ANÁLISE GENÉTICA E MOLECULAR DA VARIAÇÃO
SOMACLONAL EM *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.
(LEGUMINOSAE)

LUCIANO CONSOLI
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para a obtenção
do título de Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 1995

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"/USP

Consoli, Luciano

Análise genética e molecular da variação somaclonal em Stylosanthes guianensis (Aubl.) Sw. (Leguminosae). Piracicaba, 1995.
108p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Estilosante - Cultura de tecido 2. Estilosante - Variação genética
3. Genética molecular I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
Piracicaba

CDD 633.39

ANÁLISE GENÉTICA E MOLECULAR DA VARIAÇÃO
SOMACLONAL EM *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.
(LEGUMINOSAE)

LUCIANO CONSOLI

Aprovada em: 28. 08. 1995

Comissão julgadora:

Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira

ESALQ/USP

Prof. Dr. Cláudio Lopes de Souza Jr.

ESALQ/USP

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

CBMEG/UNICAMP

Maria Lucia Carneiro Vieira

Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

Orientadora

À Gisele

minha esposa,
pelo carinho, convivência e paciência

DEDICO

Aos meus pais,

ERCÍDIO e MARIA,

e irmãos,

JOSÉ AUGUSTO, MARIA DE LOURDES, LUCIMAR E FERNANDO

pelo constante apoio e dedicação

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira**, pela orientação e pelo exemplo de profissionalismo;

Ao **Prof. Dr. Cláudio Lopes de Souza Jr.** pela participação indispensável na realização deste trabalho;

Aos **Biólogos Carlos Alberto de Oliveira**, técnico do Laboratório de Cultura de Tecidos - Depto. de Genética, e **Victor Augustus Marin**, aluno do CPG em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ, pelo apoio e companherismo durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos amigos do CPG em Genética e Melhoramento de Plantas - Depto. de Genética, especialmente a **Nelson Fonseca Júnior** e **Antônio Augusto Franco Garcia**, pela colaboração nas análises estatísticas;

Ao **Prof. Dr. Roland Vencovsky** pelo auxílio na interpretação dos dados moleculares;

Ao **Prof. Dr. Isaías Olívio Geraldi** pelo apoio e esclarecimentos durante o curso de mestrado;

Aos **companheiros do Laboratório de Cultura de Tecidos** - Depto. de Genética da ESALQ/USP pela convivência e colaboração;

Aos **Professores do Departamento de Genética** pelo incentivo e ensinamentos recebidos;

Aos **funcionários do Departamento de Genética** pela atenção dispensada;

À **Silvana**, bibliotecária do Departamento de Genética, pela amizade e paciência;

Ao **CNPq** pelo concessão de bolsa de estudos durante a realização do Curso de Pós-Graduação;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. O fenômeno da variação somaclonal.....	4
2.2. Análise da variação somaclonal para caracteres quantitativos.	8
2.3. Análise de plantas regeneradas via RFLPs.....	10
2.3.1. Alterações no DNA nuclear.....	10
2.3.2. Alterações no DNA mitocondrial.....	12
2.4. Análise de plantas regeneradas via RAPD.....	13
2.5. O gênero <i>Stylosanthes</i> : cultura <u>in vitro</u> e marcadores moleculares.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Material vegetal.....	17
3.1.1. Cultura de tecidos.....	17
3.1.2. Obtenção das progênies originais e regeneradas.....	18

	Página
3.2. Execução experimental.....	18
3.3. Caracteres avaliados.....	19
3.4. Análises de variância.....	21
3.4.1. Análises de variância para cada local.....	21
3.4.2. Análises de variância conjuntas.....	24
3.4.3. Estimativas dos componentes de variância, da herdabilidade e do progresso esperado com seleção.....	26
3.4.4. Análise de covariância e cálculo dos coeficientes de correlação genética e fenotípica.....	29
3.5. Análise molecular via RAPD.....	31
3.5.1. Extração do DNA genômico.....	32
3.5.2. Quantificação do DNA.....	34
3.5.3. Condições de amplificação.....	35
3.5.4. Análise preliminar.....	36
3.5.5. Análise de "pool" de DNA.....	36
3.5.6. Seleção de primers para utilização nas reações de RAPD.....	37
3.5.7. Análise dos dados moleculares.....	38
3.5.8. Coeficiente de correlação cofenética (r_{cof}).....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1. Análise dos dados de campo.....	42
4.1.1. Análise de variância individual por experimento.....	42
4.1.2. Análise de variância por local.....	44
4.1.3. Análise de variância conjunta.....	48

	Página
4.2. Análise molecular via RAPD.....	60
4.2.1. Otimização das condições de reação.....	60
4.2.2. Seleção de primers.....	61
4.2.3. Análise preliminar.....	64
4.2.4. Análise envolvendo "pools" de DNA.....	69
5. CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela nº.	Página
1. Quadro da análise de variância, com fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e esperanças dos quadrados médios [E(QM)], correspondentes ao modelo matemático utilizado para as análises individuais.....	22
2. Quadro da análise de variância, com fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e teste F, correspondentes ao agrupamento dos experimentos 1 e 2 , realizado dentro de cada local.....	23
3. Quadro da análise de variância, com fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e esperanças dos quadrados médios [E(QM)], correspondente ao modelo matemático utilizado para as análises conjuntas.....	25
4. Quadro da análise de variância, com fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e teste F, correspondentes ao agrupamento das análises conjuntas.....	26
5. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV%) das análises de variância individuais do experimento 1 nos três locais, para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS).....	43

Tabela nº.	Página
6. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV%) das análises de variância individuais do experimento 2 nos três locais, para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS).....	43
7. Médias e amplitudes dos caracteres produção de matéria verde (PMV, em g/planta) e produção de matéria seca (PMS, em g/planta) das populações original (Po) e regenerada (Pr), obtidas a partir do agrupamento das análises individuais dos experimentos 1 e 2 para cada local.	44
8. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV%) dos agrupamentos das análises de variância individuais dos experimentos 1 e 2 nos três locais, para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS).	46
9. Estimativas das variâncias genéticas entre progênies (σ^2_D), variâncias fenóticas entre médias (σ^2_F), herdabilidade ao nível de médias (h^2_m) e ganho com seleção (Gs%) para as populações original (o) e regenerada (r) para produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), obtidas a partir do agrupamento das análises de variâncias individuais dos experimentos 1 e 2, nos três locais.	46
10. Médias esperadas das populações original (Po) e regenerada (Pr) para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), envolvendo os dois experimentos de cada local.	49

Tabela nº.	Página
11. Produtos médios (PM) obtidos nas análises agrupadas dos experimentos 1 e 2 para cada local, para a dupla de caracteres produção de matéria verde (PMV) x produção de matéria seca (PMS).	49
12. Estimativas para as covariâncias genéticas (COV_p) e fenotípicas (COV_F) entre médias dos caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), para as populações original (o) e regenerada (r), obtidas em cada local.	49
13. Estimativas dos coeficientes de correlação genética (r_G) e fenotípica (r_F) entre os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), para as populações original (o) e regenerada (r), obtidas em cada local.	50
14. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV%) das análises conjuntas dos experimentos 1 e 2 de cada local, para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS).	50
15. Médias e amplitudes obtidas a partir do agrupamento das análises conjuntas para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS) das populações original (Po) e regenerada (Pr).	52
16. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV%) obtidos a partir do agrupamento das análises conjuntas dos experimentos 1 e 2, para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS).	52

Tabela nº.

Página

17. Estimativas das variâncias genéticas entre progênies (σ^2_D), variâncias das interações entre progênies e locais (σ^2_{PL}), variâncias fenotípicas entre médias (σ^2_F), herdabilidade ao nível de médias (h^2_m) e ganho com seleção (Gs%) para as populações original e regenerada para produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), obtidas a partir do agrupamento das análises de variâncias conjuntas dos experimentos 1 e 2.	54
18. Médias esperadas das populações original e regenerada para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), envolvendo todos os locais.	54
19. Produtos médios (PM) obtidos a partir do agrupamento das análises conjuntas dos experimentos 1 e 2, para a dupla de caracteres produção de matéria verde (PMV) x produção de matéria seca (PMS).	56
20. Estimativas para as covariâncias genéticas (COV_D) e fenotípicas entre médias (COV_F) dos caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), para as populações original e regenerada, obtidas a partir do agrupamento das análises conjuntas dos experimentos 1 e 2.	56
21. Estimativas dos coeficientes de correlação genética (r_G) e fenotípica (r_F) entre os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), para as populações original e regenerada, obtidas a partir do agrupamento das análises conjuntas dos experimentos 1 e 2.	56
22. Primers selecionados para amplificação do DNA das progênies originais e regeneradas.	64

LISTA DE FIGURAS

Figura nº.	Página
1. A) Vista geral das progênies originais e regeneradas mantidas na casa de vegetação antes do plantio; B) Variabilidade observada na altura e arquitetura das plantas dentro de uma progênie regenerada (PR), quando comparada com uma progênie original (PO); C) Vista geral de um experimento no campo, logo após o plantio; D) Vista geral do mesmo experimento, 3 meses após o plantio.	20
2. A) Influência da quantidade de enzima ($E2 = 2u$ e $E1 = 1u$) no padrão de amplificação de diferentes progênies gerado pelo primer OPF-02 (GAGGATCCCT); diferenças na intensidade de bandas são indicadas por setas; B) Padrões de amplificação de progênies originais (PO) e regeneradas (PR) para três condições de reação: C1 (1,5u de enzima, 40 ng de DNA e volume de 20 μ l); C2 (1,5u de enzima, 40 ng de DNA e volume de 15 μ l) e C3 (1,0u de enzima, 30 ng de DNA e volume de 15 μ l). (B) reação em branco, sem DNA molde. (M) marcador de peso molecular (λ /HindIII).	62

3. Seleção de primers. A) Amplificação do DNA de 3 plantas da progênie 69PO gerada com diferentes primers: OPF-03 (CCTGATCACC); OPF-19 (CCTCTAGACC); OPD-12 (CACCGTATCC); OPG-03 (GAGCCCTCCA). B) Padrão de amplificação para três progênies (69PO, 10PR, 133PR), representadas por quatro plantas, para o primer OPF-05 (CCGAATTCCC). C) Padrões de amplificação para duas progênies originais (3PO e 66PO) e duas regeneradas (2PR e 13PR) gerados por 4 primers (OPF-01-ACGGATCCTG; OPA-07-GAACGGGTG; OPA-08-GGGATATCGG e OPA-09-CCAAGCTTCC) para fins de detectar polimorfismo. As setas indicam a presença de polimorfismos entre as progênies. (B) reação em branco, sem DNA; (M) marcador de peso molecular (λ /HindIII). 63
4. Padrão de amplificação para 6 progênies originais (PO) e 6 progênies regeneradas (PR), representadas por 3 plantas, gerado pelo primer OPF-01 (ACGGATCCTG). (B) reação em branco, sem DNA; (M) marcador de peso molecular (λ /HindIII). 65
5. Agrupamento das 12 progênies de *Stylosanthes*, sendo 6 originais (PO) e 6 regeneradas (PR), cada uma representada por 3 plantas. As similaridades genéticas foram obtidas a partir da análise de 90 bandas geradas por 4 primers e calculadas de acordo com o coeficiente de similaridade Simple Matching. O agrupamento foi realizado utilizando-se o método UPGMA. 66
6. Agrupamento das 12 progênies de *Stylosanthes*, sendo 6 originais (PO) e 6 regeneradas (PR), utilizando-se os coeficientes médios de similaridade. O agrupamento foi realizado utilizando-se o método UPGMA. Os valores indicados na abscissa representam coeficientes de similaridade. 68

7. Padrão de amplificação para 16 progênieis originais (PO) e 16 regeneradas (PR), representadas por um "pool" de DNA de três plantas, gerado pelo primer OPA-09 (GGGTAACGCC); (B) reação em branco, sem DNA; (M) marcador de peso molecular (Ladder 100pb). As setas indicam a presença de polimorfismo, com "perda" de bandas preferencialmente na população regenerada (setas menores) e "ganho" de bandas (setas maiores) com menor frequência. 70

8. Padrão de amplificação para 16 progênieis originais (PO) e 16 regeneradas (PR), representadas por um "pool" de DNA de três plantas, gerado pelo primer OPE-01 (CCCAAGGTCC). As setas indicam a presença de polimorfismos; (B) reação em branco, sem DNA; (M) marcador de peso molecular (Ladder 100pb). 71

9. Agrupamento das 32 progênieis de *Stylosanthes*, 16 originais (PO) e 16 regeneradas (PR), cada uma representada por um "pool" de DNA de três plantas. As similaridades genéticas foram obtidas a partir da análise de 219 bandas geradas por 10 primers, calculadas de acordo com o coeficiente de similaridade Simple Matching. O agrupamento foi realizado utilizando-se o método UPGMA. 73

10. Agrupamento das 32 progênieis de *Stylosanthes*, 16 originais (PO) e 16 regeneradas (PR), cada uma representada por um "pool" de DNA de três plantas. As similaridades genéticas foram calculadas de acordo com o coeficiente de similaridade de Jaccard. O agrupamento foi realizado utilizando-se o método UPGMA. 74

**ANÁLISE GENÉTICA E MOLECULAR DA VARIAÇÃO
SOMACLONAL EM *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.
(LEGUMINOSAE)**

Autor: Luciano Consoli

Orientadora: Maria Lúcia Carneiro Vieira

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da cultura de tecidos em características quantitativas de interesse agrônomo e também detectar possíveis alterações ao nível molecular, através da técnica de RAPD, em progênies de plantas regeneradas de *Stylosanthes guianensis*.

Sessenta e três progênies derivadas da cultura de tecidos (R_2) e 53 derivadas da população original (O_2) foram avaliadas para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS). Detectou-se na população regenerada, em média, uma variabilidade genética 2,6 vezes superior em relação à variabilidade presente na população original, para os dois caracteres. As estimativas do coeficiente de herbabilidade e do ganho esperado com seleção para os dois caracteres, também foram superiores para a população regenerada. No entanto, a população regenerada apresentou reduções significativas nas médias para os caracteres PMV (2656,32 g/planta) e PMS (891,27 g/planta) em relação às médias da população original (PMV=2978,11 e PMS=1000,90). Apesar destas reduções, as médias esperadas da população regenerada selecionada, para os dois caracteres, foram superiores às médias esperadas da população original. Estes resultados indicam que a cultura de

tecidos foi capaz de gerar uma variabilidade genética superior à variabilidade encontrada na população original, podendo ser aproveitada em programas de melhoramento.

Amostras de 16 progênies de cada uma das populações original e regenerada, foram analisadas através da técnica de RAPD utilizando-se 10 primers de sequência aleatória. Estes primers geraram 219 produtos de amplificação apresentando 51,6% de polimorfismo. O agrupamento das progênies pelo método UPGMA, baseado no coeficiente de similaridade Simple Matching, gerou um dendrograma no qual visualiza-se a formação de dois grupos distintos, separando as progênies originais das regeneradas. Apesar da semelhança nos valores dos coeficientes de similaridade genética observados dentro de cada população, a separação das progênies em dois grupos indica que a cultura de tecidos provocou alterações ao nível molecular, capazes de alterar os padrões de RAPDs.

**ANALYSIS GENETIC AND MOLECULAR OF THE
SOMACLONAL VARIATION IN *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.
(LEGUMINOSAE)**

Author: Luciano Consoli

Adviser: Maria Lúcia Carneiro Vieira

SUMMARY

The objective of this research was to study the effects of tissue culture on quantitative agronomic traits, and also detect possible alterations on molecular level in progenies derived from regenerated plants of *Stylosanthes guianensis*, by using RAPD techniques.

Sixty-three tissue culture derived progenies (R_2) and 53 progenies of the original population (O_2) were evaluated for fresh matter yield (FMY) and dry matter yield (DMY). The regenerated population showed a genetic variability 2.6 times higher than that presented by the original population for both traits. Estimates of the heritability coefficient and expected gain with selection for FMY and DMY were also higher in the regenerated population. However, the means for FMY (2,656.32 g/plant) and DMY (891.27 g/plant) of the regenerated population was significantly reduced when compared to the original one (FMY = 2,978.11 g/plant and DMY = 1,000.90 g/plant). Despite these reductions, the means for FMY and DMY of the selected regenerated population, for both traits were higher than the original one. The results indicate that tissue culture was able to generate genetic variability, greater than that found in the

original population, allowing the utilization of this technique in genetic breeding programs.

Samples of 16 progenies of each regenerated and original populations were analyzed by RAPD techniques using 10 primers of random sequence. These primers originated 219 amplified fragments showing 51.6% of polymorphism. Progenies grouped by UPGMA method, based on the Simple Matching similarity coefficient, produced a dendrogram in which it was possible to distinguish two different groups, separating original progenies from regenerated ones. Despite the likeness of genetic similarity coefficients observed for each population, the separation of progenies in two distinct groups pointed out that tissue culture generated alterations at the molecular level that were able to modify the RAPDs patterns.

1. INTRODUÇÃO

O fenômeno da variação somaclonal, decorrente dos processos de cultivo in vitro, pode aparecer em culturas de células, tecidos e órgãos vegetais e em plantas regeneradas destas culturas (LARKIN & SCOWCROFT, 1981). A variação somaclonal tem sido indicada como uma nova fonte de variabilidade genética com grande potencial para uso em programas de melhoramento (EVANS & SHARP, 1986). O trabalho de EVANS (1989) relata a obtenção de plantas estáveis a partir de culturas celulares de tomate, apresentando maior consistência para polpa e resistência a *Fusarium*, além de variantes somaclonais de pimentão, regenerados a partir de culturas de anteras, apresentando um reduzido número de sementes (9/planta) comparado com o material original (330/planta), com grande potencial para serem introduzidos em programas de melhoramento. No entanto, a exploração maior destas técnicas só será possível com a determinação dos fatores que induzem o aparecimento de variantes somaclonais, sua frequência, magnitude e estabilidade em gerações subsequentes. Desta forma, será viável estabelecer procedimentos de seleção adequados.

A maioria dos regenerantes obtidos tem sido avaliada para caracteres qualitativos (BARWALE & WIDHOLM, 1987; FREYTAG et al, 1989 e LINACERO & VÁZQUEZ, 1993), alterações citológicas (KARP &

MADDOCK, 1984; LEE & PHILLIPS, 1987a e b) e alterações bioquímicas (AMBERGER et al, 1992 e SHENOY & VASIL, 1992). Trabalhos relacionados com a avaliação de caracteres quantitativos, limitam-se a comparações de médias entre a população regenerada e a população controle (LEE et al, 1988; ADKINS et al, 1990 e DAHLEEN et al, 1991), ou a estimativas da variância fenotípica (GODWIN et al, 1987 e DALE & McPARTLAN, 1992). No entanto, poucos estudos usando técnicas de genética quantitativa incluindo a estimação de parâmetros genéticos têm sido reportados (LIU & CHEN, 1978 e BAENZIGER et al, 1989).

Variações ao nível do DNA total (MÜLLER et al, 1990; BROWN et al, 1991 e SABIR et al, 1992) e do DNA mitocondrial (KEMBLE & FLAVELL, 1982; McNAY et al, 1984 e KANE et al, 1992) de plantas regeneradas têm sido detectadas através da técnica de RFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição). O desenvolvimento da técnica de RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) descrita por WILLIAMS et al (1990) ou AP-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Primers Arbitrários) descrita por WELSH & McCLELLAND (1990), possibilitou o surgimento de um novo tipo de marcador molecular. Estes marcadores são originados a partir da amplificação ao acaso de fragmentos do DNA molde utilizando-se apenas um primer de sequência arbitrária. Os alelos gerados por RAPD têm apresentado grande potencial para estudos da variabilidade genética, proporcionando um meio rápido e eficiente para a identificação do grau de similaridade genética entre populações, para construção de mapas genéticos, para identificação de genomas (DNA "fingerprinting") e estudos de taxonomia (WILLIAMS et al, 1993). Mais

recentemente, a utilização da técnica de RAPD tem sido descrita na literatura com o objetivo de detectar a presença de variação somaclonal, em plantas derivadas da cultura de tecidos (BROW et al, 1993; CHOWDHURY & VASIL, 1993 e VALLÉS et al, 1993) .

O conhecimento mais aprofundado dos mecanismos cromossômicos, genéticos e moleculares envolvidos no processo de geração da variação somaclonal deverá permitir um possível controle desta variação. Este controle é essencial para a exploração das técnicas manipulação genética, seja visando a propagação de plantas, a transferência de genes mediada por vetores de transformação ou a obtenção de variantes somaclonais.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve por objetivos: a) quantificar a variação somaclonal presente em progênes obtidas a partir de plantas regeneradas de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cultivar IRI 1022, em caracteres quantitativos, através da estimação de parâmetros genéticos; e b) verificar nestas progênes possíveis alterações ao nível de DNA provocadas pela cultura de tecidos através da análise de marcadores moleculares do tipo RAPD.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O fenômeno da variação somaclonal

Inicialmente, a cultura de tecidos foi vista como um método sofisticado de propagação assexual para clonar genótipos de interesse, apresentando a capacidade de gerar cópias idênticas à da planta doadora de explantes. No entanto, uma série de variantes fenotípicas foi observada entre as plantas regeneradas (SELBY & COLLIN, 1976 e SHEPARD et al, 1980). Posteriormente, análises de progênie dos regenerantes, mostraram que a maior parte desta variação era herdável, ou seja, de natureza genética. Assim, a técnica de cultura de tecidos passou a ser indicada como uma nova fonte de variação genética, podendo ser introduzida em programas de melhoramento (EVANS & SHARP, 1986). A revisão de EVANS et al (1984), traz vários exemplos de variantes somaclonais descritos em batata e tomate, e aponta estratégias para o uso destes variantes em programas de melhoramento.

A variação genética detectada em plantas regeneradas a partir de técnicas de cultura de tecidos foi denominada variação somaclonal (LARKIN & SCOWCROFT, 1981). Embora a origem desta variação ainda esteja por ser determinada, vários fatores têm sido associados à ocorrência e à frequência da variação somaclonal. Estes fatores são principalmente o

genótipo, o grau de ploidia da planta doadora de explantes, a fonte de explante, o tempo de permanência na fase de calo e a composição hormonal do meio de cultura (MEINS, 1983; KARP, 1990 e BAI & KNOTT, 1993). Vários autores sugerem que os mecanismos envolvidos no processo de geração da variação somaclonal estão relacionados com algum tipo de alteração ao nível do material genético, tais como aberrações cromossômicas (estruturais e numéricas), ativação de elementos transponíveis, ocorrência de metilação, amplificação do DNA e mutações pontuais (LEE & PHILLIPS, 1988 e PESHKE & PHILLIPS, 1992).

