

Gauer L, Albarus MH, Cavalli-Molina S. 2001. Variabilidade isoenzimática em progênes de biótipos apomíticos de *Paspalum dilatatum* (Poaceae). Ciência Rural. 31: 799-804.

Godoy R, Batista LAR, Negreiros GF. 1994. Avaliação agronômica e seleção de germoplasma de guandu forrageiro (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). Revista Brasileira de Zootecnia. 23: 742-749.

Godoy R, Batista LAR, Negreiros GF. 1995. Avaliação agronômica de guandu forrageiro (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). Revista Brasileira de Zootecnia. 24: 730-742.

Godoy R, Batista LAR, Negreiros GF. 1997. Avaliação agronômica e seleção de germoplasma de guandu forrageiro (*Cajanus cajan* (L.) Millsp proveniente da Índia. Revista Brasileira de Zootecnia. 26: 447-453.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Godoy R, Batista LAR, Souza FHD. 1993. Caracterização de linhagens puras de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). Revista Brasileira de Zootecnia. 32 (3): 546-555.

Godoy R, Fushita AT, Dübbern De Souza FH. 2004. Caracterização de onze linhagens puras de guandu selecionadas em São Carlos, SP. Revista Brasileira de Zootecnia. 33: 2206-2213.

Goldstein Bd & Schlotterer C. 2001. Microsatellites: evolution and application. Oxford: Oxford University Press. 352p.

Greenland DJ. 1981. Soil management and soil degradation. Journal Soil Science. 32: 301-322.

Grof B, Fernandes CD, Fernandes ATF. 2001. New *Stylosanthes guianensis* for tropical grasslands. In: Proceedings of the XIX International Grassland Congress, São Paulo, Brazil.

Hamrick JL. 1990. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In Isozymes in plant biology (Soltis DE & Soltis PS eds.). Chapman & Hall. 87-105p.

Hamrick J & Godt M. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 351: 1291-1298.

Hanna WW. 1995. Use of apomixes in cultivar development. Advances in Agronomy. 54: 333-354.

Hanna WW & Bashaw EC. 1987. Apomixis: its identification and use in plants. *Science*. 27: 1136-1139.

Hitchcock AS. 1950. *Manual of the Grasses of the United States*. 2nd ed. (Revised by A. Chase.) Washington, D.C.: Government Printing Office.

Humphreys LR, Ivory DA, Wong CC, Topark-Ngarm A. 1990. Regional experience with *Centrosema*: Tropical Asia and Pacific. In: Schultze-Kraft R and Clements RJ. (eds) *Centrosema: Biology, Agronomy, and Utilization*. (Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT]: Cali, Columbia). 543 – 558p.

ICRISAT. 1984. Pigeonpea. In: ICRISAT annual report 1984. Andhra Pradesh. 167-194p.

Jank L, Costa JCG, Savidan YH, Valle CB. 1993. New *Panicum maximum* cultivars for diverse ecosystems in Brazil. In: International Grassland Congress. Palmerston North. Proceedings... New Zealand Grassland Association. 17: 509-511.

Jank L. Savidan YH, Souza MT, Costa JCG. 1994. Avaliação do germoplasma de *Panicum maximum* introduzido da África: 1. Produção forrageira. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Viçosa, MG. 23: 433-440.

Jank L. 1995. Melhoramento e seleção de variedades de *Panicum maximum*. In: Simpósio sobre Manejo da Pastagem. Piracicaba, Anais... FEALQ. 12: 21-58.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Jank L, Calixto S, Costa JCG, Savidan YH, Curvo JBE. 1997. Catalog of the characterization and evaluation of the *Panicum maximum* germplasm: morphological description and agronomical performance. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 68). 53p.

Jank L, Valle CB, Resende RMS. 2005. Grass and forage plant improvement in the tropics and sub-tropics. In: D. A. McGilloway (ed), Grassland: A Global Resource. Wageningen Academic Publishers, Wageningen. 69-81p.

Kalisz S, Vogler DW, Hanley KM. 2004. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature*. 430: 884-887.

Koltunow AM. 1995. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell*. 5: 1425-1437.

Koltunow AM, Bicknell RA, et al. 1995. Apomixis: molecular strategies for the genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology*. 108: 1345-1352.

Lascano CE. 1994. Nutritive value and animal production of forage *Arachis*. In: Kerridge PC, Hardy B. Biology and agronomy of forage *Arachis*. Colômbia: CIAT. 109-121p.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Leopoldino WM. 2000. Avaliação nutricional de pastagens consorciadas com leguminosas tropicais, dinâmica ruminal e produção de leite de vacas mestiças. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 49f.

Litt M & Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*. 44: 397-101.

