

**IDENTIFICAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *BRACHIARIA*
RUZIENSIS POR MARCADORES MOLECULARES**

Luciana Machado Guaberto

**IDENTIFICAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *BRACHIARIA*
RUZIZIENSIS POR MARCADORES MOLECULARES**

Luciana Machado Guaberto

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador:

Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto

633.2
G896i

Guaberto, Luciana Machado

Identificação da variabilidade genética de *Brachiaria ruzizensis* por marcadores moleculares / Luciana Machado Guaberto – Presidente Prudente, 2009.
39 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2009.
Bibliografia

1. Genética molecular. 2. Marcadores RAPD.
3. *Brachiaria ruzizensis*. I. Título.

LUCIANA MACHADO GUABERTO

Identificação da variabilidade genética de *Brachiaria ruziziensis* por marcadores moleculares

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Presidente Prudente, 27 de novembro 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Matheus Gustavo da Silva
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Prof. Dra. Juliana Parisotto Poletine
Universidade Estadual Maringá - UEM
Maringá - PR

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu marido Jose Antonio pelo grande amor, paciência e por ter sempre me incentivado a lutar pelos meus objetivos.

Aos meus filhos Matheus e Mylena que são a razão de todos os meus esforços, que sempre com muito carinho e paciência souberam entender a minha ausência no decorrer deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, quem me iluminou e acompanhou nesta longa caminhada, que nem sempre foi fácil, mantendo-me firme em meus propósitos;

À Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, pela oportunidade de aperfeiçoamento; disponibilizando recursos financeiros e equipamentos para realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Nelson Barbosa Machado Neto, pela orientação, amizade e ajuda diante das dificuldades que encontrei, por todos os ensinamentos e confiança depositados em mim durante a realização deste trabalho;

Aos professores do programa de pós-graduação em Agronomia, que contribuíram para minha formação profissional. Em especial aos professores Dra Ana Cláudia Pacheco e Dr Fabio Fernando de Araújo pelas preciosas sugestões.

À minha amiga e cunhada Márcia Guaberto pelo apoio quando eu não encontrava forças para continuar.

À minha amiga e companheira de trabalho Ana Cláudia Ambiel pelo grande incentivo profissional e pela amizade onde serei eternamente grata.

Às minhas colegas dos laboratórios do bloco Q da Unoeste, Ana Cristina, Edna Antonia, Lindaura Helena agradeço o carinho e companheirismo.

Aos professores membro da banca avaliadora da defesa Dra Juliana Pacheco Parisotto Poletine e Dr Matheus Gustavo da Silva.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA que gentilmente forneceu amostras para realização deste trabalho.

A todos aqueles que confiaram em mim e de certa forma contribuíram para a realização desta dissertação, agradeço.

Obrigada! Obrigada! Obrigada!

“A mente que se abre para uma nova idéia, jamais voltará a seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

Identificação da Variabilidade genética de *Brachiaria ruzizensis* por marcadores molecular

O conhecimento da variabilidade genética de *Brachiaria ruzizensis* é necessário antes de iniciar-se um programa de melhoramento. Este trabalho objetivou estudar a variabilidade genética de 37 amostras de *Brachiaria ruzizensis*, provenientes de coleta realizada pela EMBRAPA Gado de leite por meio de marcadores moleculares RAPD e primers longos. O DNA das folhas foi extraído pelo método CTAB, utilizaram-se 14 primers decâmeros e 9 primers longos. Os dados foram utilizados para análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se as distâncias ao quadrado (EXCOFFIER et al., 1992) com auxílio do programa Arlequin (EXCOFFIER et al., 2006). Encontrou-se variação entre espécies de 47,42% e 36,07% para RAPD e primers longos, respectivamente e dentro da espécie observou-se variação de 52,58% e 63,93%. Foi construído um dendrograma com o algoritmo de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average) utilizando-se para essa análise o programa NTSYS 2.0 (ROHLF, 1998). Ambos marcadores conseguiram agrupar os genótipos onde as amostras 1 a 5 foram as mais semelhantes entre si. RAPD utilizando-se primers curtos e primers longos são eficientes para estimar a variabilidade em *Brachiaria ruzizensis*.

Palavras chave: RAPD; Diversidade; Pastagem

ABSTRACT

Genetic variability identification in *Brachiaria ruziziensis* by molecular markers

Knowledge of the genetic variability of *Brachiaria ruziziensis* is required before you start a breeding program. This study investigated the genetic variability of 37 samples of *Brachiaria ruziziensis*, from the collection held by EMBRAPA Dairy Cattle by molecular markers and long primers. The DNA was extracted from leaves by CTAB method, we used 14 decamer primers and primers 9 long. The data were used for analysis of molecular variance (AMOVA) using the squared distances (Excoffier et al., 1992) using the program Arlequin (Excoffier et al., 2006). We found variation between species of 47.42% and 36.07% for RAPD primers and long, respectively and within the species observed variation of 52.58% and 63.93%. A dendrogram was constructed with the UPGMA clustering algorithm (Unweighted Pair-Group Method using an Arithmetic Average) using this analysis to the program NTSYS 2.0 (ROHLF 1998). Both markers were able to group the samples where genotypes 1 to 5 the most similar to each other. RAPD using primers short and long primers are effective to estimate the variability in *Brachiaria ruziziensis*.

Keywords: RAPD; diversity; Pasture

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 O Gênero <i>Brachiaria</i>	10
1.2 Marcadores Moleculares	12
2 MATERIAL E MÉTODOS	18
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Gênero *Brachiaria*

A *Brachiaria* é um gênero pertencente à família Poaceae, nativa da África Tropical, abrangendo cerca de 100 espécies e revisto por Dusi et al., (2000). As espécies do gênero *Brachiaria* têm sua distribuição como forrageiras tropicais em ambos os hemisférios do globo, ocorrendo principalmente na África.

No Brasil, são encontradas 15 espécies, das quais cinco são nativas. Provavelmente três dessas espécies foram introduzidas há várias décadas, sendo, portanto consideradas como nativas, e sete espécies foram introduzidas (RENVOIZE et al., 1996). O gênero *Brachiaria* é uma gramínea, de origem africana, sendo introduzida no Brasil a partir da década de 1950, onde, a verdadeira expansão ocorreu nas décadas de 1970 e 1980, principalmente nas regiões de clima mais quente (ZIMMER; EUCLIDES 2000). Na região do cerrado, a introdução de gênero *Brachiaria* foi, sem dúvida alguma, o elemento responsável pela grande expansão da pecuária. Segundo Keller-Grein et al. (1996) das pastagens implantadas no Brasil 85% correspondem ao gênero *Brachiaria*. Além da importância como forrageira, ainda é considerada a planta importante para a formação de palhada para sistemas de plantio direto (MENEZES; LEANDRO 2004; LARA-CABEZAS; PÁDUA 2007).

O gênero *Brachiaria* é de grande importância para a pecuária brasileira por ser amplamente utilizado na alimentação animal. Apresenta características vantajosas, como a formação de pastagens por sementes, adaptação às mais variadas condições de solos, desenvolvendo-se desde solos úmidos e férteis, até os solos pobres do Cerrado sujeitos a secas estacionais. Além destas características, pode-se citar a alta qualidade nutricional, alta produção de matéria seca, crescimento bem distribuído durante a maior parte do ano, o baixo custo quando comparado ao fornecimento de outros concentrados e

a tolerância a altos níveis de alumínio predominantes em solos ácidos de algumas importantes regiões de pecuária no Brasil (BARBOSA, 2006).