A literatura também relata a obtenção de plantas regeneradas as quais não apresentam variação somaclonal (HANNA et al, 1984) ou mesmo a reversão da variação observada em plantas propagadas vegetativamente, para as características originais da população doadora de explantes (LOURENS & MARTIN, 1987). As variações fenotípicas observadas nas plantas obtidas a partir do cultivo *in vitro*, não são necessariamente devido a alterações genéticas, podendo ser resultado de efeitos fisiológicos (DETREZ et al, 1989) ou devido a eliminação de agentes patogênicos, principalmente de vírus (LARKIN & SCOWCROFT, 1981). Desta forma, alguns autores têm sugerido que a maioria das variações obtidas não apresenta grande importância como nova fonte de variabilidade (KARP et al, 1987 e SALEH et al, 1990), pois podem ser de natureza epigenética (D'AMATO et al, 1985 e MORRISH et al, 1990) ou decorrentes da natureza quimérica pré-existente no explante da planta doadora (BREIMAN et al, 1989 e MORRISH et al, 1990).

Por outro lado, diversas publicações têm demonstrado que a cultura de tecidos é responsável por alterações citológicas, morfológicas e

moleculares em plantas regeneradas in vitro. Alterações cromossômicas decorrentes da variação somaclonal têm sido extensivamente pesquisadas e há importantes revisões sobre este assunto (LARKIN & SCOWCROFT, 1981; D'AMATO, 1985; LEE & PHILLIPS, 1988 e DAHLEEM et al, 1991). Em *Stylosanthes guianensis*, MILES et al (1989) relataram que a cultura de calos proporcionou a indução de variantes somaclonais tetraplóides, que diferiram fenotipicamente dos diplóides além de apresentarem uma menor produção de sementes.

Estes resultados contraditórios podem estar relacionados com diversos fatores, tais como a natureza do genótipo utilizado (BREIMAN et al, 1987) e o tipo de análise utilizada para detectar os efeitos do cultivo in vitro, a qual pode ser desde observações morfológicas, citológicas (SWEDLUND & VASIL, 1985), avaliações de campo (RAJASEKARAN et al, 1986) até estudos bioquímicos e moleculares (SHIMRON-ABARBANELL & BREIMAN, 1991; SABIR et al, 1992 e SHENOY & VASIL, 1992). Certas alterações nos genes podem não se refletir ao nível morfológico ou fisiológico. No entanto, a detecção de mutações silenciosas por exemplo, pode se tornar importante para verificar a frequência com que ocorrem estas alterações no genoma de plantas regeneradas a partir de técnicas de cultivo in vitro.

Os RFLPs podem ser gerados por dois mecanismos; mutações pontuais e estruturais ou alterações no padrão de metilação do DNA, acarretando mudanças dos sítios de clivagem das enzimas utilizadas (MÜLLER et al, 1990). Já os RAPDs podem ser gerados por mudanças na sequência de nucleotídeos complementares ao primer, por deleção de um sítio

de anelamento, por inserção de fragmentos dentro da região amplificada, tornando o espaço entre os primers muito longo para amplificação, ou ainda, por deleções ou inserções alterando o tamanho do produto final de amplificação (WILLIAMS et al, 1990). Estes são alguns dos eventos mutacionais que têm sido relacionados com a geração de variações herdáveis em culturas de tecidos, os quais podem ser detectados quando se utiliza marcadores moleculares.

As técnicas de RFLP e mais recentemente de RAPD vêm sendo utilizadas na tentativa de monitorar a variação somaclonal presentes em plantas regeneradas a partir do cultivo in vitro, para diferentes espécies vegetais. A análise molecular de calos e de plantas regeneradas tem como finalidade caracterizar a variação somaclonal e se possível determinar que aspectos cultivo in vitro (tempo de cultura, concentração de fitorreguladores, etc) poderiam estar relacionados com as alterações observadas ao nível molecular. Com isto, mudanças nos protocolos de culturas de tecidos poderiam ser propostas na tentativa de se reduzir ou otimizar, dependendo da finalidade do trabalho, a ocorrência de variação. Além disso, um dos principais interesses dos estudos relacionados da variação somaclonal tem sido o de desenvolver um método que possa usado no controle da qualidade das mudas geradas pelo cultivo in vitro. Para isso, há necessidade de se aplicar metodologias que permitam a associação de marcas moleculares com alterações fenotípicas presentes nas plantas regeneradas.

2.2. Análise da variação somaclonal para caracteres quantitativos

Relatos sobre variantes somaclonais que se caracterizam por apresentar mudanças morfológicas do tipo arquitetura variável, nanismo e albinismo são bastantes frequentes na literatura. Entretanto, os mecanismos responsáveis pelo surgimento desta variação têm sido pouco estudados, principalmente para caracteres de natureza complexa ou poligênica.

Estudos envolvendo a herança de variantes foram realizados através de cruzamentos controlados, por exemplo, em plantas leguminosas como a *Vigna radiata* (BATHIA & MATHEUS, 1988), a soja (FREYTAG et al, 1989), a alfafa (BINGHMAM et al, 1975) e o *Stylosanthes* (GODWIN et al, 1987). Este último relato mostrou que a variação somaclonal está presente em cerca de 40% das famílias R2 obtidas a partir da autofecundação de plantas regeneradas R1. Muitas destas famílias segregaram para caracteres qualitativos como albinismo, alteração da morfologia e redução dos níveis de fertilidade. Um único caráter poligênico de interesse agrônomo, dias para o florescimento, mostrou variação.

GRAYBOSCH et al (1987) mostraram evidências favoráveis para a utilização da cultura de tecidos como fonte adicional de variação em soja, tendo sido possível detectar variabilidade para produção de grãos, em duas das 19 famílias R1 avaliadas, quando comparadas com os cultivares controles. Além deste trabalho, STEPHENS et al (1991) também verificaram em soja que a cultura de tecidos causou variação benéfica para maturidade, peso e qualidade de semente.

Em trigo, uma ampla variabilidade para caracteres morfológicos e bioquímicos foi relatada por LARKIN et al (1984) e RYAN et al (1987), tanto de natureza qualitativa como quantitativa, tais como altura de planta, coloração de glumas e grãos, número de grãos por espiga, produção de grãos, índice de colheita, regulação para α -amilase, etc.

Em batata, somaclones derivados da cultura de protoplastos do cultivar Russet mostraram uma ampla variação. Parte desta variação ocorreu para caracteres quantitativos de interesse agrônomo (SHEPARD et al, 1980 e SECOR & SHEPARD, 1981). DALE & McPARTLAN (1982) também compararam a variação presente em populações de plantas regeneradas de batata com a população controle, verificando um aumento na variação para caracteres quantitativos.

Em cana-de-açúcar, abordagens de natureza genético-estatísticas foram usadas por LIU & CHEN (1978), envolvendo a análise de nove características relacionadas com a produção. Neste trabalho, foram estimados os componentes da variância genética e analisados os padrões eletroforéticos do sistema esterase. Isto para comparar a variação genética presente nos melhores clones derivados de calo, com aquela variação presente nas respectivas plantas doadoras de explantes. Duas das 11 linhas derivadas da população original apresentaram produção superior, o que ainda foi evidenciado pelo padrão diferencial mostrado pela análise isoenzimática.

BAENZIGER et al (1989) avaliaram a performance agrônoma de linhagens duplo-haplóides, obtidas a partir da cultura de anteras de duas cultivares de trigo, comparadas com as respectivas populações controles. Os

autores detectaram um aumento na variância genética apenas para uma das cultivares.

Alterações benéficas foram observadas para o caráter maturidade em plantas regeneradas de sorgo (BHASKARAN et al, 1987) e milho (LEE et al, 1988) apresentando maior precocidade e para tolerância a inundação em arroz (ADKINS et al, 1990).

2.3. Análise de plantas regeneradas via RFLPs

2.3.1. Alterações no DNA nuclear

A análise do DNA de plantas de arroz derivadas da cultura de tecidos tem mostrado que tanto culturas de calos quanto plantas regeneradas apresentam altas taxas de polimorfismo molecular (MÜLLER et al, 1990). Este polimorfismo foi detectado tanto entre plantas regeneradas a partir de diferentes culturas de calos, como também entre plantas irmãs regeneradas a partir de um mesmo calo. Os autores verificaram um alto grau de instabilidade genética entre plantas regeneradas de culturas mantidas por 67 dias na fase de calo quando comparadas com plantas obtidas a partir de culturas de 28 dias, utilizando apenas uma sonda de cDNA. O dobro de tempo na fase de calo proporcionou um aumento de 6,3 para 23% no grau de polimorfismo de RFLPs, em apenas um gene. No entanto, os autores não observaram relação entre alterações fenotípicas e o polimorfismo de RFLPs.

Resultados semelhantes foram obtidos por BROWN (1989), que observaram um efeito da cultura de tecidos no padrão de metilação do DNA

de milho. O autor não observou relações diretas entre as alterações moleculares e fenotípicas, presentes nas plantas regeneradas. BROWN et al (1991), trabalhando com a mesma linhagem de milho, verificaram níveis elevados de variação no padrão de hibridação para três sondas de c-DNA, em culturas de calo. Os autores não detectaram relação entre o nível de polimorfismo molecular observado e as diferentes concentrações de 2,4-D ou diferentes meios de cultura basais. Evidências da ocorrência de amplificação gênica e redução no número de cópias para os genes estudados também foram observadas, devido a alterações na intensidade das bandas de hibridação. Quando os DNAs de plantas regeneradas foram analisados, verificou-se uma redução no nível de polimorfismo em relação as análises de calos, indicando a ocorrência de seleção durante o processo de regeneração. Estas alterações apresentaram-se específicas para a linhagem utilizada, não sendo observadas em outras linhagens.

Outra série de trabalhos tem reportado a ausência de polimorfismos moleculares gerados por RFLP em plantas regeneradas, principalmente via embriogênese somática, nas culturas de cevada (SHIMRON-ABARBANELL & BREIMAN, 1991), napier (SHENOY & VASIL, 1992), cana-de-açúcar (CHOWDHURY & VASIL, 1993) e trigo (CHOWDHURY et al, 1994), dando suporte à hipótese da ocorrência de uma forte seleção a favor da regeneração de plantas a partir de células normais em calos embriogênicos (VASIL, 1987 e 1988).

2.3.2. Alterações no DNA mitocondrial

O primeiro relato indicando a influência da cultura de tecidos provocando alterações no DNA mitocondrial foi descrito por BRETTELL et al (1980), em plantas regeneradas de milho. A análise do DNA mitocondrial dos regenerantes apresentou padrões de hibridação diferentes tanto em plantas portadoras de citoplasma T quanto de citoplasma N, indicando a ocorrência de alterações no mtDNA devido ao processo de cultura de tecidos (KEMBLE & FLAVELL, 1982).

CHOWDHURY et al (1994) relataram a presença de variação no mtDNA em suspensões celulares de trigo não embriogênicas. Resultados semelhantes foram obtidos por RODE et al (1988) em culturas de calos não embriogênicos de trigo. As culturas de calos embriogênicos apresentaram uma organização idêntica ao mtDNA das plantas doadoras de explantes, sugerindo uma relação entre capacidade de regeneração e organização do mtDNA. Alto grau de estabilidade no genoma mitocondrial foi observado em plantas regeneradas de cana-de-açúcar a partir de culturas embriogênicas (CHOWDHURY & VASIL, 1993). Em cevada (SHIMRON-ABARBANELL & BREIMAN, 1991) e em napier (SHENOY & VASIL, 1992), foram verificadas alterações no mtDNA apenas em regiões não apresentando transcrição, reforçando a hipótese anterior. No entanto, altos níveis de variações no mtDNA foram observadas em duas cultivares de trigo (HARTMANN et al, 1987) e em sorgo (KANE et al, 1992).

2.4. Análise de plantas regeneradas via RAPD

BROWN et al (1993) utilizaram a técnica de RAPD com a finalidade de verificar a ocorrência de variação somaclonal durante o desenvolvimento de plantas regeneradas de cultivares de trigo. Os autores relatam que os RAPDs apresentam potencial para discriminar plantas regeneradas, mesmo não apresentando alterações morfológicas. Plantas R_0 apresentaram diferenças em relação ao padrão de amplificação dos respectivos controles. A maioria das alterações foi observada em fragmentos amplificados de alto peso molecular, além de haver um considerável nível de polimorfismo entre as bandas com diversos pesos moleculares. A análise do DNA de células mantidas em dois métodos de cultivo in vitro, culturas de calos e suspensões celulares, indica o potencial da técnica de RAPD não somente para diferenciar as linhagens celulares dos respectivos controles, mas também para caracterizar diferentes sistemas de cultura de tecidos. Além disso, também foi demonstrada a capacidade da técnica de RAPD em amplificar o DNA isolado a partir de protoplastos individuais de tabaco e de microcolônias derivadas de um protoplasto, aumentando assim as possibilidades de investigação dos eventos genéticos ocorridos durante as diferentes fases do cultivo in vitro.

Estudos preliminares para avaliação de três culturas de células embriogênicas de *Picea mariana*, obtidas a partir de cruzamentos diferentes, não demonstraram instabilidade genética entre os embriões somáticos, dentro de cada cultura em particular. No entanto, a análise foi realizada em cinco embriões para cada cultura, utilizando-se apenas 3 primers, que amplificaram 10 alelos de RAPD (ISABEL et al, 1993). VALLÉS et al (1993) utilizando 18

primers, não detectaram variação nos padrões de amplificação entre as plantas regeneradas a partir de suspensões celulares embriogênicas de *Festuca pratensis* quando comparados com os padrões das plantas controles. Resultados semelhantes foram observados ao se analisar plantas regeneradas a partir de protoplastos obtidos das mesmas suspensões celulares.

2.5. O gênero *Stylosanthes*: cultura in vitro e marcadores moleculares

O gênero *Stylosanthes* Sw. pertence à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae. Trata-se de um gênero nativo da América tropical, sendo o Brasil o maior centro de diversidade genética (FERREIRA & COSTA, 1979, WILLIAMS et al, 1984). É considerado como uma das fontes de pastagens naturais mais importantes dos trópicos (EDYE & CAMERON, 1984) mais especificamente, a espécie *S. guianensis* (Aubl.)Sw., tem sido amplamente utilizada na Austrália, onde ocorreu o maior número de introduções de espécies potencialmente forrageiras.

Trata-se de um gênero que mostra ampla variabilidade, sendo *S. guianensis* uma espécie adaptada a solos ácidos e de baixa fertilidade, mostrando boa produção como planta forrageira. Apresenta um sistema de reprodução preferencialmente por autogamia, com taxas de cruzamentos em torno de 13,8% (MILES, 1985).

Técnicas de cultura de tecidos e metodologias de manipulação genética têm sido indicadas para complementar programas de melhoramento de *Stylosanthes*. Vários estudos têm sido publicados demonstrando regeneração de plantas a partir de explantes de folhas, hipocótilos e

cotilédones (MEIJER & STEINBISS, 1983; SZABADOS & ROCA, 1986 e SILVA, 1991). Neste aspecto, o *Stylosanthes* é uma das leguminosas menos (MEIJER & SZABADOS, 1990), mostrando uma regeneração abundante que ocorre por organogênese, com desenvolvimento de brotos na superfície dos calos. A regeneração de plantas a partir de embriões somáticos foi igualmente relatada no gênero (DORNELAS et al, 1992).

MEIJER & STEINBISS (1983) e SZABADOS & ROCA (1986), observaram a regeneração de plantas de *S. guianensis* a partir da cultura de protoplastos. VIEIRA et al (1990), além da regeneração de *S. guianensis*, obtiveram brotos de *S. macrocephala* e de *S. scabra*, demonstrando a viabilidade de regeneração de plantas através da cultura de protoplastos em outras espécies do gênero.

Estudos visando a obtenção de plantas transgênicas têm sido igualmente reportados (MANNERS 1987 e 1988 e MANNERS & WAY, 1989).

Conforme já mencionado, o gênero *Stylosanthes* se apresenta como um excelente modelo para estudos de cultura in vitro pois mostra um sistema de regeneração abundante e de fácil controle. Sendo assim, se presta como material biológico para estudos fisiológicos e genéticos, associados ao processo de cultura de tecidos, como aqueles relacionados à geração e exploração da variação somaclonal.

Marcadores de RAPDs foram utilizados por KAZAN et al (1993b) com o objetivo de detectar variação genética entre 20 cultivares e diversos acessos de 4 espécies de importância agrônômica do gênero *Stylosanthes* (*S. guianensis*, *S. scabra*, *S. hamata*, *S. humilis*). Níveis de

polimorfismos variando entre 0 e 16%, gerados por 200 alelos de RAPD amplificados a partir de 20 primers, foram detectados dentro de cada espécie, enquanto o polimorfismo entre as espécies atingiu valores acima de 46%. Níveis reduzidos de polimorfismo molecular foram detectados entre indivíduos pertencentes ao mesmo cultivar ou acesso. O baixo nível de polimorfismo molecular observado dentro de cada espécie sugere que cruzamentos interespecíficos apresentam grande importância para a construção de mapas de ligação de RAPD em *Stylosanthes* (KAZAN et al, 1993c). KAZAN et al (1993a) investigaram a variação genética entre 5 grupos taxonômicos do complexo *Stylosanthes guianensis* representados por 45 acessos. Os dados obtidos a partir de marcadores de RAPDs possibilitaram a construção de um dendrograma que vem suportar os resultados de taxonomia obtidos com outras metodologias, confirmando a aplicabilidade dos marcadores de RAPD em estudos de sistemática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

3.1.1. Cultura de tecidos

Sementes de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cv IRI 1022, foram cedidas pelo IRI, instituto de pesquisa já extinto, localizado em Matão, São Paulo. As sementes foram escarificadas em ácido sulfúrico por 2 minutos, esterilizadas em álcool 70% (v/v) por 40 segundos e em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v) por 8 minutos, sendo em seguida, lavadas 3 vezes em água esterilizada. A germinação ocorreu em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo metade da sua concentração original de sais e vitaminas, 1,5% de sacarose (p/v), pH 5,8 e solidificado com 0,9% de agar (p/v), sob $30 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação luminosa, à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, e fotoperíodo de 16 horas.

Explantos hipocotiledonares (10 dias de idade) e foliares (30 dias) foram excisados das plântulas germinadas in vitro e inoculados em meio MS contendo $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP para hipocótilos, e $0,4 \text{ BAP} + 0,1 \text{ NAA}$ para explantes de folha. A regeneração dos brotos ocorreu após 30 e 60 dias para os explantes hipocotiledonares e foliares, respectivamente. Os brotos foram isolados e transferidos para meio de enraizamento (MS/2) contendo $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de IBA.

3.1.2. Obtenção das progênes originais e regeneradas

A população R_0 (regenerantes primários) foi constituída por 133 plantas regeneradas, as quais foram mantidas em casa de vegetação. Paralelamente, uma população de 100 plantas provenientes de sementes (geração O_0), foi cultivada em vasos.

Sementes foram coletadas individualmente das plantas R_0 e O_0 após 2 ciclos de florescimento, constituindo 63 progênes R_1 e 53 progênes O_1 . A coleta individual das sementes foi repetida para cada uma das 116 progênes R_1 e O_1 obtidas para a constituição das progênes R_2 e O_2 .

As progênes R_1 e O_1 foram analisadas para 5 caracteres de interesse agrônômico: comprimento da haste principal, área basal, diâmetro basal, vigor da planta, produção de matéria verde e produção de matéria seca. As análises referentes a estes caracteres estão apresentadas na forma de um artigo incluído no Apêndice 1 desta dissertação. Destas plantas coletou-se sementes individuais as quais foram utilizadas em etapa posterior.

3.2. Execução experimental

As sementes das progênes R_2 e O_2 foram semeadas no mês de janeiro de 1994 em sacos plásticos de 1 litro, contendo uma mistura de terra, areia e esterco (1:1:1) e mantidas em casa de vegetação (Figura 1A e 1B).

As 116 progênes R_2 e O_2 obtidas foram distribuídas em dois experimentos, repetidos em 3 ambientes diferentes ou locais da área experimental da Fazenda Anhembi, pertencente ao Departamento de Genética da ESALQ/USP

(Figura 1C e 1D). No experimento 1, foram avaliadas 32 progênies da população regenerada e 27 progênies da população original, e no experimento 2, foram avaliadas 31 progênies da população regenerada e 26 progênies da população original.

O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso, apresentando três repetições, com parcelas constituídas por quatro plantas espaçadas entre si por 0,5 metro. O espaçamento entre as parcelas foi de um metro, com uma área útil de dois m² por parcela, totalizando 4176 plantas.

3.3. Caracteres avaliados

Foram avaliados dois caracteres, cujos dados foram coletados no mês de fevereiro de 1995:

- Produção de matéria verde (PMV) - correspondente ao peso total de cada parcela em g, obtido após o corte da planta realizado a 30 centímetros do solo.
- Produção de matéria seca (PMS) - correspondente ao peso total de cada parcela, em g, após a secagem em ambiente com corrente forçada de ar quente.

Todas as parcelas foram avaliadas para ambos caracteres e a correção foi feita para o estande médio, de acordo com a metodologia de covariância descrita por VENCOVSKY & BARRIGA (1992).

FIGURA 1. A) Vista geral das progênie original e regeneradas mantidas na casa de vegetação antes do plantio; B) Variabilidade observada na altura e arquitetura das plantas dentro de uma progênie regenerada (PR), quando comparada com uma progênie original (PO); C) Vista geral de um experimento no campo, logo após o plantio; D) Vista geral do mesmo experimento, 3 meses após o plantio.

