

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRUPAMENTO DE ACESSOS E
CULTIVARES DE *BRACHIARIA* POR MARCADORES DE RAPD**

ANA CLAUDIA AMBIEL

AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRUPAMENTO DE ACESSOS E CULTIVARES DE *BRACHIARIA* POR MARCADORES DE RAPD

ANA CLAUDIA AMBIEL

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. - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto

633.2
A492a

Ambiel, Ana Claudia

Avaliação da variabilidade genética e agrupamento de acessos e cultivares de *Brachiaria* por marcadores de RAPD. / Ana Claudia Ambiel – Presidente Prudente: [s.n.], 2007.

55 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2007.

Bibliografia

1. Capim *Brachiaria* 2. Variabilidade Genética. 3. Marcadores Molecular. I. Título.

ANA CLAUDIA AMBIEL

**Avaliação da variabilidade genética e agrupamento de acessos e cultivares de
Brachiaria por marcadores de RAPD**

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 – Área de Concentração: Produção Vegetal.

Presidente Prudente, 18 de julho 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. José Salvador Simoneti Foloni
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador, Dr. Nelson Barbosa Machado Neto, que além de orientador é um grande amigo.

Ao meu colega de trabalho José Eduardo Creste pelos conselhos e palavras de incentivo.

A colega Luciana Machado Guaberto e a aluna Talita Marques Vanderlei as quais serei sempre grata.

Ao programa de pós-graduação da Universidade do Oeste Paulista pela disponibilização de recursos financeiros e equipamentos para a realização das análises moleculares.

E a EMBRAPA – CNPGC, que gentilmente cedeu material do banco de germoplasma, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Muito Obrigada !

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu marido Eduardo pelo incentivo e colaboração e aos meus filhos Helena e Paulo que sempre compreenderam a ausência da mãe em muitos momentos ao longo destes anos.

E a toda a minha família que mesmo de longe acompanha e torce pelas minhas conquistas.

“[...] tudo vale a pena se a alma não é pequena [...]”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
REFERÊNCIAS	12
AGRUPAMENTO DE ACESSOS E CULTIVARES DE TRÊS ESPÉCIES DE <i>BRACHIARIA</i> POR RAPD	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
REFERÊNCIAS	30
ESTUDO DA DISSIMILARIDADE GENÉTICA EM ACESSOS E CULTIVARES DE <i>BRACHIARIA</i> POR RAPD	34
RESUMO	35
ABSTRACT	36
INTRODUÇÃO	37
MATERIAL E MÉTODOS	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
CONCLUSÕES	52
REFERENCIAS	53

INTRODUÇÃO

No Brasil as cadeias produtivas de carne e leite têm importante participação no PIB nacional e na pauta de exportações brasileiras. Com um rebanho bovino de aproximadamente 207 milhões de cabeças (IBGE, 2005), este tem como principal fonte de alimento as pastagens. Assim, os sistemas de produção a pasto abastecem o mercado interno de carne e leite com preços acessíveis, além de propiciar ao país uma importante vantagem competitiva no mercado internacional desses dois produtos.

O Brasil é um país com mais 845 milhões de hectares. Do total do seu território, 28% é considerado área agricultável. Nesse contexto, as pastagens naturais e cultivadas aparecem com excepcional destaque, ocupando cerca de 177 milhões de hectares, ou seja, 73% da área do setor agropecuário (IBGE, 1996).

As gramíneas do gênero *Brachiaria*, de origem Africana, foram introduzidas no Brasil a partir da década de 1950. Entretanto, a verdadeira expansão ocorreu nas décadas de 1970 e 1980, principalmente nas regiões de clima mais quente (ZIMMER et al., 1988). Na região do cerrado, a introdução do gênero *Brachiaria* foi, sem dúvida alguma, o elemento responsável pela grande expansão da pecuária. Estima-se que, no Brasil, 85% das pastagens implantadas seja do gênero *Brachiaria* (KELLER-GREIN et al., 1996). O Brasil é maior produtor de sementes de forrageiras tropicais do mundo. Considera-se que anualmente são comercializadas 100.000 toneladas de sementes de forrageiras tropicais, com um valor bruto estimado em US \$ 100 milhões. O País é também o maior exportador, com um volume aproximado de 5 mil toneladas de sementes exportadas anualmente, principalmente para suprir os mercados da América do Sul e Central (ANDRADE, 2004).

O gênero *Brachiaria* é constituído por cerca de cem espécies. No Brasil, foram encontradas 15 espécies deste gênero, sendo sete de introdução recente: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyneura*, *B. humidicola*, *B. arrecta*, *B. ruziziensis* e *B. vittata*. As outras espécies foram introduzidas há várias décadas e são consideradas naturalizadas: *B. extensa*, *B. mutica* e *B. plantagíena*. Além dessas, ocorrem cinco

espécies nativas: *B. adspersa*, *B. fasciculata*, *B. mollis*, *B. reptans* e *B. venezuelae* (SOARES FILHO, 1996).

Porém, somente cinco acessos pertencentes a três espécies de *Brachiaria* (*B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. humidicola*) deram origem aos 20 cultivares liberados em diversos países da América tropical, entre eles: Brasil, Cuba, México, Venezuela, Costa Rica, Colômbia, Panamá e Equador. Como consequência desse fato, a base genética dos materiais cultivados de *Brachiaria* é extremamente estreita, e os conhecimentos adquiridos sobre o gênero estão baseados em poucos genótipos (KELLER-GREIN et al., 1996).

Além disso, as espécies de maior importância agrônômica (*B. decumbens* e *B. brizantha*) são predominantemente tetraplóides ($2n=4x=36$) e apomíticas. A apomixia é caracterizada pelo desenvolvimento do embrião a partir de uma célula não-fertilizada, ou seja, a formação do embrião ocorre sem a fusão dos gametas masculino e feminino. Assim, a descendência contém exatamente a constituição genética da planta-mãe. Esse fato também dificulta o aumento da variabilidade genética desse gênero (ASSIS et al., 2003). Entretanto, Valle (1990) encontrou acessos totalmente sexuais em espécies tidas como apomíticas obrigatórias (*B. decumbens*, *B. dictyoneura* e *B. jubata*), e sexualidade alta em espécies de importância econômica (*B. brizantha* e *B. humidicola*). E para Marcos Filho (2005), a apomixia geralmente não é completa, podem ocorrer uma taxa de variável de sexualidade, de acordo com a região e ano de produção. Cita como exemplo, o capim colonião no qual se encontra uma taxa de sexualidade média de 5%

As espécies com maior difusão e importância econômica no Brasil são: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. humidicola*. *B. brizantha* apresenta uma ampla distribuição natural em toda a África Tropical (KELLER-GREIN et al., 1996), ocorrendo sob uma precipitação anual acima de 800 mm. Nos lugares de origem, *B. brizantha* varia consideravelmente, sendo possível a seleção de tipos distintos. Esta espécie diferencia-se de *B. decumbens* e *B. ruziziensis* por ser de porte quase ereto, enraizar muito pouco nos nós, possuir folhas pilosas em forma de canoa e ráceros geralmente mais longos. É uma espécie perene, cespitosa, com colmos

eretos ou suberetos, pouco radicantes nos nós inferiores, e com porte de 1 a 1,5 m de altura (SOARES FILHO, 1996).

B. ruzizensis está mais proximamente relacionada com *B. decumbens*, da qual difere, no entanto por ser de porte maior e apresentar a gluma inferior distante do resto da espiguetta (SOARES FILHO, 1996). É originária da África, porém, apresenta distribuição natural bastante restrita (KELLER-GREIN et al., 1996), ocorrendo em condições úmidas e não inundáveis. É uma espécie perene, subereta, com 1-1,5 m de altura, apresenta a base decumbente e radicante nos nós inferiores. Possui rizomas fortes, em forma de tubérculos arredondados e com até 15 mm de diâmetro. As folhas são lineares e lanceoladas, de cor verde amareladas (SEIFFERT, 1980).

B. decumbens é uma espécie perene, que ocorre de forma nativa no leste tropical da África, restrita a uma estreita faixa de latitude (KELLER-GREIN et al., 1996) em altitudes acima de 800 m, sob um clima moderadamente úmido, em pastagens abertas ou em áreas com arbustos esporádicos e em solos férteis (BOGDAN, 1977 apud SOARES FILHO, 1996). No Brasil há dois tipos bastante distintos: o primeiro foi introduzido pelo IPEAN (Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte) em 1965 sob a denominação de cultivar IPEAN; o segundo, por São Paulo em 1970 proveniente da Austrália, mas de origem africana, denominado cultivar Basilisk. Sendo este cultivar o mais plantado na região dos cerrados, é perene, de 0,6-1 m de altura, subereto e pouco radicante. As folhas são linear-lanceoladas, com 150-250 mm de comprimento e 20 mm de largura, rígidas e esparsamente pilosas. A planta forma relvado com folhas junto ao solo (SEIFFERT, 1984).

B. humidicola é originária da África Equatorial, com ampla distribuição natural (KELLER-GREIN et al., 1996). Apresenta como características: alta capacidade de adaptação a vários tipos de solos, especialmente, os de baixa fertilidade e com alto nível de umidade; rebrota vigorosa, mesmo com manejo baixo e intervalos pequenos de cortes sob pastejo; estolões finos e fortes; folhas de cor verde-pálida e fortemente denticuladas nas margens; resistência ao pastejo e apresenta boa tolerância ao encharcamento, podendo ser plantada em várzeas; não

tolerante ao fogo e com produção de pouca semente (até 50 kg/ha); seu principal atributo são os fortes estolões produzidos com a alta habilidade de enraizamento, promovendo rápida cobertura do solo, que o protege e, ainda, compete com as pragas (SOARES FILHO, 1996).

B. arrecta, mais conhecida como “Tanner grass”, é originária da África de locais encharcados e nas margens de lagos e rios. É perene, subereta, fortemente radicante nos nós inferiores. As folhas são lanceoladas, brilhantes de aspecto suculento e de cor verde-escura. É uma gramínea muito agressiva, com preferência para locais úmidos ou alagados, exige solos de média fertilidade, porém não tolera solos secos. Não possui sementes viáveis, sendo a multiplicação feita através de material vegetativo (ROCHE et al., 1990 apud SOARES FILHO, 1996).

Brachiaria híbrido cv. ‘Mulato’ é o primeiro híbrido comercial obtido no Centro Internacional em Agricultura Tropical (CIAT) em Cali, Colômbia. É originário do cruzamento de um acesso sexual tetraploidizado de *B. ruziziensis* com a espécie tetraplóide *B. brizantha* cv. ‘Marandu’. O capim Mulato se adapta a solos de boa drenagem, de fertilidade média a alta, com pH acima de 5.0, exigindo uma precipitação anual de pelo menos 600mm em sequeiro. A forrageira suporta bem os longos períodos de estiagem, entre 7 a 8 meses, devido a seu sistema radicular profundo (ARGEL et al., 2006).

REFERÊNCIAS

ANDRADE, R. P. et al. A parceria EMBRAPA-UNIPASTOS e seu impacto na pesquisa e desenvolvimento de pastagens tropicais do Brasil. **Matéria Técnica 2004**. Disponível em:

<http://www.abrasem.com.br/materia_tecnica/2004/0008_parceria_embrapa_unipastos.htm>.

Acesso em: 27 maio 2007.

ARGEL, P. J. et al. **Cultivar Mulato (Brachiaria híbrido CIAT 36061) Gramínea de alta producción y calidad forrajera para los trópicos**. Publication CIAT/Semilhas Papalotla, 2006. 24 p.

ASSIS, G. M. L. et al. Discriminação de Espécies de *Brachiaria* Baseada em Diferentes Grupos de Caracteres Morfológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 576-584, 2003.

SOARES FILHO, C. V. et al. *Brachiaria* – Espécies e variedades recomendadas para diferentes condições. Campinas: CATI, 26 p., 1996. (Boletim Técnico, 226).

IBGE. **Censo Agropecuário 1996**. Disponível em:

<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/>>. Acesso em: 20 maio 2007.

KELLER-GREIN, G. et al. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J. W. et al. (Eds.). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Cali: CIAT, p.18-45, 1996.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

SEIFFERT, N. F. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: Embrapa- CNPGC, 1984. 74 p. (Circular Técnica, 1).

ZIMMER, A. H. et al. Manejo de plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 9., Piracicaba, 1988. **Anais...** Piracicaba, FEALQ, 1988. p. 141-183.

CAPÍTULO I

Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD

RESUMO

Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD.