O gênero *Brachiaria* possui espécies que se reproduzem tanto por sexualidade quanto por apomixia, permitindo estudo comparativo dos dois modos de reprodução. Valle (1990), analisando a reprodução de 14 espécies de *Brachiaria* reunidas pelo CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical, numa coleção de 251 acessos, encontrou alguns totalmente sexuais em espécies apomíticas obrigatórias (*B. decumbens*, *B. dictyneura* e *B. jubata*), e sexualidade alta nas espécies *B. brizantha* e *B. humidicola*. Segundo Marcos Filho (2005) a apomixia geralmente não é completa, podendo ocorrer taxas variáveis de sexualidade de acordo com a região e o ano de produção.

A *Brachiaria ruziziensis* apresenta excelente adaptação na maioria das regiões brasileiras. Por ser considerada uma planta sexuada diplóide, a espécie está servindo de base para o desenvolvimento de novos cultivares de *Brachiaria*. Desde 1988, o programa de melhoramento da Embrapa Gado de Corte vem realizando cruzamentos interespecíficos, usando acessos sexuais de *B. ruziziensis*, duplicados por colchicina (VALLE, 1990).

Estudos mais cautelosos sobre sistema de compatibilidade conduzidos em *B. ruziziensis*, cuja contraparte apomítica não foi ainda identificada, mostraram rejeição de tubos polínicos no estigma e estilete, mas com formação de sementes auto polinizadas (0,49% a 7,20%) e, portanto, a alogamia foi sugerida como sistema preferencial de reprodução. Da mesma forma, foi observada rejeição e limitada formação de sementes nos tetraplóides sexuais de *B. ruziziensis* e nos seus híbridos sexuais (NGENDAHOYO et al., 1988; LUTTS et al., 1994). Apesar da baixa diversidade verificada, esse gênero apresenta potencial para o desenvolvimento de cultivares superiores por intermédio de programas de melhoramento genético (ASSIS et al., 2003).

Um dos problemas observados no melhoramento genético de *Brachiaria*, é que as plantas se reproduzem preferencialmente por apomixia e são poliplóides, enquanto as fontes de sexualidade, que são espécies *B. ruziziensis* ou

acessos de outras espécies, são diplóides. Assim, o fluxo gênico é possível, tanto intra, como interespecificamente (VALLE et al., 1990),

A preocupação em aumentar a base genética da *Brachiaria* nas pastagens aponta para diferentes demandas do melhoramento, havendo a necessidade de desenvolver-se novas variedades tetraplóides e apomíticas diplóides que permitam o cruzamento intraespecífico. Atualmente, todo o programa de melhoramento de *Brachiaria* utiliza como progenitor feminino uma única introdução de *B. ruziziensis* tetraplóide artificial (CARNEIRO et al., 2003).

O melhoramento genético de *Brachiaria* tem por objetivo selecionar plantas e obter híbridos que reúnam características desejáveis: a alta produtividade, adaptações a solos ácidos, bom valor nutritivo e resistência a cigarrinha-das-pastagens (VALLE et al., 2004). Uma das limitações do melhoramento do gênero *Brachiaria* é a diferença de ploidia entre plantas apomíticas e sexuais (ARAÚJO et al., 2005).

1.2 Marcadores Moleculares

O estudo da variabilidade genética torna-se importante para a evolução, sendo também utilizada como instrumento de investigação por ecólogos e sistematas em diversas áreas como, na verificação das afinidades e os limites entre as espécies, e detecção sobre os modos de reprodução e estrutura familiar, para estimar níveis de migração e dispersão nas populações (AVISE, 1994).

Os marcadores moleculares estão facilitando a realização de estudos de genética, taxonomia e evolução de plantas, proporcionando substancial avanço no conhecimento científico. As principais implicações deste avanço se refletem no poder, precisão e rapidez na manipulação da variabilidade genética, beneficiando de várias maneiras o melhoramento de plantas (FALEIRO, 2007). Nas plantas, os marcadores moleculares exercem importante função no mapeamento cromossômico, identificação e clonagem de genes e melhoramento e criação de

novas variedades, permitindo o conhecimento da variabilidade e identificação em níveis genéticos intra e interespecíficos (WILLIAMS et al., 1993; GOTIMSKY et al. 1999).

Os marcadores de DNA apresentam vantagens em relação aos marcadores morfológicos e isoenzimáticos, uma vez que podem ser obtidos em grande número e não são influenciados por fatores ambientais (BORÉM, 1998). Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) o nível de polimorfismo para cada *loci* estudado é geralmente alto, além disso, marcadores facilitam a construção de mapas genéticos, pois a fonte de polimorfismo molecular em populações segregantes é teoricamente “ilimitada”.

Utilizando seqüências derivadas de milho, Pessino et al. (1998) localizaram marcadores moleculares que segregam com o caráter apospórico em *B.brizantha* localizados no cromossomo 5 de seu genoma. Leblanc et al. (1997) isolaram fragmentos de cDNA específicos de plantas apomíticas pertencentes a uma população segregante originada de cruzamentos entre *B. brizantha* (apomítica) e *B. ruziziensis* (sexual).

Caracteres fenotípicos, tradicionalmente usados para estimar a diversidade genética, são limitados, uma vez que são influenciados pelo ambiente e estágio de desenvolvimento da planta (TATINENI et al., 1996). Os marcadores de DNA são independentes das condições ambientais e mostram alto nível de polimorfismo, com herança mendeliana, possibilitando uma descrição mais detalhada da estrutura genética de populações (WILLIAMS et al., 1990).

Segundo Milach (1998) os vários tipos de marcadores moleculares disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada, pela habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade. Para Faleiro (2007) as metodologias utilizadas para identificar os tipos de marcadores moleculares dividem-se em dois grupos: hibridização ou amplificação de DNA.

Ainda segundo Faleiro (2007) dentre os marcadores mais conhecidos identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minissatélite ou locos VNTR (*Variable Number*

of *Tandem Repeat*). Os mais conhecidos, por amplificação, são os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*). Recentemente, dois marcadores baseados em amplificação estão sendo amplamente utilizados: AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

Em *Paspalum simplex* tetraplóide (apomítico), a análise de segregação utilizando RFLP mostrou herança tetrassômica, sugerindo que esta espécie seja um autotetraplóide (PUPILLI et al., 1997).

Rodrigues et al. (2001) utilizando a técnica “Differential Display PCR” (DDPCR) compararam o perfil de expressão gênica em ovários de plantas de *B.brizantha* apomíticas e sexuais, obtendo 60 seqüências de cDNA amplificadas por PCR de RNAm, caracterizando o genoma funcional desta forrageira, para esta característica.

Tecnologias baseadas em amplificação que utilizam o próprio DNA das espécies em estudo são aquelas baseadas nos protocolos da reação em cadeia da polimerase (PCR), oferecendo certas vantagens como a utilização da enzima DNA-polimerase termoestável, que, com alterações de temperatura, amplifica exponencialmente um determinado segmento de DNA. Em particular, a PCR associada à técnica denominada “*Random Amplified Polymorphic DNA*” e “*Inter Simple Sequence Repeat*” tem conduzido as pesquisas de identificação do polimorfismo (FALEIRO, 2007).