3.4. Análises de variância

Para os dois caracteres avaliados foram realizadas análises de variância individuais para cada experimento, que foram agrupadas dentro de cada local. Em seguida, análises conjuntas de variância foram realizadas para cada experimento, com os dados dos três locais, possibilitando o estudo da interação progênes x locais. A partir desta análise, é possível determinar se as progênes apresentam comportamento diferencial em função do local em que se encontram. Posteriormente, realizou-se o agrupamento das análises conjuntas para os dois caracteres avaliados. A análise de covariância para a dupla de caracteres PMVxPMS foi conduzida seguindo-se os mesmos procedimentos adotados para as análises de variância.

Todas análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS, 1988).

3.4.1. Análises de variância para cada local

Para cada experimento, dentro de cada local, foi realizada análise de variância seguindo-se o modelo matemático associado ao delineamento em blocos ao acaso (STEEL & TORRIE, 1960):

$$Y_{ij} = m + p_i + b_j + e_{ij} \text{ , sendo:}$$

Y_{ij} a observação da progênie i no bloco j ;

m a média geral do experimento;

p_i o efeito da progênie i , $i = 1$ a 116;

b_j o efeito do bloco j , $j = 1$ a 3;

e_{ij} o erro experimental associado a progênie i no bloco j .

As somas de quadrados e os respectivos graus de liberdade da fonte de variação progênie foram desdobrados em P_{orig} (progênie originais), P_{reg} (progênie regeneradas) e comparação P_{orig} versus P_{reg} , para todas as análises efetuadas. As análises de variância individuais foram feitas considerando o esquema apresentado na Tabela 1.

TABELA 1. Quadro da análise de variância, com fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e esperanças dos quadrados médios [E(QM)], correspondentes ao modelo matemático utilizado para as análises individuais.

FV	GL ¹	GL ²	SQ	QM	E(QM)
BLOCOS	j-1=2	j-1=2	SQB	QMB	—
PROGÊNIES	i-1=57	i-1=57	SQP	QMP	$\sigma_E^2 + j\sigma_P^2$
P _{orig}	m-1=25	m'-1=26	SQP _o	QMP _o	$\sigma_E^2 + j\sigma_{P_o}^2$
P _{reg}	n-1=31	n'-1=30	SQP _r	QMP _r	$\sigma_E^2 + j\sigma_{P_r}^2$
P _{orig} vs P _{reg}	57-25-31=1	57-26-30=1	SQ1	QM1	—
RESÍDUO	(j-1)(i-1)=114	(j-1)(i-1)=114	SQR	QMR	σ_E^2
TOTAL	ij-1=173	ij-1=173			

onde:

j = número de blocos (repetições), j=3;

i = número de progênies por experimento, i=58;

m = número de progênies originais no experimento 1 (GL1), m = 26;

m' = número de progênies originais no experimento 2 (GL2), m' = 27;

n = número de progênies regeneradas no experimento 1, n = 32;

n' = número de progênies regeneradas no experimento 2, n' = 31.

Após as análises individuais, os experimentos foram agrupados dentro de cada local, para que os parâmetros genéticos fossem estimados para as 116 progênes avaliadas. A estrutura da análise de variância referente ao agrupamento dos experimentos 1 e 2 está apresentada na Tabela 2.

TABELA 2. Quadro da análise de variância, com fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e teste F, correspondentes ao agrupamento dos experimentos 1 e 2, realizado dentro de cada local.

FV	GL ³	SQ ¹	QM	F
EXPERIMENTO	1	—	—	—
BLOCOS / EXP.	4	SQB	QMB	—
PROGÊNIES / EXP.	114	SQP	QMP	QMP/QMR
Porig / EXP.	51	SQP _o	QMP _o	QMP _o /QMR
Preg / EXP.	61	SQP _r	QMP _r	QMP _r /QMR
Porig vs Preg / EXP.	2	SQ ₁	QM ₁	QM ₁ /QMR
RESÍDUO MÉDIO	228	SQR	QMR	
TOTAL	347			

GL³ e SQ¹ = somatório dos graus de liberdade e soma de quadrados dos experimentos 1 (GL¹) e 2 (GL²), respectivamente, apresentados na Tabela 1.

Todos quadrados médios (QM) foram testados com o QM do resíduo, de acordo com as esperanças E(QM) apresentadas na Tabela 1, inclusive o QM₁ da fonte de variação P_{orig} versus P_{reg} (Tabela 2).

3.4.2. Análises de variância conjuntas

Análises de variância conjuntas para cada caráter, nas quais os três locais de cada experimento foram reunidos, foram realizadas adotando-se o seguinte modelo matemático (COCHRAN & COX, 1969):

$Y_{ijk} = m + p_i + b_{i/k} + l_k + (pl)_{ik} + e_{ijk}$, sendo:

- Y_{ijk} a observação da progênie i na repetição j do local k;
- m a média geral;
- p_i o efeito da progênie i;
- $b_{i/k}$ o efeito da repetição j dentro do local k;
- l_k o efeito do local k;
- $(pl)_{ik}$ o efeito da interação entre a progênie i e o local k, e
- e_{ijk} o erro associado à parcela ij do local k.

A estrutura das análises de variância conjuntas para cada experimento é semelhante ao quadro apresentado na Tabela 1, apresentando duas fontes novas de variação (locais e interação progênes x locais), além do desdobramento dos graus de liberdade e dos quadrados médios (Tabela 3).

Os quadrados médios das respectivas fontes de variação foram testados de acordo com as E(QM) apresentadas na Tabela 3.

Após as análises conjuntas, os experimentos foram agrupados para que os parâmetros genéticos fossem estimados para as 116 progênes avaliadas nos três locais diferentes. A análise de variância correspondente ao agrupamento das análises conjuntas dos experimentos 1 e 2 apresenta a estrutura que pode ser visualizada na Tabela 4.

TABELA 3. Quadro da análise de variância, com fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e esperanças dos quadrados médios [E(QM)], correspondente ao modelo matemático utilizado para as análises conjuntas.

FV	GL ¹	GL ²	SQ	QM	E(QM)
BLOCO/LOC.	$k(j-1)=6$	$k(j-1)=6$	SQB	QMB	—
LOC.	$k-1=2$	$k-1=2$	—	—	—
PROGÊNIES	$i-1=57$	$i-1=57$	SQP	QMP	$\sigma_E^2 + j\sigma_{PL}^2 + jk\sigma_P^2$
Porig	$m-1=25$	$m'-1=26$	SQP _o	QMP _o	$\sigma_E^2 + j\sigma_{PL}^2 + jk\sigma_{Po}^2$
Preg	$n-1=31$	$n'-1=30$	SQP _r	QMP _r	$\sigma_E^2 + j\sigma_{PL}^2 + jk\sigma_{Pr}^2$
Porig vs Preg	$57-25-31=1$	$57-26-30=1$	SQ1	QM1	—
PROGxLOC.	$(k-1)(l-1)=114$	$(k-1)(l-1)=114$	SQP _L	QMPL	$\sigma_E^2 + j\sigma_{PL}^2$
Porig x LOC.	$(k-1)(m-1)=50$	$(k-1)(m'-1)=52$	SQP _{oL}	QMP _{oL}	$\sigma_E^2 + j\sigma_{PoL}^2$
Preg x LOC.	$(k-1)(n-1)=62$	$(k-1)(n'-1)=60$	SQP _{rL}	QMP _{rL}	$\sigma_E^2 + j\sigma_{PrL}^2$
PorigvsPregxLOC	$114-50-62=2$	$114-52-60=2$	SQ2	QM2	—
RESÍDUO MÉDIO	$k(j-1)(i-1)=342$	$k(j-1)(i-1)=342$	SQR	QMR	σ_E^2
TOTAL	$ijk-1=521$	$ijk-1=521$			

onde;

k = número de locais, $k = 3$;

j = número de blocos (repetições), $j = 3$;

i = número de progênies por experimento, $i = 58$;

m = número de progênies originais no experimento 1 (GL1), $m = 26$;

m' = número de progênies originais no experimento 2 (GL2), $m' = 27$;

n = número de progênies regeneradas no experimento 1, $n = 32$;

n' = número de progênies regeneradas no experimento 2, $n' = 31$.

TABELA 4. Quadro da análise de variância, com fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e teste F, correspondentes ao agrupamento das análises conjuntas.

FV	GL ⁴	SQ ²	QM	F
EXPERIMENTO				
BLOC / LOCAIS / EXP	k(j-1)=6	SQB	QMB	QMB/QMR
LOCAIS / EXP	k-1=2	SQL	QML	QML/QMB
PROGÊNIES / EXP	i-1=57	SQP	QMP	QMP/QMPL
Porig / EXP	m-1=25	SQPo	QMPo	QMPo/QMPL
Preg / EXP	n-1=31	SQPr	QMPr	QMPr/QMPL
Porig vs Preg / EXP	57-25-31=1	SQ1	QM1	QM1/QMPL
PROGxLOCAIS / EXP	(k-1)(l-1)=114	SQpL	QMPL	QMPL/QMR
Porig x LOCAIS / EXP	(k-1)(m-1)=50	SQPoL	QMPoL	QMPoL/QMR
Preg x LOCAIS / EXP	(k-1)(n-1)=62	SQPrL	QMPrL	QMPrL/QMR
PorigvsPregxLOCAIS / EXP	114-50-62=2	SQ2	QM2	Q2/QMR
RESÍDUO MÉDIO	k(j-1)(i-1)=342	SQR	QMR	
TOTAL	ijk-1=521			

GL⁴ e SQ² = somatório dos graus de liberdade (GL¹) e (GL²) e das somas de quadrados dos experimentos 1 e 2, respectivamente, apresentados na Tabela 3.

3.4.3. Estimativas dos componentes de variância, da herdabilidade e do progresso esperado com seleção

A partir da Tabela 2, análise agrupada dentro de cada local, os parâmetros componentes da variação fenotípica para os dois caracteres foram estimados da seguinte maneira:

- Variância genética entre progênies: $\sigma_p^2 = (QM_p - QM_E)/r$
- Variância do erro experimental entre parcelas: $\sigma_E^2 = QM_E$

- Variância fenotípica entre médias de progênes: $\sigma_F^2 = QM_P / r$

Com estas estimativas foram obtidos os seguintes parâmetros genéticos:

- Herdabilidade ao nível de médias de progênes: $h_m^2 = \sigma_P^2 / \sigma_F^2$
- Progresso esperado com seleção entre progênes: $Gs = ds \frac{\sigma_P^2}{\sqrt{\sigma_F^2}}$
- Progresso esperado com seleção entre progênes, em porcentagem:

$$Gs\% = \frac{Gs}{x} 100$$

onde:

QM_P = quadrado médio entre progênes;

QM_E = quadrado médio do erro experimental;

r = número de repetições;

$ds = \bar{X}_s - \bar{X}$ (diferencial de seleção);

$\bar{X}$ = média experimental;

$\bar{X}_s$ = média das progênes selecionadas.

A partir da Tabela 4, que apresenta a estrutura do agrupamento das análises conjuntas de cada experimento, os parâmetros componentes da variação fenotípica para os dois caracteres foram estimados da seguinte maneira:

- Variância genética entre progênes: $\sigma_P^2 = (QM_P - QM_{PL})/rl$
- Variância das interações entre progênes e locais: $\sigma_{PL}^2 = (QM_{PL} - QM_E)/r$
- Variância do erro experimental entre parcelas: $\sigma_E^2 = QM_E$
- Variância fenotípica entre médias de progênes: $\sigma_F^2 = QM_P / rl$

Com estas estimativas foram obtidos os seguintes parâmetros genéticos:

- Herdabilidade ao nível de médias de progênes: $h_m^2 = \sigma_P^2 / \sigma_F^2$
- Progresso esperado com seleção entre progênes: $Gs = ds \frac{\sigma_P^2}{\sqrt{\sigma_F^2}}$
- Progresso esperado com seleção entre progênes, em porcentagem:

$$Gs\% = \frac{Gs}{x} 100$$

onde:

QM_P = quadrado médio entre progênes;

QM_{PL} = quadrado médio das interações entre progênes e locais;

QM_E = quadrado médio do erro experimental;

r = número de repetições;

l = número de locais utilizados para cada experimento;

$ds = \bar{X}_s - \bar{X}$ (diferencial de seleção);

$\bar{X}$ = média experimental;

$\bar{X}_s$ = média das progênes selecionadas.

A partir do cálculo do progresso esperado com seleção, foram obtidas as médias esperadas das populações original e regenerada selecionadas, considerando um ganho de seleção de 10%, através da expressão:

- $\mu_s = \bar{X} + Gs,$

onde μ_s é a média esperada das populações melhoradas após seleção.

Além dos parâmetros acima, foi estimado o coeficiente de variação experimental (CV_e), em porcentagem:

- $$CV_e\% = \frac{\sqrt{\sigma_e^2}}{\bar{x}} 100.$$

Todos os procedimentos foram executados para as progênies regeneradas (r) e originais (o), separadamente.

3.4.4. Análise de covariância e cálculo dos coeficientes de correlação genética e fenotípica

Foi estimado o coeficiente de correlação genética para a associação entre os dois caracteres estudados, separadamente para as progênies regeneradas e originais, semelhante ao procedimento adotado para os componentes de variância, coeficiente de herdabilidade e progresso esperado com seleção.

A correlação foi estimada através das covariâncias e das variâncias obtidas para os dois caracteres. Após a realização de cada análise de variância individual, foi realizada a análise correspondente à soma dos dois caracteres, seguindo-se a mesma estrutura apresentada nas análises de variância.

Desta forma, foram calculadas as covariâncias genéticas e fenotípicas entre os caracteres X e Y, para as análises agrupadas dentro de cada local (Tabela 2), usando-se as seguintes fórmulas:

- Covariância genética entre caracteres: $COV_{G(XY)} = (PM_{PXY} - PM_{EXY}) / r$
- Covariância fenotípica entre médias de dois caracteres : $COV_F = PM_{PXY} / r$

Após o agrupamento das análises conjuntas de cada experimento, foram calculadas as covariâncias genéticas e fenotípicas entre os caracteres X e Y, de acordo com a estrutura da análise de variância apresentada na Tabela 4, usando-se as seguintes fórmulas:

- Covariância genética entre caracteres: $COV_{G(xy)} = (PM_{Pxy} - PM_{PLxy}) / rl$
- Covariância fenotípica entre médias de dois caracteres : $COV_F = PM_{p_{xy}} / rl$,

onde:

X e Y referem-se aos dois caracteres em estudo;

Z refere-se à soma dos dois caracteres;

PM_{Exy} = covariância residual;

$PM_{Pxy} = (1/2)(QM_{Pz} - QM_{Px} - QM_{Py})$;

$PM_{PLxy} = (1/2)(QM_{PLz} - QM_{PLx} - QM_{PLy})$

PM_{Pxy} : produto médio entre progênies para os caracteres X e Y;

QM_{Pz} : quadrado médio entre progênies para a soma X + Y;

QM_{Px} : quadrado médio entre progênies para o caráter X;

QM_{Py} : quadrado médio entre progênies para o caráter Y;

PM_{PLxy} : produto médio das interações entre progênies e locais entre os caracteres X e Y;

QM_{PLz} : quadrado médio das interações entre progênies e locais para a soma X+Y;

QM_{PLx} : quadrado médio das interações entre progênies e locais para o caráter X;

QM_{PLy} : quadrado médio das interações entre progênies e locais para o caráter Y;

As esperanças matemáticas dos produtos médios são semelhantes às dos quadrados médios apresentados nas Tabelas 2 e 4, substituindo-se apenas variância (σ^2) por covariância (COV).

Finalmente, foram estimados os coeficientes de correlações genéticas e fenotípicas entre médias, para as progênies regeneradas e originais, a partir das seguintes expressões:

- Coeficiente de correlação genética: $r_{G(xy)} = \frac{COV_{P(xy)}}{\sqrt{\sigma_{P(x)}^2 \cdot \sigma_{P(y)}^2}}$
- Coeficiente de correlação fenotípica entre médias: $r_{\bar{F}(xy)} = \frac{COV_{\bar{F}(xy)}}{\sqrt{\sigma_{\bar{F}(x)}^2 \cdot \sigma_{\bar{F}(y)}^2}}$

3.5. Análise molecular via RAPD

Uma análise preliminar foi realizada para 6 progênies regeneradas e 6 progênies originais retiradas aleatoriamente do conjunto de 116 progênies avaliado para caracteres quantitativos. Cada progênie foi representada por 3 plantas ou repetições, totalizando 36 plantas que foram analisadas a partir dos padrões de amplificação de 4 primers. Esta primeira etapa apresentou basicamente dois objetivos: i) otimização das reações de RAPD; e, ii) cálculo do coeficiente de similaridade médio dentro de cada progênie.

Posteriormente, outra amostra de 20 progênies foi retirada do mesmo conjunto de progênies, perfazendo um total de 32 progênies analisadas. Nesta segunda fase, foram utilizados "pools" de DNA de 3 plantas de cada progênie nas reações de RAPD, amplificadas a partir de 10 primers.

3.5.1. Extração do DNA genômico

As sementes obtidas da amostra das progênies R₂ e O₂ foram germinadas in vitro. Três plantas de cada progênie, com cerca de 10 dias, foram diretamente usadas para extração do DNA, utilizando-se o método de CTAB descrito por MURRAY & THOMPSON (1980) e ROGERS & BENDICH (1985), com modificações.

Foram utilizados, aproximadamente, 100 mg de tecido fresco de cada planta, macerados em nitrogênio líquido. Após a maceração, o material foi colocado em eppendorfs de 2 ml, contendo 1 ml do tampão de extração CTAB previamente aquecido a 65°C. O material foi homogeneizado com o auxílio de uma espátula, e mantido a 65°C por 30 min, em banho maria, com agitações brandas e periódicas. Após a retirada dos eppendorfs do banho maria, acrescentou-se uma mistura de 700 µl de clorofórmio-octanol na proporção de 24:1, respectivamente, homogeneizada por inversões dos tubos.

Composição do tampão de extração CTAB:

Tris-HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	1,4 M
EDTA 4Na	20 mM
CTAB	2% (p/v)
PVP 40.000	1% (p/v)

As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf, recuperando-se 700 µl do sobrenadante ou fase

aquosa, os quais foram transferidos para novos tubos de 2 ml. Para a precipitação do DNA, acrescentou-se 520 µl de isopropanol, invertendo-se cuidadosamente os tubos, que foram mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente, ou colocados na geladeira a 4°C para favorecer a precipitação. O DNA precipitado foi recuperado através de centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos. O isopropanol foi descartado e os resíduos foram removidos passando-se uma espátula envolvida em papel Kleenex® dentro de cada tubo.

Em seguida, adicionou-se 1 ml de solução de lavagem ("wash") nos tubos, deixando os DNAs em imersão por 30 minutos. A solução "wash" foi descartada e os resíduos foram eliminados repetindo-se o procedimento adotado para a eliminação do isopropanol.

Acrescentou-se 100 µl de solução TE aos tubos eppendorfs, os quais permaneceram à temperatura de aproximadamente 4°C por cerca de 18h, até a ressuspensão completa do DNA. O DNA foi novamente precipitado acrescentando-se 50 µl de acetato de NH₄ (7,5 M) e 375 µl de etanol absoluto. O conteúdo do tubo foi misturado por inversões suaves e o DNA precipitado foi recuperado através da centrifugação por 15 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e uma última lavagem foi realizada adicionando-se 500 µl de etanol 70%, durante 20 minutos. O etanol 70% foi descartado e os resíduos foram eliminados passando uma espátula envolvida em papel Kleenex® dentro de cada tubo.

Finalmente, o DNA de cada planta foi ressuspendido em 100 µl de solução TE, quantificado e diluído para utilização nas reações de RAPD.

Solução "wash"

Etanol	76%
Acetado de NH ₄	10 mM

Solução TE

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

3.5.2. Quantificação do DNA

A quantificação foi realizada através da eletroforese de alíquotas de cada DNA, comparando-se com uma série de concentrações de DNA do fago λ (10 a 100 ng) em géis de agarose 0,8% (p/v). A concentração de DNA foi estimada a partir da comparação visual da intensidade das bandas, reveladas pela coloração com brometo de etídeo. Diluições de 10 ng/ μ l foram feitas e novas alíquotas foram submetidas a eletroforese, para confirmar as concentrações. Diluições em volumes de 500 μ l foram feitas com o objetivo de serem utilizadas durante todo o experimento de amplificação pela técnica de RAPD. Estas diluições foram feitas em tampão contendo apenas 10 mM de Tris-HCl pH 8,0. O EDTA em excesso interfere na reação de amplificação devido à sua capacidade em quelar íons de Mg^{2+} , que são necessários para a atividade da enzima *Taq* DNA polimerase.

O DNA quantificado e diluído de cada planta individual foi misturado em partes iguais (1:1:1), e utilizado nas reações para a análise do "pool" de DNAs das três plantas de cada progênie.

3.5.3. Condições de Amplificação

As reações foram amplificadas no termociclador TC 01, da Perkin Elmer-Cetus, de acordo com condições descritas por VIEIRA et al (1995), com modificações. As reações foram submetidas a 40 ciclos de amplificação, após desnaturação inicial a 92°C por 4 min. Cada ciclo consistiu de 45 seg a 92°C, 1min 30 seg a 40°C e 1min 30 seg a 72°C. Ao final dos 40 ciclos, foi realizada uma extensão final de 5 min a 72°C.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese (3V/cm) em géis de agarose 1,4% (p/v), utilizando o tampão de corrida TBE 1X. O DNA de λ clivado com HindIII ou Ladder 100pb foram usados como marcadores de peso molecular e uma reação em branco, não apresentando DNA, foi utilizada para verificar a presença de DNA contaminante. Os géis foram corados com brometo de etídeo (1µg/ml de TBE) e fotografados sob luz UV.

Tampão de corrida TBE 1X

Tris-Borato	0,09 M
EDTA pH 8,0	0,002 M

3.5.4. Análise preliminar

As reações, para as 12 progênes inicialmente analisadas, foram feitas de acordo com KAZAN et al (1993a) e VIEIRA et al (1995), alterando-se apenas o volume da reação, passando a ser realizadas em volume de 20 µl contendo:

- 10 mM Tris-HCl (pH 8,3)
- 50 mM KCl
- 4,0 mM MgCl₂
- 0,2 mM de cada dNTP (Pharmacia)
- 0,2 µM primer (Operon Technologies)
- 1,5 unidades de enzima *Taq*-DNA polimerase (Pharmacia)
- 40 ng de DNA
- H₂O q.s.p.