O propósito deste trabalho foi determinar a similaridade genética de entre acessos de germoplasma e cultivares comerciais três espécies de *Brachiaria* (inter e intraespecífica), através de marcadores RAPD. Sementes foram utilizadas como fonte de DNA. 10 primers decâmeros foram selecionados de 120 primers avaliados, produzindo 107 bandas polimórficas, as quais foram utilizados para a análise de variância molecular (AMOVA), o coeficiente de similaridade de Jaccard e índices de fixação gênica. 24,40% da variabilidade genética total está contida entre as espécies e 75,60% dentro destas, com índice de fixação gênica (FST) 0,24. No dendrograma houve a formação de dois ramos, um formado por *P. maximum* e *B. arrecta* e o outro subdividido em três: todas amostras de *B. ruziziensis*; todos os acessos de *B. decumbens* e três acessos de *B. brizantha* e o último com dois acessos de *B. brizantha* mais as *B. brizantha* comerciais e a *B. decumbens* cv 'Basilisk'. Foi possível agrupar os acessos e cultivares de *Brachiaria* através de RAPD. O índice de variabilidade genética entre espécies foi considerado baixo, sendo inferior a valores determinados em algumas espécies autógamas. *B. brizantha* apresenta maior variabilidade genética e menor FST indicando maior fluxo gênico intra-específico do que as outras.

Palavras-chave: *Brachiaria*, marcadores moleculares, variabilidade genética, dendrograma, índice de fixação gênica

ABSTRACT

RAPD grouping of accesses and cultivars of three *Brachiaria* species

The aim of this work was the determination of intra and intergenetic similarity between three *Brachiaria* species among germplasm accesses and commercial materials throughout RAPD markers. Seeds were used as DNA source. 10 decamers primers were selected between 120 primers assayed and 107 polymorphic bands were used to perform the molecular variance analysis (AMOVA), Jaccard similarity and species fixation index. 24.4% of the total variability was contained between species and 75.6% inside the species, with a species fixation index (FST) of 0.24. The tree showed that two major branches were formed, one with the three outgroup species and other with the species, this one split in three minor branches one with all *B. ruziziensis* samples; other with all *B. decumbens* accessions and three of *B. brizantha* and the last with two *B. brizantha* accesses, all commercial cultivars and *B. decumbens* cv. 'Basilisk'. It was possible to group, throughout RAPD, *Brachiaria* accesses and cultivars. The genetic variability index between species was considered low and somehow low when faced with autogamous species. *B. brizantha* showed the highest genetic variability and the lowest FST what means that there is a higher genetic flux intra specific than the others.

Key-words: *Brachiaria*, molecular markers, genetic variability, dendrogram, genetic fixation index

INTRODUÇÃO

As espécies de *Brachiaria* têm alta produção de matéria seca, apresentam excelente resposta a fertilizantes, são perenes, e permanecem verdes mesmo durante os períodos de baixos índices pluviométricos. Os valores nutricionais indicam alta palatabilidade, o que proporciona aos animais altos níveis de ingestão (NDIKUMANA; LEEUW, 1996).

Sete espécies africanas perenes (*B. arrecta*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola*, *B. mutica*, e *B. ruziziensis*) têm sido amplamente utilizadas como forrageiras especialmente na América tropical, e em menores proporções na Ásia, no Sul do Pacífico e na Austrália. Na América do Sul e Central as principais gramíneas tropicais utilizadas pertencem ao gênero *Brachiaria*. Somente no Brasil existem aproximadamente 40 milhões de hectares de pastagem de *Brachiaria*, sendo que mais de 85% ocupado por *B. decumbens* cv. 'Basilisk' e *B. brizantha* cv. 'Marandu' (KELLER-GREIN et al., 1996).

Todavia, a base genética dos cultivares comerciais de *Brachiaria* é extremamente estreita, devido a origens das mesmas estarem ligadas a somente uns poucos acessos de três espécies de *Brachiaria* (*B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. humidicola*; Keller-Grein et al., 1996) e a predominância da apomixia, que confere à descendência a mesma constituição genética da planta-mãe. Todavia, aparentemente a apomixia parece não ser completa, permitindo alguma taxa de recombinação entre e dentro das espécies de acordo com as condições de ano e local de produção (MARCOS FILHO, 2005).

Para Shelton (2007) a identificação correta entre algumas espécies de *Brachiaria* é difícil e até mesmo confusa. Por exemplo na estação de pesquisa de Kitale, no Kênia, por muito tempo as *B. ruziziensis* e *B. brizantha* não foram diferenciadas. Outro problema de identificação acontece com o cv 'Basilisk' amplamente difundido como sendo uma *B. decumbens*, mas segundo Maass (1996) citando Renvoize et al. (1996) a classificação correta é uma *B. brizantha*, sugerindo,

porém, que nenhuma alteração seja feita, antes de uma completa revisão e classificação taxonômica do gênero.

A taxonomia do gênero *Brachiaria* não é satisfatória nem em relação à posição entre as espécies e nem na inter-relação com outros gêneros, não existindo chave adequada para *Brachiaria*, embora uma classificação setorial tenha sido proposta por Stapf (1919) para 56 espécies africanas e, em nível mundial, por Pilger (1940) para 50 espécies (ambos citados por RENVOIZE et al., 1996). Estes propuseram, para tanto, a aplicação de análises estatísticas da morfologia, aliadas à outras informações, como forma de proporcionar um sistema razoável de classificação ainda inexistente (RENVOIZE et al., 1996).

Porém, o conhecimento de variabilidade e divergência genética entre acessos e espécies do gênero *Brachiaria* é de fundamental importância para o sucesso no melhoramento intra e interespecífico neste gênero (Assis et al., 2001). Além disso, o conhecimento da diversidade genética entre os acessos contribui para a redução nos custos de manutenção dos bancos de germoplasma, pois permitem a eliminação dos acessos similares. (MACHADO NETO et al., 2002).

Com o objetivo de avaliar a variabilidade existente, vários autores trabalharam com diferentes variáveis como Valle (1990) que utilizou descritores morfológicos, não afetados pelo meio-ambiente, ou seja, características de origem genética para avaliar 73 acessos de *B. brizantha*, *B. ruziziensis*, *B. jubata* e *B. decumbens*. *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*, classificando-as de forma distinta. Alguns acessos apresentaram pequena distância filogenética, permitindo o intercâmbio gênico entre espécies, desde que as ploidias coincidam e exista sexualidade. *B. jubata*, contudo, apresentou maior individualidade quando comparado com as outras três espécies. Na análise intra-específica, observou-se que *B. brizantha*, com maior número de acessos, apresentou maior variabilidade nas características estudadas, quando comparadas *B. decumbens* e *B. ruziziensis*.

De forma análoga, Assis et al. (2003) analisaram 301 acessos, pertencentes a seis diferentes espécies de *Brachiaria*. Entre os grupos de caracteres estudados, os vegetativos e reprodutivos foram os mais discriminantes para as espécies. Assim, *B. decumbens* e *B. humidicola* só foram discriminados pelos

caracteres de pilosidade; *B. jubata* e *B. dictyoneura* foram completamente discriminadas pelos caracteres vegetativos e *B. brizantha* e *B. ruzizensis* foram discriminadas pelos caracteres reprodutivos. Porém, nenhum caractere foi capaz de separar em grupos diferentes as espécies *B. humidicola* e *B. dictyoneura*.

Machado Neto et al. (2002) utilizando-se de eletroforese de proteína, extraída de sementes, para verificar a diferença entre cinco acessos de seis espécies de *Brachiaria* concluíram que em *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruzizensis*, *B. humidicola* e *B. nigropedata* os acessos apresentaram variações suficientes para separar os acessos e que em *B. jubata* os acessos são geneticamente muito homogêneos.

Caracteres morfológicos têm sido utilizados, tradicionalmente, como assinaturas da identidade, pureza varietal e genética, constituindo-se em uma base pobre por ser uma medida indireta da composição genética do material sofrendo forte influência ambiental. Caracteres moleculares revelam diferenças genéticas mais rapidamente, com maior precisão e sem o obscurecimento causado pelo efeito ambiental, oferecendo vantagens significativas em termos de discriminação, confiabilidade, rapidez e custo reduzido (ASSIS et al., 2003). Uma técnica relativamente nova, o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Williams et al., 1990), tem sido adotada por alguns pesquisadores envolvidos no desenvolvimento de métodos de identificação de cultivares (WEEDEN, 1992; MENEZES et al., 2002) principalmente por ser uma técnica simples que não requer nenhuma informação prévia sobre seqüências de nucleotídeos do genoma da espécie, além de ser bastante acessível e de custo relativamente baixo que pode ser utilizado onde as informações moleculares ainda são escassas.

Comparando os métodos tradicionalmente utilizados para determinação da pureza genética e identificação de cultivares, McDonald (1995) defende algumas vantagens da utilização de RAPDs: (i) marcadores RAPD proporcionam grande potencial para a discriminação de cultivares já que a composição de nucleotídeos de um gene está sendo diretamente determinada em vez do produto da expressão do gene, como uma enzima; (ii) a versatilidade da análise de RAPD é maior do que da eletroforese de proteína. Mais de 700 “primers” estão disponíveis, contra apenas 20

sistemas enzimáticos; (iii) a análise de RAPD requer os mesmos equipamentos gerais e qualidade profissional que a técnica de eletroforese de proteína, apenas alguns equipamentos adicionais são necessários, como o termociclador; (iv) o custo e o tempo, para uma análise completa de RAPD, são equivalentes aos protocolos atuais de eletroforese de proteínas.

Esse trabalho teve como objetivos determinar, a similaridade genética inter e intraespecífica entre acessos de germoplasma e cultivares comerciais de três espécies de *Brachiaria*, através de marcadores RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, em Presidente Prudente – SP. Utilizou-se como fonte de DNA sementes de cinco diferentes acessos das espécies de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* cedidas pela EMBRAPA – Gado de Corte (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte) e de cultivares comerciais das mesmas espécies, além de uma amostra da *Brachiaria* híbrida cv ‘Mulato’, dois cultivares comerciais de *Panicum maximum*, ‘Mombaça’ e ‘Tanzânia’ e folhas de *B. arrecta* totalizando 27 amostras (Tabela 1).

Para a extração de DNA utilizou-se o método de Doyle e Doyle (1987) com adaptações. Utilizou-se de 6 a 8 sementes por amostra, as quais foram maceradas em cadinho de porcelana; exceto *B. arrecta*, da qual aproximadamente 1cm² de folha foi macerado em nitrogênio líquido. Após maceração o material foi transferido para microtubos de 1,5mL contendo 700µL de tampão CTAB 2% à 65°C. O material foi homogeneizado e mantido à 65°C por 40 minutos. Acrescentaram-se então 700µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e homogeneizou-se por inversão. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos, sendo a porção aquosa recuperada e transferida para outro tubo, acrescentando-se 8% de acetato de amônio a 7,5M e 54% do volume total de isopropanol absoluto a -20°C, mantendo-se nesta temperatura por 24 horas. Posteriormente o material foi centrifugado a 14000rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 700µL de etanol 70% a 8°C, centrifugando-se novamente a 14000rpm por 1 minuto. O etanol foi descartado e o precipitado seco em fluxo de ar à temperatura ambiente. O DNA foi hidratado em 100µL de tampão TE em banho seco por 1 hora à 55°C e quantificado em espectrofotômetro, a 260 nm, e diluído com TE para a concentração de 10ng µL⁻¹.

As condições de amplificação foram baseadas em Williams et al. (1990) com modificações. O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 25µL, contendo 10% de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20mM, pH 8,4 e KCl 50mM), 1,5

mM MgCl₂, 0,4µM de primer (oligonucleotídeos), 0,2µM de cada dNTP, uma unidade de Taq DNA Polimerase e DNA molde. As reações de RAPD foram amplificadas em termociclador “MJ – PTC 100” programado para 43 ciclos com passo inicial de desnaturação a 94°C por três minutos, seguidos por um minuto a 94°C para desanelamento, um minuto a 37°C para anelamento com primers e 30 segundos a 72°C para elongação da cadeia, dando-se após 43 ciclos um passo final de extensão a 72°C por cinco minutos.

Tabela 1. Relação dos acessos e dos cultivares comerciais de *Brachiaria* com o respectivo código, identificação (Ident.), registro nacional de germoplasma/cultivares, região e país de origem do material catalogado no banco de germoplasma da Embrapa – Gado de Corte.