Os RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) consistem um dos marcadores moleculares mais usados em estudos genéticos. Os RAPDs amplificam o DNA genômico, de forma arbitrária, utilizando apenas uma seqüência iniciadora em cada reação, onde oligonucleótidos de 10 bases, denominados “primers”, formados por diferentes combinações das quatro bases nitrogenadas, e com um conteúdo de G+C entre 50 e 70%, sem seqüências polindrômicas dirigem a reação da polimerase em cadeia (FRITSCH; RIESEBERG, 1992). Ainda, é uma técnica que requer muito pouco DNA, sua manipulação é simples, quando comparada a outras técnicas de marcação molecular que exigem qualquer sistema especial para detecção de polimorfismo, tais como hibridizações,

marcações radioativas ou compostas quimioluminescentes e, também, por não necessita de informação prévia sobre a genética do organismo a ser estudado (CAETANO-ANOLLES et al., 1991).

Ishii et al. (1996) estudando a divergência genética entre variedades de arroz na Ásia, conseguiram identificar o grau de parentesco e grupo precursor de *Oryza sativa* e de *Oryza glaberrima* pela técnica do RAPD. Verma et al. (1999) conseguiram diferenciar variedades locais de arroz na Índia utilizando a mesma técnica.

Em *Poa pratensis*, análises com RAPD e AFLP mostraram uma ligação altamente significativa entre alguns marcadores e partenogênese, reforçando a hipótese de herança monogênica desta característica (BARCACCIA et al., 1998).

A técnica de RAPD tem sido bem difundida para análise da variabilidade genética de plantas, Vieira (2003) analisou a variabilidade genética em acessos de trapoeraba (*Commelina benghalensis*) em comparação à resposta fenotípica ao herbicida glyphosate. Este autor observou uma considerável variabilidade genética entre os acessos estudados e este não permitiu agrupar, distintamente, aqueles tolerantes e sensíveis ao glyphosate.

Segundo Bitencourt et al. (2008) foi possível identificar 286 híbridos e 61 não híbridos utilizando-se RAPD entre diversas plantas potencialmente híbridas de *Brachiaria humidicola*. Fato semelhante foi demonstrado por Srivastava et al. (2009), estudando *Bougainvillea*, onde a técnica de RAPD permitiu a confirmação da relação genética entre híbridos e seus parentais.

A técnica de RAPD tem-se mostrado uma ferramenta poderosa seja na determinação de variabilidade, como em *Bougainvillea* (SRIVASTAVA et al., 2009), *Catharanthus roseus* (SHAW et al., 2009), *Coffea* (*C. arabica* autogamous) (DINIZ et al., 2005); *C.canephora* allogamous (FERRÃO et al., 2009), Mandioca (*Manihot esculenta* - FERREIRA et al., 2008), seja em *Brachiaria* (CHIARI et al., 2007, AMBIEL et al., 2008, BITENCOURT et al., 2008, CHIARI et al., 2008) ou em capim elefante (PEREIRA et al., 2008) e *Paspalum urvillei* (SAWASATO et al., 2008).

Os ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) são marcadores arbitrários altamente informativos *multiloci* correspondentes a microssatélites produzidos por amplificação da reação de cadeia polimerase utilizando um único iniciador (*primers* 16-20 pb) (POWELL et. al.,1996). Os ISSR apresentam alto polimorfismo, não requerem prévios conhecimentos genômicos, possuem maior reprodutibilidade e, além disso, são de custo relativamente baixo (ZIETKIEWICZ et. al., 1994). A técnica de ISSR é baseada na amplificação de regiões (100-3000bp) orientadas inversamente, espaçadas proximamente aos microssatélites oferecendo ampla cobertura de regiões neutras do genoma (REDDY et al., 2002).

Os microssatélites estão dispersos no genoma de forma relativamente proporcional. Regiões de grande abundância destas seqüências têm sido encontradas e são nomeadas “SSR hot spots” (ZIETKIEWICZ et al., 1994, BORNET; BRANCHARD, 2001).

Por meio das análises de marcadores ISSR, Rossato et al. (2007), estudando as populações de palmeiras do gênero *Butia*, demonstraram complexidade em sua diversidade genética, confirmando a classificação botânica. Souza et al. (2005) utilizando a técnica ISSR com os “primers” UBC 854, 855 e 811, conseguiram detectar regiões genômicas potencialmente associadas a tolerância a ácidos orgânicos, enquanto que a utilização dos iniciadores UBC 850 e 826 possibilitou a identificação de regiões genômicas potencialmente associadas à sensibilidade.

Esselman et al. (1999) e Assefa et al. (2003) utilizaram marcadores ISSR para acessar a diversidade genética de *Calamagrostis porteri ssp. insperata* Swallen. e *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter, respectivamente, ambos representantes da família Poaceae, tendo alto nível de polimorfismo. Morais et al. (2008) estudando a diversidade genética de maracujazeiro azedo, com marcadores ISSR, obtiveram similaridade de 62 %. Essa possibilidade foi relatada por Pio Viana et al. (2003) trabalhando com genótipos comerciais de maracujazeiro amarelo utilizando marcadores RAPD.

As técnicas moleculares descritas permitem estimar a variabilidade genética entre e espécies, além de servirem como ponto de partida para estudos

de manejo dessas plantas, pois, aliadas ao sequenciamento permitem localizar genes de resistência, bem como possíveis mutações relacionadas ao surgimento de indivíduos resistentes em determinadas espécies.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade molecular entre amostra *Brachiaria ruzizensis*, acessos pertencentes ao programa de melhoramento genético da Embrapa Gado de Leite por meio dos marcadores moleculares RAPD comparando a utilização de primers curtos e primers longos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de genética molecular e citogenética da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, em Presidente Prudente – SP no período compreendido entre janeiro de 2008 a julho de 2008.

Como fonte de DNA utilizou-se tecido foliar de 37 amostras de *Brachiaria ruziziensis*. Como outras espécies do gênero utilizaram-se uma amostra de *B. decumbens* ‘Basilisk’, as *B. brizantha* ‘Marandu’ e ‘Xaraés’, a *B. humidicola* ‘Tully’, *B. jubata*, *Brachiaria* híbrida ‘Mulato’, obtidas partir de coleta da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora - MG, sendo que os cultivares ‘Tanzânia’, ‘Mombaça’ e ‘Tobiatã’ de *Panicum maximum* foram usados como marcadores externos.

Para extração do DNA do tecido foliar utilizou-se o método Doyle e Doyle (1987) com adaptações. Foram utilizados aproximadamente 1cm de tecido foliar o qual foi macerado com pistilo em cadinho de porcelana sob nitrogênio, sendo adicionado tampão de extração (Tris–HCL 0,1M, EDTA 20mM, NACL1,4M, CTAB 2% e 0,2% β -mercaptoetanol). O extrato foi transferido para um micro tubo e colocado em banho seco a 65°C, por 50 minutos, sendo agitado, por inversão, por intervalos de 10 minutos, adicionando-se posteriormente, uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 12000 rpm, separando-se em duas fases. A fase orgânica foi descartada e a fase aquosa precipitada por isopropanol gelado (-20°C), deixando para precipitar (*overnight*) em freezer a temperatura de -20°C. Após este período, os tubos foram novamente centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos para a formação de um “pellet”. O precipitado recolhido foi lavado em etanol 70% e centrifugado novamente a 12000 rpm por 10 minutos. Os “pellets” que apresentaram excesso de carboidratos foram incubados por 15 min a 65°C em etanol 70% centrifugando-se novamente por mais 10 minutos a 12000 rpm. Após a lavagem, as amostras foram secas em fluxo laminar até a completa evaporação do etanol.