Loigier HA. 1994. Descriptive Flora of Puerto Rico and Adjacent Islands. Spermatophyta. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. Volume 1-5.

Maass BL & Torres AM. 1992. Outcrossing in the tropical forage legume *Centrosema brasilianum* (L) Benth. Book of Poster Abstracts XIIIth Eucarpia Congress. Angers. France. 465-466p.

Macedo MCM. 2006. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: Barbosa RA. (Ed.) Morte de pastos de Braquiárias. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte. 35-65p.

McSweeney CS & Wesley-Smith RN. 1986. Factors affecting the intake by sheep of the tropical legume, *Calopogonium mucunoides*. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 26: 659-664.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Miles JW, Clements RJ, Grof B, Serpa A. 1990. Genetics and breeding of *Centrosema*. In: *centrosema: biology, agronomy, and utilization* (Schultze-Kraft R & Clements RJ, eds). Cali, Colombia: CIAT publication. 92: 245-270.

Nascimento JT. 2003. Efeito de leguminosas nas características químicas e matéria orgânica de um solo degradado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental*. 7: 457-462.

Nogler GA. 1982. How to obtain diploid apomictic *Ranunculus auricomus* plants not found in the wild state. *Botânica Helvetica*. 92: 13-22.

Novaes IM & Penteado MIO. 1993. Chromosomic observations in *Centrosema*. *Revista Brasileira de Genética*. 16: 441-447.

Nworgu FC & Fasogbon FO. 2007. *Centrosema* (*Centrosema pubescens*) Leaf Meal as Protein Supplement for Pullet Chicks and Growing Pullets. *International Journal of Poultry Science*. 6: 255-260.

Odeyinka SM, Oyedele OJ, Adeleke TO, Odedire JA. 2008. Reproductive performance of rabbits fed *Moringa oleifera* as a replacement for *Centrosema pubescens*. *Reproduction*. 10: 411-415.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Olufowote JO, Xu YB, Chen XL, Park WD, Beachell HM, Dilday RH, Goto M, McCouch SR. 1997. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L) using microsatellite and RFLP markers. *Genome*. 40(3): 370-378

Paiva JR, Kageyama PY, Vencovsky R. 1993. Outcrossing rates and inbreeding coefficients in rubber trees (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.DC.) Müll. Arg.). *Revista Brasileira de Genética*. 16: 1003-1011.

Paiva JR, Kageyama PY, Vencovsky R. 1994. Genetics of rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex A.DC.) Müll. Arg.) 2. Mating system. *Silvae Genética*. 43: 373-376.

Pereira AV, Valle CB, Ferreira RP, Miles JW. 2001. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: Nass LL, Valois ACC, Melo IS, Valadares-Inglis MC. (eds.). *Recursos Genéticos & Melhoramento – Plantas*, Fundação MT, 549-602p.

Perez HE, Pezo DA, Arze J. 1993. Crecimiento de *Brachiaria brizantha* y *Brachiaria dictyoneura* asociadas con soya (*Glycine max* L.). *Pasturas Tropicales*. 15: 2-9.

Pernès J. 1975. Organization évolutive d`un groupe agamique: La section des maximae du genre *Panicum* (Gramenées). Paris: ORSTOM. (Mémoires ORSTOM, 75).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Pessim C, Pagliarini MS, Jank L. 2007. Anormalidades meióticas em híbridos de *Panicum maximum*. In: Simpósio Internacional de Melhoramento de Forrageiras. Campo Grande, MS. Anais... Campo Grande, MS: FUNDECT. CD-ROM.

Pizarro EA & Carvalho MA. 1997. Evaluation of a collection of *Calopogonium mucunoides* Desv. for the Cerrado ecosystem, Brazil. Journal of Applied Seed Production. 15: 17-21.

Pizarro EA, Ramos AK, Carvalho MA. 1998. Efecto de la frecuencia de cortes em la producción de semillas de *Arachis pintoi*. Pasturas Tropicales. 20: 31-33.

Portal DBO. Acessado em 13/06/2010.
<http://www.portaldbo.com.br/noticias/DetalheNoticia.aspx?notid=26900>.

Provazi M, Camargo LHG, Santos PM, Godoy R. 2007. Descrição botânica de linhagens puras selecionadas de guandu. Revista Brasileira de Zootecnia. 36: 328-334.

Queiroz MA, Lopes MA. 2007. Importância dos recursos genéticos vegetais para o agronegócio. In: Nass LL (ed.). Recursos Genéticos Vegetais. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 61-119p.

Rafalsky JA, Vogel JM, Morgante M, Powell W, Tingey SV. 1996. Generating new DNA marker in plants. In: Birren B, Lai E. (Ed.) Analysis of non mammalian genome: a practical guide. Orlando: Academic Press. 75-134p.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Rao SC. 2002. Pigeonpea May Fill Seasonal Forage Gap. ARS News Service, Agricultural Research Service [online]. Disponível em:<
<http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/aug02/range0802.htm>>, acesso em 09 de março de 2007.