Acessos da Embrapa – Gado de Corte	Código	Ident.	Registro	Região de origem - País
<i>B. ruziziensis</i>	ruz1	R100	BRA005541	Trans Nzoia/Quênia
<i>B. ruziziensis</i>	ruz2	R106	BRA005649	Bujumbura/Burundi
<i>B. ruziziensis</i>	ruz3	R108	BRA005584	Cibitoke/Burundi
<i>B. ruziziensis</i>	ruz4	R109	BRA005631	Ruyigi/Burundi
<i>B. ruziziensis</i>	ruz5	R128	BRA002291	-----
<i>B. decumbens</i>	de1	D53	PI355744	-----
<i>B. decumbens</i>	de2	D7	BRA004472	South Nyanza/Quênia
<i>B. decumbens</i>	de3	D9	BRA004499	Nakuru/Quênia
<i>B. decumbens</i>	de4	D58	BRA000191	Embrapa- CPATU/Brasil
<i>B. decumbens</i>	de5	D59	BRA000116	Embrapa CNPMF /Brasil (cv 'Ipean')
<i>B. brizantha</i>	Briz1	B158	BRA003719	Bungoma/Etiópia
<i>B. brizantha</i>	Briz2	B23	BRA001945	Embrapa CNPGC/Brasil
<i>B. brizantha</i>	Briz3	B67	BRA003336	Ilubabor/Etiópia
<i>B. brizantha</i>	Briz4	B112	BRA002844	Welega/Etiópia
<i>B. brizantha</i>	Briz5	B127	BRA003107	Gamo Gofa/Etiópia
Cultivares comerciais				
<i>B. brizantha</i> cv 'MG4'	<i>brizMG4</i>		02256	
<i>B. brizantha</i> cv 'Marandu'	<i>brizMar</i>		02250	
<i>B. brizantha</i> cv 'La libertad'	<i>brizLaliber</i>			
<i>B. brizantha</i> cv 'Xaraés'	<i>brizXaraes</i>		04509	
<i>B. brizantha</i> cv 'MG5'	<i>brizMG5</i>		04509	
<i>B. decumbens</i> cv 'Basilisk'	<i>decBasi</i>		02277	
<i>B. ruziziensis</i>	<i>Ruzi-a</i>		02043	
<i>B. ruziziensis</i>	<i>Ruzi-b</i>		02043	
<i>B. arrecta</i>	<i>arrecta</i>			
Híbrido cv 'Mulato'	<i>mulat</i>		09669	
<i>P. maximum</i> cv 'Mombaça'	<i>mombaça</i>		01697	
<i>P. maximum</i> cv 'Tanzania'	<i>tanzania</i>		01699	

As amplificações foram feitas em duas condições, com 25 e 50ng de DNA molde, sendo consideradas apenas as bandas presentes nas duas amplificações.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em géis de agarose 1,5% (p/v) utilizando o tampão de corrida TBE ½X. O ladder AMRESCO 100pb foi utilizado como marcador de peso molecular. Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados em câmara com iluminação ultravioleta (câmara CCD Alpha-Inmotech) sendo as imagens capturadas pelo software Chemilmager.

Testaram-se 120 primers decâmeros arbitrários da OPERON Technologies Inc dos grupos A, C, D, G, X e Y. Para a primeira fase da seleção do primers utilizou-se a amostra de *B. brizantha* cv 'MG4' pela maior disponibilidade de material. Foram pré-selecionados 43 primers, por apresentarem bandas di, tri e polimórficas bem visíveis. Na segunda fase os primers pré-selecionados foram testados em uma amostra de *B. ruziziensis*. Seguindo os mesmos critérios, elegeram-se dez primers para serem utilizados nas reações de RAPD em todas as amostras.

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 através 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). Foi realizada para os quinze acessos do banco de germoplasma da EMBRAPA – Gado de Corte e todos os cultivares comerciais e para *B. arrecta*, excluídos os *Panicum*, sendo o híbrido cv 'Mulato' analisado junto com o grupo de *B. brizantha*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No dendrograma (figura 1) pode-se observar que a *B. arrecta* não foi classificada no mesmo grupo das demais espécies de *Brachiaria* estudadas, assim como as duas amostras de *P. maximum*. *B. arrecta* apresentou um baixo coeficiente de similaridade em relação às demais amostras. Essa espécie apresenta um conjunto de características vegetativas e reprodutivas bastante distinto, o que facilmente a diferencia das outras espécies de *Brachiaria*. Renvoize et al. (1996) classifica através daquelas a *B. arrecta* como pertencente ao grupo 3 e a *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* no grupo 5 .

O segundo grupo subdividiu-se em três subgrupos. O primeiro composto por todas as amostras de *B. ruziziensis*; o segundo por todas as *B. decumbens* e por três acessos de *B. brizantha*, todos eles com origem em banco de germoplasma e o terceiro reunindo os dois acessos de *B. brizantha* restantes, as *B. brizantha* comerciais, inclusive o híbrido cv 'Mulato' e a *B. decumbens* cv 'Basilisk'.

Atentando-se para a variabilidade genética dentro dos acessos é possível destacar que há menor variabilidade genética entre os acessos de *B. decumbens* e *B. ruziziensis* quando comparados com os acessos de *B. brizantha*. Valle (1990) concluiu, através de análises multivariadas, 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, enquanto as outras duas espécies estão circunscritas a áreas menores no gráfico de distribuição, indicando maior homogeneidade morfológica entre os componentes analisados.

Considerando que os cultivares 'MG5' e 'Xaraés' tem a mesma origem (acesso CIAT 26110), estão registrados com o mesmo número (04509) no cadastro Nacional de Cultivares e são apomíticas, estes deveriam apresentar alto coeficiente de similaridade, o que não foi observado. Isto pode ser explicado pela extração de DNA de um "bulk" de sementes comerciais, sujeito a contaminação do material com outras sementes de *Brachiaria*, fato comum nos campos de sementes. O mesmo se

aplica para os cultivares 'MG4' e 'La Libertad'. Todavia, apesar das sementes de *B. ruziziensis* (a e b) serem comerciais tal contaminação, não se fez sentir, pois as mesmas seguiram o padrão da espécie, ficando todas no mesmo clado. A confirmação desses resultados necessita de confirmação utilizando como fonte de DNA folhas de plantas identificadas morfologicamente.

O cultivar de *B. decumbens* cv 'Basilisk' apresentou maior proximidade genética com o grupo da *B. brizantha* do que com as *B. decumbens*, corroborando as observações de Renvoize *et. al.* (1996) de que o cultivar 'Basilisk', amplamente utilizado, e comumente identificado com *B. decumbens* é na verdade uma *B. brizantha*.

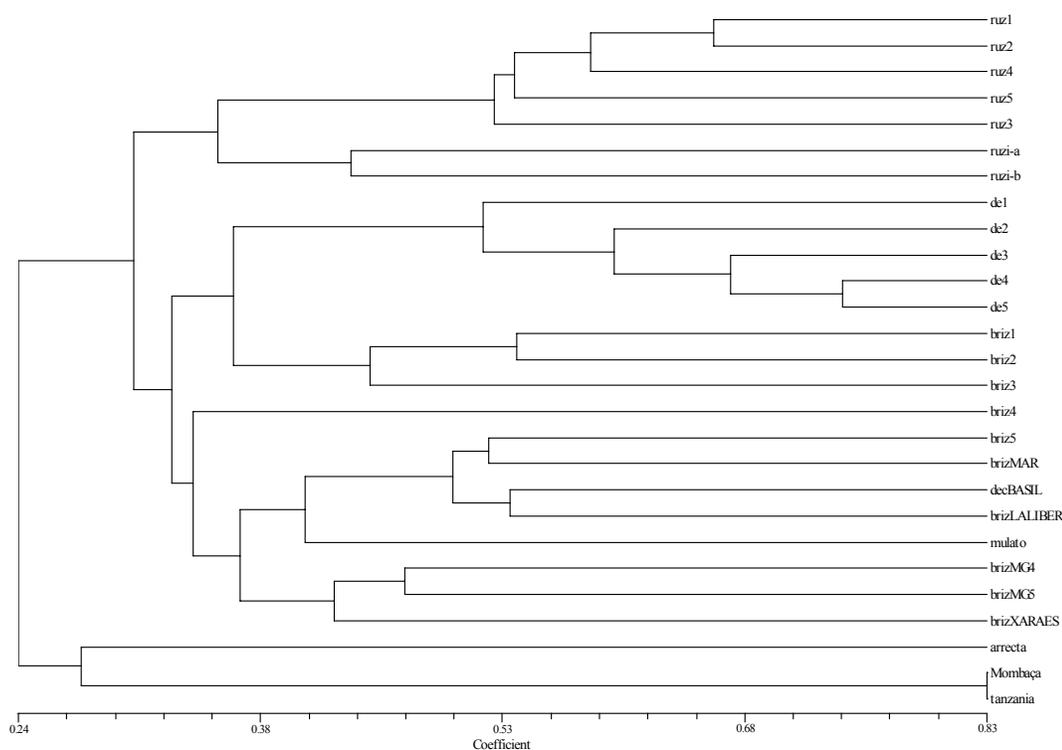


Figura 1. Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA das amostras de *Brachiaria* com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard utilizando o programa NTSYS 2.0.

Na Tabela 2, podem-se observar os dez primers selecionados e a seqüência destes, o número de bandas, o número de bandas polimórficas e o tamanho dos fragmentos amplificados. Os fragmentos amplificados variaram de 200

pb a 1450 pb, encontrando-se dentro dos limites de 200 pb a 1500 pb, nos quais a técnica RAPD, segundo Liu et al., (1999), apresenta boa reprodutibilidade.

Tabela 2. Seqüências nucleotídicas dos *primers*, número de bandas, número de bandas polimórficas e tamanho dos fragmentos amplificados em *Brachiaria*

Primers	Seqüência de nucleotídeos (5' → 3')	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficas	Tamanho dos fragmentos (pb)
A5	AGG GGT CTT G	9	8	260 a 1000
A9	GGG TAA CGC C	10	10	200 a 1000
D11	AGC GCC ATT G	10	8	300 a 900
G5	CTG AGA CCG A	12	12	200 a 1000
G9	CTG ACG TCA C	11	10	300 a 1300
G10	AGG GCC GTT C	7	7	300 a 1000
G17	ACG ACC GAC A	14	13	200 a 1200
X15	CAG ACA AGC C	11	10	300 a 1450
X17	GAC ACG GAC C	13	12	300 a 1000
Y1	GTG GCA TCT C	12	12	300 a 1300

Apesar de toda a importância que a espécie apresenta, pouco se conhece a respeito da diversidade genética presente entre e dentro das espécies cultivadas. Este conhecimento é de fundamental importância para o estabelecimento das estratégias de melhoramento genético e de conservação destes materiais.

Através da análise de variância molecular (AMOVA), com base nos dados de 107 bandas polimórficas verificou-se que 24,40% da variabilidade genética total está contida entre as espécies de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. arrecta* analisadas e 75,60% do total está contida dentro das espécies (entre os acessos e os cultivares comerciais das mesmas espécies) conforme tabela 3.

Estudos sobre estrutura genética já demonstraram que a distribuição da variação genética não é aleatória dentro das populações. De acordo com Hamrick (1983) ela é determinada pelas seguintes características: sistema reprodutivo, distribuição geográfica da espécie, tamanho efetivo das populações, modo de reprodução e fluxo gênico através da dispersão do pólen. Sendo também resultado de

um conjunto de fatores evolutivos, que atuam na diversidade genética, introduzindo novos alelos ou modificando as frequências sendo eles: mutação, migração, seleção natural e deriva genética (WEIR, 1990).

Tabela 3: Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) das espécies comerciais e acessos de *Brachiaria*, agrupadas em 4 espécies (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensi* e *B. arrecta*) obtidos por marcadores moleculares de RAPD

<i>Fonte de variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>Componentes de variação</i>	<i>Porcentagem de variação</i>
Entre espécies	3	131,998	5,074	24,40%
Dentro de espécies	21	330,162	15,722	75,60%
Total	24	462,160	20,796	

Espécies alógamas são, por definição, muito mais variáveis que as autógamias (YANAKA, 2005). Em algumas populações de espécies alógamas, pode ser encontrada variabilidade intrapopulacional maior que inter-populacional, como em *Lolium perenne* (SWEENEY; DANNENBERGER, 1994), *Trifolium pratense* (Kongkiatngam et al., 1995), *Medicago sativa* (CROCHEMORE et al., 1996). Fernandez e Coulman (2002) também detectaram variabilidade por RAPD e AFLP maior dentro das populações que entre as populações analisadas de *B. inermis* e *B. riparius*. Dados semelhantes foram obtidos por Vieira et al. (2004) em *Lolium multiflorum*, uma alógama cultivada em largas extensões, 98% da diversidade total está contida dentro das populações, enquanto que a diversidade genética entre as populações foi de apenas 2%. Isto reduz a possibilidade de deriva genética e de endogamia, contribuindo dessa maneira para a manutenção da alta diversidade genética dentro das populações. Em várias outras espécies de forrageiras observou-se alta variabilidade dentro das populações, em *Bromus inermis*, (DIABY; CASLER, 2005); bromegrass (*Bromus riparius* Rehm.; Fernandez et al., 2001), grama azul (*Bouteloua gracilis* tion.; Phan, 2000), buffalograss (*Buchloe" dactyloides*, Peakall et al., 1995); *B. auleticus* (RIVAS, 2001), *Lolium perenne* L. (HUFF, 1997; KUBIK , 2001), *Chloris gayana* K. (UBI , 2003) e *Pascopyrum smithii* (LARSON , 2003).