O DNA coletado foi solubilizado em tampão TE (pH 8,0) adicionado de RNAase 0,1 μ g. μ l⁻¹ e incubado a 37°C por 30 min, sendo novamente aquecido a

65°C por 15 minutos para inativação da enzima. O DNA obtido foi quantificado em gel de agarose 1% contra um padrão conhecido através de espectrofotometria, e então diluído para amostras de trabalho de 10ng μL^{-1} acondicionadas em freezer – 20°C para o uso posterior.

Testaram-se 27 *primers* decâmeros arbitrários (OPERON Technologies Inc) com diferentes concentrações de DNA molde (25, 50, 75ng) com a finalidade de se obter quantidade satisfatória para reações da RAPD. Os *primers* que formaram bandas estáveis em gel de agarose, reproduzíveis em RAPD e polimórficas com forma consistente foram eleitos.

As reações RAPD baseadas em Williams et al. (1990) com modificações foram realizadas em termociclador MJ-PTC 100, onde cada solução continha 25ng de DNA molde, 10% de tampão para PCR (20 mM Tris-HCL, ph 8.4, 50 mM de KCL) mais 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 μM de cada DNTP, 0,4 μM do *primer* a ser testado e 1 U de *Taq DNA polimerase* em volume final de 25 μl . As reações ocorreram em 43 ciclos. Após a desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, cada ciclo constituiu-se de: desnaturação 94°C por 30 segundos; anelamento a 37°C por 1 minuto e 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos. Após os 43 ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Em seguida as amostras foram resfriadas a 4°C. Após a reação o material foi aplicado em gel de agarose a 1,2% com brometo de etídeo, embebido em tampão TBE 0,5X e submetido a corrida de eletroforese a 150V/120mA por 1 hora. Os resultados foram visualizados com iluminação ultravioleta em câmara escura e as imagens capturadas em câmera CCD Alpha-Inmotech, sendo então analisadas por software Chemilmager.

As reações de primers longos foram realizadas em termociclador MJ-PTC 100, onde cada solução continha 25ng de DNA molde, 10% de tampão para PCR (20 mM Tris-HCL, ph 8.4, 50 mM de KCL) mais 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 μM de cada DNTP, 0,8 μM do primer a ser testado e 1 U de *Taq DNA polimerase* em um volume final de 25 μl . As reações ocorreram em 35 ciclos. Após a desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto e 50 segundos, cada ciclo constituiu-se de: desnaturação a 94°C por 40 segundos; anelamento a 44°C por 45 segundos, e

extensão a 72°C por 1 minuto e 50 segundos. Após os 35 ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72°C; em seguida as amostras foram resfriadas a 4°C. Após a reação o material foi aplicado em gel de agarose a 1,2% com brometo de etídeo, embebido em tampão TBE 0,5X e submetido a corrida de eletroforese a 150V/120mA por 1 hora. Como marcador de peso molecular foi usado *Ladder* de 100pb (Invitrogen). Os resultados foram visualizados com iluminação ultravioleta em câmara escura e as imagens capturadas em câmera CCD Alpha-Inmotech, sendo então analisadas por software Chemilmager.

A presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos foi usada para a construção de uma matriz de similaridade com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando “1” como a presença da banda no gel e “0” como sua ausência. A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, com a matriz de similaridade, foi construído um dendrograma com o algoritmo de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average) utilizando-se para essa análise o programa NTSYS 2.0 (ROHLF, 1998). A análise da variância molecular (AMOVA) foi calculada por meio da decomposição total nos seus componentes entre e dentro de espécies utilizando-se as distâncias ao quadrado (EXCOFFIER et al., 1992) com auxílio do programa Arlequin (EXCOFFIER et al., 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para otimização das reações RAPD utilizou-se a concentração de 25ng de DNA molde extraído de tecido foliar, escolhida por não ocorrer diferenças em relação as demais concentrações de DNA testadas (Figura1); a partir de 10 amostras de *B.ruzizensis*.

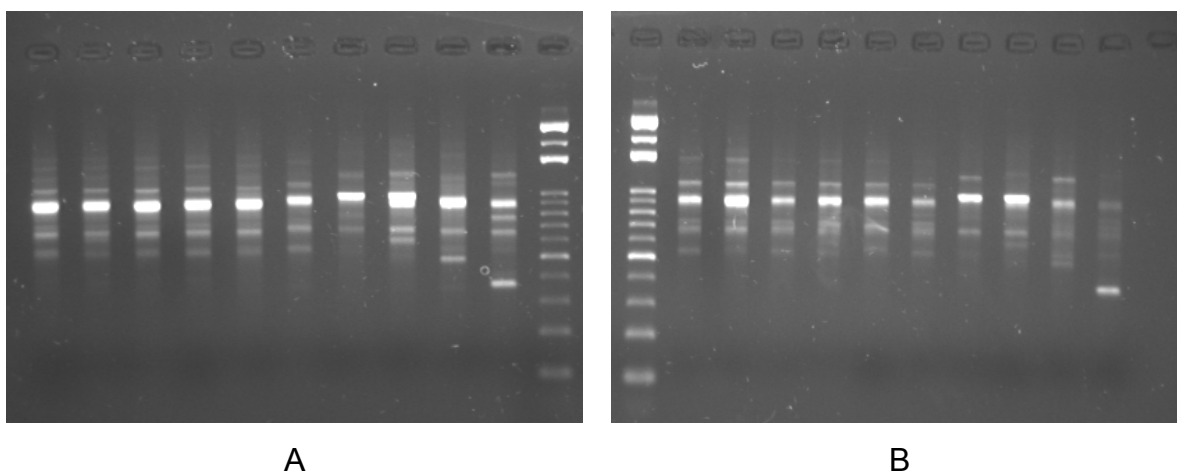


FIGURA 1 - Gel de agarose a 1%, amostras de 1 ao 10 de *Brachiaria ruzizensis*, utilizando-se 25 ng (A) e 50 ng (B) de DNA respectivamente

Utilizando-se DNA extraídos de sementes e folhas de cultivares de Vinca para análise de pureza genética Menezes et al. (2002) observou que o padrão de bandas obtidas através da técnica RAPD apresentou mais reprodutivos com o DNA extraído do tecido foliar.

O teste com 27 “primers” foram escolhidos 14 para serem utilizados nas 46 amostras, quais geraram um total de 202 bandas, com média de 14 de bandas por primer, onde 184 foram polimórficas. Os tamanhos variaram de 300 a 1560pb como pode ser observado na Tabela 1 encontrando-se dentro dos limites segundo Liu et al. (1999).

Chiari et al (2007) trabalhando com 58 amostras acessos de *Brachiaria humidicola* encontraram 10 bandas por primer no total de 10 primers.

Dos 47 primers utilizados em quatro espécies de *Brachiaria* Chiari et al (2008) amplificaram 396 bandas com média de 8,4 bandas por primer.

Ambiel et al. (2008) trabalhando com 42 amostras de várias espécies de *Brachiaria* e utilizando 10 primers, obtiveram um total de 114 bandas, perfazendo em média 11,4 bandas por primer, sendo todas polimórficas. Os tamanhos variaram de 200 a 1450 pb.

