

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ISOENZIMÁTICA DE ACESSOS DE
Bromus auleticus TRINIUS (EX-NEES)**

FABIANA YURIKO YANAKA
Zootecnista/UEM

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Zootecnia
Área de concentração Plantas Forrageiras

Porto Alegre (RS), Brasil
Julho de 2002

AGRADECIMENTOS

À Deus,

À minha família pelo incentivo e apoio,

À EMBRAPA/CPPSUL e a seus pesquisadores pela assistência para com este projeto,

Ao professor Miguel Dall’Agnol pela amizade, dedicação e orientação,

Ao CNPq pela bolsa de estudo,

Aos colegas Daniel Montardo e Tatiana Boff pela amizade e incentivo,

Aos bolsistas José Mauro, Juliano, Rogério e Thiago pelo auxílio em diversos momentos,

A todos os colegas que, de uma forma ou de outra, ajudaram na realização deste projeto.

Ao meu noivo, amigo e companheiro Alan pela dedicação, carinho, estímulo e compreensão, e a quem dedico este trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Características do gênero <i>Bromus</i> L.	6
2.2. Características da espécie <i>Bromus auleticus</i> Trinius ex Nees.....	7
2.3. Marcadores genéticos.....	13
2.3.1. Isoenzimas.....	15
2.3.2. Marcadores Moleculares.....	19
2.3.3. RAPD.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Origem do Material Vegetal.....	27
3.2. Germinação do Material.....	27
3.3. Eletroforese de Isoenzimas.....	29
3.3.1. Sistemas Enzimáticos.....	29
3.3.2. Extração de Proteínas.....	30
3.3.3. Preparo dos Géis.....	31
3.3.4. Aplicação das Amostras no Gel.....	32
3.3.5. Eletroforese.....	32
3.3.6. Revelação e Fixação dos Géis.....	33
3.3.7. Análise dos Géis.....	34
3.3.8. Análise Estatística.....	36
3.4. Marcadores RAPD.....	37

3.4.1. Extração de DNA.....	37
3.4.2. Quantificação de DNA.....	38
3.4.3. Amplificação e Resolução.....	39
3.4.4. Análise Estatística dos dados de RAPD.....	42
3.5. Cálculo das distâncias geográficas entre os acessos.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Isoenzimas.....	44
4.1.1. Sistema Peroxidase (PO) – análise entre acessos.....	44
4.1.2. Sistema Peroxidase (PO) – análise dentro de cada acesso	51
4.1.3. Sistema Esterase (EST) – análise entre acessos.....	53
4.1.4. Sistema Esterase (EST) – análise dentro de cada acesso..	60
4.1.5. Avaliação entre acessos considerando os dois sistemas....	62
4.1.6. Avaliação dentro dos acessos considerando os dois sistemas.....	65
4.2. Marcadores RAPD.....	66
4.2.1. Comparação análise de isoenzimas e RAPD.....	72
5. CONCLUSÕES.....	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
7. APÊNDICE.....	86

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Relação das sementes de <i>Bromus auleticus</i> , seus respectivos coletores, local de coleta, latitude, longitude e altitude.....	28
2. Sistemas enzimáticos testados e respectivas siglas.....	30
3. Composição da solução utilizada para a extração de proteínas.....	31
4. Composição da solução estoque para preparo do gel de poliacrilamida 8%.....	32
5. Composição do tampão TPS utilizado na extração de DNA.....	38
6. Relação dos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para estudo de caracterização de acessos de <i>Bromus auleticus</i>	41
7. Variabilidade isoenzimática detectada com o sistema peroxidase (PO).....	44
8. Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 9 acessos de <i>Bromus auleticus</i>	48
9. Valores dos coeficientes de similaridade média (coeficiente de Jaccard) entre os acessos de <i>Bromus auleticus</i> , obtidos através das informações dos sistemas peroxidase e esterase individualmente e juntos.....	49
10. Valores das distâncias geográficas entre os diferentes acessos de <i>Bromus auleticus</i>	50
11. Valores dos coeficientes de similaridade médios (coeficiente de Jaccard) para os 09 acessos de <i>Bromus auleticus</i> , obtidos através das informações dos sistemas peroxidase e esterase juntos e individualmente.....	52
12. Variabilidade isoenzimática detectada pelo sistema Esterase (EST) em 9 acessos de <i>Bromus auleticus</i> ,	55

13. Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase, incluindo 13 isoenzimas para 9 acessos de *Bromus auleticus*..... 58
14. Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para os sistemas Esterase e Peroxidase, incluindo 45 isoenzimas para 9 acessos de *Bromus auleticus*..... 63
15. Matriz de similaridade genética obtida através dos dados do coeficiente de Jaccard, para 12 acessos de *B. auleticus*..... 71
16. Coeficientes de similaridade de Jaccard para os acessos comuns nas análises de isoenzimas e RAPD (células hachuradas)..... 73

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Distribuição da espécie <i>Bromus auleticus</i> no Estado do Rio Grande do Sul (Longhi-Wagner, 1987).....	8
2. Placa de Petri contendo sementes de <i>Bromus auleticus</i>	29
3. Plantas de <i>Bromus auleticus</i> mantidas em casa de vegetação.....	29
4. Esquema das cubas eletroforéticas horizontais.....	33
5. Termocicladores PTC-100 (<i>Programmable Thermal Controller MJ Research, INC.</i>) utilizados para amplificação das seqüências de DNA.....	40
6. Esquema das cubas de eletroforese utilizadas para RAPD.....	41
7. Câmera digital adaptada ao transiluminador U.V.	42
8. Gel para avaliação dos padrões de peroxidase (PO). Da esquerda para a direita os padrões de cinco indivíduos e duas repetições dos acessos 16 e 06.....	47
9. Gel para avaliação dos padrões de peroxidase (PO). Da esquerda para a direita os padrões de cinco indivíduos e duas repetições dos acessos 09 e 07.....	47
10. Fenograma de similaridade genética utilizando o coeficiente de Jaccard de 9 acessos de <i>Bromus auleticus</i> para o sistema Peroxidase.....	48
11. Gel para avaliação dos padrões de esterase (EST). Da esquerda para a direita os padrões de cinco indivíduos e duas repetições dos acessos 06 e 16.....	56
12. Gel para avaliação dos padrões de esterase (EST). Da esquerda para direita os padrões de cinco indivíduos e duas repetições dos acessos 15 e 13.....	56

13. Gel para avaliação dos padrões de esterase (EST). Da esquerda para direita os padrões de cinco indivíduos e duas repetições dos acessos 07 e 09.....	57
14. Fenograma de similaridade genética utilizando o coeficiente de Jaccard de 9 acessos de <i>Bromus auleticus</i> para o sistema Esterase.....	59
15. Fenograma de similaridade genética utilizando o coeficiente de Jaccard de 9 acessos de <i>Bromus auleticus</i> , considerando os sistemas Esterase e Peroxidase.....	64
16. Padrões de bandas obtidas com o iniciador D para 17 indivíduos do acesso 03 e 16 indivíduos do acesso 05. A primeira linha foi utilizada como padrão (100pb).....	67
17. Padrões de bandas obtidos com o iniciador D para o conjunto de indivíduos dos acessos 01, 02, 03, 04, 05, 06, 17 (não incluído na análise final), 08 e 09. Nas sete primeiras linhas não foi observado nenhum fragmento amplificado.....	68
18. Fenograma de similaridade genética obtido através de dados do coeficiente de Jaccard, utilizado para a análise de agrupamento, para 12 acessos de <i>B. auleticus</i>	72

1. INTRODUÇÃO

A caracterização de germoplasma é importante em qualquer projeto que envolva recursos genéticos, seja com objetivo do conhecimento, avaliação, manejo ou conservação destes recursos. Ela deve ser baseada em múltiplas abordagens, pois diferentes enfoques de um mesmo problema levam a resultados mais abrangentes e confiáveis. E dentre as várias abordagens possíveis, o uso de marcadores genéticos têm sido uma das técnicas mais utilizadas.

Marcadores genéticos são características qualitativas com herança mendeliana simples, facilmente reconhecidos e cuja expressão não é influenciada pelo ambiente. Os primeiros marcadores genéticos utilizados foram características morfológicas. Entretanto, esses marcadores freqüentemente são controlados por genes dominantes, não permitindo distinguir plantas heterozigotas (Robinson, 1998).

Marcadores genéticos bioquímicos e moleculares, além de serem identificáveis em qualquer idade da planta, não interferem com o processo biológico que se deseja estudar. Por definição, os marcadores genéticos bioquímicos são produtos da expressão do gene (proteínas ou compostos secundários). Marcadores genéticos moleculares derivam da análise do polimorfismo presente no próprio DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Até a década de 60, aproximadamente, a caracterização era mais acentuadamente morfológica. Apesar da grande contribuição desta para a construção das primeiras versões de mapas genéticos (Ferreira e Grattapaglia,

1998), seus pequenos números reduziu a probabilidade de se encontrar associações significativas deles com caracteres de importância econômica. Além disso, são expressos somente na planta adulta e são usualmente influenciados pela ação do ambiente e por outros fatores genéticos (Molina, 1999).

Devido a estes fatores, a utilização dos marcadores morfológicos para descrever as complexas estruturas genéticas que podem existir dentro e entre espécies fica limitada (Avisé, 1994). Para superar isto, diversas técnicas têm sido utilizadas para a detecção de variabilidade, incluindo o uso de isoenzimas (Soltis e Soltis, 1989) e de técnicas baseadas na reação em cadeia polimerase (PCR). Estes marcadores são geralmente independentes de fatores ambientais e mais numerosos que os caracteres morfológicos (Avisé, 1994).

O desenvolvimento dos marcadores isoenzimáticos proporcionou uma revolução neste quadro, considerando que o número de marcadores genéticos disponíveis foi ampliado e a aplicabilidade da técnica passou a incluir potencialmente todas as espécies de plantas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Isoenzimas são os marcadores bioquímicos mais utilizados no melhoramento vegetal. Elas são detectadas e visualizadas por coloração química no gel para a proteína em questão. Esta técnica têm sido utilizada para caracterização da diversidade genética (Huang *et al.*, 1998, Spinoso *et al.*, 1998, Fuentes *et al.*, 1999, Buso *et al.* 1998, Díaz *et al.*, 2000, Rivas, 2001), estudos filogenéticos (Matos *et al.*, 2001, Jobim-Delor *et al.*, 1997), identificação de híbridos (Elisário *et al.*, 1999), delimitação e conservação da espécie (González e Schifino-Wittmann, 1996), determinação do modo de

reprodução (Rivas, 2001) e em estudos evolutivos (Jaaska, 1997). Além disso, a relativa simplicidade e o baixo custo fazem desta técnica de ampla utilização (Avisé, 1994).

Com o progresso na biologia molecular, surgiram métodos modernos de detecção de polimorfismo ao nível de DNA proporcionando aos geneticistas uma nova ferramenta para a análise dos genes e seus efeitos sobre o fenótipo (Buso *et al.*, 1998). Dentre as diversas técnicas moleculares hoje existentes, a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990) provavelmente é a mais utilizada, pois permite a amplificação do DNA genômico com iniciadores de seqüências arbitrárias de nucleotídeos, garantindo a detecção de polimorfismo na ausência de informação sobre a seqüência de nucleotídeos que compõe o DNA a ser analisado. Além disso, requer uma pequena quantidade de DNA, é mais simples e de baixo custo comparada a outras técnicas moleculares (Hadrys *et al.*, 1992).