Antagonicamente, alta diversidade genética entre populações é encontrada principalmente para espécies autógamas, desde que as mesmas não estejam sobre pressão de seleção artificial. Em *Campanula microdonta* Koidz., Oiki et al. (2001) estabeleceram que 54 % da variância total estava dentro das populações e 46% entre populações, por análise de RAPD.

Garris et al. (2005) analisaram 234 acessos de arroz, representando uma ampla distribuição geográfica pelo mundo do *O. sativa* através de microssatélites e atribuíram 62,5% da variância total dentro das populações e 37,5% entre populações. Esses resultados podem ser explicados pelo sistema de reprodução autógama do arroz.

Liu et al. (2003) analisaram 260 linhas endogâmicas de milho, por microssatélites, que representavam a diversidade genética dos cultivares comerciais de importância ao melhoramento de clima temperado e várias linhas tropicais e subtropicais encontrando apenas 8,3% de variância entre populações.

Para as espécies apomíticas, como é o caso da maioria dos acessos e cultivares do presente trabalho, espera-se que a variação intrapopulacional seja mínima ou nula, quando se utiliza AMOVA para a análise de indivíduos agrupados em diferentes populações.

O parâmetro FST estima o fluxo gênico a partir da variância das frequências gênicas entre populações ou espécies, onde o menor valor indica que há fluxo gênico entre as populações, por conseqüência maior a variabilidade genética.

Lu et al. (2005) estudaram a variabilidade genética em populações de arroz selvagem (*Zizania palustris* var. *palustris*), no norte do estado de Wisconsin, EUA e afirmaram que o FST de 0,30 encontrado está especialmente alto entre essas populações, sugerindo baixas taxas de fluxo gênico entre as populações. Além disso os autores sugerem que no estudo do fluxo gênico entre populações deva ser incluído informações sobre a distribuição geográfica e o tamanho das populações. De modo oposto, um alto nível de fluxo gênico entre as populações poderia também homogeneizar a composição genética das populações, diminuindo a correlação entre distancia geográfica e genética e levando a um baixo nível de FST.

Os valores absolutos do FST das espécies de *Brachiaria* variaram de 0,244 a 0,380, com valor médio de 0,244 (tabela 4). *B. brizantha* apresentou o menor índice de fixação gênica, sendo 11,4% inferior ao médio, revelando ainda ter o maior número de bandas polimórficas, indicando um maior fluxo gênico e por consequência maior variabilidade genética, fato também observado no dendrograma (figura 1).

Deve-se considerar que das espécies estudadas, *B. brizantha* apresenta o maior número de amostra (11) sendo 6 de cultivares comerciais, que apesar de terem uma base genética muito estreita (KELLER-GREIN et al., 1996), foram selecionados e lançados como cultivar nas últimas décadas. Para Garris et al., 2005, populações que estão sob pressão de seleção apresentam menores valores de FST.

Tabela 4: Índices de fixação gênica (FST) médio e dentro das espécies, números de amostras e o número de bandas polimórficas de cada espécie, obtidos pela análise de variância molecular (AMOVA) dos acessos e cultivares comerciais de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. arrecta*.

<i>Espécies</i>	<i>FST (valores absolutos)</i>	<i>FST %</i>	<i>Num. amostras</i>	<i>Número de bandas polimórficas na espécie.</i>
<i>B. brizantha</i>	0,216	-11,4%	11	89
<i>B. decumbens</i>	0,272	11,7%	6	57
<i>B. ruziziensis</i>	0,244	0,0%	7	74
<i>B. arrecta</i>	0,380	55,6%	1	0
<i>Médio</i>	0,244		25	107

FST % - valores relativos em porcentagem comparados com o FST médio de 0,244

CONCLUSÕES

Através dos marcadores moleculares de RAPD foi possível agrupar os acessos e cultivares comerciais de *Brachiaria*, ferramenta que poderá auxiliar na construção de uma chave taxonômica para o gênero.

Considerando a maioria das *Brachiarias* estudadas, como apomíticas ou com apomixia facultativa, o índice de variabilidade genética entre espécies pode ser considerado baixo, pois é inferior a valores encontrados para algumas espécies autógamas. Para espécies apomíticas, a escassez de estudos realizados, não permite comparações.

Entre as espécies estudadas a *B. brizantha* apresenta maior variabilidade genética, maior número de bandas polimórficas e menor FST indicando maior fluxo gênico intra-espécies do que as *B. decumbens* e *B. ruziziensis*.

A *B. decumbens* cv 'Basilisk' apresenta maior proximidade genética com o grupo das *B. brizantha* do que com as *B. decumbens*.

Sugerimos outros estudos para a confirmação desses resultados utilizando como fonte de DNA folhas de plantas sistematicamente identificadas.

REFERÊNCIAS

ASSIS, G. M. L. et al. Análise discriminante e divergência genética em espécies de *Brachiaria*. In: SCHENK, M. A. M. (Ed.) **Despertando vocações: a Embrapa Gado de Corte pesquisando com o estudante**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p.18 (Documentos).

ASSIS, G. M. L. et al. Discriminação de Espécies de *Brachiaria* Baseada em Diferentes Grupos de Caracteres Morfológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 576-584, 2003.

CROCHEMORE, et al. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex. **Agronomie**, v. 16, p. 421-432, 1996.

DIABY, M.; CASLER, M. D. RAPD Marker Variation among Divergent Selections for Fiber Concentration in Smooth Brome grass. **Crop Science**, v. 45, p. 27-35, 2005.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987

EXCOFFIER, L. et al. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 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 Jan. 2007.

FERDINANDEZ, Y. S. N.; COULMAN, B.E. Evaluating genetic variation and relationships among two brome grass species and their hybrid using RAPD and AFLP markers. **Euphytica**, v. 125, p. 281-291, 2002.

FERDINANDEZ, Y.S.N., et al. Estimating the genetic relationship of hybrid brome grass to smooth brome grass and meadow brome grass using RAPD markers. **Plant Breeding**, v. 120, p.149–153, 2001.

GARRIS, A. J. et al. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, v.169, p.1631-1638, 2005.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural forest population. In: SCHONEWALD- COX, C.M. et al. (Eds.). **Genetics and Conservation**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1983. p. 335-348.

- HUFF, D. R. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. **Crop Science**, v. 37, p.557–564, 1997.
- KELLER-GREIN, G. et al. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J. W. et al. (Eds.). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Cali: CIAT, 1996. p.18-45.
- KÖLLIKER, R. et al. Genetic variability of forage grass cultivars: a comparison of *Festuca pratensis* Huds., *Lolium perenne* L., and *Dactylis glomerata* L. **Euphytica**, v.106, p.261-270, 1999.
- KONGKIATNGAM, et al. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.):comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. **Euphytica**, v.84, p.237-246, 1995.
- KUBIK, C. et al. Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. **Crop Science**, v.41, p.1565-1572, 2001.
- KUMAR, A. O milheto como cultura granífera para ração. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE MILHETO, 1., 1999. Brasília. **Anais...** Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa/Planaltina), 1999. p. 113-130.
- LARSON, S. R. et al. Identification of western wheatgrass cultivars and accessions by DNA fingerprinting and geographic provenance. **Crop Science**, v.43, p.394-401, 2003.
- LIU, K. J. et al. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsateletes. **Genetics**, v. 165, p.2117-2128, 2003.
- 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.
- LU, Y. et al. Genetic variability is correlated with population size and reproduction in american wild-rice (*Zizania palustris* var. *palustris*, Poaceae) populations. **American Journal of Botany**, v.92, n.6, p.990–997, 2005.
- MAASS, B.L. Identifying and naming *Brachiaria* species. In: MILES, J. W. et al. (Eds.). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Cali: CIAT, 1996. p.ix-xiii.
- MACHADO NETO, N. B. et al. *Brachiaria* access germplasm distinction using SDS PAGE. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p.1439-1445, 2002.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

McDONALD, M. B. Genetic purity: from protein electrophoresis to RAPDs. In: Proceedings of the Fiftieth Annual Corn & Sorghum Industry Research Conference, 1995. Washington. **Anais...** p.256-271, 1995.

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**, v 24, n.1, p.279-285, 2002.

NDIKUMANA, J.; LEEUW, P.N. Regional with *Brachiaria*: Sub-Saharan Africa. In: MILES, J. W. et al. (Eds.). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Cali: CIAT, 1996. p.247-257.

OIKI, S. et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among populations of the insular endemic plant *Campanula microdonta* (Campanulaceae). **Annals of Botany**, v.87, p.661-667, 2001.

PEAKALL, R. et al. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. **Molecular Evolution**, v. 4, p. 135–147, 1995.

PHAN, A. T. **Genetic diversity of blue grama (*Bouteloua gracilis*) and little bluestem (*Schizachyrium scoparium*) as affected by selection**. 2000 PhD. Thesis, University of Manitoba, Canada, 2000.

RENVOIZE, S. A. et al. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trinius) Griseberg. In: MILES, J. W. et al. (Eds.). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Cali: CIAT, 1996. p.1-17.

RIVAS, M. Sistema reproductivo y estructura genética de poblaciones de *Bromus auleticus* Trinius ex-Nees (Poaceae). Estudio mediante isoenzimas. **Agrociencia**, v.5, p.32-40, 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: 20 jan. 2007.

SHELTON, M. *Brachiaria Decumbens*, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/data/Pf000188.HTM>>. Acesso em: 30 jan. 2007.

SWEENEY, P.M.; DANNEBERGER, T.K. Random amplified polymorphic DNA in perennial ryegrass: a comparison of bulk samples vs. individuals. **Hort. Science**, v.29, p.624–626, 1994.

UBI, B. E. et al. Genetic diversity in diploid cultivars of rhodes grass determined on basis of amplified fragment length polymorphism markers. **Crop Science**, v. 43, p.1516-1522, 2003.

VALLE, C. B. **Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1990. 33 p. (Documento, 46).

VIEIRA, E. A. et al. Genetics structure of annual rygrass (*Lolium multiflorum*) populations estimated by RAPD. **Scientia Agricola**, v.61, n.4, p.407-413, 2004.

WEEDEN, N.F. Inheritance and reliability of RAPD markers. In: SYMPOSIUM ON APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING, 1, 1992. **Anais...** Minneapolis: Crop Science Society of America/American Society for Horticultural Science/American Genetic Association, 1992. p.12-1.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data**. Sunderland, Sinawer Associates, Inc. Publishers, 1990. 377 p.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

YANAKA, Y.F. et al. Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (Poaceae) com Base em Isoenzimas e Marcadores RAPD. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.1897-1904, 2005.