3.5.5. Análise de "pool" de DNA

As reações de amplificação usando-se a mistura do DNA de três indivíduos, para cada uma das 32 progênes amostradas, sofreram modificações após a otimização, para volume final da reação, concentração da enzima e quantidade de DNA. Estas reações passaram a ser realizadas em volumes de 15 µl contendo:

10 mM Tris-HCl (pH 8,3)

50 mM KCl

4,0 mM MgCl₂

0,2 mM de cada dNTP (Pharmacia)

0,2 µM primer (Operon Technologies)

1,0 unidades de enzima *Taq*-DNA polimerase (Pharmacia)

30 ng de DNA

H₂O q.s.p

3.5.6. Seleção de primers para utilização nas reações de RAPD

A seleção de primers foi realizada usando-se 9 primers, sendo 7 do Kit F (OPF-01 a OPF-03, OPF-05, OPF-09, OPF-12 e OPF-16), um do Kit D (OPD-12) e um do Kit G (OPG-03). Esta seleção foi feita utilizando-se DNA de apenas três progênies (69PO, 10R e 133R). Posteriormente, outras progênies (3PO, 66PO, 2R e 13R) foram utilizadas para seleção de primers polimórficos, a partir do "pool" de DNA de três indivíduos. Nesta fase, foram utilizados três primers do Kit A (OPA-07 a OPA-9) e três do Kit E (OPE-01, OPE-09 e OPE-17). Estes primers foram previamente selecionados a partir de uma avaliação dos produtos de amplificação gerados pelos primers OP-1 a OP-19, tanto para o Kit A quanto para o Kit E.

3.5.7. Análise dos dados moleculares

A análise dos dados moleculares foi realizada a partir da leitura dos géis, baseada na presença ou ausência (1 ou 0, respectivamente) de cada banda com o mesmo peso molecular. Com estes dados, construiu-se uma matriz binária, apresentando na horizontal as progênies analisadas, representadas por três indivíduos ou pelo "pool" de DNA das três plantas, e na vertical, os dados referentes à presença ou ausência de bandas obtidos a partir de todos os produtos de amplificação gerados pelos primers utilizados.

A partir da matriz binária foram calculados os coeficientes de similaridade entre todas as progênies através do coeficiente de coincidência simples (Simple Matching), obtido pela fórmula $SM = (a + d) / n$. Este coeficiente baseia-se tanto na presença de coincidências positivas (a: número de bandas presente nas duas plantas), quanto na presença de coincidências negativas (d: número de ausências de bandas nas duas plantas) onde n representa o total de bandas obtidas. A matriz de parença ou de similaridade, gerada por este coeficiente, foi utilizada para a construção de dendrogramas através de técnicas de agrupamento.

As análises de agrupamentos foram realizadas utilizando-se o método das médias das distâncias ou UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages). Este é um processo hierárquico, e em cada passo diminui uma dimensão da matriz de parença pela reunião de pares mais semelhantes, até reunir todos os pontos em um único grupo (BUSSAB et al, 1990).

Na análise das plantas individuais, foram calculados os coeficientes médios dentro de cada progênie, eliminando o fator repetição, e entre progênies a partir da matriz de similaridade entre todos os indivíduos de acordo com um modelo hierárquico (VENCOVSKY, 1995¹). Estes coeficientes médios foram utilizados para elaboração de uma matriz de parença, gerando um dendrograma a partir de técnicas de agrupamentos.

- Coeficiente médio dentro de progênie: $\bar{S}_{Di'j'} = \frac{\sum (a+d)_{jj'}}{\sum n_{jj'}}$, para $i = i'$ e $j \neq j'$
ou simplesmente $\bar{S}_{Di'j'} = \frac{\sum S_{jj'}}{3}$, para $i = i'$ e $j \neq j'$;
- Coeficiente médio entre progênies: $\bar{S}_{Ei'j'} = \frac{\sum (a+d)_{jj'}}{\sum n_{jj'}}$, para $i \neq i'$ e tanto para $j = j'$ como $j \neq j'$.

ou simplesmente $\bar{S}_{Ei'j'} = \frac{\sum S_{jj'}}{9}$, para $i \neq i'$ e tanto para $j = j'$ como $j \neq j'$,

onde: i = progênies e j = plantas ou repetições por progênies. Por exemplo:

		i=3PO			i=4PO		
		j=1	j=2	j=3	j=1	j=2	j=3
i'=3PO	j'=1	—					
	j'=2	⊗	—				
	j'=3	⊗	⊗	—			
i'=4PO	j'=1	Δ	Δ	Δ	—		
	j'=2	Δ	Δ	Δ	⊗	—	
	j'=3	Δ	Δ	Δ	⊗	⊗	—

onde ⊗ representa os valores utilizados para o cálculo dos coeficientes médios dentro de progênies, para $i=i'$ e $j \neq j'$, e Δ

¹VENCOVSKY, R. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba, SP) Comunicação pessoal, 1995.

representa os valores utilizados para o cálculo dos coeficientes médios entre progênies, com $i \neq i'$ e tanto para $j = j'$ como $j \neq j'$.

O cálculo através da média não ponderada é válido somente para o coeficiente SM, uma vez que os denominadores ($n_{jj'} = a + b + c + d$, correspondendo ao número total de bandas obtidas) são iguais para o cálculo das similaridades entre todas as comparações, sendo:

		i	
		+	-
i'	+	a	b
	-	c	d

onde: + e - referem-se a presença ou ausência de bandas, respectivamente nas plantas i e i'.

3.5.8. Coeficiente de correlação cofenética (r_{cof})

O coeficiente de correlação cofenética é utilizado para se avaliar o desempenho da análise de agrupamento através de indicadores quantitativos, calculando uma correlação entre os correspondentes elementos da matriz de similaridade original e a matriz de similaridade produzida por um método de agrupamento hierárquico. Este coeficiente foi inicialmente proposto para se avaliar a concordância entre um agrupamento obtido e sua estrutura original, passando a ser empregado, posteriormente, como um método de avaliação para diferentes agrupamentos obtidos a partir do mesmo conjunto de dados (BUSSAB et al, 1990).

Todas as análises dos dados moleculares foram obtidas utilizando-se o pacote de análise estatística NTSYS (Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs) versão 1.7 (RHOLF, 1992).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise dos dados de campo

4.1.1. Análise de variância individual por experimento

Conforme descrito, as 116 progênes foram avaliadas em três locais, com dois experimentos cada, localizados na área experimental da Fazenda Anhembi pertencente ao Depto de Genética. No experimento 1, foram analisadas 26 progênes originais e 32 regeneradas, enquanto no experimento 2, foram analisadas 27 progênes originais e 31 regeneradas.

Nas Tabelas 5 e 6 estão apresentados os valores dos quadrados médios e os coeficientes de variação para as análises individuais dos experimentos 1 e 2, respectivamente, dentro de cada local, para os caracteres PMV e PMS. Para as progênes regeneradas, foi possível detectar a presença de variabilidade genética para os conjuntos de progênes avaliados nos experimentos 1 e 2 nos três locais, tanto para PMV quanto PMS (Tabelas 5 e 6). No entanto, para as progênes originais avaliadas no experimento 1, não detectou-se variabilidade genética para o caráter PMV no local 1 e para PMS no local 3 (Tabela 5). Já para o grupo de progênes originais avaliadas no experimento 2, não se verificou variabilidade genética para PMV, somente para as análises realizadas no local 2, enquanto para PMS, não se detectou variabilidade nos locais 2 e 3 (Tabela 6).

TABELA 5. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV%) das análises de variância individuais do experimento 1 nos três locais, para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS).

FV	GL	QM ^a					
		LOCAL 1		LOCAL 2		LOCAL 3	
		PMV	PMS	PMV	PMS	PMV	PMS
Progênes	57	15,8847**	1,5703**	28,6059**	2,7365**	15,0489**	1,3015**
Porig	25	7,2218 ^{ns}	0,9246 *	21,3948**	2,1332 *	13,2685 *	1,0852 ^{ns}
Preg	31	21,8534 *	0,2083**	32,9860**	2,9946**	14,7511**	1,3417**
Porig vs Preg	1	36,0232**	0,1830 ^{ns}	73,0179 *	9,8152**	68,7938**	5,4619**
Erro	114	5,1770	0,5768	11,4723	1,2545	7,8819	0,7634
CV% orig		21,78%	24,13%	28,90%	30,07%	33,79%	33,35%
CV% reg		13,87%	25,82%	32,51%	34,49%	39,85%	38,55%

^a valores dos quadrados médios (QM) foram multiplicados por 10⁻⁵

*, ** significativos a 5% e 1%, respectivamente; ^{ns} não significativo

TABELA 6. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV%) das análises de variância individuais do experimento 2 nos três locais, para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS).

FV	GL	QM ^a					
		LOCAL 1		LOCAL 2		LOCAL 3	
		PMV	PMS	PMV	PMS	PMV	PMS
Progênes	57	16,6516**	1,2586**	15,0901**	2,2550**	21,4701**	1,6066**
Porig	26	7,9176**	1,0114**	9,7204 ^{ns}	1,4010 ^{ns}	18,3424 *	1,3066 ^{ns}
Preg	30	12,6412**	1,4322**	19,5580**	3,0084**	22,2397**	1,7486**
Porig vs Preg	1	22,0526 *	2,4801**	20,6684 ^{ns}	1,8558 ^{ns}	79,7032**	5,1452**
Erro	114	3,8741	0,5352	11,4723	1,3420	11,8236	0,9111
CV% orig		26,76%	27,40%	32,14%	31,20%	35,96%	35,63%
CV% reg		29,64%	30,09%	34,75%	33,04%	41,91%	40,89%

^a valores dos quadrados médios (QM) foram multiplicados por 10⁻⁵

*, ** significativos a 5% e 1%, respectivamente; ^{ns} não significativo

As significâncias observadas na fonte de variação P_{orig} versus P_{reg} , para a maioria dos experimentos, indicam a presença de diferenças significativas entre as médias das populações original e regenerada.

4.1.2. Análise de variância por local

As médias dos caracteres peso de matéria verde (PMV) e peso de matéria seca (PMS) da população regenerada apresentaram-se inferiores em relação às médias da população original para todos os locais. As amplitudes também foram inferiores para a população regenerada para os dois caracteres, com exceção para PMV no local 1, onde o valor máximo detectado para a população regenerada foi superior em relação ao valor máximo da população original (Tabelas 7).

TABELA 7. Médias e amplitudes dos caracteres produção de matéria verde (PMV, em g/planta) e produção de matéria seca (PMS, em g/planta) das populações original e regenerada, obtidas a partir do agrupamento das análises individuais dos experimentos 1 e 2 para cada local.

	PMV			
	População Original		População Regenerada	
	Média	Amplitude	Média	Amplitude
Local 1	2805,22	1396,00 - 4040,33	2564,19	867,11 - 4334,78
Local 2	3299,70	1983,56 - 6285,44	2996,83	1173,22 - 5204,22
Local 3	2829,42	1534,67 - 5476,56	2408,32	1046,23 - 4783,73
	PMS			
	População Original		População Regenerada	
	Média	Amplitude	Média	Amplitude
Local 1	918,51	505,22 - 1273,33	850,76	285,78 - 1307,78
Local 2	1175,98	764,35 - 2075,78	1076,12	343,56 - 1894,11
Local 3	838,47	542,63 - 1478,56	727,29	299,74 - 1359,87

As análises agrupadas dentro de cada local para os dois caracteres avaliados foram obtidas a partir do somatório dos graus de liberdade e das somas de quadrados das análises individuais para ambos caracteres.

Com o agrupamento dos dados foi possível detectar variabilidade genética entre as 53 progênes originais e as 63 regeneradas para os três locais, para os dois caracteres avaliados. Além da variabilidade genética detectada dentro de cada população, os contrastes entre progênes originais *versus* progênes regeneradas também apresentaram significância para ambos caracteres nos três locais (Tabela 8).

Assim, a média da população original para o caráter PMV ($PMV_{L1}=2805,22$; $PMV_{L2}=3299,70$ e $PMV_{L3}=2829,42$ g/planta) foram significativamente superiores em relação às médias da população regenerada ($PMV_{L1}=2564,19$; $PMV_{L2}=2996,83$ e $PMV_{L3}=2408,32$), para os três locais. O mesmo comportamento também foi observado para PMS nos três locais, onde as médias da população original ($PMS_{L1}=919,51$; $PMS_{L2}=1175,98$ e $PMS_{L3}=838,47$ g/planta) diferiram significativamente das médias da população regenerada ($PMS_{L1}=850,76$; $PMS_{L2}=1067,12$ e $PMS_{L3}=727,29$) (Tabela 7).

As estimativas das variâncias genéticas entre progênes (σ_{Po}^2 , σ_{Pr}^2), variâncias ambientais (σ_E^2), variâncias fenotípicas entre médias (σ_{Fo}^2 , σ_{Fr}^2), herdabilidade ao nível de médias (h_{mo}^2 , h_{mr}^2) e ganho com seleção ($G_{s_{Po}}$, $G_{s_{Pr}}$) para as populações original (o) e regenerada (r) obtidas a partir das análises agrupadas, tanto para PMV e PMS, estão apresentadas na Tabela 9.

Ao contrário do comportamento observado para as médias, a população regenerada apresentou valores superiores para todos os parâmetros

TABELA 8. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV%) dos agrupamentos das análises de variância individuais do experimento 1 e 2 nos três locais, para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS).

FV	GL	QM ^a					
		LOCAL 1		LOCAL 2		LOCAL 3	
		PMV	PMS	PMV	PMS	PMV	PMS
Bloc / Exp.	4	37,2025**	1,8619**	10,1071 ^{ns}	2,6774 ^{ns}	32,1710 ^{ns}	2,4100 ^{ns}
Prog. / Exp.	114	13,1682**	1,4145**	21,8480**	2,4957**	18,2595**	1,4540**
Porig / Exp.	51	7,5765**	0,9688**	15,4431**	1,7599 *	15,8552**	1,1981 *
Preg / Exp.	61	17,3228**	1,7628**	26,3834**	3,0014**	18,4340**	1,5417**
Po vs Pr/Exp.	2	29,0379**	2,1553 *	46,8431**	5,8355**	74,2485**	5,3036**
Erro Médio	228	4,5256	0,5560	10,1037	1,2983	9,8527	0,8372
CV% orig		23,98%	25,67%	30,46%	30,64%	35,08%	34,51%
CV% reg		26,24%	27,72%	33,54%	33,77%	41,22%	39,78%

^a valores dos quadrados médios (QM) multiplicados por 10⁻⁵

*, ** significativos a 5% e 1%, respectivamente; ^{ns} não significativo

TABELA 9. Estimativas das variâncias genéticas entre progênes (σ_{Po}^2 , σ_{Pr}^2), variâncias fenotípicas entre médias (σ_{Fo}^2 , σ_{Fr}^2), herdabilidade ao nível de médias (h_{mo}^2 , h_{mr}^2) e ganho com seleção (Gs_{Po} , Gs_{Pr}) para as populações original (o) e regenerada (r) para produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), obtidas a partir do agrupamento das análises de variâncias individuais dos experimentos 1 e 2, nos três locais.

Parâmetros	LOCAL 1		LOCAL 2		LOCAL 3	
	PMV	PMS	PMV	PMS	PMV	PMS
σ_{Po}^2 ^a	101,698	13,762	167,980	15,390	200,081	12,029
σ_{Pr}^2 ^a	426,575	40,226	542,655	56,771	286,041	23,486
σ_{Fo}^2 ^a	252,551	32,295	514,771	58,665	528,506	39,937
σ_{Fr}^2 ^a	577,427	58,759	879,446	100,047	614,466	51,393
h_{mo}^2	0,4027	0,4261	0,3457	0,2623	0,3786	0,3012
h_{mr}^2	0,7388	0,6846	0,6170	0,5674	0,4655	0,4570
Gs_{Po}^0	12,66	14,63	13,90	9,48	17,07	12,60
Gs_{Pr}^0	38,42	34,23	33,89	29,52	26,59	25,00

^a valores multiplicados por 10⁻³

estimados em relação aos valores relacionados com a população original para as análises dos três locais.

Para o carácter PMV, observou-se acréscimos de até 4,2 vezes na variância genética da população regenerada ($\sigma_{Pr}^2=426,575$) em relação à população original ($\sigma_{Po}^2=101,698$) referente às análises do local 1. Para as análises dos locais 2 ($\sigma_{Pr}^2=542,655$, $\sigma_{Po}^2=167,980$) e 3 ($\sigma_{Pr}^2=286,041$, $\sigma_{Po}^2=200,081$) foram observados acréscimos de 3,0 e 1,4 vezes, respectivamente, na variância genética da população regenerada. As variâncias fenotípicas entre médias da população regenerada apresentaram acréscimos de 2,3, 1,7 e 1,6 vezes em relação aos valores da população original. Tanto a herdabilidade média quanto o ganho esperado com seleção foram superiores para a população regenerada, atingindo valores de $h_{mr}^2=0,7388$ e $Gs\%_{Pr}=38,42\%$ contra $h_{mo}^2=0,4027$ e $Gs\%_{Po}=12,66\%$ para a população original no local 1.

A mesma tendência de aumento nos valores dos parâmetros relacionados com a população regenerada em relação à população original foi observada para o carácter PMS. Para a variabilidade genética, foram detectados aumentos variando de 1,9 a 3,7 vezes para os locais 3 e 2, respectivamente. Um aumento médio de 1,6 vezes foi observado na variância fenotípica entre médias para a população regenerada, apresentado uma amplitude de 1,3 a 1,8 vezes. A herdabilidade e ganho com seleção para PMS apresentou valores máximos no local 1, tanto para a população regenerada ($h_{mr}^2=0,6846$ e $Gs\%_{Pr}=34,23\%$), quanto para a população original ($h_{mo}^2=0,4261$ e $Gs\%_{Po}=14,63\%$).

As médias melhoradas esperadas, dos caracteres avaliados, para a população regenerada (μ_{mr}) passaram a apresentar valores superiores em relação às médias melhoradas da população original (μ_{mo}) para todos os locais, com

exceção do local 3, onde a média do PMV para a população original ($\mu_{mo}=3312,42$ g/planta) manteve-se superior em relação à média da população regenerada ($\mu_{mr}=3048,73$). Esta superioridade das médias melhoradas esperadas da população original em relação à população regenerada ($\mu_{mo}=994,11$ contra $\mu_{mr}=909,11$) também foi observada para PMS no local 3 (Tabela 10).

A partir dos produtos médios entre os caracteres PMV e PMS para os três locais (Tabela 11) foram estimadas as covariâncias genéticas e fenotípicas entre estes caracteres (Tabela 12).

As estimativas dos coeficientes de correlação genética (r_{Go} e r_{Gr}) e fenotípica (r_{Fo} , r_{Fr}) para o par de caracteres PMVxPMS nas populações originais e regeneradas foram positivas e apresentaram-se elevadas para todos os locais (Tabela 13).

4.1.3. Análise de variância conjunta

Os quadrados médios e os coeficientes de variação para as análises dos experimentos 1 e 2 para os dois caracteres estão apresentados na Tabela 14. Nestas análises, detectou-se diferenças significativas dentro e entre os conjuntos de progênies originais e regeneradas avaliados separadamente nos experimentos 1 e 2. Apesar de terem sido identificadas diferenças entre os locais para os dois experimentos, apenas a interação progênies x locais para os tratamentos do experimento 1 foi significativa para o caráter PMV. No entanto, com a decomposição dos graus de liberdade para progênies em progênies originais e regeneradas, não verificou-se a presença de interação significativa para progênies originais x local e progênies regeneradas x local, indicando que não houve

TABELA 10. Médias esperadas das populações original (Po) e regenerada (Pr) para os caracteres produção de matéria verde (PMV, em g/planta) e produção de matéria seca (PMS, em g/planta), envolvendo os dois experimentos de cada local.

MÉDIAS	POPULAÇÕES SELECIONADAS*					
	LOCAL 1		LOCAL 2		LOCAL 3	
	Po	Pr	Po	Pr	Po	Pr
PMV (g/planta)	3160,37	3546,39	3735,05	4012,37	3312,43	3048,73
PMS (g/planta)	1052,91	1141,99	1287,49	1382,11	944,11	909,11

* intensidade de seleção de 10%.

TABELA 11. Produtos médios (PM) obtidos nas análises agrupadas dos experimentos 1 e 2 para cada local, para a dupla de caracteres produção de matéria verde (PMV) x produção de matéria seca (PMS).

FV	GL	PM		
		LOCAL 1	LOCAL 2	LOCAL 3
		PMVxPMS	PMVxPMS	PMVxPMS
Prog. / Exp.	114	390464,76	488080,95	433849,73
Porig / Exp.	51	259380,36	502265,04	424192,59
Preg / Exp.	61	534407,58	869932,29	523184,56
Erro médio	228	147445,04	345210,33	279034,58

TABELA 12. Estimativas para as covariâncias genéticas (COV_p) e fenotípicas (COV_f) entre médias dos caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), para as populações original (o) e regenerada (r), obtidas em cada local.

	PMVxPMS		
	LOCAL 1	LOCAL 2	LOCAL 3
COV_{Po}	37311,77	52351,57	48386,00
COV_{Pr}	128987,51	174907,32	81383,32
COV_{fo}	86460,12	167421,68	141397,53
COV_{fr}	178135,86	289977,43	174394,84

TABELA 13. Estimativas dos coeficientes de correlação genética (r_G) e fenotípica (r_F) entre os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), para as populações original (o) e regenerada (r), obtidas em cada local.

	LOCAL 1	LOCAL 2	LOCAL 3
r_{Go}	0,997	1,000	0,986
r_{Gr}	0,985	0,997	0,993
r_{Fo}	0,957	0,963	0,973
r_{Fr}	0,967	0,978	0,981

TABELA 14. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV%) das análises conjuntas dos experimentos 1 e 2 de cada local, para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS).