TABELA 1 - Sequências nucleotídicas dos primers RAPD, número de bandas, número de bandas polimórficas e tamanho dos fragmentos amplificados em *Brachiaria ruziziensis*

Primers	Seqüência de nucleotídeos (5' → 3')	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficas	Polimorfismo %	Tamanho dos fragmentos (pb)
A1	CAG GCC CTT C	14	14	100	430 a 1390
A5	AGG GGT CTT G	18	16	89	300 a 1500
A9	GGG TAA CGC C	11	09	81	350 a 1200
A16	AGC CAG CGA A	18	18	100	330 a 1360
C2	GTG AGG CGT C	14	14	100	330 a 1360
C16	CAC ACT CCA G	14	11	78	350 a 1420
G5	CTG AGA CCG A	17	15	88	400 a 1340
G9	CTG ACG TCA C	18	17	94	300 a 1500
G10	AGG GCC GTT C	14	14	100	410 a 1480
G11	TGC CCG TCG T	14	13	93	410 a 1560
X6	ACG CCA GAG G	13	12	92	440 a 1450
X15	CAG ACA AGC C	10	07	70	370 a 1500
X20	CCC AGC TAG A	16	14	87	310 a 1490
Y5	GGC TGC GAC A	11	10	91	440 a 1410
14		202	184	92,28	

No dendrograma (Figura 2) pode-se observar que as amostras 1 ao 6 têm grande similaridade formando o primeiro grupo, já as demais amostras tem uma alta variabilidade entre si formando um segundo grupo. Os acessos de *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. jubata*, *B. Mulato* e *B. humidicola* estão próximos formando o terceiro grupo com uma similaridade entre elas. As amostras 32, 34, 35 e 37 indicando um outgroup de *B. ruziziensis* sendo anômala formando o

quarto grupo, já os acessos *P. maximum* formam um grupo externo sendo quinto grupo.

Ambiel et al. (2008) utilizando-se dois lotes de sementes comerciais de *B.ruziziensis*, onde poderia ocorrer contaminação cruzada com outras espécies, conseguiu por meio dos marcadores RAPD agrupar os acessos seguindo o padrão da espécie, ficando todas no mesmo clado.

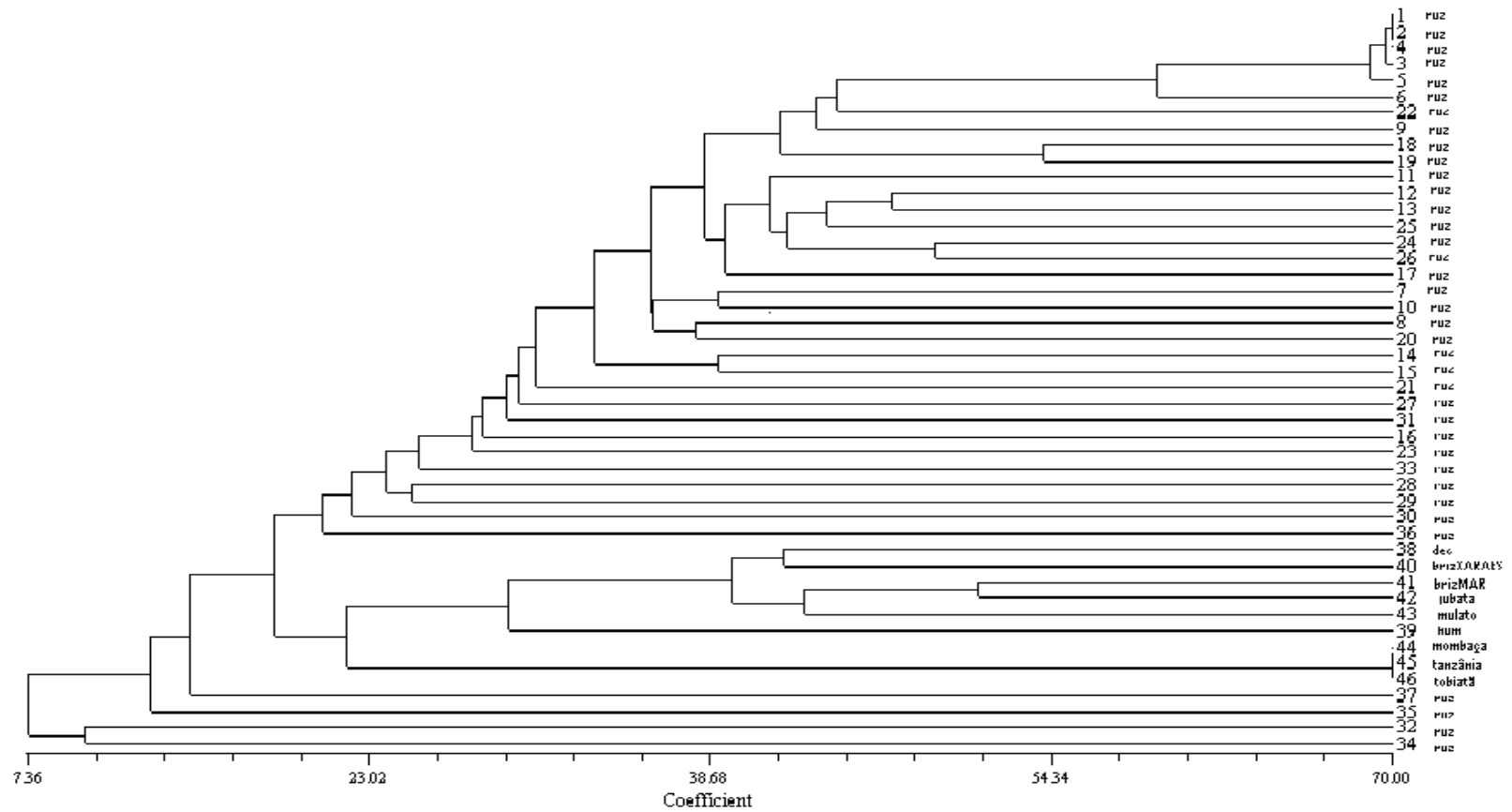


FIGURA 2 - Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA, obtidos de bandas de RAPD, das amostras de *Brachiaria* e *Panicum* com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard utilizando o programa NTSYS2.0.

Com as informações obtidas pela análise de variância molecular (AMOVA), com base nos dados de 184 bandas polimórficas verificou-se que 47,4% da variabilidade genética total está contida entre as espécies e 52,5% dentro da espécie conforme a Tabela 2. Fato esse pode estar relacionado que as amostras de *Brachiaria ruziziensis* consideradas sexuadas, ou seja, ocorre fluxo gênico. Sendo que as demais variedades são consideradas apomíticas gerando a progênie idêntica a planta mãe não ocorrendo o fluxo gênico.

TABELA 2 - Resultados da análise de variância molecular (Amova) das espécies *Brachiaria*, agrupadas obtidos por marcadores moleculares RAPD

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre espécies	6	180,3	6,1	47,4
Dentro da espécie	39	534,8	13,7	52,5
Total	45	715,1	19,8	

Chiari et al (2007) encontraram um índice de similaridade variando 0,14 a 0,97 denotando uma significativa variabilidade genética interacessos. Segundo Chiari et al (2008) a similaridade genética variou de 0,49 a 0,87 sendo a menor similaridade entre *B. brizantha* cv. *Marandu* e *B. humidicola* cv. BRS Tupi e alta similaridade nos acessos de *B. ruziziensis* entre 0,73 a 0,83.