CAPITULO II

Dissimilaridade genética em acessos e cultivares de *Brachiaria* por RAPD

RESUMO

Dissimilaridade genética em acessos e cultivares de *Brachiaria* por RAPD

Este trabalho teve como objetivo estudar a dissimilaridade genética entre acessos de seis diferentes espécies de *Brachiaria* e os principais cultivares comerciais através de marcadores moleculares de RAPD. Foi extraído DNA de sementes de cinco diferentes acessos de seis espécies de *Brachiaria* (*B. decumbens*, *B. ruzizensis*, *B. nigropedata*, *B. humidicola*, *B. jubata* e *B. brizantha*), cedidas pela EMBRAPA – Gado de Corte, de doze cultivares comerciais, dois cultivares de *P. maximum* e de folhas da *B. arrecta*. 120 primers foram testados e 10 selecionados e amplificados em duas diferentes concentrações de DNA molde produzindo um total de 114 bandas polimórficas. Com auxílio do Programa Genes 2007, foram estimados os índices de dissimilaridade genética para todas as amostras analisadas. Considerando todas as amostras de *Brachiaria*, o intervalo de dissimilaridade observado foi de 0,262 a 0,907 e entre os 30 acessos variaram de 0,262 a 0,880, sendo menor entre dois acessos de *B. decumbens*. Os materiais foram agrupados pelo método de agrupamento de ligação média entre grupos (UPGMA) e formaram-se quatro grupos distintos: grupo I com *P. maximum* e *B. arrecta*, grupo II com todos os acessos de *B. jubata*; grupo III com todos os acessos de *B. nigropedata* e no grupo IV todos os acessos e cultivares comerciais das espécies *B. ruzizensis*, *B. decumbens*, *B. brizantha* e *B. humidicola*. Foi possível agrupar os acessos e cultivares comerciais de *Brachiaria* através dos marcadores moleculares de RAPD, ferramenta que poderá auxiliar na solução de problemas taxonômicos no gênero. Além de verificar uma correlação entre a dissimilaridade média dos acessos de uma mesma espécie e a distribuição natural das espécies no continente Africano. Espécies com distribuição natural estreita, como a *B. decumbens* e *B. ruzizensis* apresentaram baixa dissimilaridade genética, enquanto que, espécies com ampla distribuição natural apresentam altas taxas de dissimilaridade.

Palavras-chave: *Brachiaria*, marcadores moleculares, dissimilaridade genética, dendrograma,

ABSTRACT

Genetic dissimilarity among accesses and cultivars of *Brachiaria* estimated by RAPD markers.

The main objective of this work was to study the genetic dissimilarity among germplasm accesses of six *Brachiaria* species and the most important cultivars through RAPD markers. DNA was extracted from seed of five different accesses of the following *Brachiaria* species (*B. decumbens*, *B. ruziziensis*, *B. nigropedata*, *B. humidicola*, *B. jubata* e *B. brizantha*) donated by EMBRAPA – CNPQC, and from 12 commercial cultivars, two *P. maximum* and from leaves of *B. arrecta*. 120 primers were tested and 10 were selected and amplified in two different concentrations of template DNA, producing 114 polymorphic bands. With the aim of GENES program the dissimilarity indexes were estimated for all samples analysed. The range, for all samples, was between 0,262 and 0,907; and between the accesses from 0.262 to 0.880. The lowest range was between two *B. decumbens* accesses. They were grouped by UPGMA and four groups could be clearly distinct: group I with the out groups - *P. maximum* and *B. arrecta*; group II all accesses of *B. jubata*; group III with the *B. nigropedata* and group IV with all accesses and commercial materials of *B. ruziziensis*, *B. decumbens*, *B. brizantha* and *B. humidicola*. It was possible to group all accesses and cultivars of *Brachiaria*, through RAPD markers and it could be helpful to solve taxonomic problems within the genus and allowed to verify the dissimilarity inside one species as the natural distribution in the African continent. Species with a narrow range as *B. decumbens* and *B. ruziziensis* showed low levels of dissimilarity and natural widely spread species showed high dissimilarity levels.

Key-words: *Brachiaria*, molecular markers, genetic variability, dendrogram, genetic fixation index

INTRODUÇÃO

As gramíneas do gênero *Brachiaria* abriram novas expectativas para a pecuária tropical, devido a sua ampla faixa de adaptação, maior quantidade de forragem e superior qualidade nutricional, além da propagação por sementes.

Sabe-se que a pastagem é a base da produção de bovinos de corte no Brasil, e a área de pastagem com espécies cultivadas situam-se em torno de 115 milhões de hectares, com a predominância das *Brachiaris* (ZIMMER; EUCLIDES FILHO, 1997; ZIMMER; EUCLIDES, 2000).

Já é realidade na pecuária nacional a intensificação dos sistemas de produção, tornando necessário o desenvolvimento de novos cultivares forrageiros, que combinem elevada capacidade de produção com alta qualidade e que apresentem tolerância a condições ecológicas adversas. O lançamento de cultivares melhorados é uma demanda constante que requer um processo contínuo de introdução e avaliação.

O sucesso de qualquer programa de melhoramento ou de conservação é dependente do conhecimento da quantidade de variação presente na espécie de interesse. Em relação ao gênero *Brachiaria* existem sete importantes coleções no mundo, que possuem um total de 987 acessos de 33 espécies conhecidas (KELLER-GREIN et al., 1998). Entre as espécies de *Brachiaria* existe grande variabilidade natural, com isso, identificar caracteres realmente discriminantes torna-se uma difícil tarefa (ASSIS et al., 2003; RENVOIZE et al., 1996).

Além disso, caracteres morfológicos e agronômicos, usados para a medição da diversidade genética em determinadas populações, apresentam uma grande dificuldade na identificação de grupos taxonômicos próximos. Esta dificuldade deve-se ao fato de que a grande maioria dos caracteres vegetativos é influenciada por fatores ambientais. Para tentar solucionar este problema, técnicas moleculares têm sido utilizadas para monitorar a variabilidade genética (PARKER et al., 1998).

Para Vilela-Morales e Valois (2000) é nos acessos de germoplasma que podem ser encontradas fontes de variabilidade genética para a obtenção de genótipos

produtivos, mais adaptados às diversas condições ecológicas e resistentes a fatores bióticos e abióticos, em consonância com as necessidades do desenvolvimento agropecuário sustentável.

Para Chiari et al. (2006) a utilização de recursos genéticos, nativos e/ou exóticos, é estratégica no desenvolvimento de novas variedades de forrageiras e depende da identificação de acessos superiores, tanto do ponto de vista agrônomo quanto da variabilidade genética, para sua utilização em programas de melhoramento. O conhecimento da variabilidade genética disponível no banco de germoplasma é extremamente relevante para o planejamento de cruzamentos divergentes bem como para orientar novas coletas ou intercâmbio de germoplasma para características de interesse específicos.

Cruz (2006) vai além e diz que o sucesso de um programa de melhoramento reside na existência de variabilidade na população de trabalho e recomenda, para a formação de população-base, o inter cruzamento entre cultivares superiores e divergentes. Sendo que essa divergência pode ser avaliada a partir de características agrônomicas, morfológicas e moleculares. As informações múltiplas de cada cultivar são expressas em medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade que há no conjunto estudado.

A demanda da agropecuária por recursos genéticos necessita cada vez mais da utilização de métodos e processos biotecnológicos para alcançar o sucesso da agropecuária sustentável. Na aplicação de biotecnologias para atender às demandas de recursos genéticos, entre outros, são considerados vários processos entre eles os marcadores moleculares (VILELA-MORALES; VALOIS, 2000).

Dentre os diversos tipos de marcadores atualmente disponíveis, os marcadores de RAPD destacam-se pela simplicidade, rapidez, baixo custo, demanda de quantidades mínimas de DNA, análise de um grande número de locos e a possibilidade de estudo de espécies sobre as quais não se tem nenhum tipo de informação genética. Entre as limitações da técnica, duas podem ser consideradas as mais importantes. Uma delas se refere à característica dominante dos marcadores RAPD, o que não permite a diferenciação de indivíduos heterozigotos. E a, outra, é a

questão da baixa repetibilidade de algumas bandas (LACERDA, 2002). Todavia, o uso destes marcadores não é inválido (SIMMONS, 2007).

A característica dominante da técnica de RAPD certamente traz alguns inconvenientes, principalmente do ponto de vista da análise estatística. Porém, Clark e Lanigan (1993) e Stewart e Excoffier (1996) são alguns dos autores que têm procurado desenvolver metodologias de análise dos dados visando contornar o problema da dominância. Em relação a baixa repetibilidade de algumas bandas, muitos destes estudos destacam que alterações nas concentrações de cloreto de magnésio, DNA genômico, *primer* e *Taq* polimerase são as principais causas para o aparecimento de bandas consideradas artefatuais. De qualquer forma, parece haver um consenso de que a realização de estudos prévios para a escolha dos *primers* mais adequados para a espécie alvo do estudo, o estabelecimento das concentrações ótimas dos reagentes e do programa de PCR e uma cuidadosa atenção aos detalhes reduzem bastante a possibilidade de se obter bandas de baixa repetibilidade (HEUN; HELENTJARIS, 1993; VIRK et al., 1995).

Chiari et al. (2006) destaca a importância de conhecer a variabilidade genética entre os acessos de *Brachiaria*, disponíveis no banco de germoplasma, para se obter sucesso nos programas de melhoramento, no planejamento de cruzamentos divergentes e para orientação de novas coletas ou intercâmbio de germoplasma. Para Rocha et al. (2006) uma aplicação dos marcadores moleculares em programas de melhoramento de *Brachiaria* está na determinação da variabilidade genética disponível, auxiliando na escolha de genitores para programas de hibridação inter e intraespecíficas.

Recentes trabalhos já mostraram a alta variabilidade genética existente entre os acessos de *B. humidicola* do banco de germoplasma da Embrapa – Gado de Corte, fazendo deste um germoplasma valioso para o melhoramento e seleção de novos cultivares, justificando a sua manutenção (CHIARI et al., 2006).

O propósito deste trabalho foi estudar a dissimilaridade genética entre acessos de seis diferentes espécies de *Brachiaria* e os principais cultivares comerciais através de marcadores moleculares de RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, em Presidente Prudente – SP.

Utilizou-se como fonte de DNA sementes de cinco diferentes acessos de seis espécies de *Brachiaria* (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruzizensis*, *B. jubata*, *B. nigropedata* e *B. humidicola*) cedidas pela EMBRAPA – Gado de Corte e de onze cultivares comerciais das espécies *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola*, *B. ruzizensis*, uma amostra da *Brachiaria* híbrida cv ‘Mulato’, dois cultivares comerciais de *P. maximum* (‘Mombaça’ e ‘Tanzânia’) e folhas da *B. arrecta* totalizando 44 amostras conforme descrito nas Tabelas 1 e 2.

Para a extração de DNA utilizou-se o método de Doyle e Doyle (1987) com adaptações. Foram utilizadas de 6 a 8 sementes por amostra, as quais foram totalmente maceradas em cadinho de porcelana exceto para *B. arrecta* da qual aproximadamente 1cm² de folha foi macerado em nitrogênio líquido. Após a maceração o material foi transferido para microtubos de 1,5mL contendo 700µL de tampão CTAB 2% previamente aquecido a 65°C. O material foi homogeneizado e mantido a 65°C por 40 minutos. Em seguida foram acrescentados 700µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e homogeneizados por inversão. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos. A porção aquosa foi recuperada e transferida para outro tubo, ao qual foi acrescentado 8% do volume transferido de acetato de amônio a 7,5M e 54% do volume total de isopropanol absoluto a -20°C e mantidos nesta temperatura por 24 horas. Posteriormente, o material foi centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 700µL de etanol 70% a 8°C, sendo novamente centrifugados a 14000rpm por 1 minuto. O etanol foi descartado e o precipitado foi seco em um fluxo de ar a temperatura ambiente. Para a hidratação do DNA foram adicionados 100µL de tampão TE em banho seco por 1 hora a 55°C.

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm, e diluído em TE para uma concentração de 10ng µL⁻¹.