RAPD tem sido largamente utilizado em caracterização de genótipos (Lu *et al.*, 1996), para determinar a variabilidade genética intra ou inter populacional (Campos-de-Quiroz e Ortega-Klose, 2001, Bustos *et al.*, 1998, Croft *et al.*, 1999, Gustine e Huff, 1999, Kölliker *et al.*, 1999), identificação de híbridos (Elisários *et al.*, 1999, Mösges e Friedt, 1994) e estudos de relacionamento genético entre espécies e cultivares (Machado *et al.*, 1996).

Uma tendência atual é a reunião de informações obtidas pela análise de isoenzimas com aquelas obtidas com marcadores moleculares (Buso *et al.*, 1998).

Tendo em vista que a cevadilha vacariana (*Bromus auleticus* Trinius ex-Nees) tem demonstrado ser uma forrageira de boa adaptação às regiões frias do Estado, onde persiste por vários anos, e ter apresentado uma grande variabilidade morfológica de acessos, é importante que se realizem estudos sobre a variabilidade genética apresentada por esta espécie, apontando a possibilidade de trabalhos de melhoramento genético. Esta espécie também atende à filosofia de trabalho do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia desta Universidade, uma vez que é nativa do Rio Grande do Sul e apresenta várias características que a coloca entre as melhores forrageiras para outono/inverno neste estado. Trabalhos iniciais de caracterização e avaliação de uma população de *Bromus auleticus* visando a seleção de plantas com características superiores já foram realizados neste mesmo Departamento (Soares, 1999).

Porém, ainda com respeito à espécie, existe muito pouco material disponível na literatura mundial e as informações são muito escassas a respeito de isoenzimas e marcadores moleculares, embora existam algumas informações para outras espécies do gênero.

Portanto, com a aplicação destas técnicas para caracterizar as diferentes espécies e populações deste gênero, poder-se-á dar continuidade aos trabalhos de caracterização agrônômica já realizados com a espécie, contribuindo assim com obtenção de informações que poderão ser utilizadas para estabelecer relações entre as espécies e avaliar a variabilidade intrapopulacional.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de caracterizar acessos de *Bromus auleticus* ocorrentes no Rio Grande do Sul através de seus padrões de isoenzimas e RAPD e, com base nestas informações, estabelecer relações entre estes acessos e subsidiar trabalhos de melhoramento genético da espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem do material vegetal

As sementes de *Bromus auleticus* utilizadas são provenientes do Banco de Germoplasma de Forrageiras do Centro de Pesquisa dos Campos Sul Brasileiros - CPPSUL (Embrapa/Bagé), coletadas em Bagé, Livramento, Uruguaiana, Itaara, Júlio de Castilho, Pinheiro Machado, Dom Pedrito e Cruz Alta (Gomes *et al.*, 2000) e em Quaraí, Santiago e Livramento por outros coletores, e nomeadas de 1 a 16, conforme TABELA 1.

3.2. Germinação do material

A superação da dormência das sementes foi obtida com um pré-resfriamento das sementes à 5-10°C por 7 dias seguindo-se de tratamento com KNO₃ 0,2%.

Para a germinação, as mesmas foram colocadas sobre papel filtro umedecido com Clorotalonil 1% em placas de Petri previamente esterilizadas a fim de se evitar a proliferação de fungos (FIGURA 2). As placas foram mantidas em germinadores com temperatura entre 20 e 30°C. As sementes iniciavam a germinação com aproximadamente dez dias sendo o tempo máximo de germinação de 28 dias. Após atingirem de dois a três centímetros, as plântulas foram transplantadas para copos plásticos com terra e mantidas em casa de vegetação (FIGURA 3).

Para as análises, foi estabelecida uma população de dez indivíduos de cada genótipo e destes foram coletadas amostras de tecidos foliares jovens.

Durante o período das análises, foi realizada reposição de nutrientes e manutenção do solo nos vasos.

TABELA 1 – Relação das sementes de *Bromus auleticus*, seus respectivos coletores, local de coleta, latitude, longitude e altitude.

Genótipo	Coletores ⁽¹⁾	Local	Latitude	Longitude	Altitude
01	GoDu 87	Bagé	31°11' S	53°50' W	300
02	GoRg 119	Bagé	31°09' S	53°48'W	330
03	OvGoMgGu 64	Livramento	30°35' S	56°02'W	220
04	OvGoMgGu 66	Livramento	30°39' S	56°05'W	220
05	OvGoMgGu 69	Livramento	30°34' S	56°04'W	200
06	OvGoMgGu 78	Uruguiana	29°57' S	56°56'W	190
07	OvGoMgGu 97	Itaara	29°24' S	53°40'W	510
08	GoRg 121	Júlio de Castilhos	29°19' S	53°40'W	490
09	GoOv 59	Pinheiro Machado	31°33' S	53°25'W	415
10	GoOv 62	Dom Pedrito	31°04' S	54°30'W	180
11	OvRgVj 44	Pinheiro Machado	31°31' S	53°31'W	420
12	GoLe 110	Livramento	30°33' S	56°07'W	196
13	OvGoGu 107	Cruz Alta	28°37' S	53°25'W	440
14	Freitas	Santiago	n.o. ⁽²⁾	n.o. ⁽²⁾	n.o. ⁽²⁾
15	Schilick	Livramento	n.o. ⁽²⁾	n.o. ⁽²⁾	n.o. ⁽²⁾
16	Quirino	Quaraí	n.o. ⁽²⁾	n.o. ⁽²⁾	n.o. ⁽²⁾

⁽¹⁾Go= Klecius Ellera Gomes, Du= Gustavo Moglia Dutra, Rg= Rudnei Gomes, Ov= João Carlos Pinto Oliveira, Mg= Magda Benavides, Gu= Adriana Guglieri, Vj= Carlos Valejo, Le= Eli Lemos

⁽²⁾n.o. = valores não observados.



FIGURA 2 – Placa de Petri contendo sementes de *Bromus auleticus*.



FIGURA 3 – Plantas de *Bromus auleticus* mantidas em casa de vegetação.

3.3. Eletroforese de isoenzimas

3.3.1. Sistemas enzimáticos

Inicialmente foram avaliados oito sistemas (TABELA 2), porém seis destes tiveram sua utilização impossibilitada pelo fato de não se ter conseguido ajustar condições satisfatórias de resolução.

Em função disto, foram testados dois sistemas enzimáticos: β -esterase (β -EST) e peroxidase (PO).

TABELA 2 – Sistemas enzimáticos testados e respectivas siglas.

Sistema enzimático	Sigla
Álcool Desidrogenase	ADH
Enzima Málica	ME
β -Esterase	β -EST
Fosfogluco Isomerase	PGI
Glucose Desidrogenase	GDH
Isocitrato Desidrogenase	IDH
Peroxidase	PO
Superóxido Dismutase	SOD

3.3.2. Extração de proteínas

Amostras de tecido foliar jovem foram coletadas e submetidas à extração de proteínas e separação através de eletroforese de isoenzimas.

A maceração do tecido foliar foi realizada utilizando um bastão, em placas de vidro com pequenas cavidades onde foi colocada a amostra de tecido e 20 μ l de solução extratora (Latorre, 1996) (TABELA 3) na qual se acrescentou β -Mercaptoetanol 0,014M no momento da extração. Durante este processo, as placas eram mantidas sobre o gelo para evitar a desnaturação das proteínas.

Após a maceração, colocou-se 20 µl da solução de Azul de Bromofenol (1%) na primeira e última cavidade. Sobre as mesmas, colocou-se papel cromatográfico com dimensões de 3 x 1 mm, o qual absorve a solução e é aplicado diretamente no gel.

A solução de Azul de Bromofenol (1%) é composta de 0,1 g de Azul de Bromofenol e 100 ml de Álcool Etilico (Etanol).

TABELA 3 – Composição da solução utilizada para extração de proteínas (Latorre, 1996).

Reagente	Concentração (M)	Qtde para 200 ml (g)
Tris-HCl (Ph 7,6)	0,050	1,211
KCl	0,010	0,149
MgCl ₂ 6.H ₂ O	0,010	0,406
EDTA (Tetrasódico)	0,001	0,076

3.3.3. Preparo dos géis

Foram utilizados géis de poliacrilamida a uma concentração de 8%.

Os tampões utilizados para o preparo dos géis foram os tampões A e B Scandalios (1969) na proporção 1A : 9B (APÊNDICE 1).

Para o preparo do gel, foi feito inicialmente uma solução estoque (TABELA 4) que foi mantida em geladeira por no máximo 30 dias. Ao preparar a solução final, a uma alíquota de 70 ml da solução estoque se acrescentou 0,07 ml de tetrametiletilenodiamida (TEMED) e 0,7 ml de solução de persulfato de amônia (AP) 10%.

TABELA 4 – Composição da solução estoque para preparo do gel de poliacrilamida 8%.

Tampão A + Tampão B (180 ml B + 20 ml A)	200 ml
Acrilamida	15,20 g
N, N' – metileno-bis-acrilamida (BIS)	0,80 g

A solução final foi colocada para polimerizar em suportes de vidro de dimensões 16,5 x 13,9 cm e tapado com placa de vidro, previamente umedecida com óleo mineral para evitar dificuldade no momento da retirada do gel, cuidando-se para evitar a formação de bolhas.

O gel permaneceu por 20 minutos em temperatura ambiente até polimerização e após, foi mantido em geladeira.

3.3.4. Aplicação das amostras no gel

Após retirada do gel da geladeira, retirou-se cuidadosamente a placa de vidro e com um pente de aço inox possuindo 24 dentes de 0,4 cm cada e distância de 0,3 cm entre eles, foram feitos os orifícios para serem colocados os papéis de aplicação. Na primeira e na última cavidade foram aplicadas amostras da planta controle coletadas em um canteiro de *Bromus auleticus*.

3.3.5. Eletroforese

O gel com as amostras aplicadas foram colocados entre duas cubas eletroforéticas horizontais contendo 600 ml Tampão A e mantidos em geladeira

a 4°C (FIGURA 4). Para ligação entre o gel e o tampão utilizou-se pontes de Perfex duplo. O tampão foi trocado a cada seis corridas.

A distância entre o ponto de aplicação das amostras e a ponte foi de um centímetro e entre uma ponte e outra de 12 cm.

Durante a migração, o gel foi coberto com uma película de filme de PVC para evitar evaporação e foi mantida uma tensão elétrica constante de 100V sem limite de corrente. Em intervalos de dez minutos a voltagem era conferida até estabilização, que demorava cerca de uma hora.

A distância de migração foi padronizada em 7,5 cm e durou cerca de 2,5 horas.