Estudando a similaridade genética inter e intraespecífica entre acessos de germoplasma e cultivares comerciais de *Brachiaris*, Ambiel et al. (2008) atentando-se para variabilidade genética dentro dos acessos, destacou que há menor variabilidade genética entre os acessos de *B. decumbens* e *B. ruziziensis* quando comparadas aos acessos de *B. brizantha*. Valle (1990) concluiu, através de variadas análises, para caracteres morfológicos, que as espécies *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* estão superpostas, porém, *B. brizantha* é a que apresenta maior variabilidade nas características estudadas.

Para análises de primers longos foi utilizada uma concentração de 25ng DNA. Dos 10 primers testados, 9 foram selecionados por apresentarem-se adequados, produzindo fragmentos robustos, e de boa intensidade, com bom perfil de amplificação. Os primers utilizados geraram um total de 142 bandas, com uma média de 15,8 de bandas por primer, sendo 130 polimórficas. Os tamanhos variaram de 340 a 1490pb como pode ser observado na Tabela 3.

TABELA 3 - Seqüências nucleotídicas dos primers longos, número de bandas, número de bandas polimórficas e tamanho dos fragmentos amplificados em *Brachiaria ruziziensis*

Primers	Seqüência de nucleotídeos (5' → 3')	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficas	Polimorfismo %	Tamanho dos fragmentos (pb)
1	GAC TGG GTA CCA ATT CA	27	26	96	460 a 1480
2	CAC TGC GTTA CCA ATT CAC G	19	17	90	340 a 1500
3	GAC TGC GTA CCA ATT CAC T	15	14	93	480 a 1330
4	CTG ACC CAT GGT TAA	14	12	86	410 a 1520
5	GAT GAG TCC TGA GTA A	8	07	88	540 a 1490
6	GAT GAG TCC TGA GTA ACA A	14	14	100	510 a 1490
7	GAT GAG TCC TGA GTA ACA C	17	15	88	550 a 1460
8	GAT GAG TCC TGA GTA ACA G	10	07	70	610 a 1260
9	GAT GAG TCC TGA GTA ACA T	18	18	100	430 a 1440
		142	130	92,22	

Estudando cinco espécies de amora (*Morus* sp.) Vijayan et al. (2004) utilizaram 15 primers de ISSR considerados primers longos, obtendo um total de 150 bandas. Chen et al. (2006) utilizaram 5 primers em estudos genéticos em populações de *Caldesia grandis* e obtiveram um total de 60 bandas. Em estudos de genética espacial de soja selvagem, foram utilizados 15 primers ISSR, obtendo-se 182 bandas (JIN et al., 2006). Batista et al. (2008) trabalhando com *Tibouchina papyrus* utilizaram 6 primers ISSR, obtendo 42 bandas.

No dendrograma obtido por meio dos primers longos observa-se alta similaridade entre as amostras 1 a 5 e próxima a amostra 6 formando o primeiro

grupo. As demais amostras apresentam uma alta variabilidade entre si formando o segundo grupo. As amostras 38, 41,42 e 43 estão próximas formando um terceiro grupo, as demais variedades que são as amostras 39 e 40 estão mais distantes das demais, porém próximas entre si, sendo que a amostra 27 manteve se como um grupo externo ao outgroup sendo considerada quinto grupo. Os 3 acessos *Panicum* apresentaram-se próximos formando sexto grupo conforme a Figura 3.

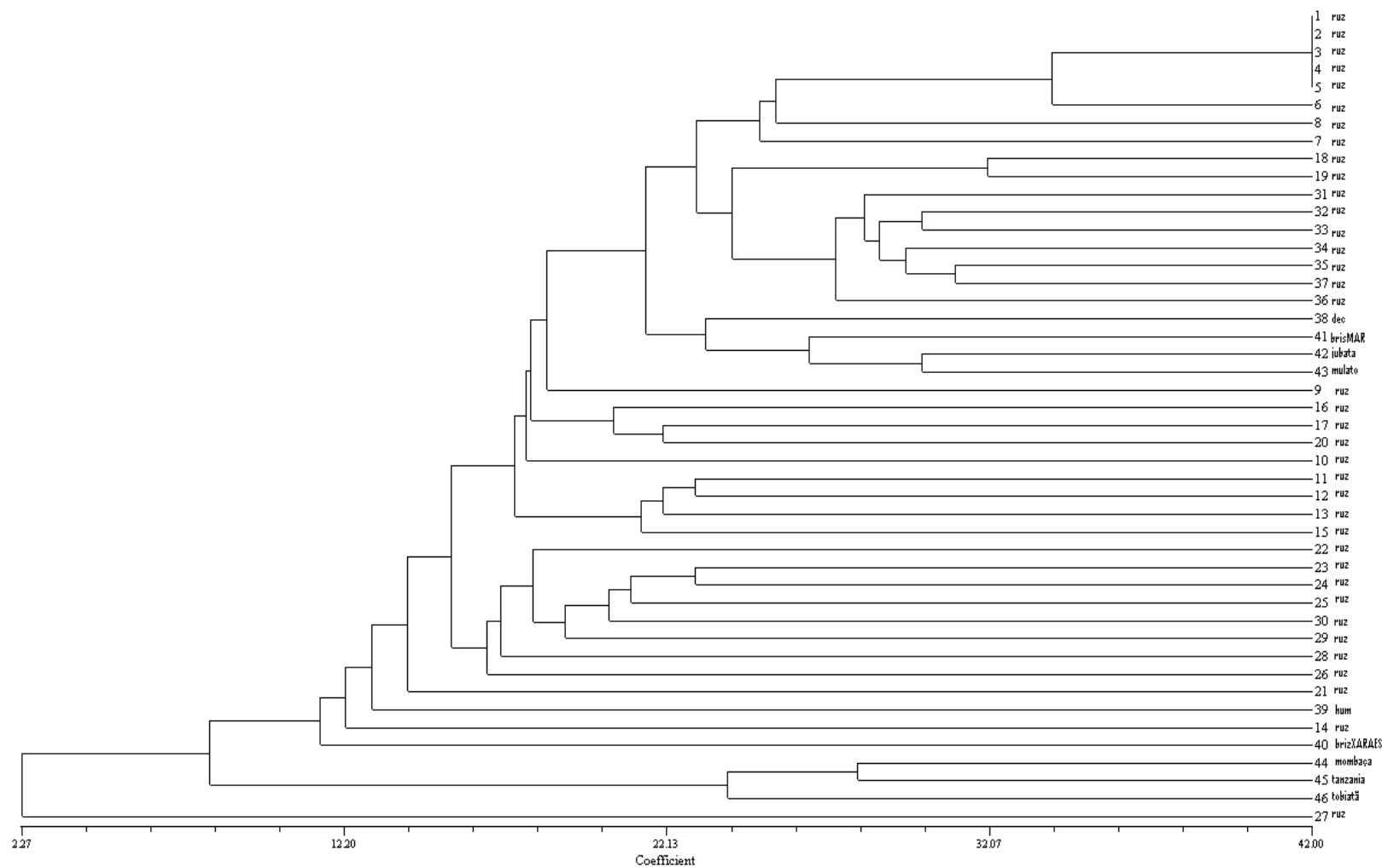


FIGURA 3 - Dendrograma pelo agrupamento UPGMA, obtidos de bandas de primers longos, das amostras de *Brachiaria Panicum* com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard utilizando o programa NTSYS2.0

Rossato et al. (2007) utilizaram 4 *primers* ISSR em uma população de Palmeira do gênero *Butia*, obtiveram 5 grupos, de acordo com as espécies.