TABELA 1. Relação dos acessos de *Brachiaria* com o respectivo código, identificação (Ident.), o número no registro nacional de germoplasma, região e país de origem do material catalogado no banco de germoplasma da Embrapa – Gado de Corte

Acessos da Embrapa CNPGC	Código	Ident.	Registro	Local de origem - País
<i>B. ruziziensis</i>	<i>B. ruziz</i> 1	R100	BRA005541	Trans Nzoia/Quênia
<i>B. ruziziensis</i>	<i>B. ruziz</i> 2	R106	BRA005649	Bujumbura/Burundi
<i>B. ruziziensis</i>	<i>B. ruziz</i> 3	R108	BRA005584	Cibitoke/Burundi
<i>B. ruziziensis</i>	<i>B. ruziz</i> 4	R109	BRA005631	Ruyigi/Burundi
<i>B. ruziziensis</i>	<i>B. ruziz</i> 5	R128	BRA002291	-----
<i>B. decumbens</i>	<i>B. decum</i> 1	D53	PI355744	Bogotá/Colômbia
<i>B. decumbens</i>	<i>B. decum</i> 2	D7	BRA004472	South Nyanza/Quênia
<i>B. decumbens</i>	<i>B. decum</i> 3	D9	BRA004499	Nakuru/Quênia
<i>B. decumbens</i>	<i>B. decum</i> 4	D58	BRA000191	Embrapa- CPATU/Brasil
<i>B. decumbens</i>	<i>B. decum</i> 5	D59	BRA000116	Embrapa CNPMF/Brasil (cv 'Ipean')
<i>B. brizantha</i>	<i>B. briz</i> 1	B158	BRA003719	Bungoma/Etiópia
<i>B. brizantha</i>	<i>B. briz</i> 2	B23	BRA001945	Embrapa CNPGC/Brasil
<i>B. brizantha</i>	<i>B. briz</i> 3	B67	BRA003336	Ilubabor/Etiópia
<i>B. brizantha</i>	<i>B. briz</i> 4	B112	BRA002844	Welega/Etiópia
<i>B. brizantha</i>	<i>B. briz</i> 5	B127	BRA003107	Gamo Gofa/Etiópia
<i>B. jubata</i>	<i>B. jubata</i> 1	J17	BRA005223	Idamo/Etiópia
<i>B. jubata</i>	<i>B. jubata</i> 2	J13	BRA005533	Yumba/Ruanda
<i>B. jubata</i>	<i>B. jubata</i> 3	J8	BRA005461	Trans Nzoia/Quênia
<i>B. jubata</i>	<i>B. jubata</i> 4	J4	BRA005291	Ungoma/Quênia
<i>B. jubata</i>	<i>B. jubata</i> 5	J30	BRA05380	Ericho/Quênia
<i>B. nigropedata</i>	<i>B. nigro</i> 1	N203	CIAT16923	Masvingo/Zimbabwe
<i>B. nigropedata</i>	<i>B. nigro</i> 2	N190	BRA001123	-----
<i>B. nigropedata</i>	<i>B. nigro</i> 3	N191	BRA005916	Hwange/Zimbabwe
<i>B. nigropedata</i>	<i>B. nigro</i> 4	N202	CIAT16921	BIKITA/Zimbabwe
<i>B. nigropedata</i>	<i>B. nigro</i> 5	N197	CIAT16911	Urungwe/Zimbabwe
<i>B. humidicola</i>	<i>B. humi</i> 1	H10	BRA004952	Inyanga/Zimbabwe
<i>B. humidicola</i>	<i>B. humi</i> 2	H12	BRA004979	Inyanga/Zimbabwe
<i>B. humidicola</i>	<i>B. humi</i> 3	H13	BRA005011	Masvingo/Zimbabwe
<i>B. humidicola</i>	<i>B. humi</i> 4	H108	BRA001937	Embrapa CNPGC/Brasil
<i>B. humidicola</i>	<i>B. humi</i> 5	H112	BRA002208	CSIRO/Austrália

As condições de amplificação foram baseadas em Williams *et al.* (1990) com algumas modificações. O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 25µL, no qual utilizou-se 10% de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20mM, pH 8,4 e KCl 50mM), 1,5 mM MgCl₂, 0,4µM de primer (oligonucleotídeos), 0,2µM de cada dNTP, uma unidade de Taq DNA Polimerase com diferentes concentrações de DNA molde (25 e 50ng). As reações de RAPD foram amplificadas em um termociclador “MJ

– PTC 100” programado para 43 ciclos com o passo inicial de desnaturação a 94°C por três minutos, 94°C por um minuto para desanelamento, 37°C para anelamento com primers por um minuto e 72°C para alongação da cadeia por 30 segundos. Ao final de 43 ciclos foi dado um passo final de extensão a 72°C por cinco minutos.

TABELA 2. Relação dos cultivares comerciais de *Brachiaria* com o respectivo código e o número no registro nacional de cultivares.

Cultivares comerciais	Código	Registro
<i>B. brizantha</i> cv ‘MG4’	<i>B. briz</i> MG4	02256
<i>B. brizantha</i> cv ‘Marandu’	<i>B. briz</i> Mar	02250
<i>B. brizantha</i> cv ‘La libertad’	<i>B. briz</i> Laliber	
<i>B. brizantha</i> cv ‘Xaraés’	<i>B. briz</i> Xaraes	04509
<i>B. brizantha</i> cv ‘MG5’	<i>B. briz</i> MG5	04509
<i>B. decumbens</i> cv ‘Basilisk’	<i>B. dec</i> Basilisk	02277
<i>B. humidicola</i>	<i>B. hum</i> - a	04189
<i>B. humidicola</i>	<i>B. hum</i> - b	04189
<i>B. ruziziensis</i>	<i>B. ruzi</i> - a	02043
<i>B. ruziziensis</i>	<i>B. ruzi</i> - b	02043
<i>B. arrecta</i>	<i>B. arrecta</i>	
<i>B. híbrida</i> cv ‘Mulato	Mulato	09669
<i>P. maximum</i> cv ‘Mombaça’	Mombaça	01697
<i>P. maximum</i> cv ‘Tanzânia’	Tanzânia	01699

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) utilizando o tampão de corrida TBE ½X. O ladder AMRESCO 100pb foi utilizado como marcador de peso molecular. Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados em uma câmara com iluminação ultravioleta (câmara CCD Alpha-Inmotech) e as imagens capturadas pelo software Chemilmager.

Foram testados 120 primers decâmeros de combinações arbitrárias do conjunto OPERON Technologies Inc dos grupos A, C, D, G, X e Y. Para a primeira fase da seleção do primers optou-se em utilizar a amostra de *B. brizantha* cv ‘MG4’ pela maior disponibilidade de material. Foram pré-selecionados 43 primers, por apresentarem bandas di, tri e polimórficas bem visíveis. Na segunda fase os primers pré-selecionados foram testados em uma amostra de *B. ruziziensis* e outra de *B. jubata*. Seguindo os mesmos critérios, foram eleitos dez primers para serem utilizados nas reações de RAPD em todas as amostras.

Os perfis de RAPD de cada amostra foram analisados, com auxílio do programa LabImage, pela presença (1) ou ausência (0), de bandas de tamanhos

moleculares idênticos para cada primer. Foram consideradas as bandas reproduzidas nas duas diferentes concentrações de DNA. Em seguida, foi construída uma matriz de dissimilaridade genética usando o Programa Genes - Aplicativo computacional em genética e estatística (CRUZ, 2006), versão 2007.0.0. Com o mesmo programa foi possível representar graficamente o padrão de divergência genética, pela construção de um dendrograma pelo método de agrupamento de ligação média entre grupos (UPGMA).

UPGMA é o método mais simples de construção de árvores filogenéticas a partir de dados de distância. Emprega um algoritmo seqüencial de agrupamento, no qual as relações são identificadas em ordem de similaridade, e a árvore é construída passo a passo. Primeiro identifica-se entre todas as unidades estudadas as duas mais similares considerando como se fosse uma unidade. Subseqüentemente, do resto do grupo identifica-se outra unidade com maior similaridade, e assim por diante (BUSO, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 42 amostras de várias espécies do gênero *Brachiaria* e as 2 amostras do gênero *Panicum* foram amplificadas com 10 primers selecionados, os quais geraram um total de 114 bandas, perfazendo uma média de 11,4 bandas por primer, sendo todos polimórficos. Os tamanhos variaram de 200 a 1450 pb como pode ser observado na Tabela 3. Valores semelhantes foram encontrados por Chiari et al. (2006) que em 58 acessos de *B. humidicola* encontraram 10 bandas por primer. Porém, Rocha et al. (2006) avaliando acessos de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*, todos do banco de germoplasma da Embrapa – Gado de Corte, obtiveram maior número de bandas, 17 por primer, dos quais 98% foram polimórficos. Em *Brachiaria dictyoneura*, Zorzatto et al. (2006) utilizaram 11 primers em oito acessos, perfazendo uma média de 7,9 bandas por primer, das quais 84% polimórficas. O número de bandas encontrado no presente trabalho, que segundo Telles et al. (2001) é mais importante que o de primers, está de acordo com o número obtido por vários outros autores para a estimativa da diversidade genética pela técnica de RAPD.

TABELA 3. Seqüências nucleotídicas dos *primers*, número de bandas polimórficas e tamanho dos fragmentos amplificados em todas as amostras.

Primers	Seqüência de nucleotídeos (5' → 3')	Nº de loci polimórficos	Tamanho dos fragmentos (pb)
A5	AGG GGT CTT G	10	260 a 1000
A9	GGG TAA CGC C	10	200 a 1000
D11	AGC GCC ATT G	10	300 a 900
G5	CTG AGA CCG A	12	200 a 1000
G9	CTG ACG TCA C	11	300 a 1300
G10	AGG GCC GTT C	8	300 a 1000
G17	ACG ACC GAC A	16	200 a 1300
X15	CAG ACA AGC C	12	300 a 1450
X17	GAC ACG GAC C	13	300 a 1000
Y1	GTG GCA TCT C	12	300 a 1300

Foram estimados os índices de dissimilaridade genética para todos as amostras analisadas (tabela 4, 5 e 6). Não considerando *P. maximum*, o intervalo de dissimilaridade observado entre as amostras foi de 0,262 a 0,907, demonstrando uma significativa variabilidade genética entre os acessos e cultivares do gênero *Brachiária*. Outros trabalhos, que avaliaram a variabilidade genética utilizando RAPD em gramíneas, tiveram resultados similares. Por exemplo, Dong et al. (2003) obtiveram em *Vetiveria zizanioides* valores de dissimilaridade genética que variaram de 0,005 a 0,495 e Chandra et al. (2004) em *Dichantium annulatum* de 0,02 a 0,62.

Para cada espécie foi destacados o maior e o menor valor de dissimilaridade genética encontrado entre os acessos, que podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7. Maior e menor dissimilaridade genética, em porcentagem, entre acessos de cada espécie estudada e o país de origem de cada material.

Espécie	Maior dissimilaridade			Menor dissimilaridade		
	Acessos	Origem	Valor (%)	Acessos	Origem	Valor (%)
<i>B. jubata</i>	BRA005533	Ruanda	70,2	BRA005291	Quênia	40,5
	BRA05380	Quênia		BRA05380	Quênia	
<i>B. ruziziensis</i>	BRA005649	Burundi	55,6	BRA005541	Quênia	34
	BRA005584	Burundi		BRA005649	Burundi	
<i>B. decumbens</i>	BRA000191	Brasil	53,9	BRA000191	Brasil	26,2
	PI355744	Colômbia		BRA000116	Brasil	
<i>B. nigropedata</i>	CIAT16911	Zimbabwe	57,7	BRA005916	Zimbabwe	34,8
	CIAT16923	Zimbabwe		CIAT16911	Zimbabwe	
<i>B. humidicola</i>	BRA002208	Austrália	63,6	BRA001937	Brasil	40,5
	BRA004952	Zimbabwe		BRA002208	Austrália	
<i>B. brizantha</i>	BRA003336	Etiópia	72,3	BRA001945	Brasil	46
	BRA003107	Etiópia		BRA003719	Etiópia	

Não foi possível estabelecer nenhuma relação entre o local de origem dos acessos e os valores de dissimilaridade. Chiari et al. (2006), através do método de agrupamento entre acessos de *B. humidicola*, também não relacionaram a formação dos grupos ao local de origem dos acessos.

TABELA 4. Matriz de dissimilaridade genética entre todos os acessos do banco de germoplasma da Embrapa – CNPQC. Presidente Prudente/SP, 2007.