FV	QM ^a					
			EXPERIMENTO 1		EXPERIMENTO 2	
	GL ¹	GL ²	PMV	PMS	PMV	PMS
Local	2	2	523,3336**	47,0787**	200,3029**	68,2310**
Progenies	117	57	40,6646**	3,8805**	35,6488**	3,7101**
Porig	25	26	24,8329**	2,5150**	20,5929**	2,1070**
Preg	31	30	49,1341**	4,6062**	42,4173**	4,9219**
Porig vs Preg	1	1	173,9066**	15,5174**	110,0489**	9,0322**
ProgxLocal	114	114	9,3374**	0,8639 ^{ns}	6,78152 ^{ns}	0,7051 ^{ns}
Porig x Local	50	52	8,5261 ^{ns}	0,8140 ^{ns}	7,6937 ^{ns}	0,8060 ^{ns}
Preg x Local	62	60	10,2295 ^{ns}	0,9064 ^{ns}	6,0107 ^{ns}	0,6336 ^{ns}
PorigvsPregxLocal	2	2	1,9642 ^{ns}	0,7950 ^{ns}	6,1877 ^{ns}	0,2245 ^{ns}
Resíduo médio	342	342	8,1771	0,8650	8,1443	0,9294
CV% orig			28,15%	29,38%	32,79%	31,91%
CV% reg			31,78%	33,00%	36,66%	34,97%

^a valores dos quadrados médios (QM) multiplicados por 10⁻⁵

GL¹ graus de liberdade referente ao experimento 1; GL² graus de liberdade referente ao experimento 2

*, ** significativos a 5% e 1%, respectivamente; ^{ns} não significativo

alteração sensível no comportamento relativo dos genótipos em relação aos diferentes locais.

O agrupamento foi realizado a partir do somatório dos graus de liberdade e das somas de quadrados das análises conjuntas dos dois experimentos.

As médias e amplitudes para os caracteres PMV e PMS obtidas a partir deste agrupamento apresentam o mesmo comportamento observado nas análises agrupadas dentro de cada local, ou seja, as médias da população original (PMV = 2978,11 e PMS = 1000,90) foram superiores em relação às médias da população regenerada (PMV = 2656,32 e PMS = 891,27) para os dois caracteres avaliados, assim como as amplitudes observadas (Tabela 15).

Os quadrados médios relativos ao agrupamento, bem como os coeficientes de variação para os dois caracteres avaliados estão apresentados na Tabela 16. Detectou-se diferenças altamente significativas para as progênes originais e regeneradas, indicando a presença de variabilidade genética dentro de cada população, assim como para o contraste entre as duas populações representado pela fonte de variação progênie original *versus* regenerada. Estas significâncias indicam que as médias das duas populações para PMV e PMS apresentadas na Tabela 16, diferem significativamente.

Verificou-se diferenças significativas entre os locais, mas a interação progênes x locais dentro de experimento não foi significativa, indicando que não houve alteração no comportamento das progênes, quando avaliados em locais diferentes.

Os altos valores observados para os coeficientes de variação da população original (CV% = 30,33% para PMV e CV% = 29,33% para PMS) e da população regenerada (CV% 34,00% para PMV e 33,61% para PMS) estão

TABELA 15. Médias e amplitudes obtidas a partir do agrupamento das análises conjuntas para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS) das populações original (Po) e regenerada (Pr).

	PMV (g/planta)		PMS (g/planta)	
	Média	Amplitude	Média	Amplitude
Po	2978,11	2132,67 - 4328,84	1000,90	730,33 - 1408,20
Pr	2656,32	1229,78 - 4174,35	891,27	349,13 - 1360,07

TABELA 16. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV%) obtidos a partir do agrupamento das análises conjuntas dos experimentos 1 e 2, para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS).

FV	GL	QM ^a	
		PMV	PMS
Local / Experimento	4	361,8182**	57,6548**
Progênes / Experimento	114	37,1567**	3,7953**
Porig / Experimento	51	22,6713**	2,3070**
Preg / Experimento	61	45,8310**	4,7615**
Porig vs Preg / Experimento	2	141,9777**	12,2748**
ProgxLocal / Experimento	228	6,3804 ^{ns}	0,7845 ^{ns}
Porig x Local / Experimento	102	8,1018 ^{ns}	0,8099 ^{ns}
Preg x Local / Experimento	122	8,1547 ^{ns}	0,7722 ^{ns}
Porig vs PregxLocal / Experimento	4	4,0759 ^{ns}	0,5098 ^{ns}
Resíduo médio	684	8,1607	0,8972
CV% orig		30,33%	29,93%
CV% reg		34,00%	33,61%

^a valores dos quadrados médios (QM) multiplicados por 10⁻⁵

*, ** significativos a 5% e 1%, respectivamente, ^{ns} não significativo

associados aos caracteres. Valores semelhantes foram obtidos para as análises das gerações O1 e R1 apresentadas no Apêndice 1, e também por BARROS (1977) e MARTINS & VELLO (1978).

Foram observados acréscimos de 2,60 vezes em média na variabilidade genética para os dois caracteres na população regenerada ($\sigma^2_{pr} = 418,623$ para PMV e $\sigma^2_{pr} = 44,325$ para PMS) quando comparados com os valores obtidos para a população original ($\sigma^2_{po} = 161,884$ para PMV e $\sigma^2_{po} = 16,634$ para PMS). As variâncias fenotípicas da população regenerada também foram superiores, apresentando em média, valores 2,1 vezes superiores em relação aos valores da população original. As estimativas para as variâncias das interações entre progênes x locais foram negativas para ambos caracteres nas duas populações, indicando a estabilidade das progênes originais e regeneradas quando avaliadas em locais diferentes (Tabela 17).

A população regenerada apresentou valores elevados para o coeficiente de herdabilidade de $h^2_{mr} = 0,8221$ e ganho esperado com seleção de $Gs\%_{pr} = 38,76\%$ para o caráter PMV, em relação aos valores da população original ($h^2_{mo} = 0,6426$ e $Gs\%_{po} = 19,01\%$). Os valores de $h^2_{mr} = 0,8378$ e $Gs\%_{pr} = 37,95\%$ para o caráter PMS estimados para a população regenerada também foram superiores em relação aos valores obtidos para a população original ($h^2_{mo} = 0,6489$ e $Gs\%_{po} = 18,22\%$).

A população regenerada apresentou valores superiores para todos os parâmetros genéticos estimados, assim como para as médias melhoradas esperadas (PMV= 3685,86 e PMS= 1229,47 g/planta) em relação às médias da população original (PMV = 3544,17 e PMS = 1183,24 g/planta) para os dois caracteres analisados (Tabela 18).

TABELA 17. Estimativas das variâncias genéticas entre progênies (σ_p^2), variâncias das interações entre progênies e locais (σ_{PL}^2), variâncias fenotípicas entre médias (σ_F^2), herdabilidade ao nível de médias (h_m^2) e ganho com seleção (Gs%) para as populações original e regenerada para produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), obtidas a partir do agrupamento das análises de variâncias conjuntas dos experimentos 1 e 2.

Parâmetros	População original		População regenerada	
	PMV	PMS	PMV	PMS
σ_p^2 ^a	161,884	16,634	418,623	44,325
σ_{PL}^2 ^a	- 1,964	- 2,907	- 0,199	- 4,164
σ_F^2 ^a	251,904	25,634	509,231	52,906
h_m^2	0,6426	0,6489	0,8221	0,8378
Gs%	19,01	18,22	38,76	37,95

^a valores multiplicados por 10^{-3}

TABELA 18. Médias esperadas das populações original e regenerada para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), envolvendo todos os locais.

POPULAÇÕES SELECIONADAS*		
MÉDIAS	População original	População regenerada
PMV (g/planta)	3544,17	3685,86
PMS (g/planta)	1183,24	1229,47

As estimativas das covariâncias genéticas e fenotípicas, para as populações original e regenerada, foram obtidas a partir do produto médio PMVxPMS (Tabela 19).

A partir do cálculo das covariâncias, foram estimados os coeficientes de correlação genética (r_{G0} e r_{Gr}) e fenotípica (r_{F0} , r_{Fr}) para o par de caracteres PMVxPMS nas populações originais e regeneradas (Tabela 20). Todas as correlações foram positivas e apresentaram valores elevados tanto para a população original ($r_{G0} = 1,0$ e $r_{F0} = 0,98$), quanto para população regenerada ($r_{Gr} = 1,0$ e $r_{Fr} = 0,99$) (Tabela 21). Valores semelhantes de correlação genética entre estes dois caracteres foram reportados por PONTES et al (1983) e BARROS & MARTINS (1977).

Os resultados obtidos indicam que a metodologia utilizada para regeneração de plantas de *Stylosanthes guianensis*, apesar de ter provocado uma redução significativa nas médias das progênes R₂ de aproximadamente 10,9% para os caracteres peso de matéria verde e peso de matéria seca, proporcionou um aumento significativo na variabilidade genética para estes dois caracteres.

Os resultados obtidos para a geração O₁ e R₁ (Apêndice 1) apresentaram reduções relativas semelhantes de 12,8% e 10,9% em relação às médias da população original para PMV e PMS, respectivamente. Nesta fase, além dos caracteres de produção, foram avaliados os caracteres comprimento da haste principal (CP), diâmetro basal (DB), área basal (AB), e vigor de planta (VP), nas gerações O₁ e R₁. As médias destes caracteres para a população regenerada também apresentaram reduções significativas em relação aos valores da população original, exceto para o caráter altura da planta que não apresentou

TABELA 19. Produtos médios (PM) obtidos a partir do agrupamento das análises conjuntas dos experimentos 1 e 2, para a dupla de caracteres produção de matéria verde (PMV) x produção de matéria seca (PMS).

FV	GL	PM
		PMVxPMS
Progênes / Experimento	114	1171394,267
Porig / Experimento	51	710383,649
Preg / Experimento	61	1458390,920
Progênes x Locais / Experimento	228	317852,982
Porig x Locais / Experimento	102	237727,173
Preg x Locais / Experimento	122	234566,738
Erro médio	684	257229,984

TABELA 20. Estimativas para as covariâncias genéticas (COV_P) e fenotípicas entre médias (COV_F) dos caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), para as populações original e regenerada, obtidas a partir do agrupamento das análises conjuntas dos experimentos 1 e 2.

	População original	População regenerada
	PMVxPMS	
COV_P	52517,386	78931,5166
COV_F	135980,465	162043,436

TABELA 21. Estimativas dos coeficientes de correlação genética (r_G) e fenotípica (r_F) entre os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), para as populações original e regenerada, obtidas a partir do agrupamento das análises conjuntas dos experimentos 1 e 2.

	População original	População regenerada
r_G	1,00	1,00
r_F	0,98	0,99

diferenças significativas. Além da redução observada nas médias dos caracteres, a população regenerada apresentou acréscimos de 50,7%, 102,2% e 61,9% na variabilidade genética para os caracteres AB, DB e VP, respectivamente. Devido a estes aumentos consideráveis na variabilidade genética da população regenerada, as médias esperadas após seleção para os caracteres AB, DB e VP foram semelhantes aos valores obtidos para a população original, compensando a redução significativa na média.

No entanto, as estimativas das variâncias genéticas para os caracteres PMV e PMS foram inferiores para as progênies R1, apresentando reduções de 45,5% e 32,9%, respectivamente, em relação aos valores da população original. Os demais parâmetros estimados, como variância fenotípica, herdabilidade e ganho com seleção também apresentaram reduções na população regenerada, acarretando em estimativas de médias esperadas após a seleção inferiores para estas progênies.

As plantas sofreram um grande estresse na fase inicial do experimento, comprometendo o sistema radicular e conseqüentemente todo o desenvolvimento da planta, que pode ser verificado analisando-se os valores médios obtidos para os caracteres de produção avaliados. Neste experimento, a população original apresentou valores médios para PMV (228,57 g/planta) e PMS (54,26 g/planta), aproximadamente 10 e 20 vezes inferiores em relação às médias da geração O2 (PMV=2978,11 g/planta e PMS=1000,90 g/planta). Esta grande diferença entre as médias das gerações também foi observada para a população regenerada, que apresentou na geração R1 valores de PMV=199,29 e PMS=48,35 g/planta bastante inferiores aos da geração R2 (PMV=2656,32 e PMS=891,27).

Esta redução observada na média das populações na primeira geração em relação às médias O_2 e R_2 , está relacionada às condições nas quais foram formadas as mudas. As sementes das gerações O_1 e R_1 foram semeadas em copos plásticos pequenos (175 ml) e permaneceram durante três meses na casa de vegetação devido a alta incidência de chuvas no período de janeiro a março de 1992, o que inviabilizou o plantio na época adequada. Além deste fator, a ocorrência de geada logo após o plantio das mudas no campo também contribuiu para o não desenvolvimento das plantas. Assim, estes fatores podem ter provocado um maior estresse na população regenerada, promovendo uma homogeneização das plantas em relação aos caracteres de produção, influenciando as estimativas dos parâmetros genéticos.

GODWIN et al (1987) também observaram uma redução significativa no peso de matéria seca em 33,7% das progênes regeneradas obtidas a partir da cultura de tecidos de *Stylosanthes guianensis*. Reduções no PMS em 12,5% das progênes regeneradas da espécie *S. scabra* foram reportadas pelos mesmos autores, sendo que nenhuma progênie regenerada apresentou médias superiores em relação ao controle. No entanto, para a espécie *S. hamata*, os autores observaram 12,5% e 2,5% das progênes regeneradas apresentando acréscimos e reduções na média para PMS, respectivamente (GODWIN et al, 1990).

A maioria dos trabalhos referentes à avaliação do caráter produção tem demonstrado uma ação deletéria da variação somaclonal, promovendo uma redução na média em populações regeneradas como observado em milho (LEE et al, 1988), trigo (BAENZIGER et al, 1989 e MOHMAND & NABORS, 1990), cevada (DAHLEEN et al, 1991) e batata (DALE & McPARTLAN, 1992). Já para

a cultura da soja, STEPHENS et al (1991) não detectaram diferenças na produção entre progênies regeneradas e o controle, ao contrário dos resultados obtidos por HAWBAKER et al (1993), que reportaram uma variação bidirecional para 10 caracteres de interesse agrônomo avaliados, verificando aumentos e reduções na produção para diferentes cultivares.

DALE & McPARLAN (1992) relataram a presença de variância fenotípica superior entre as plantas regeneradas de batata em comparação com a variância exibida pelas plantas controle, para os caracteres altura da planta, peso de tubérculos, número de tubérculos, peso dos maiores tubérculos e número de maiores tubérculos. RIETVELD et al (1993) observaram diferentes níveis de aumento na variabilidade fenotípica para plantas regeneradas a partir de diferentes cultivares de batata. Resultados demonstrando a presença de maior variabilidade entre as plantas regeneradas, também foram reportados por HANSON et al (1994) para plantas regeneradas de trigo.

LIU & CHEN (1978) detectaram a presença de variabilidade genética em cana-de-açúcar para os caracteres produção, produção de açúcar, número, diâmetro e volume de colmos, sendo que apenas um clone apresentou média significativamente superior em relação ao controle para os caracteres produção de cana e produção de açúcar. BAENZIGER et al (1989) relataram a presença de variância genética superior entre plantas regeneradas a partir da cultura de anteras de trigo, para o caráter produção de grãos, número de perfilhos e peso/hectolitro em relação ao controle.

No entanto, plantas regeneradas a partir da cultura de tecidos de milho não apresentaram alterações na variabilidade genética quando comparadas com a variabilidade presente nas plantas controles (BECKERT et al, 1983).

Nos resultados apresentados neste trabalho, fica evidente a ocorrência de variação somaclonal nas progênies regeneradas, decorrente do processo de cultura de tecidos, caracterizada pela presença de diferenças significativas entre as médias dos caracteres avaliados, tanto para a primeira geração (O1 e R1), quanto para a segunda geração de autofecundação (O2 e R2) avaliadas. No entanto, os resultados divergentes observados para os parâmetros genéticos estimados, associados aos caracteres PMV e PMS, entre as populações original e regenerada, serão elucidados apenas com a análise das progênies O3 e R3 de *Stylosanthes guianensis*.

4.2. Análise molecular via RAPD

4.2.1. Otimização das condições de reação

As condições de reação descritas no item 3.5.4 foram testadas, utilizando-se 1 e 2 unidades de enzima. A redução na concentração de enzima provocou uma redução na intensidade de algumas bandas, indicadas por setas na Figura 2A. Devido à perda de intensidade, optou-se pela utilização de 1,5 unidades de enzima em reações de 20 µl, contendo 0,2 µM de primer. A redução na concentração de primer e na quantidade de enzima, em relação ao trabalho de VIEIRA et al (1995), foi baseada no trabalho de KAZAN et al (1993a).

As alterações no volume da reação de 20 µl para 15 µl, na quantidade de DNA de 40 ng para 30 ng e na quantidade de enzima de 1,5 para 1,0 unidade, foram realizadas para as análises com "pool" de DNA de 4 progênies (3PO, 66PO, 2PR, 13PR). As reações não apresentaram diferenças no padrão de

amplificação para o primer OPF-01 quando o volume foi reduzido para 15 µl, o que pode ser observado através da comparação das canaletas C1 (20µl de volume de reação; 40 ng de DNA e 1,5u de enzima) e C2 (15µl de volume de reação; 40 ng de DNA e 1,5u de enzima) na Figura 2B, mantendo-se as mesmas condições para os demais componentes, conforme descrito no item 3.5.4. Também não foram observadas alterações quando a quantidade de DNA foi reduzida de 40 ng para 30, utilizando-se 1 unidade de enzima para 15 µl de volume de reação (Figura 2B, canaleta C3). A partir destes resultados, todas as reações para "pool" de DNA foram realizadas em volume de 15 µl, contendo 30 ng de DNA e 1 unidade de enzima.

4.2.2. Seleção de primers

A seleção de primers foi realizada em duas etapas, na análise de plantas individuais (Figura 3A e B), e na análise do "pool" de DNA (Figura 3C). Os primers foram selecionados para o maior número de fragmentos amplificados (OPF-03, Figura 3A) e também para a presença de bandas polimórficas, indicadas por setas na Figura 3C. Os primers que revelaram monomorfismos não foram utilizados para a análise das progênes (Figura 3B).

Dos 15 primers testados, foram selecionados 10, os quais revelaram polimorfismos entre as progênes originais e regeneradas (Tabela 22), e geraram fragmentos com peso molecular variando de 350 pb a 4000 pb. Apenas um dos primers revelou monomorfismo para todas as regiões amplificadas(OPF-05), enquanto 4 primers (OPE-09, OPF-19, OPD-12 e OPG-03) não apresentaram padrões de amplificação satisfatórios.

FIGURA 2. A) Influência da quantidade de enzima ($E2 = 2u$ e $E1 = 1u$) no padrão de amplificação de diferentes progênies gerado pelo primer OPF-02 (GAGGATCCCT); diferenças na intensidade de bandas são indicadas por setas; B) Padrões de amplificação de progênies originais (PO) e regeneradas (PR) para três condições de reação: C1 (1,5u de enzima, 40 ng de DNA e volume de 20 μ l); C2 (1,5u de enzima, 40 ng de DNA e volume de 15 μ l) e C3 (1,0u de enzima, 30 ng de DNA e volume de 15 μ l). (B) reação em branco, sem DNA molde. (M) marcador de peso molecular (λ HindIII).

FIGURA 3. Seleção de primers. A) Amplificação do DNA de 3 plantas da progênie 69PO gerada com diferentes primers: OPF-03 (CCTGATCACC); OPF-19 (CCTCTAGACC); OPD-12 (CACCGTATCC); OPG-03 (GAGCCCTCCA). B) Padrão de amplificação para três progênies (69PO, 10PR, 133PR), representadas por quatro plantas, para o primer OPF-05 (CCGAATTCCC). C) Padrões de amplificação para duas progênies originais (3PO e 66PO) e duas regeneradas (2PR e 13PR) gerados por 4 primers (OPF-01-ACGGATCCTG; OPA-07-GAACGGGTG; OPA-08-GGATATCGG e OPA-09-CCAAGCTTCC) para fins de detectar polimorfismo. As setas indicam a presença de polimorfismos entre as progênies. (B) reação em branco, sem DNA; (M) marcador de peso molecular (λ HindIII).

TABELA 22. Primers selecionados para amplificação do DNA das progênies originais e regeneradas.

Primer	Sequência 5' - 3'
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-09	GGGTAACGCC
OPE-01	CCCAAGGTCC
OPE-17	CTACTGCCGT
OPF-01 *	ACGGATCCTG
OPF-02 *	GAGGATCCCT
OPF-03	CCTGATCACC
OPF-12 *	ACGGTACCAG
OPF-16 *	GGAGTACTGG

* primers utilizados na análise preliminar

4.2.3. Análise preliminar

A análise das 6 progênies originais e 6 regeneradas com 3 repetições por progênie foi realizada usando-se os produtos de amplificação obtidos a partir de 4 primers: OPF-01, OPF-02, OPF-12 e OPF-16. Um total de 90 produtos de amplificação foi gerado, sendo que 31 bandas apresentaram-se polimórficas, representando 34,4 % de polimorfismo. Foram geradas, em média, 22,5 bandas por primer, variando de 19 a 28 bandas, dependendo do primer (Figura 4).

Utilizando-se o coeficiente Simple Matching obteve-se uma matriz de similaridade (Apêndice 2) que foi utilizada para a construção de um dendrograma (Figura 5) gerado pelo método UPGMA.

FIGURA 4. Padrão de amplificação para 6 progênies originais (PO) e 6 progênies regeneradas (PR), representadas por 3 plantas, gerado pelo primer OPF-01 (ACGGATCCTG). (B) reação em branco, sem DNA; (M) marcador de peso molecular (λ HindIII).

FIGURA 5. Agrupamento das 12 progênies de *Stylosanthes*, sendo 6 originais (PO) e 6 regeneradas (PR), cada uma representada por 3 plantas. As similaridades genéticas foram obtidas a partir da análise de 90 bandas geradas por 4 primers e calculadas de acordo com o coeficiente de similaridade Simple Matching. O agrupamento foi realizado utilizando-se o método UPGMA.

Verifica-se pela análise destes dados preliminares que o agrupamento foi capaz de separar as plantas em dois grupos distintos, um pertencente às progênies derivadas de semente e outro representado pelas progênies obtidas a partir da cultura de tecidos. O não-agrupamento de duas plantas representando as progênies 3PO e 34PO com o grupo das progênies originais, e de uma planta representando a progênie 14PR com o grupo das regeneradas, pode estar relacionado com o reduzido número de primers utilizado, que proporcionou apenas 2,5 bandas por acesso analisado.