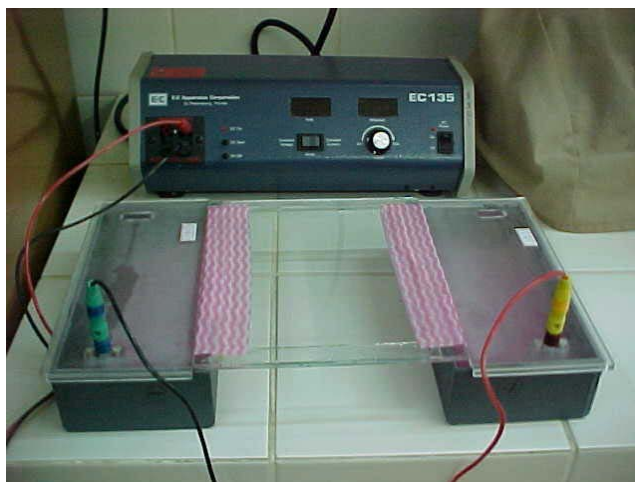


FIGURA 4 – Esquema das cubas eletroforéticas horizontais.

3.3.6. Revelação e fixação dos géis

Os géis foram retirados da cuba, colocados para revelação e, para a coloração das isoenzimas de esterase, foi utilizada metodologia segundo Schifino-Wittmann (1996), descrita no APÊNDICE 2.

A revelação da esterase se realizou incubando-se o gel no escuro por 30 a 60 minutos em temperatura de 37°C. Terminada a coloração, os géis foram lavados e fixados por 10 minutos em solução de álcool : ácido acético : água destilada na proporção de 5 : 5 : 1.

Para coloração da peroxidase foi utilizada metodologia segundo Gottlieb (1973) (APÊNDICE 3).

Primeiramente dissolveu-se o 3-amino-metil-carbazol na Dimetilformamida, agitando para evitar precipitação. Após, foram acrescentados os demais reagentes sendo a água oxigenada aplicada por último, no momento da coloração.

A revelação durou cerca de 30 minutos e realizou-se à temperatura ambiente. Após, o gel foi lavado e fixado em solução contendo 450 ml de álcool metílico, 110 ml de ácido acético e 440 ml de água destilada durante 15 minutos.

Após a fixação dos géis, estes foram envoltos por filme de PVC, devidamente identificados e foi realizada a sua leitura com o auxílio de um transiluminador de luz branca. O registro destes géis foi realizado desenhando as bandas em filme plástico e após, os géis foram estocados a 4°C.

3.3.7. Análise dos géis

A análise dos géis foi realizada logo após o registro em plástico, utilizando-se régua milimetrada e medindo-se a distância entre o ponto de aplicação e cada banda. A medida da distância percorrida pela linha de frente se fez necessária, apesar da mesma ter sido padronizada em 7,5 cm, devido a

possíveis problemas técnicos ocorrentes durante a eletroforese, tais como diminuição da força iônica dos tampões, contatos desiguais nas pontes eletroforéticas e ao resfriamento desigual do gel (Alfenas *et al.*, 1991). Estes fatores podem ocasionar uma migração desigual de uma mesma isoenzima em géis diferentes.

Para contornar estes problemas, calculou-se a mobilidade das bandas em relação a uma banda, selecionada do indivíduo controle, que foi constante, nítida e de identificação segura.

Os valores da migração de cada banda foram divididos pelo valor da respectiva linha de frente, obtendo-se assim, valores da migração relativa das bandas (**mr**). Em seguida, fez-se a conversão do valor da migração da banda a um valor relativo à banda controle, dividindo-se a distância de migração da enzima pela distância de migração da enzima controle, obtendo desta forma o **mr'**.

Calculou-se então um fator de correção através da média dos valores da **mr** das bandas controle de todos os géis.

Os valores de migração relativa real (**MR**) das bandas foram determinados multiplicando-se o **mr'** de cada uma pelo fator de correção, permitindo assim a localização de bandas homólogas e a comparação dos resultados obtidos com os de outros autores, porém apresentando a desvantagem de subestimar parte da variabilidade intra-específica existente no loco correspondente à banda escolhida como controle (González, 1994).

3.3.8. Análise estatística

A comparação entre as espécies foi feita baseada na presença (1) ou ausência (0) de bandas. Não foram feitas determinações de locos e alelos neste trabalho.

Optou-se por subestimar a variabilidade intraloco do que considerar como variabilidade genética o que poderiam ser variações devido a problemas da técnica. Dias (1998) citou que para se obter dados concretos sobre a natureza da variabilidade (ambientais ou genéticos) são necessários que os dados tenham sido obtidos em condições experimentais, com observação de princípios como número ótimo de indivíduos, emprego de repetição no espaço e tempo, de casualização e de controle local.

A medida de variabilidade utilizada foi o coeficiente de Jaccard, largamente utilizado em estudos de biologia, e muito eficiente para comparar populações de uma mesma espécie, onde as concordâncias são mais freqüentes. Este coeficiente também é indicado para fenótipos não interpretáveis ao nível de locos e alelos (Alfenas *et al.*, 1991).

O método de agrupamento utilizado foi o método da média das distância (UPGMA – *Unweighted Pair-Group Method using an Arithmetic Average*) cujo princípio geral é o de maximizar a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos.

Para o cálculo do índice de similaridade, agrupamento e construção dos fenogramas utilizou-se o programa computacional “*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*” NTSYSpc versão 2.10m (Rohlf, 1997).

3.4. Marcadores RAPD

3.4.1. Extração de DNA

Semelhantemente à extração de proteínas, o DNA foi extraído de folhas jovens coletadas no momento da extração, segundo protocolo de Thomson e Henry (1995) modificado. O tecido foi macerado em pistilo de porcelana na presença de nitrogênio líquido e acondicionado em microtubos. Após, foi acrescentado 300 µl do tampão TPS (TABELA 5) e mantidos durante dez minutos em banho-maria a 95°C.

Após este período, retirando os ependorfes do banho-maria, foi feita a centrifugação dos mesmos por dez minutos a 13000 rpm para separar os restos de folha. Separou-se o sobrenadante e os restos de folha foram descartados.

Acrescentou-se 600 µl de etanol 95% e 90 µl de acetato de sódio 3M (pH 5,2) para a precipitação do DNA. Após, realizou-se centrifugação por cinco minutos a 13000 rpm e descartou-se o sobrenadante.

O precipitado formado de DNA foi lavado primeiramente com 500 µl de etanol 70%, centrifugado por cinco minutos, novamente lavado com 500 µl de etanol 70%, centrifugado por 30 segundos. O líquido sobrenadante foi descartado e o DNA ressuspenso em 100 µl de TE e guardado em freezer.

TABELA 5 – Composição do tampão TPS utilizado na extração de DNA.

Reagente	Concentração	Quantidade
Tris HCl	1 M	10 ml
KCl	1M	86 ml
EDTA	1M	4 ml

3.4.2. Quantificação de DNA

Após a extração, o DNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro Espectronic Gênesis 2. Para quantificação, foi realizada diluição de 5 µl da solução mãe de DNA em 495 µl de água miliq. e foram feitas medições de 260 nm e 280 nm, respectivamente de DNA e proteína. A proporção destas duas medições verificava a qualidade do DNA (1,6 a 2,0 foi considerado DNA de boa qualidade).

A concentração de DNA foi determinada pela fórmula:

$$[\text{DNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{A \times B \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}}{1000}$$

sendo:

A = leitura no comprimento de onda de 260 nm

B = 100 (fator de diluição)

50 µg/µl = fator de conversão

Após a quantificação, foram feitos conjuntos (*bulk*) de DNA contendo dez indivíduos por acesso. Para isto, juntou-se 2 μg de DNA de cada um dos dez indivíduos e foi preparada uma solução com concentração final de 25 ng DNA, de onde se retirou 1 μl para realização do PCR.

3.4.3. Amplificação e resolução

Inicialmente foram testados nove iniciadores (*primers*). Os que propiciaram a amplificação de fragmentos (oito) foram utilizados para os estudos de caracterização da espécie.

As seqüências de DNA dos diferentes conjuntos foram amplificadas em termocicladores PTC-100 (Programmable Thermal Controller MJ Research, INC.) (FIGURA 5) com os diferentes iniciadores (TABELA 6) fornecidos pela Empresa Biogen. Cada ciclo de amplificação foi composto de 1 minuto a 92°C para desnaturação, 1 minuto a 37°C para anelamento do iniciador com o DNA e 2 minutos a 72°C para extensão do fragmento. Este processo compreendeu em 39 ciclos no total e ao final do 39º ciclo, um ciclo de 5 minutos à 72°C foi realizado para completar a reação. Por fim, a temperatura foi estabilizada em 4°C por tempo indefinido.



FIGURA 5 – Termocicladores PTC-100 (*Programmable Thermal Controller MJ Research, INC.*) utilizados para amplificação das seqüências de DNA.

Os componentes para reação consistiram em 1,0 μl de solução com o conjunto de DNA (25 ng/ μl), 1,30 μL de 10x PCR buffer, 0,39 μl de MgCl_2 , 3,0 μl de iniciador (5 ng/ μl), 0,20 μl de *Taq* DNA polimerase e 0,26 μl de 10 mM dNTP mix contendo os quatro nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), cada um numa concentração de 10 mM. O volume final dos tubos de reação foi completado com água destilada para 10 μl .

As seqüências amplificadas de DNA foram separadas em gel de agarose 1,5 %, submetido a uma tensão elétrica de 100 Volts, em tampão TBE 1x (Tris, Ácido bórico, EDTA e água) (FIGURA 6), coradas em brometo de etídio (0.15 $\mu\text{l}/\text{ml}$) e fotografada sobre iluminação UV. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados com a utilização do programa Kodak EDAS 290 (Electrophoresis Documentation and Analysis System) comparando-se com o padrão de 100 pares de base.

Os géis foram registrados utilizando câmera digital Kodak adaptada ao transiluminador (FIGURA 7).

TABELA 6 – Relação dos iniciadores (*primers*) utilizados para estudo de caracterização de acessos de *Bromus auleticus* Trinius.

Primer A	5' – TTC GAG CCA G – 3'
Primer B	5' – GTG AGG CGT C – 3'
Primer C	5' – GGG GGT CTT T – 3'
Primer D	5' – CCG CAT CTA C – 3'
Primer E	5' – GAT GAC CGC C – 3'
Primer F	5' – GAA CGG ACT C – 3'
Primer G	5' – GTC CCG ACG A – 3'
Primer H	5' – TGG ACC GGT G – 3'
Primer I	5' – CTC ACC GTC C – 3'

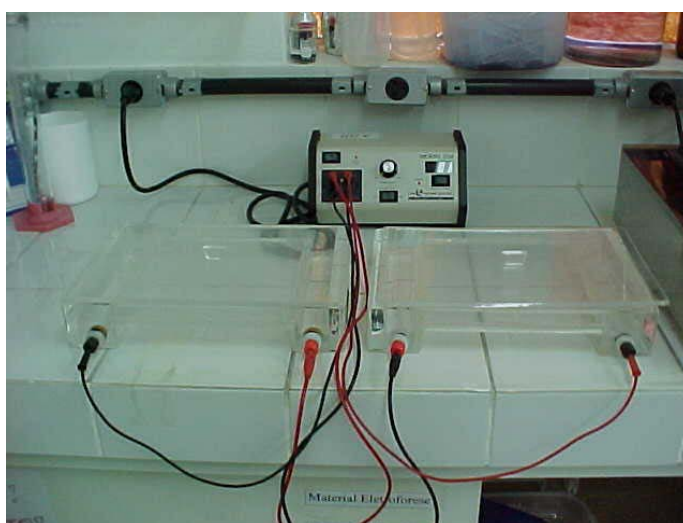


FIGURA 6 – Esquema das cubas de eletroforese utilizadas para RAPD.