	<i>Brachiaria jubata</i>					<i>Brachiaria ruzizienze</i>					<i>Brachiaria decumbens</i>					<i>Brachiaria nigropedata</i>					<i>Brachiaria humidicola</i>					<i>Brachiaria brizantha</i>			
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4
<i>Brachiaria jubata</i>	2	0,648																											
	3	0,550	0,651																										
	4	0,600	0,677	0,452																									
	5	0,537	0,702	0,450	<u>0,405</u>																								
<i>Brachiaria ruzizienze</i>	1	0,776	0,639	0,741	0,721	0,684																							
	2	0,807	0,662	0,727	0,729	0,667	<u>0,340</u>																						
	3	0,778	0,708	0,764	0,696	0,704	0,380	0,556																					
	4	0,828	0,699	0,793	0,790	0,759	0,463	0,367	0,471																				
	5	0,782	0,694	0,722	0,746	0,732	0,453	0,481	0,490	0,451																			
<i>Brachiaria decumbens</i>	1	0,722	0,685	0,754	0,690	0,696	0,645	0,714	0,614	0,650	0,667																		
	2	0,754	0,662	0,742	0,779	0,730	0,621	0,603	0,590	0,581	0,641	0,411																	
	3	0,793	0,707	0,759	0,695	0,724	0,672	0,656	0,644	0,633	0,650	0,463	0,333																
	4	0,833	0,732	0,774	0,772	0,782	0,721	0,684	0,741	0,707	0,702	0,539	0,463	0,362															
	5	0,821	0,690	0,741	0,741	0,750	0,714	0,678	0,690	0,632	0,695	0,509	0,407	0,298	<u>0,262</u>														
<i>Brachiaria nigropedata</i>	1	0,818	0,757	0,759	0,800	0,768	0,571	0,649	0,636	0,717	0,667	0,700	0,651	0,705	0,737	0,750													
	2	0,860	0,740	0,712	0,800	0,768	0,730	0,717	0,684	0,758	0,774	0,742	0,651	0,683	0,759	0,729	0,490												
	3	0,864	0,730	0,746	0,807	0,776	0,698	0,683	0,738	0,746	0,742	0,689	0,619	0,714	0,767	0,738	0,510	0,449											
	4	0,828	0,716	0,727	0,810	0,737	0,661	0,644	0,762	0,710	0,726	0,734	0,667	0,719	0,729	0,762	0,547	0,460	0,388										
	5	0,839	0,704	0,712	0,820	0,790	0,730	0,695	0,790	0,758	0,754	0,700	0,629	0,683	0,737	0,707	0,577	0,458	<u>0,348</u>	0,362									
<i>Brachiaria humidicola</i>	1	0,837	0,708	0,717	0,694	0,674	0,737	0,673	0,712	0,722	0,667	0,654	0,695	0,580	0,609	0,604	0,778	0,731	0,764	0,746	0,755								
	2	0,789	0,732	0,774	0,793	0,782	0,742	0,684	0,696	0,684	0,679	0,690	0,703	0,649	0,679	0,696	0,737	0,714	0,787	0,729	0,780	0,439							
	3	0,824	0,739	0,808	0,782	0,745	0,636	0,667	0,704	0,714	0,635	0,623	0,667	0,549	0,544	0,600	0,768	0,768	0,817	0,780	0,810	0,581	0,511						
	4	0,796	0,754	0,755	0,778	0,740	0,767	0,776	0,768	0,797	0,750	0,759	0,726	0,648	0,706	0,673	0,764	0,667	0,727	0,754	0,692	0,636	0,565	0,600					
	5	0,880	0,831	0,840	0,875	0,800	0,776	0,764	0,755	0,786	0,712	0,698	0,667	0,600	0,660	0,653	0,726	0,674	0,736	0,741	0,674	0,610	0,568	0,571	<u>0,405</u>				
<i>Brachiaria brizantha</i>	1	0,736	0,712	0,790	0,724	0,660	0,677	0,705	0,695	0,705	0,632	0,621	0,597	0,603	0,549	0,574	0,690	0,774	0,742	0,726	0,690	0,640	0,630	0,580	0,679	0,604			
	2	0,778	0,743	0,764	0,763	0,750	0,672	0,655	0,712	0,678	0,574	0,726	0,613	0,597	0,623	0,593	0,707	0,750	0,797	0,781	0,750	0,686	0,623	0,654	0,673	0,653	<u>0,460</u>		
	3	0,744	0,791	0,809	0,755	0,739	0,722	0,755	0,720	0,731	0,700	0,686	0,702	0,612	0,702	0,694	0,714	0,765	0,839	0,800	0,789	0,659	0,644	0,682	0,643	0,650	0,587	0,512	
	4	0,772	0,803	0,800	0,758	0,724	0,819	0,794	0,824	0,829	0,791	0,797	0,750	0,727	0,738	0,750	0,746	0,785	0,694	0,677	0,726	0,776	0,695	0,746	0,696	0,727	0,672	0,710	0,692
	5	0,760	0,797	0,815	0,810	0,821	0,778	0,767	0,737	0,724	0,719	0,684	0,698	0,667	0,698	0,759	0,817	0,776	0,803	0,746	0,776	0,789	0,647	0,653	0,700	0,681	0,623	0,691	0,723

Em negrito e sublinhado o maior e o menor valor, respectivamente, de dissimilaridade entre os acessos dentro de cada espécie.

TABELA 5: Matriz de dissimilaridade genética entre todos os acessos do banco de germoplasma da Embrapa - CNPGC e os cultivares comerciais. Presidente Prudente/SP, 2007.

	<i>Brachiria jubata</i>					<i>Brachiria ruzizienze</i>					<i>Brachiria decumbens</i>					<i>Brachiria nigropedata</i>					<i>Brachiria humidicola</i>					<i>Brachiria brizantha</i>				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
BbrizMG4	0,821	0,792	0,764	0,763	0,814	0,734	0,721	0,712	0,655	0,717	0,661	0,613	0,571	0,623	0,593	0,810	0,729	0,738	0,700	0,707	0,660	0,596	0,704	0,722	0,653	0,672	0,643	0,769	0,689	0,531
<i>B. brizMar</i>	0,827	0,811	0,811	0,786	0,774	0,712	0,741	0,732	0,719	0,691	0,655	0,650	0,611	0,640	0,685	0,750	0,772	0,691	0,696	0,727	0,681	0,612	0,617	0,638	0,581	0,588	0,709	0,745	0,585	0,477
<i>B. decBasisk</i>	0,810	0,769	0,797	0,813	0,763	0,727	0,672	0,705	0,650	0,667	0,586	0,587	0,518	0,593	0,589	0,762	0,721	0,750	0,714	0,742	0,679	0,643	0,648	0,667	0,620	0,621	0,661	0,759	0,683	0,500
<i>B. hum-a</i>	0,729	0,743	0,833	0,848	0,796	0,754	0,783	0,754	0,783	0,759	0,679	0,650	0,684	0,692	0,685	0,772	0,772	0,839	0,803	0,772	0,708	0,583	0,556	0,546	0,644	0,642	0,660	0,659	0,684	0,660
<i>B. ruzi-a</i>	0,722	0,629	0,732	0,794	0,783	0,708	0,714	0,746	0,694	0,667	0,586	0,565	0,661	0,690	0,638	0,721	0,762	0,730	0,672	0,678	0,814	0,754	0,719	0,780	0,722	0,667	0,746	0,782	0,761	0,707
<i>B. brizLalber</i>	0,803	0,750	0,750	0,769	0,738	0,625	0,629	0,593	0,607	0,576	0,590	0,450	0,500	0,597	0,617	0,719	0,677	0,688	0,672	0,677	0,702	0,597	0,600	0,643	0,569	0,500	0,593	0,685	0,641	0,537
<i>B. brizXaraes</i>	0,820	0,771	0,804	0,862	0,811	0,724	0,685	0,673	0,608	0,704	0,737	0,564	0,648	0,680	0,647	0,807	0,741	0,772	0,754	0,764	0,776	0,706	0,740	0,784	0,771	0,704	0,722	0,761	0,719	0,726
<i>B. hum-b</i>	0,825	0,795	0,768	0,767	0,754	0,719	0,683	0,625	0,683	0,700	0,730	0,721	0,672	0,767	0,695	0,754	0,643	0,742	0,766	0,754	0,667	0,604	0,709	0,654	0,660	0,762	0,738	0,796	0,791	0,719
<i>B. brizMG5</i>	0,828	0,798	0,750	0,771	0,800	0,779	0,769	0,742	0,750	0,746	0,773	0,706	0,698	0,729	0,700	0,738	0,625	0,705	0,710	0,738	0,810	0,750	0,800	0,817	0,807	0,746	0,700	0,800	0,633	0,604
<i>B. ruzi-b</i>	0,790	0,685	0,754	0,754	0,803	0,600	0,579	0,564	0,554	0,597	0,698	0,672	0,683	0,754	0,661	0,700	0,762	0,710	0,773	0,721	0,814	0,754	0,763	0,737	0,790	0,769	0,726	0,759	0,723	0,750
<i>B. arecta</i>	0,816	0,882	0,889	0,818	0,830	0,783	0,871	0,807	0,853	0,869	0,797	0,870	0,875	0,898	0,885	0,845	0,845	0,869	0,889	0,883	0,907	0,839	0,830	0,827	0,885	0,790	0,867	0,857	0,714	0,745
Mulato	0,750	0,756	0,820	0,778	0,787	0,629	0,698	0,689	0,739	0,672	0,683	0,714	0,688	0,738	0,750	0,803	0,838	0,791	0,776	0,821	0,754	0,695	0,655	0,696	0,750	0,650	0,689	0,786	0,667	0,510
Mombaça	0,814	0,788	0,780	0,758	0,807	0,692	0,719	0,750	0,719	0,714	0,703	0,714	0,765	0,778	0,788	0,766	0,766	0,843	0,812	0,785	0,836	0,868	0,807	0,823	0,814	0,714	0,769	0,848	0,817	0,712
Tanzânia	0,814	0,772	0,780	0,758	0,787	0,692	0,698	0,750	0,739	0,714	0,683	0,714	0,765	0,758	0,750	0,726	0,746	0,809	0,794	0,766	0,817	0,815	0,787	0,841	0,793	0,672	0,730	0,807	0,800	0,712

TABELA 6: Matriz de dissimilaridade genética entre os cultivares comerciais. Presidente Prudente/SP, 2007.

	Bbriz MG4	BbrizMar	<i>B. decBasisk</i>	<i>B. huma</i>	<i>B. ruzia</i>	<i>B. riz Lalber</i>	<i>B. brizXaraes</i>	<i>B. humb</i>	<i>B. brizMG5</i>	<i>B. ruzib</i>	<i>B. arecta</i>	Mulato	Mombaça
BbrizMG4	0,551												
<i>B. brizMar</i>	0,589	0,490											
<i>B. decBasisk</i>	0,709	0,680	0,724										
<i>B. hum-a</i>	0,683	0,702	0,698	0,655									
<i>B. ruzi-a</i>	0,518	0,471	0,464	0,678	0,613								
<i>B. brizLalber</i>	0,563	0,638	0,667	0,769	0,691	0,510							
<i>B. brizXaraes</i>	0,600	0,691	0,667	0,615	0,750	0,667	0,750						
<i>B. hum-b</i>	0,528	0,673	0,650	0,763	0,714	0,651	0,580	0,661					
<i>B. brizMG5</i>	0,683	0,702	0,698	0,724	0,561	0,697	0,714	0,710	0,672				
<i>B. ruzi-b</i>	0,764	0,789	0,836	0,740	0,776	0,790	0,827	0,746	0,679	0,754			
<i>B. arecta</i>	0,621	0,611	0,639	0,636	0,723	0,597	0,803	0,672	0,698	0,661	0,667		
Mulato	0,806	0,771	0,742	0,828	0,703	0,721	0,803	0,773	0,739	0,742	0,714	0,727	
Mombaça	0,788	0,750	0,742	0,828	0,683	0,702	0,803	0,754	0,739	0,742	0,737	0,727	0,174

Observando a Tabela 4, os valores de dissimilaridade genética encontrado entre os 30 acessos analisados variaram de 0,262 a 0,880, sendo menor entre dois acessos de *B. decumbens*, o BRA000191 (*B. decum* 4) e o BRA000116 (*B. decum* 5). A maior dissimilaridade encontrada foi entre o acesso de *B. humidicola* BRA002208 (*B. humi* 5) e o acesso de *B. jubata* BRA005223 (*B. jubata* 1). Um amplo intervalo de dissimilaridade 0,339 a 0,915, também foi observado por Rocha et al. (2006) em 14 acessos pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa – Gado de Corte de quatro espécies de *Brachiaria*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*, através de marcadores RAPD. Igualmente, os dois acessos de maior similaridade, encontrado por Rocha et al. (2006) foram entre os acessos de *B. decumbens*.

Outros trabalhos com o gênero *Brachiaria* confirmam a alta variabilidade intra-espécies. Chiari et al. (2006) utilizando marcadores RAPD para estimar a variabilidade genética em 58 acessos de *B. humidicola* do Banco de Germoplasma da Embrapa – Gado de Corte, concluíram que a similaridade genética variou de 0,14 a 0,97, sugerindo alta variabilidade genética neste grupo de acesso, apesar da grande similaridade morfológica.

Zorzatto et al. (2006), também utilizando marcadores de RAPD, agora em oito acessos de *B. dictyoneura* que constituem o banco de germoplasma da Embrapa - Gado de Corte, determinaram que a similaridade genética inter - acessos variou de 0,21 a 0,96.

Considerando a dissimilaridade média entre os acessos dentro de uma mesma espécie o menor valor encontrado (40,47%) foi para a *B. decumbens*, seguido da *B. ruziziensis* (44,52%), ou seja, apresentaram maior semelhança genética entre os acessos, sendo que as maiores dissimilaridade, 63,13% e 56,72% foram determinadas para a *B. brizantha* e *B. jubata*, respectivamente. Valores intermediários de 54,86% e de 45,89 % foram determinados para *B. humidicola* e *B. nigropedata*, respectivamente.