Os coeficientes médios de similaridade dentro de progênies apresentaram valores iguais para as progênies originais e regeneradas ($\bar{S}_D = 0,94$). A obtenção dos coeficientes médio dentro e entre progênies, permitiu a construção de uma matriz de similaridade média, com 12 acessos, sendo 6 progênies originais e 6 regeneradas (Apêndice 3). Estes coeficientes médios de similaridade também foram utilizados para o agrupamento das progênies, pelo método UPGMA, que mostrou a formação de dois grupos distintos (Figura 6). Todas as progênies originais foram agrupadas, sendo que o coeficiente médio de similaridade entre progênies foi de $\bar{S}_{Epo} = 0,90$. As progênies regeneradas foram separadas das originais, sendo que o coeficiente médio entre progênies foi de $\bar{S}_{Epr} = 0,93$. O coeficiente médio entre as duas populações ($\bar{S}_{Ep} = 0,88$) apresentou uma redução, permitindo a separação das progênies originais e regeneradas em dois grupos distintos.

Os valores dos coeficientes de correlação cofenética entre a matriz de similaridade e o agrupamento gerado pelo método UPGMA apresentaram-se semelhantes para os dois dendrogramas, sendo $r_{cof} = 0,74$ para a análise com 3

FIGURA 6. Agrupamento das 12 progênies de *Stylosanthes*, sendo 6 originais (PO) e 6 regeneradas (PR), utilizando-se os coeficientes médios de similaridade. O agrupamento foi realizado utilizando-se o método UPGMA. Os valores indicados na abscissa representam coeficientes de similaridade.

repetições por progênie e $r_{\text{cof}} = 0,77$ para o agrupamento obtido para os coeficientes médios de similaridade. Estes coeficientes estão próximos do valor $r_{\text{cof}} = 0,80$, indicado como satisfatório pela literatura.

Os altos coeficientes de similaridade observados tanto dentro, quanto entre as progênies eram esperados devido ao sistema de reprodução apresentado pelo *Stylosanthes* ser preferencialmente por autogamia. A decisão de se trabalhar com "pool" de DNA foi baseada nestes coeficientes de similaridade observados dentro de progênies.

4.2.4. Análise envolvendo "pools" de DNA

A mistura do DNA genômico de três plantas, para cada uma das 32 progênies analisadas, sendo 16 regeneradas e 16 originais, foi amplificada utilizando-se 10 primers de 3 Kits diferentes (OPA-7 a OPA-08, OPE-01, OPE-17, OPF-01 a OPF-03, OPF-12 e OPF-16), seguindo-se as condições de reação descritas no item 3.5.5 (Figuras 7 e 8). O número de bandas obtido por primer variou de 19 a 26. Produziu-se em média 21,9 bandas, perfazendo um total de 219 produtos de amplificação. Este conjunto de dados apresentou 113 bandas polimórficas, representando 51,6% de polimorfismo.

Os dados obtidos a partir da leitura dos géis para presença (1) ou ausência de bandas (0), foram analisados utilizando o mesmo coeficiente de similaridade e o mesmo método de agrupamento descritos no item 4.2.3. O dendrograma obtido a partir destes dados confirma o agrupamento das 12 progênies gerado pela análise preliminar, com 4 primers.

FIGURA 7. Padrão de amplificação para 16 progêies originais (PO) e 16 regeneradas (PR), representadas por um "pool" de DNA de três plantas, gerado pelo primer OPA-09 (GGGTAAAGGCC); (B) reação em branco, sem DNA; (M) marcador de peso molecular (Ladder 100pb). As setas indicam a presença de polimorfismo, com "perda" de bandas preferencialmente na população regenerada (setas menores) e "ganho" de bandas (setas maiores) com menor frequência.

FIGURA 8. Padrão de amplificação para 16 progênies originais (PO) e 16 regeneradas (PR), representadas por um "pool" de DNA de três plantas, gerado pelo primer OPE-01 (CCCAAGGTCC). As setas indicam a presença de polimorfismos; (B) reação em branco, sem DNA; (M) marcador de peso molecular (Ladder 100pb).

Verificou-se uma redução no coeficiente médio de similaridade entre progênes, tanto para a população original ($\bar{S}_{Epo} = 0,87$) quanto para a regenerada ($\bar{S}_{Epr} = 0,86$). Verificou-se também uma maior similaridade entre as progênes originais, ao contrário do observado na análise preliminar. As duas populações passaram a ser agrupadas com um coeficiente de $\bar{S}_{Ep} = 0,82$, indicando um aumento na divergência entre as progênes originais e regeneradas (Figura 9), quando comparada com a análise preliminar ($\bar{S}_{Ep} = 0,88$).

Este aumento no grau de polimorfismo está relacionado com uma maior saturação do genoma obtida pelo anelamento de um maior número de primers e também, pelo aumento do número de progênes analisadas. A relação entre o número de bandas geradas e o número de acessos foi 2,7 vezes superior em relação aos dados preliminares. Com isto, a similaridade entre as progênes passou a ser estimada com 6,8 bandas/acesso.

A correlação cofenética entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi de $r_{cof} = 0,78$, valor semelhante àqueles obtidos na análise preliminar.

Utilizando-se um outro coeficiente de similaridade, o de Jaccard que é $a / (a + b + c)$ o qual desconsidera as coincidências negativas (ausência de bandas), verificou-se a manutenção do agrupamento gerado pelo coeficiente Simple Matching. Apenas algumas alterações na ordem das progênes agrupadas dentro do grupo original foram observadas. A correlação entre os dados gerados pelo coeficiente de Jaccard e o dendrograma obtido foi de $r_{cof} = 0,77$, semelhante aos valores obtidos para o coeficiente Simple Matching (Figura 10).

FIGURA 9. Agrupamento das 32 progênies de *Stylosanthes*, 16 originais (PO) e 16 regeneradas (PR), cada uma representada por um "pool" de DNA de três plantas. As similaridades genéticas foram obtidas a partir da análise de 219 bandas geradas por 10 primers, calculadas de acordo com o coeficiente de similaridade Simple Matching. O agrupamento foi realizado utilizando-se o método UPGMA.

FIGURA 10. Agrupamento das 32 progênies de *Stylosanthes*, 16 originais (PO) e 16 regeneradas (R), cada uma representada por um "pool" de DNA de três plantas. As similaridades genéticas foram calculadas de acordo com o coeficiente de similaridade de Jaccard. O agrupamento foi realizado utilizando-se o método UPGMA.

Apesar de as progênies originais apresentarem uma variabilidade, detectada pelos marcadores de RAPD, semelhante àquela presente nas progênies regeneradas, esta técnica foi capaz de separar as progênies originais das regeneradas. A divergência entre as populações foi caracterizada pela perda preferencial de bandas na população regenerada (Figuras 4 e 7, indicadas pelas setas menores). O surgimento de novas bandas na população regenerada também foi observado (setas maiores), no entanto, em menor frequência (Figura 7).

Estes resultados indicam que a cultura de tecidos foi capaz de gerar alterações ao nível molecular, as quais puderam ser identificadas através da técnica do RAPD, ao contrário do que indicam os trabalhos reportados por ISABEL et al (1993) e VALLÉS et al (1993).

A estabilidade observada por ISABEL et al (1993) em embriões somáticos de *Picea mariana*, foi detectada a partir da análise de 5 embriões somáticos de 3 culturas celulares, utilizando-se apenas 3 primers, que amplificaram 10 marcadores de RAPD. Desta forma, a ausência de variação pode estar relacionada com a reduzida amostra, tanto de embriões quanto de primers utilizados. Já os resultados reportados por VALLÉS et al (1993) em plantas regeneradas a partir de suspensões celulares embriogênicas, foram obtidos a partir de produtos de amplificação gerados por 18 primers, que não apresentaram alterações nos padrões de amplificação. Além da análise via RAPD, as mesmas plantas também apresentaram uniformidade para marcadores de RFLPs, revelados por 5 sondas. Desta forma, a não-detecção de variação nas plantas regeneradas pode estar relacionada com a espécie estudada, onde observa-se uma tendência de estabilidade genética em plantas regeneradas a partir de culturas embriogênicas.

As análises de plantas regeneradas realizadas, principalmente através da técnica de RFLP, reportadas na literatura, apesar de detectarem variações ao nível molecular, raramente conseguem estabelecer relações com alterações morfológicas observadas nas plantas regeneradas (BROWN, 1989). A principal explicação sugerida pelo próprio autor está relacionada com o número de sondas utilizadas e com as regiões do genoma hibridadas por estas sondas. As alterações no DNA responsáveis pelas variações morfológicas podem não estar sendo acessadas pelas sondas, ou ainda, mudanças nos padrões de hibridação de certas sondas podem não ser suficientes para provocar mudanças fenotípicas.

Desta forma, além do agrupamento diferencial das progênes originais e regeneradas, os dados de RAPD gerados neste trabalho apresentaram-se coerentes com aqueles detectados pelas análises de genética quantitativa para os caracteres produção de matéria verde e seca, indicando que a cultura de tecidos foi capaz de gerar variabilidade genética nestas populações.

A separação das progênes conforme a sua origem nos dendrogramas gerados indica que o cultivo in vitro foi capaz de induzir mudanças ao nível do DNA, provavelmente em fases iniciais da cultura de calos. Os estresses provocados pelo cultivo de tecidos devem provocar alterações em sítios preferenciais do genoma, como aqueles ricos em DNA repetitivo, ativar transposons específicos ou até mudar a ploidia das plantas regeneradas. Isto explicaria porque um único alelo de RAPD "desaparece" em várias das progênes regeneradas ou ao contrário, bandas não presentes nas progênes originais "surgem" nas progênes regeneradas. Os resultados deste trabalho também poderiam ser interpretados supondo-se que estas mudanças nos padrões de RAPD seriam decorrentes do fato da regeneração de brotos ocorrer preferencialmente em

alguns dos calos obtidos, reduzindo com isto a variabilidade genética na população R_0 . Entretanto, as análises genético-quantitativas mostraram justamente o inverso, isto é, que as progênies regeneradas apresentam maior variação, pelo menos para os caracteres estudados.

Este trabalho abre novas perspectivas de investigação do fenômeno da variação somaclonal ao nível molecular, pois mostra evidências de que a ocorrência desta variação pode estar associada a sítios preferenciais do genoma, o que vem confirmar a idéia de WALBOT & CULLIS (1985) apresentada em uma revisão sobre alterações genômicas em plantas superiores, incluindo-se aquelas provocadas por estresses.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho e suas interpretações permitem concluir que:

a. A cultura de tecidos mostrou-se capaz de gerar um aumento na variabilidade genética, com potencial para utilização em programas de melhoramento, para os caracteres produção de matéria verde e produção de matéria seca. Para os dois caracteres avaliados, a variância genética estimada para a população regenerada apresentou acréscimos consideráveis em relação à variância genética detectada na população original.

b. O processo de cultivo in vitro provocou uma redução significativa nas médias dos caracteres produção de matéria verde e produção de matéria seca da população regenerada em relação às médias da população original.

c. A passagem pela cultura de tecidos provocou um aumento nos coeficientes de herdabilidades ao nível de médias de progênies na população regenerada para os dois caracteres, indicando uma maior eficiência no melhoramento para estes caracteres em relação à população original. Consequentemente, o ganho esperado com seleção para a população regenerada também apresentou valores superiores para os dois caracteres, refletindo em estimativas de médias selecionadas esperadas superiores para os 2 caracteres em relação à população original.

d. A técnica de RAPD foi capaz de detectar polimorfismos de DNA entre as populações regeneradas e originais, separando as progênies em dois

grupos distintos, indicando uma associação dos marcadores gerados com a procedência de cada população.

e. O agrupamento das progênes em dois grupos distintos (progênes derivadas da cultura de tecidos separadas daquelas derivadas da população original) indica que a cultura in vitro está gerando variações ao nível do DNA, as quais pelo menos em parte, são não-aleatórias, pois atingem todas as progênes derivadas da cultura de tecidos, e que se refletem em perdas ou ganhos de bandas de RAPD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKINS, S.W.; SHIRAISHI, T.; McCOMB, J.A.; RATANOPOL, S.; KUPKANCHANAKUL, T.; ARMSTRONG, L.J.; SCHULTZ, A.L. Somaclonal variation in rice - Submergence tolerance and other agronomic characters. **Physiologia Plantarum**, **80**: 647-654, 1990.
- AMBERGER, L.A.; SHOEMAKER, R.C.; PALMER, R.G. Inheritance of two independent isozyme variants in soybean plants derived from tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, **84**: 600-607, 1992.
- BAENZIGER, P.S.; WESENBERG, D.M.; SMAIL, V.M.; ALEXANDER, W.L.; SCHAEFFER, G.W. Agronomic performance of wheat doubled-haploid lines derived from cultivars by anther culture. **Plant Breeding**, **103** (2): 101-109, 1989.
- BAI, D. & KNOTT, D.R. The effects of level of 2,4-D and time in culture on regeneration rate and chromosome numbers of regenerants from calli of the hybrid *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring *ph1b* x *Thinopyrum ponticum* ($2n=10x=70$). **Genome**, **36**: 166-172, 1993.
- BARROS, L.M. Avaliação da variabilidade de caracteres agronômicos em populações de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Piracicaba, 1978. 108p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BARROS, L.M. & MARTINS, P.S. Análise da variabilidade de alguns caracteres agronômicos em *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. **Relatório Científico do Departamento de Genética da ESALQ**. Piracicaba, 11: 11-17, 1977.
- BARWALE, U.B. & WIDHOLM, J.M. Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean. **Plant Cell Reports**, **6**: 365-368, 1987.
- BATHIA, C.R. & MATHEWS, H. Inheritance of two somaclonal variants in mung bean (*Vigna radiata*). **Journal of Heredity**, **79**: 122-124, 1988.
- BECKERT, M.; POLLACSEK, M.; CAENEN, M. Etude de la variabilité génétique obtenue chez le maïs après callogénèse et régénération de plantes *in vitro*. **Agronomie**, **3** (1): 9-18, 1983.
- BHASKARAN, S.; SMITH, R.H.; PALIWOL, S.; SCHERTZ, K.F. Somaclonal variation from *Sorghum bicolor* (L.) Moench cell culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, **9**: 189-196, 1987.

- BINGHMAN, E.T.; HURLEY, L.V.; KAATZ, D.M.; SAUNDERS, J.W. Breeding alfafa which regenerates from callus tissue in culture. **Crop Science**, **15**: 719-721, 1975.
- BREIMAN, A.; ROTEM-ABARBANELL, D.; KARP, A.; SHASKIN, H. Heritable somaclonal variation in wild barley (*Hordeum spontaneum*). **Theoretical and Applied Genetics**, **74**: 104-112, 1987
- BREIMAN, A.; FELSENBURG, T.; GALUN, E. Is *Nor* region variability in wheat invariably caused by tissue culture? **Theoretical and Applied Genetics**, **77**: 809-814, 1989.
- BRETTELL, R.I.S.; THOMAS, E.; INGRAM, D.S. Reversion of Teas male-sterile cytoplasm maize in culture to give fertile T-toxin resistant plants. **Theoretical and Applied Genetics**, **58**: 55-58, 1980.
- BROWN, P.T.H.; LANGE, F. D.; KRANZ, E.; LÖRZ, H. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. **Molecular and General Genetics**, **237**: 311-317, 1993.
- BROWN, P.T.H.; GÖBEL, E.; LÖRZ, H. RFLP analysis of *Zea mays* callus cultures and their regenerated plants. **Theoretical and Applied Genetics**, **81** (2): 227-232, 1991.
- BROWN, P.T.H. DNA methylation in plants and its role in tissue culture. **Genome**, **31** (2): 717-729, 1989.
- BUSSAB, W. de O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. de. Introdução à análise de agrupamentos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA. São Paulo, 1990.
- CHOWDHURY, M.K.U.; VASIL, V.; VASIL, I.K. Molecular anlysis of plants regenerated from embryogenic cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, **87** (7): 821-828, 1994.
- CHOWDHURY, M.K.U. & VASIL, I.K. Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of hybrid sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.). **Theoretical and Applied Genetics**, **86**: 181-188, 1993.
- COCHRAN, W.G. & COX, G.M. **Experimental design**. London, Wiley & Sons, 1969. 610p.
- D'AMATO, F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, **3**: 73-112, 1985.

- DAHLEEN, L.S.; STUTHMAN, D.D.; RINES, H.W. Agronomic trait variation in oat lines derived from tissue culture. **Crop Science**, **31**: 90-94, 1991.
- DALE, P.J. & McPARTLAN, H.C. Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings. **Theoretical and Applied Genetics**, **84**: 585-591, 1992.
- DETREZ, C.; SANGWAN, R.S.; SANGWAN-NORREEL, B.S. Phenotypic and karyotypic status of *Beta vulgaris* plants regenerated from direct organogenesis in petiole culture. **Theoretical and Applied Genetics**, **77**: 462-468, 1989.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induce in immature tissues of *Stylosanthes scabra* Vog. **Annals of Botany**, **70**: 477-482, 1992.
- EDYE, L.A. & CAMERON, D.C. Prospects of *Stylosanthes* improvement and utilization. In: STAGE, H.M. & EDYE, L.A. ed. **The biology and agronomy of Stylosanthes**. Sydney, Academic Press, 1984. p.571-589.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; MEDINA-FILHO, H.P. Somaclonal and gametoclinal variation. **American Journal of Botany**, **71** (6): 759-774, 1984.
- EVANS, D.A. Somaclonal variation - Genetic basis and breeding applications. **Trends in Genetics**, **5** (2): 46-50, 1989.
- EVANS, D.A. & SHARP, W.R. Somaclonal and gametoclinal variation. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. eds. **Handbook of plant cell culture**. McMillan, NY. 1986. p.97-132.
- FERREIRA, M.B. & COSTA, N.M.S. **O gênero Stylosanthes Sw. no Brasil**. Belo Horizonte, EPAMIG, 1979. 107p.
- FREYTAG, A.H.; RAO-ARELLI, A.P.; ANAND, S.C.; WRATHER, J.A.; OWENS, L.D. Somaclonal variation in soybean plants regenerated from tissue culture. **Plant Cell Reports**, **8**: 199-202, 1989.
- GODWIN, I.D.; CAMERON, D.F.; GORDON, G.H. Variation among somaclonal progenies from three species of *Stylosanthes*. **Australian Journal of Agricultural Research**, **41**: 645-656, 1990.

- GODWIN, I.D.; GORDON, G.H.; CAMERON, D.F. Callus culture-derived somaclonal variation in the tropical pasture legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. **Plant Breeding**, **98**: 220-227, 1987.
- GRAYBOSCH, R.A.; EDGE, M.E.; DELANNAY, X. Somaclonal variation in soybean plants regenerated from the cotyledonary node tissue culture system. **Crop Science**, **27**: 803-806, 1987.
- HANNA, W.W.; LU, C.; VASIL, I.K. Uniformity of plants regenerated from somatic embryos of *Panicum maxima* Jacq. (Guinea grass). **Theoretical and Applied Genetics**, **67**: 155-159, 1984.
- HANSON, K.; HUCL, P.; BAKER, R. J. Comparative field performance of tissue culture-derived lines and breeder lines of HY320 spring wheat. **Plant Breeding**, **112**: 183-191, 1994.
- HARTMANN, C.; de BUYSER, J.; HENRY, Y.; FALCONET, D.; LEJEUNE, B.; BENSLIMANE, A.; QUETIER, F.; RODE, A. Time-course of mitochondrial genome variation in wheat embryogenic somatic tissue cultures. **Plant Science**, **53**: 191-198, 1987.
- HAWBAKER, M.S.; FEHR, W.R.; MANSUR, L.M.; SHOEMAKER, R.C.; PALMER, R.G. Genetic variation for quantitative traits in soybean lines derived from tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, **87**: 49-53, 1993.
- ISABEL, N.; TREMBLAY, L.; MICHAUD, M.; TREMBLAY, F.M.; BOUSQUET, J. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P.. **Theoretical and Applied Genetics**, **86**: 81-87, 1993.
- KANE, E.J.; WILSON, A.J.; CHOUREY, P.S. Mitochondrial genome variability in *Sorghum* cell culture protoclones. **Theoretical and Applied Genetics**, **83**: 799-806, 1992.
- KARP, A.; STEELE, S.H.; PARMAR, S.; JONES, M.G.K.; SHEWRY, P.R.; BREIMAN, A. Relative stability among barley plants regenerated from cultured immature embryos. **Genome**, **29**: 405-412, 1987.
- KARP, A. Somaclonal variation from cultured immature embryos of sister lines of rye differing in heterochromatic content. **Genome**, **33**: 177-183, 1990.

- KARP, A. & MADDOCK, S.E. Chromosome variation in wheat plants regenerated from cultured immature embryos. **Theoretical and Applied Genetics**, **67**: 249-255, 1984.
- KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; CAMERON, D. F. Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genome**, **36**: 43-49, 1993a.
- KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; CAMERON, D. F. Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, **85**: 882-888, 1993b.
- KAZAN, K.; MANNERS, J.M.; CAMERON, D.F. Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in an interspecific cross in the genus *Stylosanthes*. **Genome**, **36**: 50-56, 1993c.
- KEMBLE, R.J.; FLAVELL, R.B.; BRETTELL, R.I.S. Mitochondrial DNA analyses of fertile and sterile maize plants derived from tissue culture with the Texas male sterile cytoplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, **62** (3): 213-217, 1982.
- LARKIN, P.J.; RYAN, S.A.; BRETTELL, R.I.S.; SCOWCROFT, W.R. Heritable somaclonal variation in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, **67**: 443-455, 1984.
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, **60**: 197-214, 1981.
- LEE, M.; GEADELMANN, J.L.; PHILLIPS, R.L. Agronomic evaluation of inbred lines derived from tissue cultures of maize. **Theoretical and Applied Genetics**, **75**: 841-849, 1988.
- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. Genetic variants in progeny of regenerated maize plants. **Genome**, **29**: 834-838, 1987a.
- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. **Genome**, **29**: 122-128, 1987b.
- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. The chromosomal basis of somaclonal variation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, **39**: 413-437, 1988.