FIGURA 7 – Câmera digital adaptada ao transiluminador U.V..

3.4.4. Análise estatística dos dados de RAPD

Os padrões de bandas gerados pelos RAPDs foram analisados baseados na presença (1) ou ausência (0) de cada banda em todos os acessos.

Semelhantemente às análises de isoenzimas, o coeficiente utilizado foi o de Jaccard e através destes, foi realizada a análise de agrupamento utilizando o método da média das distâncias (UPGMA- *Unweighted Pair-Group Method using an Arithmetic Average*), e os cálculos do índice de similaridade, agrupamento e construção dos dendogramas foram realizados com o auxílio do programa computacional NTSYSpc versão 2.10m (Rohlf, 1997).

3.5. Cálculo das distâncias geográficas entre os acessos

A estimativa das distâncias geográficas (D_{geog}) entre todos os locais de coleta de todos os acessos foi realizada baseada na latitude (Lat) e longitude (Long) utilizando a equação citada por Steiner *et al.* (2001), descrita por:

$$D_{\text{geog}} = \sqrt{\{(Long_a - Long_b) \times (\pi r / 360) \times \\ \times [\cos(Lat_a) + \cos(Lat_b)]\}^2 + \\ + \{(\pi r / 180) \times [\cos(Lat_a) + \cos(Lat_b)]\}^2}$$

Onde $Long_a$ e $Long_b$ são as Longitudes dos locais de coleta **a** e **b**; $\cos(Lat_a)$ e $\cos(Lat_b)$ os respectivos cossenos das latitudes dos locais de coleta **a** e **b**; e r o raio da terra (6378km).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características do gênero *Bromus* L.

O gênero *Bromus* L. (Poaceae) é taxonomicamente muito complexo com cerca de 130 espécies anuais e perenes, diplóides e poliplóides e de larga distribuição geográfica, sendo várias destas de grande valor forrageiro. O gênero possivelmente se originou na Eurásia (Stebbins, 1981) e se encontra distribuído na Europa, Ásia, África, Austrália, América do Norte e América do Sul. Faz parte da família *Poaceae* (*Gramineae*), tribo *Festuceae* (Rosengurtt *et al.*, 1970).

São conhecidos sete subgêneros maiores dentro deste gênero: *Neobromus*, *Ceratochloa*, *Festucaria*, *Stenobromus*, *Nevskiella*, *Bromus* e *Boissiera* (Stebbins, 1981).

Sua reprodução é por autogamia ou fecundação cruzada. O gênero apresenta também uma grande variação no tamanho do cromossomo e nível de ploidia (Armstrong, 1991).

Apresenta diversos aspectos que possibilitam sua ampla colonização, tais como variabilidade morfológica, plasticidade fenotípica, hibridização e poliploidia, o que faz ser um gênero de grande interesse evolutivo. Sua distribuição é predominante em regiões temperadas (Longhi-Wagner, 1987).

Com relação aos aspectos morfológicos, as plantas do gênero *Bromus* L. são cespitosas, raramente com rizomas, com inovações intra ou extravaginais, bainhas fechadas ou semi-abertas, lígula membranosa, inteira

ou dilacerada, aguda ou com bordos denteados, glabra ou com pêlos no dorso. Prefoliação convoluta ou conduplicada. As inflorescências são panículas abertas ou contraídas com espiguetas multifloras (Longhi-Wagner, 1987).

Longhi-Wagner (1987) citou, no Rio Grande do Sul, as espécies *Bromus auleticus* Trin. ex Nees, *Bromus brachyanthera* Doell, *Bromus catharticus* Vahl, *Bromus commutatus* Schrader e *Bromus mollis* L..

2.2. Características da espécie *Bromus auleticus* Trinius ex Nees

Bromus auleticus Trinius, ou cevadilha vacariana, é uma espécie nativa, perene, com crescimento hibernar e sem latência estival (Moraes e Oliveira, 1990), com ampla distribuição nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e também na Argentina e Uruguai, que tem se destacado pela sua precocidade de produção e qualidade de forragem (Oliveira e Moraes, 1993).

Sua distribuição no estado do Rio Grande do Sul pode ser observada na Figura 1.

Barreto (1963) avaliando as principais espécies que compõe as pastagens naturais do Rio Grande do Sul, classificou a cevadilha vacariana como uma espécie perene, de hábito cespitoso, com todas as características aceitáveis como planta forrageira e cuja época de melhor utilização é inverno/primavera.

Rosengurtt (1979) classificou a espécie como perene e cespitosa, às vezes com rizomas, com colheita de sementes nos meses de novembro e dezembro, que possui uma alta diversidade de ecótipos, reúne as melhores

características como planta forrageira em termos de produção e qualidade, e cuja forragem é áspera, mas apetecida pelos animais, sendo que sua apetecibilidade é prolongada.

Smith *et al.* (1981) citaram que é uma planta característica do planalto meridional do Brasil onde apresenta ampla e descontínua dispersão, porém com inexpressivo número de indivíduos, sendo encontrada também na região da Campanha do RS, nos municípios de Livramento, Uruguai (Smith *et al.*, 1981) e Bagé (Gonçalves *et al.*, 1988).

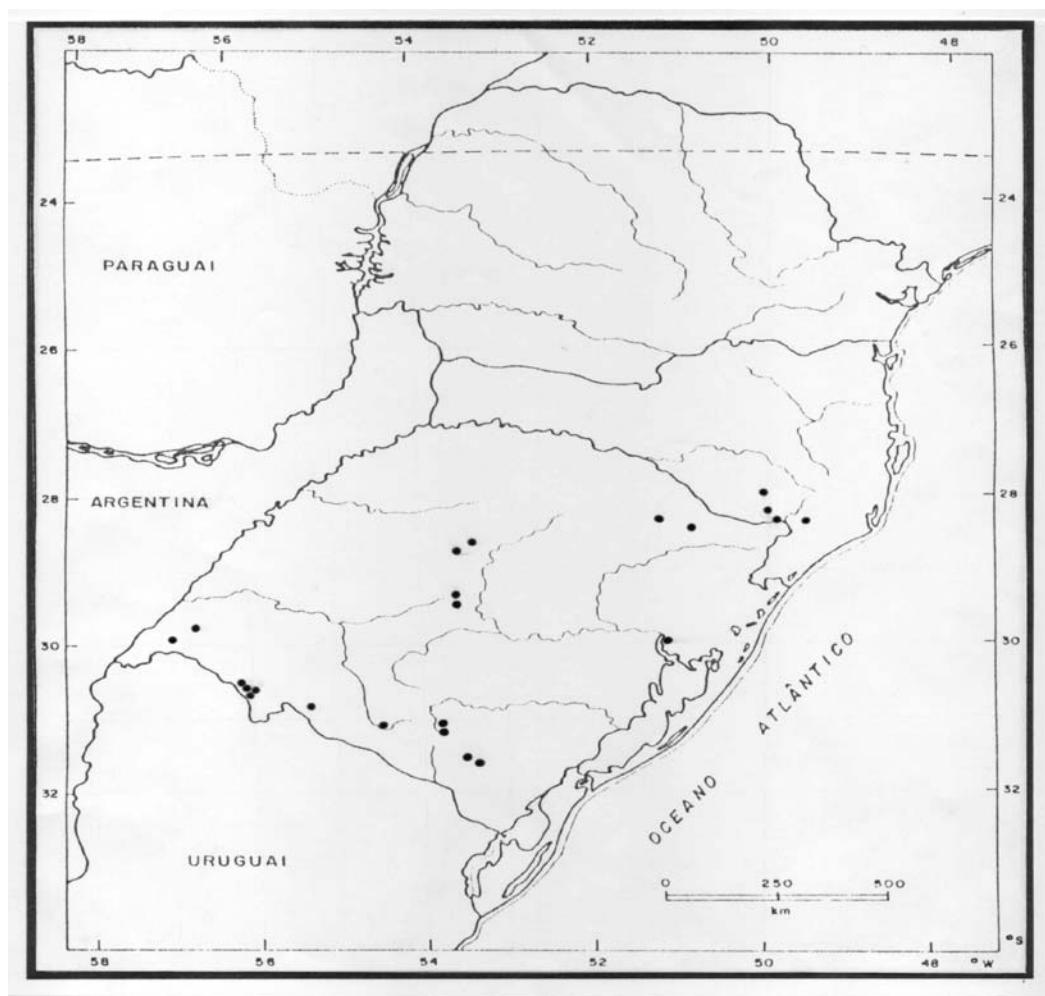


FIGURA 1 – Distribuição da espécie *Bromus auleticus* no estado do Rio Grande do Sul.

Há muito tempo ensaios de produtividade da espécie *B. auleticus* têm sido conduzidos no Rio Grande do Sul. Na Estação Experimental de Vacaria, da Secretaria da Agricultura do RS, desde 1952 esta espécie já era estudada em ensaios de competição com outras gramíneas perenes, para a produção de massa verde e em experimentos de adubação. Nos anos posteriores, ainda foram realizados ensaios de época de semeadura, consorciação com cereais de inverno e com leguminosas, e os resultados mostraram produções semelhantes às obtidas com as espécies tradicionalmente cultivadas (Rio Grande do Sul, 1952, 1953, 1954, 1956).

É uma espécie de pouca aptidão para solos argilosos e com problemas de drenagem, mas ainda assim, Oliveira e Moraes (1993) avaliando a produção e qualidade da forragem de *Bromus auleticus* concluíram que esta é uma espécie que apresenta grande potencial para uso futuro em cultivo como uma forrageira perene de estação fria por sua distribuição uniforme de produção durante o período crítico de produção do campo nativo e pela qualidade que ela apresenta.

No Uruguai, Allegri e Formoso (1984), em estudo comparativo de *Festuca arudinacea*, *Phalaris aquatica* e *Bromus auleticus* cultivados em diferentes solos, concluíram que sobre solos arenosos, *B. auleticus* se destacou pela maior produção de matéria seca hiberna e anual e por sua alta persistência.

Sua alta capacidade de persistir mesmo durante o verão e sua grande resistência ao desfolhamento se deve a diversas características morfo-

fisiológicas, como primórdios foliares e pontos de crescimento localizados sob a superfície do solo, afilhamento extravaginal, formando rizomas subterrâneos, curtos e profundos. Estas características conferem à planta um hábito de crescimento ereto, enraizamento profundo e vigoroso, grande capacidade de rebrote a partir de substâncias de reserva, além do ciclo hibernar com florescimento precoce e simultâneo e tolerância a altas temperaturas e intensidade de luz (Milot, 2000). Moraes *et al.* (1998) comparando a espécie com outras perenes de inverno destacam a sua perenidade com relação às demais espécies avaliadas. As observações feitas neste experimento mostraram que as linhas com a espécie *B. auleticus* continuam com todas as plantas vigorosas e as demais espécies, como *Dactylis*, *Holcus* e *Festuca*, não persistiram.

Rosengurtt (1946) considerou a espécie como um pasto viçoso. Suas principais características são: crescimento inicial lento, com folhas medianas, iniciando a germinar na primavera e alcançado o pico de produção ao final do segundo ano. Na estação experimental de Vacaria (Rio Grande do Sul, 1958) esta espécie desenvolveu-se lentamente e os trabalhos de pastejo foram recomendados para serem iniciados após um ano de implantação (Rio Grande do Sul, 1958).