A *Brachiaria ruzizensis* apesar de teoricamente ser sexuada apresentou cinco indivíduos geneticamente idênticos pelas duas metodologias revelando que há algum fator envolvido gerando isto, podendo ser, inclusive, uma porcentagem de apomixia nesta espécie.

Com as informações obtidas pela análise molecular (AMOVA), com base de dados de 130 bandas polimórficas verificou-se 36,6% da variabilidade genética total está contida entre as espécies e 63,9% dentro da espécie conforme a Tabela 4. Resultado semelhante encontrado com os primers curtos confirmando a ocorrência do fluxo gênico na espécie *Brachiaria ruzizensis*.

TABELA 4 - Resultado da análise de variância molecular (Amova) das espécies *Brachiaria*, agrupadas obtidos por marcadores moleculares de primers longos

Fonte de Variação	GL	SQ	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre espécies	6	188,7	6,21	36,0
Dentro da espécies	39	586,2	15,0	63,9
Total	45	774,9	21,2	

Brandão (2008) utilizando marcadores ISSR, considerados primers longos, encontrou a maior parte da diversidade genética de *M. splendens* dentro das populações, tanto nos ambientes de vegetação primária (96,49%), quanto nos ambientes de vegetação secundária (91,15%). Segundo Nybom e Bartish (2000), estimativas de diferenciação genética entre populações cuja fecundação é cruzada, são em média 28%, obtidas a partir de marcadores dominantes e calculadas pela AMOVA.

Lacerda et al. (2001) estudando *Plathymeria reticulata* encontraram 12,3% de diferenciação entre populações. Goulart et al. (2005) em estudo

realizado em duas populações de *Mabea fistulifera*, encontraram 8,97% de diferenciação entre populações.

Para espécies de *Protium spruceanum*, neste mesmo sistema, Vieira e Carvalho (2008) encontraram níveis semelhantes de distribuição da variabilidade genética, com 97 % da variabilidade ocorrendo dentro das populações

Comparando-se os resultados obtidos com os dois marcadores pode-se observar que os marcadores RAPD detectaram menos variabilidade entre os diferentes indivíduos da mesma população que os marcadores de *primers* longos. Isso difere dos resultados de Ambiel et al (2008) onde a diferença foi maior (3%). Todavia isto pode se ter ocorrido devido ao método usado por estes autores que extraíram DNA de uma amostra de sementes, para cada acesso, trabalhando então com um “pool” de DNA. Neste estudo, utilizaram-se trinta e sete acessos de uma população, e a variabilidade detectada foi maior, indicando alto índice de alogamia da espécie.

4 CONCLUSÕES

A técnica de RAPD mostrou-se uma ferramenta importante na detecção de polimorfismo interacessos em *Brachiaria ruzizensis*. Os resultados obtidos por tal técnica indicam que existe alta variabilidade genética entre os 37 acessos de *Brachiaria ruzizensis*, fazendo deste um germoplasma valioso para o melhoramento e seleção de novas cultivares.

Na utilização dos primers longos foi possível identificar alta variabilidade genética entre os acessos de *Brachiaria ruzizensis*, resultado semelhante aos marcadores RAPD, sendo assim podendo ser utilizados para estudar a variabilidade genética desta espécie.

Os primers utilizados nesse estudo considerados primers curtos e longos mostraram-se eficazes para o estudo da variabilidade da espécie *Brachiaria ruzizensis*. No entanto primers longos apresentaram alta variabilidade dentro da espécie sendo maior que o resultado dos primers curtos.

Nos dendrogramas obtido por meio dos primers curtos e longos conseguiu-se a formação de um grupo com 5 indivíduos geneticamente muito semelhantes revelando que há algum fator envolvido gerando isto, podendo ser, inclusive, uma porcentagem de apomixia nesta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSEFA, K.; MERKER, A.; TEFERA, H. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. **Hereditas**, Oxford, v. 139, p. 174-183, 2003.

AMBIEL, A. C. et al. Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, p. 457-464, 2008.

ARAÚJO, A. C. G. et al. Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, Wageningen, v. 144, p. 39-50, 2005.

ASSIS, G. M. L. et al. Discriminação de espécies de *Brachiaria* baseada em diferentes grupos de caracteres morfológicos. **Rev. Soc. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 32, p. 576-584, 2003.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. New York: Chapman and Hall, 1994. 511 p.

BARBOSA, R. A. **Morte de pastos de braquiárias**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006. 206 p.

BARCACCIA, G. et al. Inheritance of parthenogenesis in *Poa pratensis* L.: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 74-82, 1998.

BATISTA, E. C. et al. Variabilidade genética intrapopulacional utilizando marcadores ISSR em *Tibouchina papyrus*. SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO. DESAFIOS E ESTRATÉGIAS PARA O EQUILÍBRIO ENTRE SOCIEDADE, AGRONEGÓCIO E RECURSOS NATURAIS, 9., SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília - DF. **Anais...** Parla mundi, 2008. p. 6.

BITENCOURT, G. A. et al. **Uso de marcadores RAPD na identificação de híbridos de *Brachiaria humidicola***. Campo Grande, MS.: EMBRAPA, 2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 23).

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 453 p.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 19, p. 209-215, 2001.

BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia Splendens* (S.W) DC. (MYRTACEAE) por marcadores ISSR em sistema corredor- fragmento semidecíduais no Sul de Minas Gerais**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em engenharia ambiental) -- Universidade Federal de Lavras. Lavras.

CAETANO-ANOLLÉS, G. et al. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Nature Biotechnology**, London, v. 9, p. 553-556. 1991.

CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas Genéticos em Plantas. **Bragantia**, Campinas, São Paulo, v. 61, p. 123-134; 2002.

CARNEIRO, V. T. C. et al. **Contribuição da biotecnologia ao domínio da apomixia de *Brachiaria* sp.** Brasília - DF: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia, 2003. (Comunicado técnico 95).

CHEN, J. M. et al. The extent of clonality and genetic diversity in the rare *Caldesia grandis* (Alismataceae): comparative results for RAPD and ISSR markers. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 84, p. 301-307, 2006.

CHIARI, L. et al. **Estimativa da variabilidade genética em acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando marcadores RAPD**. Campo Grande - MS: Embrapa gado de corte, 2007. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 22).

CHIARI, L. et al. **Variabilidade Genética em acessos e cultivares de quatro espécies de *Brachiaria* estimada por marcadores RAPD**. Campo Grande – MS: Embrapa gado de corte, 2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 24).

DINIZ, L. E. C. et al. Genetic diversity among forty coffee varieties assessed by RAPD markers associated with restriction digestion. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48: p. 511-521, 2005.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochemistry Bulletin of the Botanical Society of America**, Saint Louis, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUSI, D. A. et al. Apomixia: reprodução assexual nas angiospermas. **Universa**, Brasília, v. 8, p. 133-148, 2000.

ESSELMAN, E. J. et al. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *Inesperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v. 8, p. 443-451, 1999.