Esses dados confirmam as observações de Valle (1990) que através da análise multivariadas das espécies *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*, conclui que a *B. brizantha* apresenta maior variabilidade nas características estudadas, enquanto as outras duas espécies estão circunscritas a áreas menores no gráfico de distribuição, indicando maior homogeneidade morfológica entre os componentes analisados.

Neste estudo, pôde-se verificar uma correlação entre a dissimilaridade média dos acessos de uma mesma espécie e a distribuição natural destas no continente Africano. As duas espécies de menor dissimilaridade genética, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*, apresentam uma estreita faixa de distribuição natural. Os acessos de *B. decumbens* que compõe o banco de germoplasma foram coletados no oeste do Quênia, Rwanda e Burundi, nas latitudes 4°21'S a 1°09'N. E os acessos de *B. ruziziensis* também foram coletados em Burundi, Rwanda e Quênia nas latitudes 4°05'S a 2°54'S. Porém, as espécies com maior dissimilaridade média entre os acessos possuem ampla distribuição natural, como exemplo, *B. brizantha* que é encontrada em toda a África Tropical, entre as latitudes 25°05'S a 12°36'N, com distribuição semelhante para a *B. jubata*, *B. humidicola* e *B. nigropedata* (KELLER-GREIN et al., 1996). Pode-se inferir que as espécies de *Brachiaria* que apresentam ampla distribuição natural adaptaram-se a diferentes condições edafoclimáticas graças a alta variabilidade genética.

Os mesmos acessos de *Brachiaria* deste trabalho foram utilizados por Machado Neto et al. (2002) para verificar as diferenças intra-espécies através da eletroforese de proteína (SDS-PAGE) extraídas das sementes, quando foi possível verificar que os acessos de *Brachiaria* apresentaram variações em quase todas as espécies, sendo a *B. jubata* geneticamente mais homogênea que as outras espécies estudadas, o que diverge do presente trabalho em que a similaridade média entre os acessos de *B. jubata* foi inferior a *B. decumbens*, *B. ruziziensis*, *B. nigropedata* e *B. humidicola*.

Os valores de dissimilaridade genética para todas as amostras (Tabela 4, 5 e 6) foram utilizados para as análises de agrupamento pelo método de agrupamento de ligação média entre grupos (UPGMA). Para representar graficamente o padrão de dissimilaridade genética esses dados foram utilizados na construção de um dendrograma (Figura 1).

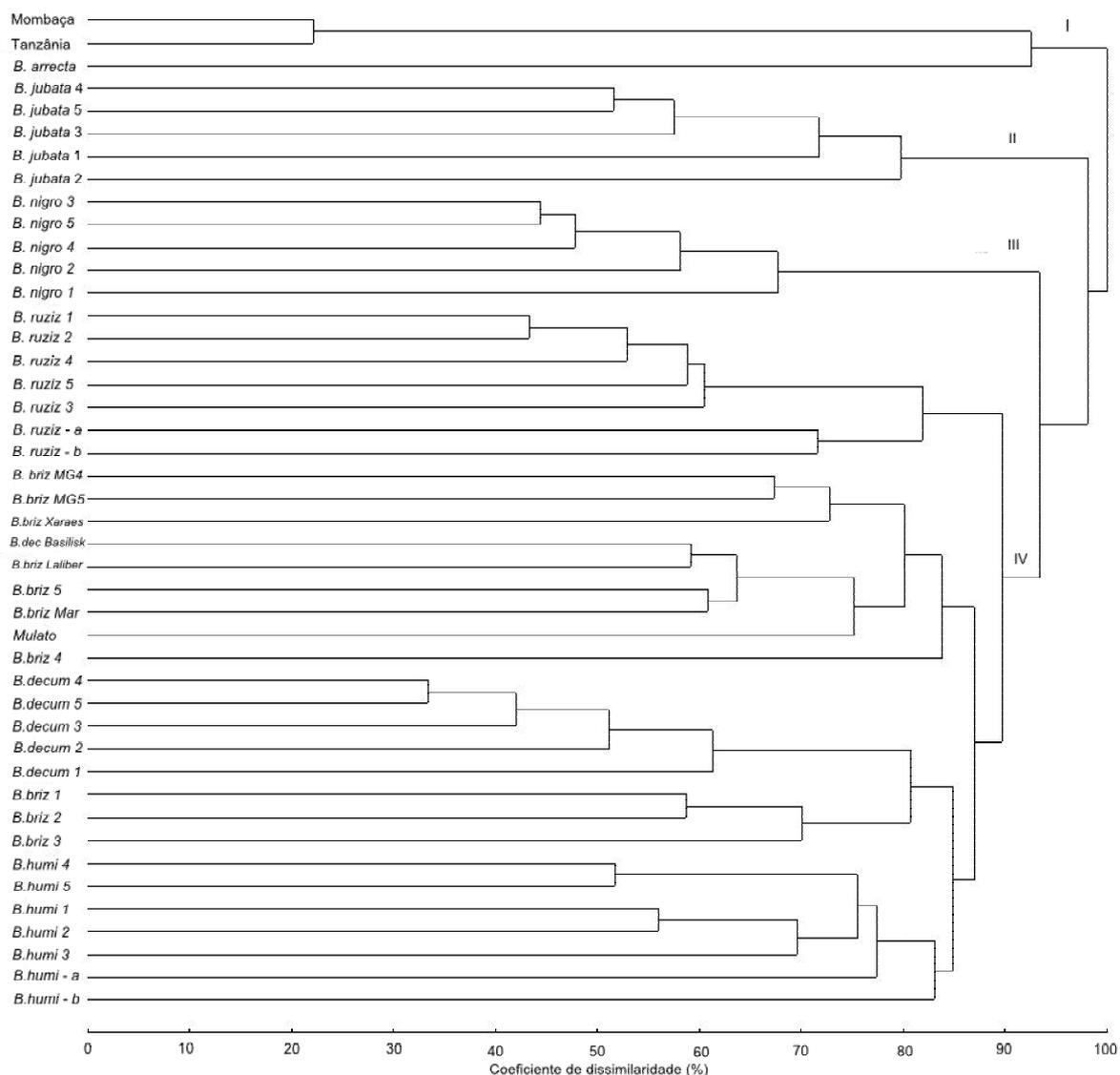


FIGURA 1: Dendrograma obtido pelo método de agrupamento de ligação média entre grupos (UPGMA) com base nas dissimilaridades genéticas entre as 44 amostras, Presidente Prudente/SP, 2007.

Quatro grupos podem ser facilmente distinguidos pela análise do dendrograma; o grupo I com três amostras corresponde aos dois cultivares de *P. maximum* e *B. arrecta*. No grupo II, separado dos demais, estão todos os acessos de *B. jubata*, no grupo III todos os acessos de *B. nigropedata* e no grupo IV todos os acessos e cultivares comerciais das espécies *B. ruzizensis*, *B. decumbens*, *B. brizantha* e *B. humidicola*.

Valle (1990), que utilizou a análise multivariada em componentes principais de descritores morfológicos, também identificou a individualidade dos acessos de *B. jubata* em relação a *B. ruzizensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha*.

O dendrograma revelou semelhança com a classificação por caracteres morfológicos proposto por Renvoize et al. (1996), isolando *B. arrecta*, pertencente ao grupo 3, das demais espécies de *Brachiaria*. *B. jubata* e *B. nigropedata*, classificadas nos grupos 6 e 2, respectivamente, foram separadas das espécies pertencentes ao grupo 5, composto pela *B. decumbens*, *B. brizantha* e *B. ruzizensis*. Porém, de forma não coerente, *B. humidicola* classificada no mesmo grupo da *B. jubata* (grupo 6) por Renvoize et al. (1996) apresentou neste estudo uma maior proximidade genética com as espécies do grupo 5.

CONCLUSÕES

Através dos marcadores moleculares de RAPD foi possível estabelecer que as espécies de *Brachiaria* estudadas apresentam amplo intervalo de dissimilaridade (0,262 a 0,907) entre acessos e cultivares comerciais.

Esses dados indicam uma alta variabilidade genética dentro de cada espécie, o que justifica a manutenção de todos os acessos estudados no banco de germoplasma e servem de subsídio para programas de melhoramento no gênero *Brachiaria*.

Pode-se verificar uma correlação entre a dissimilaridade média dos acessos de uma mesma espécie e a sua distribuição natural no continente Africano. Espécies com distribuição natural estreita, como *B. decumbens* e *B. ruziziensis* apresentaram menor dissimilaridade genética, enquanto que, espécies com ampla distribuição natural apresentaram altos valores de dissimilaridade.

Foi possível agrupar os acessos e cultivares comerciais de *Brachiaria*, através dos marcadores moleculares de RAPD, ferramenta que poderá auxiliar na construção de uma chave taxonômica para o gênero.

REFERÊNCIAS

ASSIS, G. M. L. et al. Discriminação de Espécies de *Brachiaria* Baseada em Diferentes Grupos de Caracteres Morfológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 576-584, 2003.

CIEMENT, C. R. Melhoramento de espécies nativas In: NASS, L. L. et al. (Eds.). **Recursos genéticos & melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso, 2001. pp. 423-441.

BUSO, G. S. C. **Marcadores moleculares e análise filogenética**. Brasília: Embrapa Recurso Genéticos e Biotecnologia, 2005. (Documentos, 137).

CLARK, A. G.; LANIGAN, C. M. S. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 1096-1111, 1993.

CHANDRA, A. et al. Estimation of genetic variation in "Dichanthium annulatum" genotypes by the RAPD technique. **Tropical Grasslands**, v. 38, n. 4, p. 245-258, 2004.

CHIARI, L. et al. Estimativa da variabilidade genética em acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando marcadores RAPD.. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43. 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006.

CRUZ, C. D. **Programa genes: análise multivariada e simulação**. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 175 p.

CRUZ, C. D. Programa Genes - Aplicativo computacional em genética e estatística. Disponível em: <www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>. Acesso em: 15 maio 2007.

DONG, Z. et al. Study on the genetic diversity of vetiver grass ("Vetiveria zizanioides"). In: XU L.Y. (Ed.) "Vetiver and water - an eco-technology for water quality improvement, land stabilization, and environmental enhancement". Guangzhou: **Chinese Academy of Sciences**, p.524-531, 2003.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p.11-15, 1987.

HEUN, M.; HELENTJARIS, T. Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 961-968, 1993.

KELLER-GREIN, G. et al. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J. W. et al. (Eds.). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Cali: CIAT, 1996. p.18-45.

LACERDA, D. R. et al. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Instituto de Ciências Biológicas**, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2002.

PARKER, P. G. et al. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 361-382, 1998.

RENVOIZE, S. A. et al. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trinius) Griseberg. In: MILES, J. W. et al. (Eds.). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Cali: CIAT, 1996. p.1-17.

ROCHA, M. et al. Variabilidade genética em acessos de quatro espécies de *Brachiaria* usando marcadores RAPD. In: ENEBIO - ENCONTRO ESTADUAL DE BIOLOGIA DE MATO GROSSO DO SUL. 2., 2006, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Universidade Católica Dom Bosco, 2006.

SIMMONS, M. P. A penalty of using anonymous dominant markers (AFLPs, ISSRs, and RAPDs) for phylogenetic inference **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, p. 528-542, 2007.

STEWART Jr, C. N.; EXCOFFIER, L. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). **Journal of Evolutionary Biology**, v. 9, p. 153-171. 1996.

TELLES, M. P. C. et al. Marcadores RAPD na análise de divergência genética entre raças de bovinos e número de loci necessários para a estabilidade da divergência estimada. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.2, n.2, p. 87-95, 2001.

VALLE, C. B. **Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 33 p, 1990. (Documento, 46).

VILELA-MORALES, E.; VALOIS, A. C. C. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.17, n.2, p.11-42, 2000.

VIRK, P. S. et al. Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. **Heredity**, v. 74, p. 170-179, 1995.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

ZIMMER, A. H.; EUCLIDES F. K. As pastagens e a pecuária de corte brasileira. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 1., 1997. **Anais...** Viçosa: UFV, 1997. p.379.

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: Temas em Evidência, 2000, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2000. p. 1-49.

ZORZATTO, C. et al. Estudo da variabilidade genética de acessos de *Brachiaria dictyoneura* usando marcadores RAPD. In: ENEBIO - ENCONTRO ESTADUAL DE BIOLOGIA DE MATO GROSSO DO SUL, 2., 2006. Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Universidade Católica Dom Bosco, 2006.