Moraes *et al.* (1998) confirmaram o lento crescimento da espécie no ano de estabelecimento e a melhoria de sua performance, com relação à produção de matéria seca, a partir do segundo ano.

Outros trabalhos realizados confirmaram a alta qualidade da forragem produzida pela espécie durante todo o ano. Oliveira e Moraes (1993)

obtiveram teores de proteína bruta variando de 7,25 a 14,40% no verão, 13,25 a 20,69% no outono e 22,43 a 29,54% no inverno. Já Olmos (1993), revelou que o teor de proteína da espécie no mês de junho do primeiro ano de avaliação foi de 21,2% e no mês de julho do ano seguinte foi de 13,8%.

A produção de semente é bastante variada em função da diversidade genética existente. Avaliações realizadas para produção de sementes constataram uma grande variação dentro da espécie (Moraes e Oliveira, 1990; Methol e Freire, 1990; Millot *et al.*, 1990; Soares, 1999)

A diversidade na produtividade e nos caracteres morfológicos faz da espécie *Bromus auleticus* uma espécie de características importantes para o melhoramento vegetal. No Banco de Germoplasma do Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sul Brasileiros (CPPSUL) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, em Bagé (EMBRAPA/Bagé), existe uma coleção de 54 genótipos desta espécie oriundas do Uruguai (Moraes e Oliveira, 1990). Recentemente, cultivares vêm sendo lançados no Uruguai, resultado da caracterização de cerca de 200 materiais (Moliterno *et al.* 1998).

Soares *et al.* (2000) avaliaram populações de cevadilha vacariana originárias de Dom Pedrito-RS, em área experimental da EMBRAPA-CPPSUL (Bagé-RS) e obtiveram uma alta variabilidade na produção de matéria seca total, com produtividade entre 0,61 e 46,99g por planta (média de $10,95 \pm 8,24$ g por planta). Neste trabalho, ainda foi observado que a espécie em estudo não apresentou dormência estival pois as produções de primavera e verão contribuíram com 31 e 24% da produção total, respectivamente, representando 55% do total anual produzido. As produções de outono e inverno contribuíram

com 45% da produção total, sendo 24% no outono e 21% no inverno. Observaram ainda uma taxa de crescimento maior no inverno, seguido pelo outono. Além disso, em relação à persistência das plantas, foi observado que apenas 10% das 272 plantas avaliadas não persistiram até o segundo ano de avaliação, indicando a alta persistência da espécie.

Com relação ao sistema reprodutivo da espécie, existem dados contraditórios. De acordo com estudos realizados por Traverso e von der Pahlen (1982), a variabilidade morfológica observada dentro das populações de *Bromus auleticus* permitem inferir que a espécie apresenta uma alta porcentagem de alogamia.

Por outro lado, Freyre e Methol (1982) avaliando a variabilidade em *Bromus auleticus* sugeriram reprodução por apomixia ou autogamia, considerando a baixa variação interna das populações e a repetibilidade de caracteres morfológicos das folhas e presença ou ausência de rizoma.

Oliveira *et al.* (1999), avaliando 48 acessos da espécie provenientes do Uruguai, realizaram cruzamentos dialélicos e teste de progênie e observaram alogamia e autoincompatibilidade na espécie.

Uma revisão realizada por Latorre (1996) propõe origens sexuais dos sacos embrionários de *Bromus auleticus*, descartando assim a apomixia como sistema reprodutivo. Esta autora, avaliando o sistema reprodutivo e a estrutura populacional de *B. auleticus* concluiu através de padrões de isoenzimas que a estrutura genética populacional da espécie corresponde com uma espécie alógama, as quais são heterozigotas e produzem progênies variáveis.

Considerando todos os resultados obtidos com cevadilha vacariana, pode-se concluir que é uma espécie de grande potencial, e, portanto, com condições para estudos mais aprofundados, tal como sua caracterização, objetivando uma maximização do aproveitamento da mesma, principalmente no período de inverno, onde a disponibilidade de forragem para o rebanho é reduzida.

2.3. Marcadores genéticos

Inicialmente, os progressos observados nos programas de melhoramento eram exclusivamente devido à análise de caracteres morfológicos. Os marcadores utilizados eram até então marcadores controlados por genes associados a caracteres morfológicos como cor de pétala, morfologia foliar, etc..., ou seja, fenótipos de fácil identificação visual.

Porém, o uso destes marcadores fica limitado, visto que na maioria dos casos, os marcadores morfológicos não eram ligados a genes de importância econômica e os mesmos muitas vezes podem ser influenciados pela ação do ambiente e por outros fatores genéticos.

Além disso, os marcadores morfológicos em geral se expressam somente na planta adulta, fazendo com que haja uma necessidade de tempo para ser feita a análise.

O grande progresso nesta área se deu com o desenvolvimento de marcadores genéticos, mais especificamente, os marcadores bioquímicos isoenzimáticos que possibilitaram uma ampliação no número de marcadores genéticos disponíveis e também superaram a dificuldade em obter dados que

não fossem diretamente influenciados pelo meio ambiente (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Por definição, os marcadores genéticos podem ser classificados em bioquímicos, que são produtos da expressão do gene, e moleculares, que derivam da análise do polimorfismo presente no próprio DNA.

Atualmente, diversas técnicas de biologia molecular são disponíveis para análise genômica possibilitando a verificação de polimorfismo de seqüências de DNA em vários pontos do genoma, e com isto, é possível fazer estimativa de vínculo genético entre variedades ou acessos de uma espécie (Paterson *et al.*, 1995).

A estruturação da variabilidade genética e os diferentes padrões nas populações das plantas são essenciais para o entendimento do processo evolutivo, o desenvolvimento de estratégias apropriadas e eficientes de conservação e a coleção e preservação de espécies nativas importantes (Frankel e Bennett, 1970).

Populações naturais são fonte de variabilidade para os programas de melhoramento genético. São também as unidades sobre as quais incide o manejo para a produção e conservação dos recursos naturais. Para as mais diversas aplicações práticas, o interesse em marcadores se concentra em quantificar a variabilidade genética, descrever como esta se distribui entre e dentro de populações e como podem ser manipuladas (Robinson, 1998).

Há alguns anos atrás, o interesse na estrutura genética de populações naturais aumentou devido à necessidade de alargar a base genética e, em muitos casos, à necessidade de uma melhor caracterização das

mesmas. O desenvolvimento das tecnologias moleculares tem sido para os geneticistas uma poderosa ferramenta a ser utilizada na análise de genes e seus efeitos no fenótipo (Buso *et al.*, 1998).

2.3.1. Isoenzimas

Isoenzimas (ou isozimas) são definidas como diferentes formas moleculares de uma enzima catalisando uma mesma reação na célula. Quando as isoenzimas são controladas por alelos de um único loco, elas são chamadas de aloenzimas. Estas representam a consequência bioquímica da substituição, deleção ou adição de um ou mais aminoácidos no polipeptídeo, afetando a sua carga elétrica e, conseqüentemente, a sua mobilidade durante a eletroforese (Weeden e Wendel, 1990). A mobilidade da molécula através do gel depende também do seu peso molecular e de sua conformação. A aplicação de um campo elétrico permite às moléculas migrarem a uma determinada taxa, em função da sua carga elétrica e do pH do meio.

Para estudar uma determinada enzima, é necessário dispor de técnica específica de coloração que permita a visualização de bandas no gel. Os dados obtidos no gel são o número e mobilidade relativa dos produtos enzimáticos (Weeden e Wendel, 1990).

A principal vantagem da utilização das isoenzimas para estudar a variação genética consiste no fato das seqüências de aminoácidos das proteínas estarem determinadas pelos locos que as codificam e, portanto, a análise da estrutura de uma proteína usando eletroforese, é uma primeira aproximação da análise de um gene (Latorre, 1996).

Ao analisar os padrões isoenzimáticos, deve-se considerar que esses podem apresentar diferentes isoenzimas em tecidos distintos das plantas, que certas isoenzimas podem estar presentes em um estado de desenvolvimento e ausentes em outro, e ainda que as mesmas isoenzimas podem estar presentes em tecidos distintos, porém em quantidades diferentes (Ferreira e Grattapaglia, 1998)

A caracterização de genótipos por isoenzimas pode ter uma análise genética ou não-genética. Esta última determina o grau de similaridade entre genótipos simplesmente comparando seus zimogramas contando o número de bandas com mobilidades similares ou diferentes, sem mencionar o controle genético das mesmas. Este tipo de análise, apesar de não ser o mais adequado, pode ser realizado quando não se tem informações prévias do número de locus e alelos (Simpson e Withers, 1986).

Apesar da grande utilização recente das técnicas moleculares, as isoenzimas ainda são largamente empregadas para a delimitação e conservação de espécies (Lange e Schifino-Wittman, 2000; González e Schifino-Wittmann, 1996), análise da variabilidade genética em espécies e populações (Schifino-Wittmann *et al.*, 1996) e estudo evolutivos (Jaaska, 1997). Esta técnica ainda tem sido muito utilizada em estudos taxonômicos, genéticos, evolutivos, ecológicos (Lange, 2000) e identificação de linhagens e cultivares (Daher, 1997).

As principais utilizações da técnica de isoenzimas são (Robinson, 1998):

- a) Sistemas de cruzamento em plantas e seus efeitos sobre a estrutura genética e variabilidade em populações.
- b) A diferenciação geográfica de populações dentro de espécies.
- c) Os fatores ecológicos que controlam o fluxo gênico dentro de populações.
- d) Os componentes de seleção natural durante o ciclo de vida da planta.
- e) A relação entre variabilidade de isoenzimas e características morfológicas.
- f) A caracterização de germoplasma.
- g) As relações evolutivas entre espécies como a hibridação, a introgressão e a poliploidia.
- h) A identificação de clones e a caracterização de genótipos parentais em cruzamentos.

Moore e Collins (1983) destacaram particularmente o uso de isoenzimas para o estudo da estrutura genética de populações e do sistema reprodutivo em plantas.

Estudos com várias espécies do gênero *Bromus* L. objetivando determinar diversidade genética, relacionamento da diversidade com localização geográfica e delimitação de espécies foram realizados utilizando-se da técnica de isoenzimas. Oja e Jaaska (1996) concluíram que as isoenzimas foram ótimos marcadores para serem utilizados na diferenciação genética de espécies de *Bromus*. Ainouche *et al.* (1995), igualmente, observaram uma grande diversidade genética em 25 populações do gênero *Bromus* L. utilizando

padrões de isoenzimas, que concordaram com as origens das mesmas e por sua vez, justificaram tal diversidade.

Oja e Jaaska (1998) e Oja (1998) determinaram o modo de reprodução e a afinidade genética de espécies do gênero *Bromus* através dos padrões isoenzimáticos, demonstrando que a utilização desta técnica foi eficiente para o entendimento do relacionamento filogenético dentro do gênero *Bromus* e que estes marcadores foram eficazes em estudos de diferenciação genética entre espécies.

Latorre (1996) também determinou o sistema reprodutivo e a estrutura genética de populações de *Bromus auleticus* através da análise da variação isoenzimática de progênies e cujos resultados sustentaram a hipótese que a população avaliada apresentava estrutura genética típica de espécies alógamas, aspecto este que deve ser considerado nos programas de conservação, melhoramento e produção de sementes.