EXCOFFIER, L. et al. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L., et al. **Arlequin ver 3.1 An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis (software) Bern: University of Berne Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG)**. 2006. Disponível em: <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>>. Acesso em: 27 Julho 2009.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programa de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

FERRÃO, M. A. G., et al. Genetic divergence in conillon coffee revealed by RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 9, p. 67-74, 2009.

FERREIRA, C. F., et al. Molecular characterization of cassava yellow orange roots for beta carotene improvement. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v.8, p. 23-29, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 220.

FRITSCH, P.; RIESEBERG, L. H. High out crossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. **Nature**, London, v. 359, p. 633-636, 1992.

GOTMISKY, S. A. et al. Use of molecular marker for the analysis of plant genome. **Research Journal of Genetics**, Moscow, v. 11, p. 1538-1549, 1999.

GOULART, M. F. et al. Genetic, morphological and spatial characterization of two populations of *Mabea fistulifera* Mar. (Euphorbiaceae), in different successional stages. **Brazilian archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, p. 275-284, Mar. 2005.

ISHII, T. et al. Phylogenetic relationships in A-genome species of rice as revealed by RAPD analysis. **Genes and Genetic System**, Kobe, v. 71, p. 196-201, 1996.

JIN, Y. et al. Genetic spatial clustering: significant implications for conservation of wild soybean (*Glycine soja*: Fabaceae). **Genetica**, Dordrecht, v. 128, p. 41-49, 2006.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1996. p. 16-42. (CIAT Publication, n. 259).

LACERDA, D. R. et al. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 10, p. 1143-1152, 2001.

LARA-CABEZAS, W. A. R.; PÁDUA, R. V. Eficiência e distribuição de nitrogênio aplicado em cobertura na cultura de milho consorciada com *Brachiaria ruziziensis*, cultivada no sistema Santa Fé. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 66, p. 131-140, 2007.

LEBLANC, O. et al. Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualize gene expression in mature ovaries of *Brachiaria* hybrids derived from *B. brizantha*, an apomictic tropical forage. **Plant Science, Limerick**, v. 126, p. 49-58, 1997.

LIU, Z. J. et al. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 174, p. 59-68, 1999.

LUTTS, S. et al. Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomitic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F1 hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. **Euphytica**, Wageningen, v. 78, p. 19-25, 1994.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MENEZES, C. C. E. et al. Análise da pureza genética e discriminação de cultivares de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) usando "Random Amplified polymorphic DNA" em DNA extraído de sementes e folhas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, p. 279-285, 2002.

MENEZES, L. A. S.; LEANDRO, W. M. Avaliação de espécies de coberturas do solo com potencial de uso em sistema de plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Brasília, local, v. 34, p. 173-180, 2004.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In MILACH, S. C. K. **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre, UFRGS, 1998. p. 17-28.

MORAIS, R. C. et al. Diversidade genética em maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis flavicarpa*) utilizando marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. 20., TH ANNUAL MEETING OF THE INTERAMERICAN SOCIETY FOR TROPICAL HORTICULTURE. 54., Vitória/ES. **Anais...** Vitória/ES: editora, 2008. p. 6.

NGENDAHAYO, M.; COPPENS, D'E.; LOAUNT, B-P. Self-incompatibility studies in *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard, *Brachiaria decumbens* Stapf and *Brachiaria brizantha* (Hoschst) Stapf and their interspecific hybrids. **Phytomorphology**, New Delhi, v. 38, p. 47-51, 1988.

NYBON, H.; BARTISH, I. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Zurich, v. 3/2, p. 93-114, 2000.

PEREIRA, A. V. et al. Diversidade genética entre acessos de capim-elefante obtida com marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 1216-1221, 2008.

PESSINO, S. C. et al. A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification map of the two marker closely associated with the trait. **Hereditas**, Lund, v. 128, p. 153-158, 1998.

PIO VIANA, A. et al. Diversidade genética entre genótipos comerciais de Maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e entre espécies de *Passiflora* nativas determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, p. 489-493, 2003.

POWELL, W.; MACHIRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science**, Oxford, v. 1, p. 215-222, 1996.

PUPILLI, F.; CACERE, M. E.; QUARIN, C. L. et al. Segregating Analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic. *Paspalum simplex*. **Genome**, Ottawa, v. 40, p. 822-828, 1997.

REDDY, M. P. et al. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 128, p. 9-17, 2002.

RENVOIZE, S. A. et al. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B.; KUMBLE, V. (Ed.). **Brachiaria: biology, and Agronomy, and Improvement**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1996. (CIAT Publication, n. 259).

RODRIGUES, J. C. M. et al. Isolation of differentially expressed cDNA sequences from ovaries of sexual and apomictic *Brachiaria brizantha*. In: INTERNATIONAL APOMIXIS CONFERENCE, 2., 2001, Como, Italia. **Proceedings...** S.l.: s.n., 2001.

ROHLF, F. J. **NTSYS- Pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0 user's guide. New York: Exeter Software, 1998. Disponível em: <<http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsysguide.pdf>>. Acesso em: 10 março 2007.

ROSSATO, M. et al. Caracterização molecular de populações de Palmeiras do gênero *Butia* do Rio Grande do Sul através de marcadores ISSR. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 19, p. 311-318, 2007.

SAWASATO, J. T. et al. Utilização de microssatélites e RAPD na caracterização molecular de acessos de *Paspalum urvillei* Steudel. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 1366-1374, 2008.

SHAW, R. J.; ACHARYA, .L; MUKHERJEE, A. K. Assessment of genetic diversity in a highly valuable medicinal plant *Catharanthus roseus* using molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 9, p. 52-59, 2009.

SOUZA, V. Q. et al. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácido orgânicos. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 64, p. 569-575, 2005.

SRISVASTAVA, R. et al. RAPD-based genetic relationships in different *Bougainvillea* cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 9, p. 154-163, 2009.

TATINENI, V.; CANTRELL, R. G.; DAVIS, D. D. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 186-192, 1996.

VALLE, C. B. et al. **O Capim – Xaraés (*Brachiaria brizantha* cv. Xaraés na diversidade das pastagens de braquiárias**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2004. 36 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 149).

VALLE, C. B. **Coleção de germoplasma de espécie *Brachiaria* no CIAT**. Estudos básicos visando ao melhoramento genético. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1990. 33 p. (Documentos:Embrapa Gado de Corte, 46).

VERMA, S. K.; KHANNA, V.; SINGH, N. Random amplified polymorphic DNA analysis on Indian scented basmati rice (*Oryza sativa* L.) germplasm for identification variability and duplicate accessions ,if any. **Electrophoresis**, Weinheim, Dordrecht, v. 20, n. 8, p. 1786-1789, jun. 1999.

VIEIRA, V. C. **Variabilidade genética em acessos de trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) e suas respostas ao glifosato**. 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridor: implications for conservation. **Biodiversity and conservation**, v. 17, p. 2305-2321, 2008.

VIJAYAN, K. et al. Analysis of phylogenetic relationship among five mulberry (*Morus*) species using molecular markers. **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 439-448, 2004.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G. K. et al. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 218, p. 704-40, 1993.

ZIETKIEWICZ, E. et al. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, p. 176-183, 1994.

ZIMMER, A. H.; EUCLIDES, V. P. B. Importância das pastagens para o futuro da pecuária de corte no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 1, 2000, Lavras. **Anais... Temas em Evidências**. Lavras: UFLA, 2000. p. 1-50.