Reddy MV, Raju TN, Lenné JM. 1997. Diseases of Pigeonpea. In: Allen DJ, Lenné JM. The Pathology of food and pasture legumes. Cambridge: CAB International. 517-558p.

Reddy LJ, Chandra S, Pooni H, Brammel PJ. 2004. Rate of outcrossing in pigeonpea under intercropped conditions. In: Brammel PJ (eds) Assessing the risk of losses in biodiversity in traditional cropping systems: a case study of Pigeonpea in Andhra Pradesh. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Andhra Pradesh, India. 168p.

Ritland K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating system using independent loci. *Heredity*. 88: 221-228.

Ritland K & Jain S. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity*. 47: 35-52.

Rodrigues AA, Santos PM, Godoy R, Nussio CMB. 2004. Utilização de guandu na alimentação de novilhas leiteiras. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. (Embrapa Pecuária Sudeste. Circular Técnica, 34). 8p.

Santos PM, Nussio CMB, Godoy R, Silva CE. 2004. Inclusão de duas linhagens de guandu na produção de silagem de milho. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Anais... 39. Campo Grande: SBZ.

Savidan Y. 1975. Hérité de l'apomixie contribution a l'étude de l'hérité de l'apomixie sur *Panicum maximum* Jacq. (analysis dès sacs embryonnaires). Cahiers ORSTOM série Biology. 10: 91-95.

Savidan YH. 1982a. Nature et hérité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. Paris, ORSTOM. (Travaux et Documents de l'ORSTOM, 153). 159p.

Savidan YH. 1982b. Embryological analysis of facultative apomixis in *Panicum maximum*. Crop Science. 22: 467-469.

Savidan YH. 1983. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). In: Smith JA and Hays VW (ed.) Proc. Int. Grassl. Congr., 14th. Lexington, KY. 15-24. Westview Press, Boulder, CO. 182-184p.

Savidan YH, Jank L, Costa JCG, Valle CB. 1989. Breeding *Panicum maximum* in Brazil: 1. Genetic resources, modes of reproduction and breeding procedures. Euphytica. 41: 107-112.

Savidan YH. 2000. Apomixis: Genetics and Breeding. Plant Breeding Reviews. 18: 13-86.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Schlotterer C & Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*. 20 (2): 211-215.

Schultze-Kraft R & Clements RJ. 1990. Biology, agronomy, and utilization. Cali, Colombia: CIAT publication no. 92p.

Seiffert NF & Zimmer AH. 1988. Contribución de *Calopogonium mucunoides* al contenido de nitrógeno em pasturas de *Brachiaria decumbens*. *Pasturas Tropicales*. 10: 8-13.

Sharma D & Green JM. 1980. Pigeonpea. In: Fehr WR, Hadley HH. Hybridization of crop plants. Madison: American Society of Agronomy and Crop Science of America Publishers.

Skerman PJ & Riveros F. 1990. Tropical Grasses. FAO, Rome.

Singh F & Oswalt DL. 1992. Pigeonpea botany and production practices. Patancheru, Andhra Pradesh: ICRISAT. (Skill Development, 9).

Sousa ACB, Carvalho MA, Boaventura LR, Sforça DA, Campos T, Jungmann L, Zucchi MI, Jank L, Souza AP. 2009. Microsatellite markers in tropical legume (*Centrosema pubescens* Benth): development, characterization, and cross-species amplification in *Centrosema* sp. *Conservation Genetics Resources*. 1: 347-352.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Sousa ACB, Carvalho MA, Ramos AKB, Sforça DA, Campos T, Jungmann L, Zucchi MI, Jank L, Souza AP. 2010. Development and characterization of microsatellite loci for *Calopogonium mucunoides* Desv. Molecular Ecology Resources. 10: 576-579.

Souza LAG, Albertino AMF, Silva MF, Silva JF. 2000. Superação da dormência de sementes de oito espécies de leguminosas herbáceas submetidas a tratamentos pré-germinativos. Ciências Agrárias: Revista da Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 9(1-2): 1-23.

Souza SO. 2002. Comportamento de gramíneas forrageiras tropicais isoladas e em associações com leguminosas no Norte-Fluminenses. Ciências e Agrotecnologia. 4: 1554-1561.

Spillane C, Steimer A, Grossniklaus U. 2001a. Apomixis in agriculture: the quest for clonal seeds. Sexual Plant Reproduction. 14: 179-187.

Spillane C, Vielle-Calzada JP, Grossniklaus U. 2001b. APO2001: a sexy apomixer in *Arabidopsis*. The Plant Cell. 13: 1480-1491.