Mais recentemente, Dalagnol (2000) utilizou dados de isoenzimas e RAPD para caracterizar os acessos e estimar a taxa de cruzamento das progênies de *Bromus auleticus*. Este estudo mostrou a eficiência da técnica de isoenzimas na estimação da diversidade genética entre os acessos, revelando uma ampla base genética entre eles, colocando a espécie entre aquelas com elevado índice de diversidade genética. Este autor demonstrou ainda que, pelo fato da espécie estudada ser predominantemente alógama, na opção pela formação de variedades sintéticas, a manutenção da variabilidade é facilitada, considerando que além de ganho significativo nas características quali-

quantitativas, procura-se sempre manter uma base genética ampla, que poderá conferir à cultivar oportunidade para adaptação a ambientes diversos.

Vários estudos com outras espécies forrageiras foram conduzidos utilizando-se a técnica de isoenzimas. González e Schifino-Wittmann (1996) obtiveram resultados que sustentam a utilização da técnica de isoenzimas para caracterização de germoplasma e estabelecimento de relações entre espécies de *Lathyrus* L. e *Vicia* L.

Daher *et al.* (1997) avaliaram a diversidade de 60 acessos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) utilizando padrões de isoenzimas e caracteres morfológicos, obtendo resultados concordantes na formação dos padrões de similaridade com base nos dados morfológicos e isoenzimáticos.

Para confirmar o modo de reprodução de dois biótipos de *Paspalum dilatatum*, Gauer *et al.* (2001) analisaram a ocorrência de variabilidade entre plantas e endosperma através de dados de isoenzimas onde, dos oito sistemas avaliados, apenas em dois foi observada a ocorrência de variabilidade na progênie, sugerindo a ocorrência de reprodução sexual.

2.3.2. Marcadores moleculares

O advento de técnicas bioquímicas e moleculares baseadas na análise de polimorfismos de enzimas e mais tarde de fragmentos de DNA, possibilitou a rápida proliferação do uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Estes marcadores, baseados no polimorfismo de DNA, têm inúmeras vantagens, destacando-se o fato de não serem influenciados pelo ambiente e

serem independentes do estágio da vida da planta (Molina, 1999; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Diversas são as aplicações de metodologias baseadas em marcadores moleculares no melhoramento de plantas. Entre elas, pode-se citar (expandidas e modificadas de Beckmann, 1991):

- a) Identificação de origem parental e teste de paternidade,
- b) Identificação e proteção de variedades ou clones patenteados,
- c) Avaliação de germoplasma e populações de melhoramento (variabilidade, diversidade, distância genética e filogenia),
- d) Construção de mapas genéticos de ligação,
- e) Mapeamento genético,
- f) Introgessão de características via retrocruzamentos assistidos por marcadores,
- g) Seleção assistida por marcadores moleculares.

Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) (Grodzicker *et al*, 1974). Mais recentemente, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma enzima DNA polimerase levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares. A reação em cadeia de DNA polimerase (PCR), como é chamado o processo, oferece uma nova metodologia para análise da variabilidade genética e apoio ao melhoramento vegetal.

2.3.3. RAPD

A reação em cadeia polimerase (PCR) tem sido utilizada para o desenvolvimento de vários sistemas de marcadores e, provavelmente, o mais utilizado é o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990) que permite a amplificação de DNA genômico pela PCR usando iniciadores de seqüência arbitrária (Molina, 1999).

Dentre os diferentes marcadores moleculares, este foi o que ganhou popularidade mais rapidamente (Jenczewski *et al.*, 1999). É hoje uma tecnologia estabelecida e amplamente utilizada para gerar informação sobre a variabilidade ao nível de DNA para as mais diversas aplicações na análise genética. É um marcador simples e rápido de se obter (Hadrys *et al.*, 1992).

As aplicações mais comuns incluem mapeamento genético, genética de populações, sistemática molecular, identificação de genótipos e seleção assistida por marcadores no melhoramento de plantas. A possibilidade de se obter um grande número de marcadores genéticos sem qualquer informação prévia sobre a genética do organismo, a rapidez e simplicidade na aquisição dos dados, o baixo custo e acessibilidade desta tecnologia tem sido os principais fatores que levaram à sua rápida adoção por diversos grupos de pesquisa no mundo.

O polimorfismo é inferido simplesmente através de segmentos de DNA que são amplificados em uns indivíduos e em outros não. Este polimorfismo é definido em função da presença ou ausência de bandas e refletem a seqüência de bases do local (ponto) do genoma onde ocorreu o anelamento do iniciador com a fita de DNA (Williams *et al.*, 1990).

A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementaridade do iniciador com o sítio de iniciação e assim impedir a amplificação de um segmento (Williams *et al.*, 1990). Outras fontes de polimorfismo incluem deleções de sítios de iniciação ou inserções (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O número de marcadores RAPD amplificados e visualizados na eletroforese depende exclusivamente do comprimento do iniciador utilizado e do tamanho e complexidade do genoma analisado. A freqüência de amplificação de um segmento depende da probabilidade do iniciador utilizado encontrar duas seqüências complementares (sítios de iniciação) em orientação oposta ao longo do DNA e

a uma distância amplificável, ou seja, de no máximo alguns milhares de pares de bases (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato deles se comportarem como marcadores genéticos dominantes, que os impede de separar através de bandas visualizadas nos géis, indivíduos homozigotos dos heterozigotos.

Diversos trabalhos aplicando a técnica para estudos de espécies de interesse forrageiro vêm sendo conduzidos. Kölliker *et al.* (1999) utilizaram marcadores RAPD e características de crescimento vegetativo para determinar a variabilidade genética entre cultivares de *Festuca pratensis*, *Lolium perene* e *Dactylis glomerata*, espécies estas de grande importância como plantas forrageiras. Tais estudos demonstraram consideráveis diferenças na variabilidade genética dentro dos cultivares das espécies, que podem influenciar na adaptabilidade e persistência individual de cada uma, sendo que nas três espécies, a que apresentou menor variabilidade foi *F. pratensis*.

Marcadores RAPD foram utilizados por Kongkiatngam *et al.* (1996) para identificação de cultivares de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.), sendo que neste mesmo estudo, foram avaliados diferentes números de indivíduos por grupos de amostragem (*bulk*) e foi demonstrado a reprodutibilidade do método, fato este considerado um importante critério para a aplicação de uma técnica molecular. Como resultados relacionados com os padrões de RAPD, observaram um alto nível de polimorfismo entre os 15 cultivares de trevo vermelho; o número ideal de indivíduos para a formação dos grupos de amostragem foi de 20 indivíduos; e ainda concluíram que dados de RAPD são ferramentas eficazes para identificação de cultivares.

Gustine e Huff (1999) avaliaram a dinâmica populacional e a variabilidade genética em populações de trevo branco (*Trifolium repens* L.) sob pastejo contínuo, através da análise dos padrões de RAPD de indivíduos amostrados em diferentes localidades. Estes padrões de RAPD demonstraram eficazmente que os indivíduos analisados foram separados tanto pelos diferentes locais de coleta realizados em um mesmo estado como em diferentes épocas (verão e outono). Entretanto, não ocorreu a separação quando coletados em diferentes estados, demonstrando que a espécie é prontamente adaptável às mudanças ambientais.

Esta mesma técnica foi utilizada em outro trabalho com populações de trevo branco para obter dados de variabilidade genética, através dos quais, pôde-se determinar que a diversidade genética persiste em populações com alta incidência de clones (Gustine e Sanderson, 2001).

Campos-de-Quiroz e Ortega-Klose (2001) utilizaram marcadores RAPD para determinar a relação genética e para acessar a diversidade genética existente entre um grupo de 16 linhagens de trevo vermelho e cujos resultados mostraram que a técnica foi uma ferramenta eficaz para a determinação da variabilidade genética, agrupamento de germoplasma e para acessar os efeitos do melhoramento sob a variabilidade genética de trevo vermelho, informações estas que podem ser úteis num possível desenvolvimento de populações sintéticas, na medida em que há um melhor embasamento para a seleção dos parentais.

Steiner e Garcia de los Santos (2001) caracterizaram genótipos de *Lotus corniculatus* L. através de caracteres morfológicos e marcadores de RAPD, determinando a relação entre estes dois tipos de marcadores e relacionando-os com as características ecogeográficas dos respectivos locais de coleta. Os resultados mostraram que os dados de RAPD foram concordantes com os dados de características morfológicas e que a distância geográfica observada entre os locais de coleta não foi associada à distância genética, porém a similaridade ecológica foi relacionada à similaridade genética. Estes resultados mostram que a classificação da espécie pelos marcadores RAPD só podem ser confiáveis para as características ecogeográficas e morfológicas dos acessos se os mesmos forem associados à similaridade ecológica e não com a proximidade geográfica.

A avaliação da diversidade genética utilizando marcadores morfológicos relacionados aos marcadores RAPD também foi utilizada por Crochemore *et al.* (1998) para estudar populações de alfafa. Os autores observaram que a separação dos grupos se deu melhor com a avaliação de caracteres morfológicos do que com marcadores RAPD, porém, ambos marcadores obtiveram uma ampla variabilidade em populações selvagens, mostrando que estas representam um grande “estoque” de variabilidade para futuro melhoramento da espécie.

Ainda que existam diversos estudos com várias espécies forrageiras utilizando a técnica de RAPD, avaliações com espécies de *Bromus auleticus* ainda são raras.

Dalagnol (2000) caracterizou geneticamente 11 acessos, quatro progênies e dois sintéticos da espécie utilizando marcadores RAPD e isoenzimáticos. Nesta avaliação, determinou-se que, apesar dos

marcadores RAPDs terem caráter dominante, estes possuem maior capacidade na detecção de polimorfismo, devido ao grande número de iniciadores que podem ser utilizados, comparados à co-dominância das isoenzimas, as quais possuem um número restrito de locos que podem ser acessados. Utilizando os dois resultados, o autor concluiu que, apesar da baixa similaridade detectada, os índices de diversidade genética revelaram uma base genética ampla nos cultivares sintéticos formados, fator este importante para a manutenção de uma base genética ampla quando se opta na formação de variedades sintéticas.

Ainouche *et al.* (1999) utilizaram técnicas de RAPD e dados de seqüência de DNA para estimar ao grau de similaridade entre *Bromus hoerdeaceus* tetraplóide e suas espécies diplóides relativas, pertencentes à mesma seção. Variação interespecífica consistente foi encontrada e todos os marcadores foram polimórficos entre taxa, e cada espécie pareceu ser caracterizada por um único padrão eletroforético para cada iniciador.

Como estudos da variabilidade dentro da população de *Bromus auleticus* nativa do sul do Brasil são escassos, são necessários novos estudos, com a utilização de técnicas eficientes e precisas. A associação dos marcadores RAPD a um marcador co-dominante poderá ampliar os dados necessários para estimar a variabilidade existente nestes materiais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isoenzimas

As análises apresentadas a seguir foram realizadas baseadas nos dados dos MR encontrados nas zonas de atividade de cada sistema. Portanto, os resultados apresentam as isoenzimas observadas em cada acesso e não os padrões isoenzimáticos individuais. As determinações de locos e alelos não foram realizadas pois, para a mesma, seria necessário primeiro um tamanho de amostras muito maior do que a utilizada e, para uma comprovação, uma análise de progenitores.