- LINACERO, R. & VÁZQUEZ, A.M. Somaclonal variation in rye. **Mutation Research**, **302**: 201-205, 1993.
- LIU, M.C. & CHEN, W.H. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding. II. Performance and yield potential of callus derived lines. **Euphytica**, **27**: 273-282, 1978.
- LOURENS, A.G. & MARTIN, F.A. Evaluation of in vitro propagated sugarcane hybrids for somaclonal variation. **Crop Science**, **27**: 793-796, 1987.
- MANNERS, J.M. Transformation of *Stylosanthes* spp. using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, **6**: 204-207, 1987.
- MANNERS, J.M. Transgenic plants of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. **Plant Science**, **55**: 61-68, 1988.
- MANNERS, J.M. & WAY, H. Efficient transformation with regeneration of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis* using *Agrobacterium rhizogenes* and a Ti plasmid-binary vector system. **Plant Cell Reports**, **8**: 341-345, 1989.
- MARTINS, P.S. & VELLO, N.A. Comportamento e variabilidade de caracteres agronômicos em populações de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. (Leguminosae). **Relatório Científico do Departamento de Genética da ESALQ**. Piracicaba, 12: 92-95, 1978.
- McNAY, J.W.; CHOUREY, P.S.; PRING, D.R. Molecular analysis of genomic stability of mitochondrial DNA in tissue cultured cells of maize. **Theoretical and Applied Genetics**, **67**: 433-437, 1984.
- MEIJER, E.G.M. & STEINBISS, H.H. Plantlet regeneration from suspension and protoplast cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.. **Annals of Botany**, **52**: 305-310, 1983.
- MEIJER, E.G.M. & SZABADOS, L. Cell and tissue culture of *Stylosanthes* spp.. In: BAJAI, Y.P.S. ed. **Biotechnology in agriculture and forestry**. **10. Legumes and oilseed crops I**. Springer-Verlag, London. 1990. p.312-322.
- MEINS Jr., F. Heritable variation in plant cell culture. **Annual Review of Plant Physiology**, **34**: 327-346, 1983.
- MILES, J.W.; ROCA, W.M.; TABARES, E. Assessment of somaclonal variation in *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GENETIC MANIPULATION IN

- CROPS, 2., El-Batan, 1988. **Review of advances in plant biotechnology; 1985-88.** México, CIMMYT; Manila, IRRI, 1989. p.249-257.
- MILES, J.W. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of outcrossing rate in *Stylosanthes guianensis*. **Australian Journal of Agricultural Research**, **36**: 259-265, 1985.
- MOHMAND, A.S. & NABORS, M.W. Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes. **Plant Cell Reports**, **8**: 558-560, 1990.
- MORRISH, F.M.; HANNA, W.W.; VASIL, I.K. The expression and perpetuation of inherent somaclonal variation in regenerants from embryogenic cultures of *Penisetum glaucum* (L.) R. Br. (pearl millet). **Theoretical and Applied Genetics**, **80**: 409-416, 1990.
- MÜLLER, E.; BROWN, P.T.H.; HARTKE, S.; LÖRZ, H. DNA variation in tissue-culture-derived rice plants. **Theoretical and Applied Genetics**, **80** (5): 673-679, 1990.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, **15**: 473-497, 1962.
- MURRAY, M.G. & THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, **8** (19): 1134-1137, 1980.
- PESCHKE, V.M. & PHILLIPS, R.L. Genetic implications of somaclonal variation in plants. In: SCANDALIOS, J.G. & WRIGHT, T.R.F. ed. **Advances in Genetics**. Academic Press, 1992. v.30, p. 41-75.
- PONTES, O.F.S.; MARTINS, P.S.; VELLO, N.A. Melhoramento genético de populações de *Stylosanthes guianensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **18**: 413-420, 1983.
- RAJASEKARAN, K.; SCHANK, S.C.; VASIL, I.K. Characterization of biomass production and phenotypes of plants regenerated from embryogenic callus cultures of *Pennisetum americanum* x *P. purpureum* (hybrid triploid napiergrass). **Theoretical and Applied Genetics**, **73**: 4-10, 1986.
- RIETVELD, R.C.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Somaclonal variation in tuber disc-derived populations of potato. II. Differential effect of genotype. **Theoretical and Applied Genetics**, **87** (3): 305-313, 1993.

- RODE, A.; HARTMANN, C.; FALCONET, D.; LEJEUNE, B.; QUETIER, F.; BENSLIMANE, A.; HENRY, Y.; de BUYSER, J. Extensive mitochondrial DNA variation in somatic tissue cultures initiated from wheat immature embryos. **Current Genetics**, **12**: 369-376, 1987.
- RODE, A.; HARTMANN, C.; DE BUYSER, J.; HENRY, Y. Evidence for a direct relationship between mitochondrial genome organization and regeneration ability in hexaploid wheat somatic tissue cultures. **Current Genetics**, **14**: 387-394, 1988.
- ROGERS, S.O. & BENDICH, A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. **Plant Molecular Biology**, **5** (2): 69-76, 1985.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc - Numerical Taxonomy and multivariate analysis system**. Version 1.70. Stony Brook, New York. 1992.
- RYAN, S.A.; LARKIN, P.J.; ELLESON, F.W. Somaclonal variation in some agronomic and quality characters in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, **74**: 77-82, 1987.
- SABIR, A.; NEWBURY, H.J.; TODD, G.; CATTY, J.; FORD-LLOYD, B.V. Determination of genetic stability using isozymes and RFLPs in beet plants regenerated in vitro. **Theoretical and Applied Genetics**, **84** (1-2): 113-117, 1992.
- SALEH, N.M.; GUPTA, H.S.; FINCH, R.P.; COCKING, E.C.; MULLIGAN, B.J. Stability of mitochondrial DNA in tissue-cultured cells of rice. **Theoretical and Applied Genetics**, **79**: 342-346, 1990.
- SAS Institute. **SAS/STAT User's Guide**. Cary, NC, 1988.
- SECOR, G.A. & SHEPARD, J.F. Variability of protoplast derived potato clones. **Crop Science**, **21**: 102-105, 1981.
- SELBY, C. & COLLIN, H.A. Clonal variation in growth and flavour production in tissue cultures of *Allium cepa* L.. **Annals of Botany**, **40**: 911-918, 1976.
- SHENOY, V.B. & VASIL, I.K. Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenic tissue cultures of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum). **Theoretical and Applied Genetics**, **83**: 947-955, 1992.
- SHEPARD, J.F.; BIDNEY, D.; SAHIN, E. Potato protoplasts in crop improvement. **Science**, **208**: 17-24, 1980.

- SHIMRON-ABARBANELL, D. & BREIMAN, A. Comprehensive molecular characterization of tissue-culture-derived *Hordeum marinum* plants. **Theoretical and Applied Genetics**, **83** (1): 71-80, 1991.
- SILVA, B.A.da. Cultura de tecidos de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Cv. IRI 1022: estudo morfogenético e histológico. Piracicaba, 1991. 169p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. **Principles and Procedures of Statistics**. New York, McGraw Hill-Book Company, 1960. 481p.
- STEPHENS, P.A.; NICKELL, C.D.; WIDHOLM, J.M. Agronomic evaluation of tissue-culture-derived soybean plants. **Theoretical and Applied Genetics**, **82** (5): 633-635, 1991.
- SWEDLUND, B. & VASIL, I.K. Cytogenetic characterization of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum.. **Theoretical and Applied Genetics**, **69**: 575-581, 1985.
- SZABADOS, L. & ROCA, W.M. Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplast to plants in *Stylosanthes guianensis*. A tropical forage legume. **Plant Cell Reports**, **5**: 174-177, 1986.
- VALLÉS, M.P.; WANG, Z.Y.; MONTAVON, P.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. Analysis of genetic stability of plants regenerated from suspension cultures and protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). **Plant Cell Reports**, **12**: 101-106, 1993.
- VASIL, I.K. Developing cell and tissue culture system for the improvement of cereal and grass crops. **Journal of Plant Physiology**, **128**: 193-218, 1987.
- VASIL, I.K. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. **Bio/Technology**, **6**: 397-402, 1988.
- VENCOVSKY, R. & BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto, SBG, 1992. 486p.
- VIEIRA, M.L.C.; JONES, B.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R. Plant regeneration from protoplast isolated from seedling cotyledons of *Stylosanthes guianensis*, *S. macrocephala* and *S. scabra*. **Plant Cell Reports**, **9**: 289-292, 1990.
- VIEIRA, M.L.C.; FUNGARO, M.H.P.; JUBIER, M.-F.; LEJEUNE, B. Determination of taxonomic relationships among Brazilian taxa of

- Stylosanthes* Sw., Leguminosae, using RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. (submetido à publicação).
- WALBOT, V. & CULLIS, C. Rapid genomic change in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, **36**: 367-396, 1985.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, **18** (24): 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. In: WU, R. ed. **Methods in enzymology**. v.218. Recombinant DNA. Part I. Academic Press. 1993.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18** (22): 6531-6535, 1990.
- WILLIAMS, R.J.; REID, R.; SCHULTZE-KRAFT, R.; COSTA, N.M.S.; THOMAS, B.D. Natural distribution of *Stylosanthes*. In: STAGE, H.M. & EDYE, L.A. ed. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney, Academic Press, 1984. p.73-101.

APÊNDICE 1

TISSUE CULTURE EFFECTS ON QUANTITATIVE TRAITS IN *Stylosanthes guianensis* (LEGUMINOSAE)

Luciano Consoli, Maria Lúcia Carneiro Vieira, Cláudio Lopes de Souza Jr. and Antônio Augusto Franco Garcia

Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz",
Universidade de São Paulo
Caixa Postal 83
13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

Running title: Somaclonal Variation in *Stylosanthes guianensis*

Send correspondence to M.L.C.V.

SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO: REVISTA BRASILEIRA DE GENÉTICA

ABSTRACT

Sixty-three tissue culture derived progenies (R_1) and 53 progenies from the original population (O_1) of *Stylosanthes guianensis* were assessed for six traits of interest for pasture. An increase of 50.7%, 102.2% and 61.9% in the genetic variability was observed for the traits basal area (BA), basal diameter (BD) and plant vigor (PV) in the regenerated population, respectively. A decrease in the genetic variability of 45.5% for fresh matter yield (FMY) and 32.9% for dry matter yield (DMY) was noted in the regenerated population while no difference was found for main stem height (MSH). Apart from MSH, the mean of all traits in the regenerated population was lower than those in the original population. The analysis of the expected means of FMY and DMY in the improved populations, regenerated *versus* original, indicated that the trait means were inferior in the former, 248.76 g/plant and 61.61 g/plant against 306.37 g/plant and 72.12 g/plant in the later, respectively.

INTRODUCTION

The genus *Stylosanthes* (Leguminosae) is native to tropical and subtropical regions of the American continent, with some species typical of Africa and Asia. The center of genetic diversity is located in Brazil where extensive morphological variation exists. It is considered one of the most important sources of natural tropical pastures, including the *S. guianensis* (Aubl.) Sw. species, which is adapted to acid and low fertility soils. This species has been widely used in Australia where a large number of accessions potentially useful for forage were introduced (Williams *et al.*, 1984; Edye and Cameron, 1984).

Tissue culture techniques and genetic manipulation methodologies have been indicated to complement some *Stylosanthes* breeding programs. Several studies reported the regeneration of *Stylosanthes* plants from leaf, hypocotyl and cotyledon explants (Meijer and Szabados, 1990) and also from protoplasts (Meijer and Steinbess, 1983; Szabados and Roca, 1986; Vieira *et al.*, 1990). The regeneration takes place by organogenesis with shoots developing on the surface of the callus. The genus *Stylosanthes* may be considered, among leguminous plants, as a model system for in-vitro regeneration. The techniques of tissue culture have a high potential for generating somaclonal variation (Larkin and Scowcroft,

1981; Evans *et al.*, 1984; Sree Ramulu *et al.*, 1986; van den Bulk *et al.*, 1990). Several authors suggest that the mechanisms involved in the process of variability generation are related to chromosomal abnormalities, activation of transposable elements, DNA methylation and point mutation (Lee and Phillips, 1988; Peschke and Phillips, 1992). However, the genetic basis of somaclonal variation has not yet been completely determined.

The majority of the regenerants reported in the literature have been assessed for qualitative traits (Barwale and Widholm, 1987; Freytag *et al.*, 1989; Linacero and Vázquez, 1993), cytological alterations (Karp and Maddock, 1984; Lee and Phillips, 1987a; b) and biochemical modifications (Shenoy and Vasil, 1992; Amberger *et al.*, 1992). Studies related to the assessment of quantitative traits have been limited to the comparison of averages between the regenerated population and the control (Ryen *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1988; Adkins *et al.*, 1990; Mohmand and Nabors, 1990; Dahleen *et al.*, 1991; Stephens *et al.*, 1991), or estimates of phenotypic variance (Godwin *et al.*, 1987; Jackson and Dale, 1989; Dale and McPartlan, 1992). However, very few studies on somaclonal variation assessment based on genetic parameters have been reported (Liu and Chen, 1978; Baenziger *et al.*, 1989). The objective of this study was to evaluate the genetic variability of quantitative traits in progenies derived from the original and regenerated populations of *S. guianensis*, in order to verify whether tissue culture is capable of generating a higher genetic variance than that of the original population.

MATERIAL AND METHODS

Stylosanthes guianensis (Aubl.) Sw. seeds cv IRI 1022 provided by the IRI Institute of Research, Brazil, were scarified in sulphuric acid for 2 min and then sterilized in 70% (v/v) ethanol for 40 sec and in 2% (v/v) NaOCl solution for 8 min. After washing three times in sterilized water, seeds were germinated in half-strength MS medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 0.9% (w/v) agar and 1.5% (w/v) sucrose, under 16 h light regime ($30 \mu\text{Em}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) at $27^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Hypocotyledonary and leaf tissues were excised at 10 and 30 days, respectively, from in-vitro germinated seedlings and placed on MS medium

supplemented with 2.0mg.l⁻¹ BAP (6-benzyl amino purine) for hypocotyls and 0.4mg.l⁻¹ BAP + 0.1mg.l⁻¹ NAA (1-naphthalene acetic acid) for leaves. Shoot regeneration occurred after 30 and 60 days with a short callus phase in cultures derived from hypocotyledonary and leaf explants, respectively. Shoots were isolated and transferred to the same basal medium containing 0.2mg.l⁻¹ IBA (indole-3-butyric acid) to promote root formation.

The R₀ population (first regenerants) was made up of 133 regenerated plants that were kept in greenhouse conditions besides a population of 100 plants obtained from seeds (O₀ generation). Seeds were collected individually from both populations after two flowering cycles and sown in plastic pots containing a mixture of soil, sand and manure. The progenies R₁ and O₁ were assessed for quantitative traits in two randomized design experiments with three replications in Piracicaba, SP. Plots were 1,6 square meters rows spaced, 1.0 m apart with 0.40m within rows, with 4 plants per plot. In one experiment 33 R₁ progenies and 26 O₁ progenies were assessed, while in a second experiment 30 R₁ progenies and 27 O₁ progenies were evaluated.

The following traits were recorded, height of main stem (HMS, in cm), basal diameter (BD, in m), basal area (BA = (BD²/4)π, in m²), plant vigor (PV, evaluated on a scale of 1 to 10), fresh matter yield (FMY, in g/plant) and dry matter yield (DMY, in g/plant).

Individual variance and covariance analyses were performed, and grouped into a single analyses for all trait, by using the Statistical Analysis System (SAS Institute, 1988). The following genetic and phenotypic parameters were estimated by manipulating the mean squares as follows: genetic variance of progenies $[\sigma^2_g = (MSg - MSe)/r]$, phenotypic variance at the mean progeny level $[\sigma^2_{Ph} = MSg/r]$, heritability coefficients $[h^2\% = (\sigma^2_g / \sigma^2_{Ph})100]$, expected response to selection $RS = i(\sigma^2_g / \sigma_{Ph})$ and $RS\% = (RS/\bar{x})100$. In these expressions, MSg and MSe are the mean squares of the progenies and the experimental error of the joint analyses, r is the number of replications, and $i=1,755$ is the standardized selection differential for a 10% intensity of selection. The expected selected populations means were both obtained by the expressions $\mu_{S0} = \mu_0 + RS_0$ for the original and $\mu_{Sr} = \mu_r + RS_r$ for the regenerated population, where μ_0 and μ_r stand for the general means of the original and regenerated populations, respectively. Estimates of genetic $[r_{g(x,y)} = \text{cov}_{g(x,y)} / \sigma_{g(x)} \sigma_{g(y)}]$ and phenotypic

$\left[r_{Ph(x,y)} = \text{cov}_{Ph(x,y)} / \sigma_{\bar{g}(x)} \cdot \sigma_{\bar{g}(y)} \right]$ correlations for both populations were obtained from the covariance analyses between traits, resulting in $\text{COV}_g = (\text{MP}_g - \text{MPE})/r$ and $\text{COV}_{Ph} = (\text{MP}_g)/r$, where MP_g and MPE refer to the mean products of progenies and experimental error, respectively (Falconer, 1989).

RESULTS AND DISCUSSION

Acclimation and the rate of plant survival in greenhouse conditions, close to 50%, and variable reproduction rates, which included seed non-production of some R_0 plants, resulted in a reduction in the number of regenerated progenies from 133 to 63. Similarly, the original progenies were reduced to 53.

The analysis of variance (not shown) detected genetic variability for all the traits. The contrast between the O_1 and R_1 progenies was highly significant ($P < 0.01$) for all the traits, except for MSH. With the exception of MSH trait ($\mu_o = 43.14$ and $\mu_r = 42.37$), the means of the traits BA ($\mu_o = 0.31$ and $\mu_r = 0.26$), BD ($\mu_o = 0.61$ and $\mu_r = 0.54$), PV ($\mu_o = 6.19$ and $\mu_r = 5.87$), FMY ($\mu_o = 228.57$ and $\mu_r = 199.29$) and DMY ($\mu_o = 54.26$ and $\mu_r = 48.35$) in the original (μ_o) and regenerated populations (μ_r) differed significantly ($P < 0.01$). The regenerated population showed lower range of variation than the original population for all traits, although for MSH and PV, that are quite similar. The experimental coefficients of variation are within the acceptable values for these traits, in this species (Table I).

An increase in the genetic variability of the order of 50.7%, 102.2% and 61.9% for BA, BD and PV was observed in the regenerated population, respectively; therefore, $h^2\%$ and $RS\%$ also increased in the regenerated population. However, the means of these traits ($\mu_{BA} = 0.26$, $\mu_{BD} = 0.54$ and $\mu_{PV} = 5.9$) in the regenerated population were lower than those of the original population ($\mu_{BA} = 0.31$, $\mu_{BD} = 0.61$ and $\mu_{PV} = 6.2$). A reduction in the genetic variability for the yield traits, and heritability coefficients and responses to selection values for FMY and DMY in the regenerated plants were also lower than those of the original population. The reductions in genetic variability were 45.5% and 32.9% for FMY and DMY traits, respectively. However, for the MSH trait these parameters are quite similar in the O_1 and R_1 populations (Table II).

The estimates of the genetic (r_{go} and r_{gr}) and phenotypic (r_{Pho} and r_{Phr}) correlation between traits in both types of populations were positive and high. The genetic correlations did not differ between the populations, except for MSHxBA and MSHxBD, which showed lower genetic correlation values for O_1 population ($r_{go}=0.35$ and $r_{go}=0.38$) comparatively to R_1 population ($r_{gr}=0.66$ and $r_{gr}=0.72$), respectively (Table III). When consulting the studies on quantitative genetics of *Stylosanthes guianensis* we found that high values of rg and rph were reported by Pontes *et al.* 1983 involving all combinations among the traits BD, BA, FMY and DMY. However, lower genetic ($rg=0.172$) and phenotypic ($rph=0.322$) correlations values were detected between the traits MSHxDMY (Barros, 1978).

The expected means of the original and regenerated selected populations (μ_{SO} and μ_{SR}), showed that for the MSH, BA, BD and PV traits they are quite similar, whereas for the yield traits, FMY and DMY, tissue culture seems to have had an adverse effect, reducing their expected means of the regenerated selected population, i.e., $\mu_{SO}=306,37$ and $\mu_{SR}=248,76$ g/plant, and $\mu_{SO}=72,12$ and $\mu_{SR}=61,61$ g/plant for fresh matter yield and dry matter yield traits, respectively (Table IV).

These results indicated that the methodology used for *Stylosanthes guianensis* plant regeneration increased the genetic variability in 50% of the traits assessed (BA, BD and PV), a reduction in the variability for the traits of fresh and dry matter yield, and no difference was detected for the MSH trait. The data shows a significant reduction in the mean of the regenerated population for all the traits, except MSH. Godwin *et al.* (1987, 1990) reported significant reduction in the means of the DMY trait in 33.7% and 9.5% of the R_2 progenies of *S. guianensis* and *S. scabra* and neither R_2 progenies means were superior to the control; however 12.5% of R_2 progenies means of *S. hamata* had greater and 2,5% had lower yields than the parental controls.

The majority of studies on plant yield have shown an adverse effect of the somaclonal variation, with a reduction in the mean of regenerated wheat (Baenziger *et al.*, 1989; Mohmand and Nabors, 1990), potato (Dale and McPartlan, 1992), maize (Lee *et al.*, 1988) and oat (Dahleen *et al.*, 1991) populations. However, Stephens *et al.* (1991) did not find differences in yield among regenerated and control lines of soybean, while Hawbaker *et al.* (1993) observed a bi-directional variation for all the traits studied, with an increase and decrease in soybean yield for different cultivars. Beneficial alterations were observed

for maturity in maize (Lee *et al.*, 1988), sorghum (Bhaskaran *et al.*, 1987) and for flooding tolerance in rice (Adkins *et al.*, 1990). Dale and McParthan (1992) reported a significant reduction in the means of plant height, tubers weigh, tubers number, large tubers weigh and larger tubers number per plant in regenerated potato plants. The variance in the regenerated population was greater for the four last traits.

Variation among regenerated and original plants was also found in *Lolium* (Jackson and Dale, 1989), *Stylosanthes* (Godwin *et al.*, 1987) and sugar cane (Liu and Chen, 1978). In the latter genetic variability for several traits related to sugar cane production was estimated and only one clone showed a mean significantly higher in relation to the control. Baenziger *et al.* (1989) reported genetic variance for di-haploid lines (DHLs) derived from wheat cultivars. The DHLs lines had a lower grain yield, but showed a higher genetic variance than the control.