Stür WW, Hopkinson JM, Chen CP. 1996. Regional experience with *Brachiaria*: Asia, the South Pacific, and Australia. In: Miles, J. W., Maass, B. L. and do Valle C. B. (eds) *Brachiaria*: Biology, Agronomy, and Improvement. Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT. Cali, Colombia. 258-271p.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Teitzel JK, Cameron DG, Anning P, Stockwell TG. 1990. Regional experience with *Centrosema*: Australia. In: Schultze-Kraft R and R. J. Clements (eds.) *Centrosema*: Biology, Agronomy and Utilization. CIAT publication. Cali, Columbia. 517-541p.

Usberti Filho JA. 1981. Plant breeding and the likelihood of new forage grasses cultivars release in Brazil. *Revista Brasileira de Sementes*. 3: 135-143.

Valle CB & Savidan YH. 1996. Genetics, Cytogenetics and Reproductive biology of *Brachiaria*. In: *Brachiaria* Biology Agronomy and Improvement (ed. J. W. Miles, BL Maass & Valle CB), CIAT, Embrapa, Cali. 164-177p.

Valle CB, Jank L, Resende RMS, Cançado LJ. 2004. O papel da biotecnologia de forrageiras para a produção animal. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia 41. Anais... Campo Grande, SBZ. CD-ROM. Forragicultura.

Valois AC, Nass LL, Goes M. 2001. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: Nass, LL, Valois, AC, Melo, IS, Valadares-Inglis, MC, Recursos genéticos e melhoramento. Rondonópolis: Fundação MT. 123-147p.

Van Heurck LM. 1990. Evaluación del pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) solo y asociado con las leguminosas forrajeras *Arachis pintoi* CIAT 17434 y *Desmodium ovalifolium* CIAT 350 en la producción de leche y sus componentes. MS thesis. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. 111p.

Van Hintum TJL, Brown AHD, Spillane C, Hodgkin T. 2000. Core collections of plant genetic resources. Rome: IPGRI. (Technical Bulletin, 3). 48p.

Van Oosterom EJ & Ceccarelli, S. 1993. Indirect selection of grain yield of barley in harsh Mediterranean environments. *Crop Science*. 33: 1127-1131.

Varela VP & Gurgel ESC. 2001. Tratamentos pré-germinativos em sementes de Calopogônio (*Calopogonium mucunoides* Desv.) – Leguminosae, *Papilionoideae*. *Revista de Ciências Agrárias*. 35: 89-96.

Veasey EA, Werner JC, Colozza MT, Freitas JCT, Lucena MAC, Beisman DA, Gerdes L. 1999. Evaluation of morphological, phenological and agronomic characters of tropical forage legumes in relation to seed production. *Boletim de Indústria Animal*. 56: 109-125.

Veasey EA, Oliveira GCX, Pinheiro JB. 2007. Scientific papers of Paulo Sodero Martins, 1941 – 1977: A tribute. Sociedade Brasileira de Genética – SBG, Ribeirão Preto – SP. 247p.

Vencovsky R, Pereira MB, Crisóstomo JR, Ferreira MAJF. 2001. Genética e melhoramento de populações mistas. In: Mass LL, Vallois ACC, Melo IS, Valadares-Inglis MC (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento – plantas. Rondonópolis: Fundação MT. 5490-6010p.

Volpe E. 2008. Renovação de pastagens degradadas com calagem, adubação e leguminosa consorciada, em Neossolo Quartzarênico. *Acta Scientiarum: Agronomy*, Maringá. 30 (1): 131-138.

Wetzel MMVS & Ferreira FR. 2007. Sistemas de curadorias de Germoplasma. In: Recursos Genéticos Vegetais. Nass LL (editor técnico). 123-168p.

Williams RJ & Clements RJ. 1990. Taxonomy of *Centrosema*. In: Schultze-Kraft R and Clements RJ (eds.) *Centrosema: Biology, Agronomy and Utilization*. (Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT): Cali, Columbia. 1-27p.

Wu KS & Tanksley SD. 1993. Abundance, polymorphism and genetic-mapping of microsatellites in rice. *Molecular and General Genetics*. 241(1-2): 225-235.

Zimmerman MJO & Teixeira MG. 1996. Bancos de germoplasma. In: Araújo RS, Rava CA, Stone LF, Zimmermam MJO. (eds). *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba: Potafos. 65-66p.

Zucchi MI, Pinheiro JB, Aguiar AV, Chaves LJ, Coelho ASG, Vencovsky R. 2004. Padrão espacial de divergência em populações de *Eugenia dysenterica* DC. utilizando marcadores microssatélites. *Floresta e Ambiente*. 11 (1): 29-38.