4.1.1. Sistema Peroxidase (PO) – análise entre acessos

Para o sistema peroxidase, foram encontradas 32 isoenzimas representadas na TABELA 7. A ordenação das isoenzimas foi iniciada pela região mais anódica.

TABELA 7 – Variabilidade isoenzimática detectada com o sistema peroxidase (PO).

ISOENZIMA	MR	ACESSOS								
		03	04	06	07	09	13	14	15	16
<i>PO32</i>	1.14		--	--						
PO31	1.10		--	--					--	
PO30	1.08			--						
PO29	1.05		--	--					--	
PO28	1.03			--					--	
PO27	1.00		--	--				--		--
PO26	0.98		--					--	--	

... Continuação
TABELA 7 – Variabilidade isoenzimática detectada com o sistema peroxidase (PO).

ISOENZIMA	MR	ACESSOS									
		03	04	06	07	09	13	14	15	16	
PO25	0.96		--	--	--					--	
PO24	0.94	--		--	--		--	--	--		
PO23	0.91	--		--	--			--		--	
PO22	0.89				--			--		--	
PO21	0.87	--	--					--		--	
PO20	0.84			--	--			--		--	
PO19	0.82				--		--	--		--	
PO18	0.79							--			
PO17	0.73	--			--		--			--	
PO16	0.68						--			--	
PO15	0.62		--	--							
PO14	0.59			--				--	--		
PO13	0.57			--				--			
PO12	0.54						--	--		--	
PO11	0.52						--	--		--	
PO10	0.50	--						--			
PO9	0.46							--		--	
PO8	0.43							--			
PO7	0.36						--				
PO6	0.34							--			
PO5	0.30							--	--	--	
PO4	0.27							--	--	--	
PO3	0.25						--	--		--	
PO2	0.23	--			--	--	--				
PO1	0.14	--					--	--		--	

Não foi observada nenhuma banda comum a todos os acessos.

Neste sistema ocorreu no MR= 1.08 uma banda que é exclusiva para o acesso

06, resultado este que mostra o grande polimorfismo detectado pelo sistema e a alta variabilidade existente entre os acessos da espécie avaliada.

Rivas (2001), avaliando o sistema reprodutivo e a estrutura genética de populações de *B. auleticus*, encontrou 15 bandas com o sistema peroxidase, incluindo bandas encontradas em coleóptilos e em folhas jovens. No total das bandas, somente uma foi monomórfica para a espécie, concordando com os dados do presente trabalho, que não apresentou nenhuma banda monomórfica para o sistema.

Como pode ser observado na TABELA 7, aparentemente ocorre a formação de 4 zonas de migração: a primeira mais lenta (a qual incluiu-se a banda PO1), duas intermediárias (incluindo as bandas PO2, PO3, PO4, PO5, PO6 e PO7 na primeira e as bandas PO8, PO9, PO10, PO11, PO12, PO13, PO14, PO15 e PO16 na segunda) e uma última zona, cuja velocidade de migração é maior, e onde se localizam as bandas PO17, PO18, PO19, PO20, PO21, PO22, PO23, PO24, PO25, PO26, PO27, PO28, PO29, PO30, PO31 e PO32. Porém, não se pode afirmar que estas zonas de migração sejam diferentes locos, pois para isto, seriam necessárias avaliações de progenitores e progênies.

Os padrões das bandas também podem ser visualizados através das FIGURAS 08 e 09 que apresentam os padrões dos diferentes acessos para o sistema peroxidase.

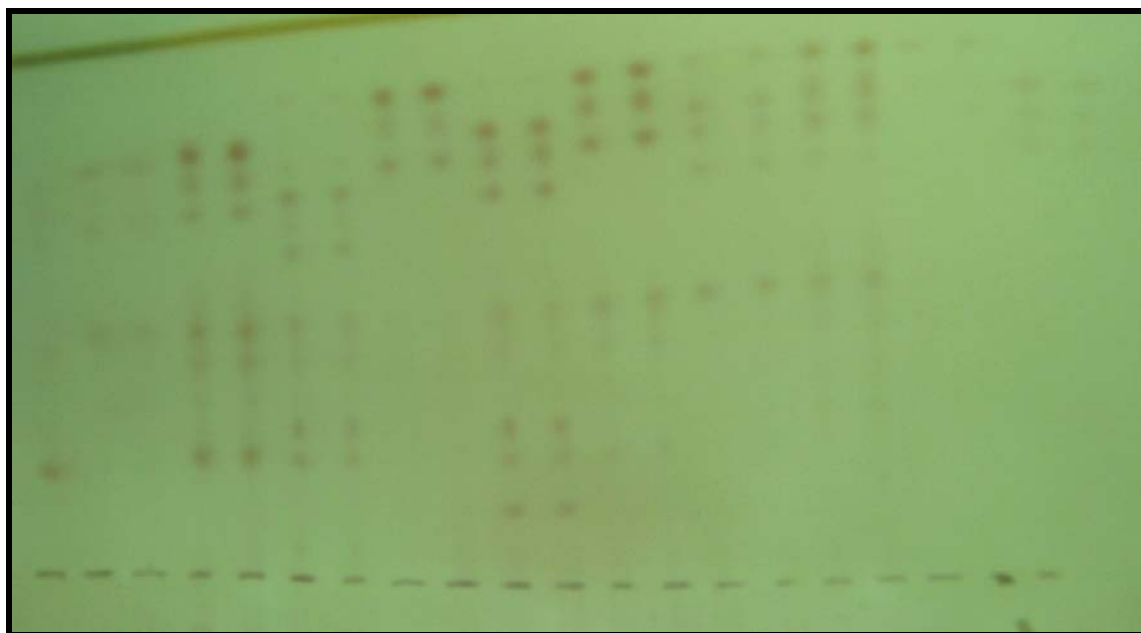


FIGURA 8 – Gel para avaliação dos padrões de peroxidase (PO). Da esquerda para a direita os padrões de cinco indivíduos e duas repetições dos acessos 16 e 06.

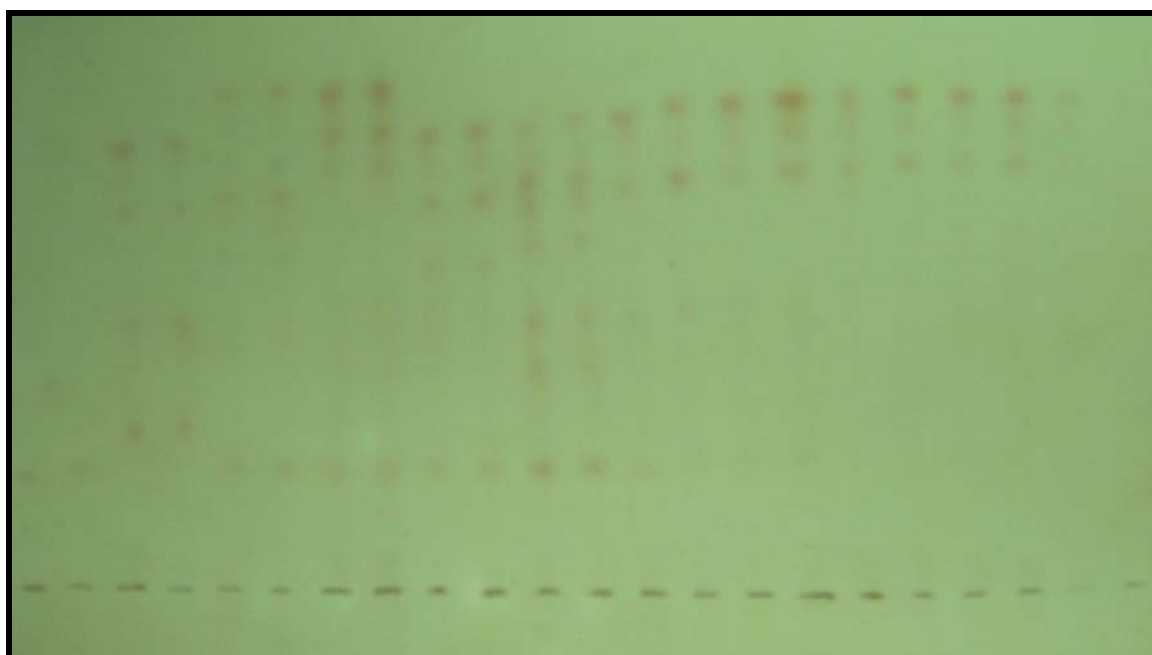


FIGURA 09 – Gel para avaliação dos padrões de peroxidase (PO). Da esquerda para a direita os padrões de cinco indivíduos e duas repetições dos acessos 09 e 07.

A TABELA 8 mostra a matriz de similaridade de Jaccard e a FIGURA 10 o fenograma resultante da análise do sistema peroxidase nos acessos de *Bromus auleticus*.

TABELA 8 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 9 acessos de *Bromus auleticus*.

	3	4	6	7	9	13	14	15	16
3	1,00								
4	0,07	1,00							
6	0,12	0,43	1,00						
7	0,31	0,20	0,38	1,00					
9	0,20	0,06	0,15	0,40	1,00				
13	0,33	0,00	0,05	0,27	0,25	1,00			
14	0,23	0,12	0,23	0,20	0,24	0,26	1,00		
15	0,07	0,23	0,25	0,13	0,12	0,06	0,22	1,00	
16	0,21	0,14	0,17	0,30	0,35	0,32	0,57	0,09	1,00

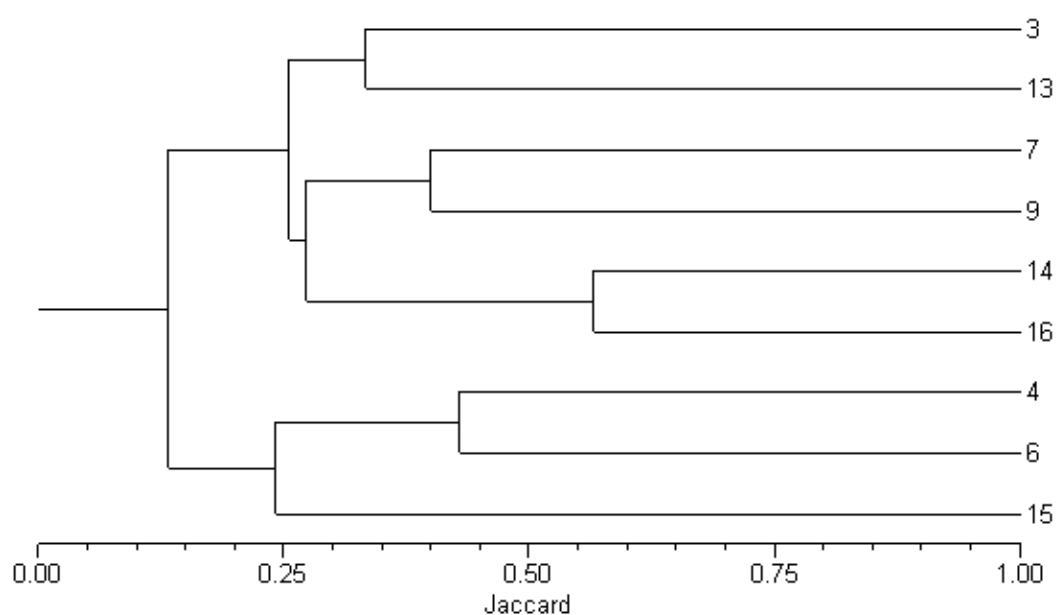


FIGURA 10 – Fenograma de similaridade genética utilizando o coeficiente de Jaccard de 9 acessos de *Bromus auleticus* para o sistema Peroxidase.