Results indicated that the methodology used for *Stylosanthes guianensis* plant regeneration caused a significant reduction in the mean of all the traits except MSH, an increase in the genetic variability for BA, BD and PV, and a decreased for FMY and DMY. Comparing the expected means of the populations after selection, there is a similarity among the means for MSH, BA, BD and PV. However means of the regenerated population were 18.81% and 14.57% lower for FMY and DMY, respectively. These results indicated that the tissue culture was not able to generate an increase in genetic variability great enough to be used in breeding programs.

However, it should be mentioned that alterations in the culture conditions (callus phase duration, hormone concentrations) can increase the levels of somaclonal variation. There are also indications in the literature of a genetic component influencing the type and magnitude of the induced variation, resulting in a higher degree of variability for certain wheat cultivars (Ryen *et al.*, 1987; Mohmond and Nabors, 1990). Thus alterations in the methodology in the process of *Stylosanthes* plant regeneration may generate high levels of genetic variability, which may justify its use in breeding programs. New studies need to be carried out to identify cultivars more responsive to genetic alterations and to detect the main in-vitro factors responsible for the increase of genetic variance in regenerated populations. These studies will allow us to make a better decision in future somaclones generation and use.

ACKNOWLEDGMENTS

To Mr. Carlos Alberto de Oliveira, for helping in the installation of the field experiments and in data collection. This research was supported by the Brazilian Institutions, FAPESP (grant 88/3816-8), CNPq (grant 52.2399/94.0) and FINEP (grant 6.4.93.172.00).

RESUMO

Sessenta e três progênies derivadas da cultura de tecidos (R₁) e 53 derivadas da população original (O₁) de *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae) foram avaliadas para 6 caracteres de interesse forrageiro. Verificou-se um aumento na variabilidade genética da população original de 50,7, 102,2 e 61,6% para os caracteres área basal (AB), diâmetro basal (DB) e vigor de planta (VP), respectivamente. Já para os caracteres produção de matéria verde (PMV) e produção de matéria seca (PMS), ocorreu um decréscimo na variabilidade genética da população regeneradas de 45,5 e 32,9%, respectivamente. Para o caráter comprimento da haste principal (CP), não verificou-se diferença. Para todos os caracteres avaliados, com exceção de CP, a média da população regenerada foi inferior à média da população original. As médias esperadas da população regenerada melhorada foram inferiores (PMV=248,76 g/planta e PMS=61,61 g/planta) em relação às médias esperadas da população original (PMV=306,37 g/planta e PMS=72,12 g/planta), para ambos caracteres.

REFERENCES

- Adkins, S.W., Shiraishi, T., McComb, J.A., Ratanapol, S., Kupkanchanakul, T., Armstrong, L.J. and Schultz, A.L. (1990). Somaclonal variation in rice - Submergence tolerance and other agronomic characters. *Physiol. Plant.* 80: 647-654.
- Amberger, L.A., Shoemaker, R.C. and Palmer, R.G. (1992). Inheritance of two independent isozyme variants in soybean plants derived from tissue culture. *Theor. Appl. Genet.* 84: 600-607.

- Baenziger, P.S., Wesenberg, D.M., Smail, V.M., Alexander, W.L. and Schaeffer, G.W. (1989). Agronomic performance of wheat doubled-haploid lines derived from cultivars by anther culture. *Plant Breed.* 103: 101-109.
- Barros, L.M. (1978). Avaliação da variabilidade de caracteres agronômicos em populações de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Master Thesis, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Barwale, U.B. and Widholm, J.M. (1987). Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean. *Plant Cell Rep.* 6: 365-368.
- Bhaskaran, S., Smith, R.H., Paliwol, S. and Schertz, K.F. (1987). Somaclonal variation from *Shorgum bicolor* (L.) Moench cell culture. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 9: 189-196.
- Dahleen, L.S., Stuthman, D.D. and Rines, H.W. (1991). Agronomic trait variation in oat lines derived from tissue culture. *Crop Sci.* 31: 90-94.
- Dale, P.J. and McPartlan, H.C. (1992). Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings. *Theor. Appl. Genet.* 84: 585-591.
- Edye, L.A. and Cameron, D.C. (1984). Prospects of *Stylosanthes* improvement and utilization. In: *The biology and agronomy of Stylosanthes* (Stace, H.M. and Edye, L.A., eds.). Sydney, Academic Press, pp 571-589.
- Evans, D.A., Sharp, W.R. and Medina-Filho, H.P. (1984). Somaclonal and gametoclonal variation. *Amer. J. Bot.* 71: 759-774.
- Falconer, D.S. (1989). *Introduction to quantitative genetics*. Longman Scientific & Technical, Harlow.
- Freytag, A.H., Rao-Arelli, A.P., Anand, S.C., Wrather, J.A. and Owens, L.D. (1989). Somaclonal variation in soybean plants regenerated from tissue culture. *Plant Cell Rep.* 8: 199-202.
- Godwin, I.D., Gordon, G.H. and Cameron, D.F. (1987). Callus culture-derived somaclonal variation in the tropical pasture legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. *Plant Breed.* 98: 220-227.
- Godwin, I.D., Cameron, D.F. and Gordon, G.H. (1990). Variation among somaclonal progenies from three species of *Stylosanthes*. *Aust. J. Agric. Res.* 41: 645-656.
- Hawbaker, M.S., Fehr, W.R., Mansur, L.M. and Shoemaker, R.C. (1993). Genetic variation for quantitative traits in soybean lines derived from tissue culture. *Theor. Appl. Genet.* 87: 49-53.
- Jackson, J.A. and Dale, P.J. (1989). Somaclonal variation in *Lolium multiflorum* L. and *temulentum* L. *Plant Cell Rep.* 8: 161-164.

- Karp, A. and Maddock, S.E. (1984). Chromosome variation in wheat plants regenerated from cultured immature embryos. *Theor. Appl. Genet.* 67: 249-255.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
- Lee, M., Geadelmann, J.L. and Phillips, R.L. (1988). Agronomic evaluation of inbred lines derived from tissue cultures of maize. *Theor. Appl. Genet.* 75: 841-849.
- Lee, M. and Phillips, R.L. (1987a). Genetic variants in progeny of regenerated maize plants. *Genome* 29: 834-838.
- Lee, M. and Phillips, R.L. (1987b). Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. *Genome* 29: 122-128.
- Lee, M. and Phillips, R.L. (1988). The chromosomal basis of somaclonal variation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 39: 413-437.
- Linacero, R. and Vázquez, A.M. (1993). Somaclonal variation in rye. *Mutation Res.* 302: 201-205.
- Liu, M.C. and Chen, W.H. (1978). Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding. II. Performance and yield potential of callus derived lines. *Euphytica* 27: 273-282.
- Meijer, E.G.M. and Steinbiss, H.H. (1983). Plantlet regeneration from suspension and protoplast cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. *Ann. Bot.* 52: 305-310.
- Meijer, E.G.M. and Szabados, L. (1990). Cell and tissue culture of *Stylosanthes* spp. In: *Biotechnology in agriculture and forestry 10. Legumes and oilseed crops I* (Bajaj, Y.P.S., ed.). Springer Verlag, London, pp 312-322.
- Mohmand, A.S. and Nabors, M.W. (1990). Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes. *Plant Cell Rep.* 8: 558-560.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Peschke, V.M. and Phillips, R.L. (1992). Genetic implications of somaclonal variation in plants. In: *Advances in Genetics, Vol. 30*. Academic Press, pp 41-75.
- Pontes, O.F.S., Martins, P.S. and Vello, N.A. (1983). Melhoramento genético de populações de *Stylosanthes guianensis*. *Pesq. Agrop. Bras.* 18: 413-420.
- Ryan, S.A., Larkin, P.J. and Elleson, F.W. (1987). Somaclonal variation in some agronomic and quality characters in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 74: 77-82.
- SAS Institute. (1988). *SAS STAT user's guide*. Cary, NC.
- Shenoy, V.B. and Vasil, I.K. (1992). Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenic tissue cultures of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum). *Theor. Appl. Genet.* 83: 947-955.

- Sree Ramulu, K., Dijkhuis, P., Poest, S., Bokelmann, G.S. and Groot, A.B. (1986). Variation in phenotype and chromosome number of plants regenerated from protoplasts of dihaploid and tetraploid potato. *Plant Breed.* 97: 118-128.
- Stephens, P.A., Nickell, C.D. and Widholm, J.M. (1991). Agronomic evaluation of tissue-culture-derived soybean plants. *Theor. Appl. Genet.* 82: 633-635.
- Szabados, L. and Roca, W.M. (1986). Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis*. A tropical forage legume. *Plant Cell Rep.* 3: 174-177.
- Vieira, M.L.C., Jones, B., Cocking, E.C. and Daveay, M.R. (1990). Plant regeneration from protoplast isolated from seedling cotyledons of *Stylosanthes guianensis*, *S. macrocephala* and *S. scabra*. *Plant Cell Rep.* 9: 289-292.
- van den Bulk, R.W., Laffler, F.J.M., Lindhout, W.H. and Koornneef, M. (1990). Somaclonal variation in tomato: Effect of explant source and comparison with chemical mutagenesis. *Theor. Appl. Genet.* 80: 817-825.
- Williams, R.J., Reid, R., Schultze-Kraft, R., Costa, N.M.S. and Tomas. B.D. (1984). Natural distribution of *Stylosanthes*. In: *The biology and agronomy of Stylosanthes* (Stace, H.M. and Edye, L.A., eds.). Sydney, Academic Press, pp 73-101.

Table 1. Means, ranges and coefficients of variation (CV%), for the traits: main stem height (MSH), basal area (BA), basal diameter (BD), plant vigor (PV), fresh matter yield (FMY) and dry matter yield (DMY), for the regenerated and original populations.

Traits	Populations				CV%
	Original		Regenerated		
	Means	Ranges	Means ^a	Ranges	
MSH (cm)	43.14 ± 3.42	29.17 - 61.08	42.37 ± 3.42 ns	26.72 - 54.50	13.88
BA (m ²)	0.31 ± 0.05	0.15 - 0.45	0.26 ± 0.05 **	0.08 - 0.44	29.87
DB (m)	0.61 ± 0.05	0.43 - 0.74	0.54 ± 0.05 **	0.30 - 0.73	15.48
PV (1-10)	6.19 ± 0.52	5.17 - 7.92	5.87 ± 0.52 **	4.08 - 7.41	14.87
FMY(g/pl)	228.57 ± 49.09	106.76 - 412.61	199.29 ± 49.09 **	67.62 - 403.60	39.98
DMY(g/pl)	54.26 ± 12.07	24.32 - 100.45	48.35 ± 12.07 **	15.24 - 86.49	40.96

a: ns - non-significant; ** P < 0,01, referring to the significance of the mean squares of the joint analysis of variance (F test) contrasting regenerated *versus* original progenies.

Table 2. Estimates of genetic (σ^2_g) and phenotypic (σ^2_{ph}) variances, heritability ($h^2\%$) and responses to selection (RS%) for all traits in the original and regenerated populations.

Traits	Populations							
	Original				Regenerated			
	σ^2_g	σ^2_{ph}	$h^2\%$	RS% ^a	σ^2_g	σ^2_{ph}	$h^2\%$	RS% ^a
MSH	28.56	40.29	70.89	18.30	27.22	38.94	69.89	18.07
BA ^b	3.04	5.38	56.55	23.72	4.58	6.92	66.24	37.47
BD ^b	3.07	5.69	53.97	11.77	6.20	8.82	70.33	21.34
PV	0.20	0.46	42.53	8.22	0.32	0.59	54.45	12.45
FMY	3370.63	5780.82	58.31	34.04	1836.88	4247.07	43.25	24.82
DMY	185.13	330.88	55.95	32.92	124.15	269.90	46.00	27.43

^a selection intensity = 10%; ^b σ^2_g and σ^2_{ph} values are multiplied by 10^3 for both populations

Table 3. Estimates of the genetic (r_g) and phenotypic (r_{ph}) correlations involving all traits for the original (upper) and regenerated population (lower diagonal).

Genetic correlations						
	MSH	BA	BD	PV	FMY	DMY
MSH	—	0.35	0.38	0.90	0.48	0.52
BA	0.66	—	1.00	0.80	0.93	0.95
BD	0.72	0.99	—	0.81	0.94	0.94
PV	0.85	0.70	0.78	—	0.99	1.01
FMY	0.66	0.86	0.86	0.85	—	0.99
DMY	0.70	0.93	0.93	0.84	0.99	—

Phenotypic correlations						
	MSH	BA	BD	PV	FMY	DMY
MSH	—	0.41	0.43	0.73	0.50	0.52
BA	0.62	—	0.99	0.72	0.85	0.86
BD	0.66	0.98	—	0.74	0.84	0.85
PV	0.73	0.68	0.74	—	0.81	0.83
FMY	0.59	0.78	0.77	0.74	—	0.98
DMY	0.62	0.83	0.82	0.76	0.98	—

Table 4. Expected means of the selected original and regenerated populations for the traits MSH, BA, BD, PV, FMY and DMY.

Traits	Improved populations ^a	
	Original	Regenerated
MSH (cm)	51.04	50.02
BA (m)	0.38	0.36
BD (m ²)	0.68	0.66
PV (scale)	6.70	6.60
FMY(g/plant)	306.37	248.76
DMY(g/plant)	72.12	61.61

^a selection intensity = 10%

APÊNDICE 2

Coeficientes de similaridade SM (Simple Matching) entre 12 progênies (6 originais - PO e 6 regeneradas - R8/) representadas por 3 plantas.

	3PO1	3PO2	3PO3	4PO1	4PO2	4PO3	32PO1	32PO2	32PO3	34PO1	34PO2	34PO3	65PO1	65PO2	65PO3	66PO1	66PO2	66PO3	2R8/1	2R8/2	2R8/3
3PO1	1.000																				
3PO2	0.867	1.000																			
3PO3	0.911	0.889	1.000																		
4PO1	0.889	0.822	0.911	1.000																	
4PO2	0.911	0.822	0.889	0.978	1.000																
4PO3	0.889	0.822	0.889	0.978	0.978	1.000															
32PO1	0.922	0.878	0.900	0.944	0.944	0.944	1.000														
32PO2	0.911	0.867	0.889	0.911	0.933	0.911	0.967	1.000													
32PO3	0.911	0.889	0.911	0.933	0.933	0.933	0.967	0.933	1.000												
34PO1	0.944	0.900	0.922	0.900	0.922	0.900	0.911	0.922	0.944	1.000											
34PO2	0.944	0.900	0.900	0.900	0.922	0.900	0.911	0.900	0.944	0.978	1.000										
34PO3	0.911	0.867	0.867	0.844	0.844	0.822	0.856	0.844	0.867	0.900	0.900	1.000									
65PO1	0.933	0.822	0.889	0.889	0.911	0.911	0.900	0.889	0.911	0.922	0.922	0.867	1.000								
65PO2	0.922	0.833	0.922	0.922	0.922	0.922	0.911	0.900	0.900	0.911	0.911	0.878	0.944	1.000							
65PO3	0.956	0.889	0.889	0.911	0.933	0.911	0.944	0.933	0.911	0.944	0.944	0.911	0.911	0.922	1.000						
66PO1	0.967	0.878	0.878	0.878	0.900	0.900	0.933	0.922	0.922	0.933	0.933	0.900	0.922	0.911	0.944	1.000					
66PO2	0.944	0.900	0.856	0.856	0.878	0.856	0.911	0.900	0.922	0.933	0.933	0.922	0.889	0.911	0.900	0.956	0.944	0.922	1.000		
66PO3	0.956	0.911	0.911	0.867	0.889	0.867	0.922	0.933	0.911	0.944	0.922	0.889	0.911	0.878	0.867	0.856	0.889	0.867	0.900	0.878	0.867
2R8/1	0.867	0.867	0.822	0.889	0.911	0.911	0.878	0.867	0.911	0.900	0.922	0.889	0.911	0.811	0.878	0.867	0.856	0.889	0.867	1.000	
2R8/2	0.856	0.856	0.833	0.833	0.900	0.922	0.889	0.878	0.922	0.889	0.900	0.867	0.889	0.789	0.856	0.867	0.856	0.867	0.844	0.833	0.944
2R8/3	0.833	0.833	0.811	0.900	0.922	0.922	0.889	0.878	0.900	0.867	0.889	0.911	0.856	0.900	0.867	0.878	0.889	0.867	0.856	0.944	0.956
4R8/1	0.878	0.856	0.833	0.900	0.922	0.922	0.889	0.878	0.900	0.889	0.856	0.878	0.800	0.844	0.856	0.867	0.878	0.889	0.867	0.944	0.956
4R8/2	0.844	0.844	0.800	0.889	0.911	0.911	0.900	0.889	0.889	0.856	0.878	0.800	0.844	0.856	0.867	0.878	0.889	0.867	0.856	0.944	0.989
4R8/3	0.833	0.833	0.833	0.878	0.900	0.900	0.844	0.833	0.878	0.867	0.889	0.833	0.878	0.867	0.889	0.856	0.867	0.833	0.844	0.922	0.933
6R8/1	0.844	0.867	0.822	0.867	0.889	0.889	0.856	0.844	0.889	0.878	0.900	0.844	0.889	0.878	0.867	0.889	0.856	0.844	0.878	0.856	0.944
6R8/2	0.889	0.844	0.800	0.867	0.889	0.889	0.878	0.867	0.889	0.878	0.878	0.867	0.889	0.856	0.867	0.889	0.856	0.867	0.900	0.867	0.922
6R8/3	0.878	0.878	0.856	0.900	0.922	0.900	0.889	0.878	0.922	0.911	0.911	0.878	0.900	0.889	0.856	0.867	0.878	0.889	0.889	0.878	0.911
13R8/1	0.900	0.878	0.833	0.900	0.922	0.900	0.911	0.900	0.922	0.889	0.911	0.856	0.856	0.844	0.878	0.856	0.844	0.878	0.911	0.878	0.944
13R8/2	0.867	0.844	0.844	0.911	0.933	0.911	0.900	0.889	0.933	0.900	0.900	0.822	0.867	0.856	0.867	0.878	0.867	0.878	0.867	0.933	0.944
13R8/3	0.856	0.856	0.811	0.900	0.922	0.922	0.911	0.900	0.900	0.867	0.889	0.811	0.856	0.867	0.878	0.889	0.867	0.856	0.967	0.978	0.956
14R8/1	0.878	0.856	0.878	0.944	0.967	0.944	0.911	0.922	0.922	0.933	0.911	0.833	0.878	0.889	0.900	0.867	0.878	0.922	0.933	0.933	0.933
14R8/2	0.878	0.878	0.833	0.922	0.944	0.922	0.933	0.922	0.922	0.889	0.911	0.833	0.856	0.867	0.878	0.889	0.889	0.878	0.944	0.956	0.956
14R8/3	0.900	0.856	0.856	0.922	0.944	0.922	0.911	0.900	0.922	0.889	0.911	0.856	0.878	0.867	0.878	0.900	0.889	0.878	0.922	0.933	0.933
16R8/1	0.844	0.822	0.800	0.867	0.889	0.889	0.856	0.844	0.867	0.856	0.878	0.844	0.867	0.833	0.844	0.856	0.833	0.844	0.856	0.922	0.922
16R8/2	0.878	0.878	0.856	0.878	0.900	0.878	0.867	0.856	0.878	0.889	0.911	0.856	0.833	0.844	0.878	0.867	0.867	0.856	0.900	0.911	0.889
16R8/3	0.856	0.833	0.811	0.900	0.922	0.900	0.889	0.878	0.900	0.867	0.889	0.811	0.833	0.844	0.856	0.867	0.867	0.833	0.922	0.933	0.933

Continuação do apêndice 2

4R8/1	4R8/2	4R8/3	6R8/1	6R8/2	6R8/3	13R8/1	13R8/2	13R8/3	14R8/1	14R8/2	14R8/3	16R8/1	16R8/2	16R8/3
1.000														
0.944	1.000													
0.956	0.944	1.000												
0.944	0.911	0.944	1.000											
0.944	0.911	0.900	0.956	1.000										
0.933	0.900	0.933	0.967	0.944	1.000									
0.956	0.944	0.911	0.922	0.944	0.933	1.000								
0.922	0.911	0.900	0.933	0.933	0.944	0.944	1.000							
0.956	0.967	0.911	0.922	0.922	0.911	0.956	0.922	1.000						
0.933	0.922	0.911	0.900	0.900	0.933	0.933	0.944	0.933	1.000					
0.956	0.967	0.911	0.922	0.922	0.933	0.978	0.944	0.978	0.956	1.000				
0.956	0.944	0.933	0.900	0.922	0.933	0.956	0.944	0.933	0.956	0.956	1.000			
0.967	0.933	0.944	0.911	0.911	0.900	0.922	0.911	0.922	0.900	0.922	0.944	1.000		
0.933	0.900	0.911	0.922	0.900	0.911	0.933	0.944	0.911	0.933	0.933	0.922	1.000		
0.911	0.922	0.889	0.922	0.922	0.911	0.956	0.944	0.933	0.933	0.956	0.911	0.878	0.911	1.000

APÈNDICE 3

Coefficientes médios de similaridades dentro e entre progênies, obtidos a partir da matriz de similaridade apresentada no apêndice 2.

	3P	4P	32P	34P	65P	66P	2R	4R	6R	13R	14R	16R
3PO	0.889											
4PO	0.872	0.978										
32PO	0.898	0.932	0.956									
34PO	0.906	0.884	0.900	0.926								
65PO	0.895	0.915	0.911	0.912	0.926							
66PO	0.911	0.877	0.920	0.923	0.912	0.941						
2PR	0.844	0.919	0.898	0.874	0.875	0.874	0.956					
4PR	0.839	0.904	0.878	0.864	0.865	0.852	0.938	0.948				
6PR	0.853	0.890	0.879	0.883	0.877	0.880	0.922	0.925	0.956			
13R	0.854	0.914	0.907	0.872	0.863	0.881	0.941	0.931	0.930	0.941		
14R	0.851	0.937	0.919	0.888	0.881	0.880	0.930	0.937	0.919	0.949	0.956	
16R	0.842	0.891	0.870	0.867	0.848	0.852	0.909	0.923	0.912	0.931	0.927	0.904