Conforme a FIGURA 10, os acessos formaram 3 grupos: o primeiro formado pelos acessos 04, 06 e 15; um segundo formado pelos acessos 07, 09, 14 e 16, e um terceiro grupo formados pelos acessos 03 e 13.

Os acessos que obtiveram um índice de similaridade maior foram os acessos 14 e 16, cujo índice foi de 0,57. Por outro lado, os acessos que mais demonstraram divergência foram os acessos 04 e 13.

O coeficiente de similaridade médio observado para o sistema peroxidase foi relativamente baixo (0,47) (TABELA 09), o que mostra a existência de uma grande variabilidade entre os acessos (intrapopulacional). Apesar desta variabilidade muitas vezes não concordar com os respectivos locais de coleta (TABELA 1) e as respectivas distâncias geográficas (TABELA 10), os dados de similaridade entre os acessos não podem ser relacionados com estes fatores, pois não se tem conhecimento de outras características como condições topográficas, vegetação existente no local de coleta, entre outras.

TABELA 09 – Valores dos coeficientes de similaridade média (coeficiente de Jaccard) entre os acessos de *Bromus auleticus*, obtidos através das informações dos sistemas peroxidase e esterase individualmente e juntos.

SISTEMAS	SIMILARIDADE MÉDIA
Esterase	0,57
Peroxidase	0,47
Esterase e Peroxidase	0,50

TABELA 10 – Valores das distâncias geográficas entre os diferentes acessos de *Bromus auleticus*.

acessos	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13
01	0,00												
02	211,62	0,00											
03	257,36	257,50	0,00										
04	265,49	265,66	111,55	0,00									
05	257,04	257,17	106,72	110,56	0,00								
06	137,74	138,11	24,45	28,33	23,38	0,00							
07	42,88	42,17	15,63	9,34	17,32	174,96	0,00						
08	38,38	37,67	23,04	16,81	24,77	183,36	131,15	0,00					
09	218,78	217,79	281,44	290,08	281,10	155,98	47,72	43,21	0,00				
10	225,85	225,88	207,58	214,25	207,32	110,61	44,10	39,17	242,21	0,00			
11	217,82	216,93	277,09	285,61	276,76	153,50	47,42	42,92	221,70	239,05	0,00		
12	257,32	257,44	105,76	109,59	104,76	22,28	19,08	26,58	281,40	207,55	277,07	0,00	
13	4,70	5,39	97,31	91,38	99,45	272,74	174,62	179,13	0,10	8,20	0,11	101,86	0,00

Estes fatores podem influenciar o genótipo do indivíduo considerando que a espécie em estudo é uma espécie alógama e que, em geral, as espécies de gramíneas forrageiras tem o vento como principal polinizador. Áreas abertas e com topografia favorável são fatores a serem considerados para a dispersão do pólen, e por isso, a falta de dados a respeito do local de coleta impossibilita a associação dos dados obtidos com as distâncias geográficas.

Estudos genéticos com peroxidase podem se tornar limitados devido à complexidade de sistema e também pelo fato de pouco ser conhecido o controle genético e função biológica deste sistema (Scandalios, 1969).

Yamamoto e Fujiware (1986) utilizando isoenzimas em estudos sobre a sistemática de espécies do gênero *Lathyrus*, dentre os cinco sistemas avaliados, um deles era peroxidase, que foi o sistema com resultados mais complicados e com bandas migrando em ambas direções (sendo que a maioria migrou negativamente).

Para avaliar a ocorrência de variabilidade genética entre indivíduos irmãos ou ocorrência de pseudogamia em dois biótipos de *Paspalum dilatatum*,

Gauer *et al.* (2001) avaliaram oito sistemas enzimáticos, sendo que um destes foi o sistema peroxidase, onde foram detectadas 24 bandas e uma grande variabilidade entre plântulas irmãs nos dois biótipos. Também foi observado neste estudo que o sistema peroxidase obteve padrões complexos que não permitiram determinar o controle genético das bandas analisadas e, conseqüentemente, não foi possível confirmar a origem desta variabilidade.

4.1.2. Sistema Peroxidase (PO) – análise dentro de cada acesso

Foram avaliados cinco indivíduos dentro de cada acesso, e em todos os casos, foi observada uma alta variabilidade dentro de cada um dos acessos.

No APÊNDICE 58 pode se observar a variabilidade isoenzimática do sistema peroxidase dentro de cada acesso avaliado e nas FIGURAS 08 e 09, os respectivos padrões de bandas de cada indivíduo avaliado.

Como pode-se observar, todos os acessos obtiveram um alto nível de polimorfismo com o sistema avaliado.

Gillespie e Langley (1974) distinguiram dois grupos de enzimas: as enzimas do Grupo I, que incluíam enzimas reguladoras e a maioria das enzimas envolvidas no metabolismo intermediário, na glicólise e no ciclo de Krebs; e as enzimas do Grupo II, que incluíam as esterases, fosfatases, peroxidases, álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, que são enzimas que utilizam substratos múltiplos, freqüentemente de origem externa, e que respondem diretamente à diversidade ambiental.

Este fato pode ter refletido nos valores observados na TABELA 11 onde estão apresentados os coeficientes de similaridade médios observados

entre os indivíduos de cada acesso, visto que, apesar de serem indivíduos de um mesmo local, a diversidade ambiental pode muitas vezes refletir sobre a atividade enzimática, que por sua vez, refletem na variabilidade detectada na espécie através de marcadores isoenzimáticos.

Pode-se observar que, para o sistema peroxidase, todos os acessos apresentaram uma baixa similaridade. Dentre os acessos de *B. auleticus*, o que apresentou maior similaridade foi o acesso 04 (0,69 de similaridade) e o que apresentou menor similaridade foi o acesso 06 (0,47), sendo coletados respectivamente em Santana do Livramento e Uruguaiana.

TABELA 11 – Valores dos coeficientes de similaridade médios (coeficiente de Jaccard) para os 09 acessos de *Bromus auleticus*, obtidos através das informações dos sistemas peroxidase e esterase juntos e individualmente.

SISTEMAS	ACESSOS								
	03	04	06	07	09	13	14	15	16
Peroxidase	0,55	0,69	0,47	0,54	0,63	0,53	0,53	0,64	0,50
Esterase	0,54	0,65	0,61	0,57	0,61	0,70	0,62	0,54	0,66
Peroxidase/Esterase	0,54	0,67	0,61	0,55	0,61	0,57	0,56	0,59	0,54

Estes baixos índices de similaridade entre indivíduos de um mesmo acesso mostram-se interessantes quando se visa o melhoramento da espécie. A análise da variabilidade genética, tanto dentro como entre populações é de fundamental interesse para o melhoramento visto que, através dela, obtém-se

a estimativa da extensão da variabilidade disponível e ela contribui para o monitoramento do germoplasma (Moreno-Gonzalez e Cubero, 1993).

O entendimento da extensão e distribuição da variabilidade genética dentro de um programa de melhoramento é essencial para a melhor utilização do germoplasma disponível e para a criação de estratégias de melhoramento hábeis para a obtenção de novos materiais ainda mantendo níveis apropriados de variabilidade para sustentar futuros progressos genéticos da espécie (Campos-de-Quiroz e Ortega-Klose, 2001)

Ainda, com a análise do sistema peroxidase entre os indivíduos de cada acesso, nenhum índice de similaridade igual a 1 foi observado, que representa portanto, a inexistência de grupos de plantas idênticas.

Através destes resultados, obteve-se dados dos coeficientes de similaridade de Jaccard e os indivíduos foram agrupados formando os fenogramas apresentados nos APÊNDICES 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21. Nestes fenogramas pode-se visualizar a variabilidade existente entre indivíduos de uma mesma espécie.

Nos APÊNDICES 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 também são apresentadas as respectivas matrizes de similaridade de cada um dos acessos.

4.1.3. Sistema Esterase (EST) – análise entre acessos

Para o sistema esterase, inicialmente foram testados os sistemas α e β -Esterase. Porém, somente β -Esterase obteve boa resolução e coloração para a espécie avaliada.

A melhor resolução das bandas β -Esterase também foi encontrada por Lange (2001) avaliando espécies do gênero *Trifolium*. Esta autora observou que a concentração de bandas β -Esterase estava localizada na região anódica do gel e bandas α -Esterase sendo de migração mais lentas, o que também foi verificado no presente estudo onde somente as β -Esterase foram reveladas.

Latorre (1996) avaliou acessos de *B. auleticus* através dos padrões de bandas α -Esterase. Esta autora obteve distâncias de migração entre 2,60 e 3,30 cm. O presente trabalho apresentou para o sistema Esterase distâncias de migração variando de 4,7 a 6,4 cm, concordando com os dados de Lange (2001) que indicam as bandas α -Esterase como de migração mais lenta que as β -Esterase.

Do mesmo modo, Dalagnol (2000) também utilizou os padrões de bandas α -Esterase para avaliação da diversidade genética de *B. auleticus*.

Para o sistema esterase foram encontradas 13 isoenzimas representadas na TABELA 12. Rivas (2001) em estudo com populações desta mesma espécie, observou a formação de sete bandas com o sistema esterase, que incluíam quatro bandas de coleóptilo e três bandas de folhas jovens.

Os padrões de bandas podem ser observados nas FIGURAS 11, 12 e 13, onde são apresentados os géis para avaliação do sistema esterase.

Não foram observadas bandas monomórficas. Assim como no sistema peroxidase, este sistema apresentou um alto índice de polimorfismo quando avaliados os acessos. Estudos indicam que algumas proteínas são mais polimórficas que outras (Selander, 1976). As esterase são grupos de enzimas muito complexos e heterogêneos (Scandalios, 1969) e são

considerados um dos sistemas com alto grau de polimorfismo em plantas (Weeden e Wendel, 1990).

TABELA 12 – Variabilidade isoenzimática detectada pelo sistema Esterase (EST) em 9 acessos de *Bromus auleticus*,

ISOENZIMA	MR	ACESSOS								
		03	04	06	07	09	13	14	15	16
<i>EST1</i>	0.76					--		--	--	
EST2	0.79							--	--	
EST3	0.80						--	--		
EST4	0.82	--			--	--	--	--	--	--
EST5	0.84			--				--	--	
EST6	0.85			--	--	--	--	--	--	
EST7	0.87		--	--	--	--		--	--	--
EST8	0.88		--	--				--	--	--
EST9	0.90		--	--	--	--		--		--
EST10	0.92		--	--	--	--				--
EST11	0.94	--				--				--
EST12	0.98	--								
EST13	1.01	--								

Tanto o sistema esterase como o peroxidase têm sido relatado como os mais polimórficos nas plantas (Fuentes *et al.*, 1999).

Lange e Schifino-Wittmann (2000) observaram uma alta variabilidade detectada pelo sistema esterase entre os acessos de espécies do gênero *Trifolium* L..



FIGURA 11 – Gel para avaliação dos padrões de esterase (EST). Da esquerda para a direita os padrões de cinco indivíduos e duas repetições dos acessos 06 e 16.

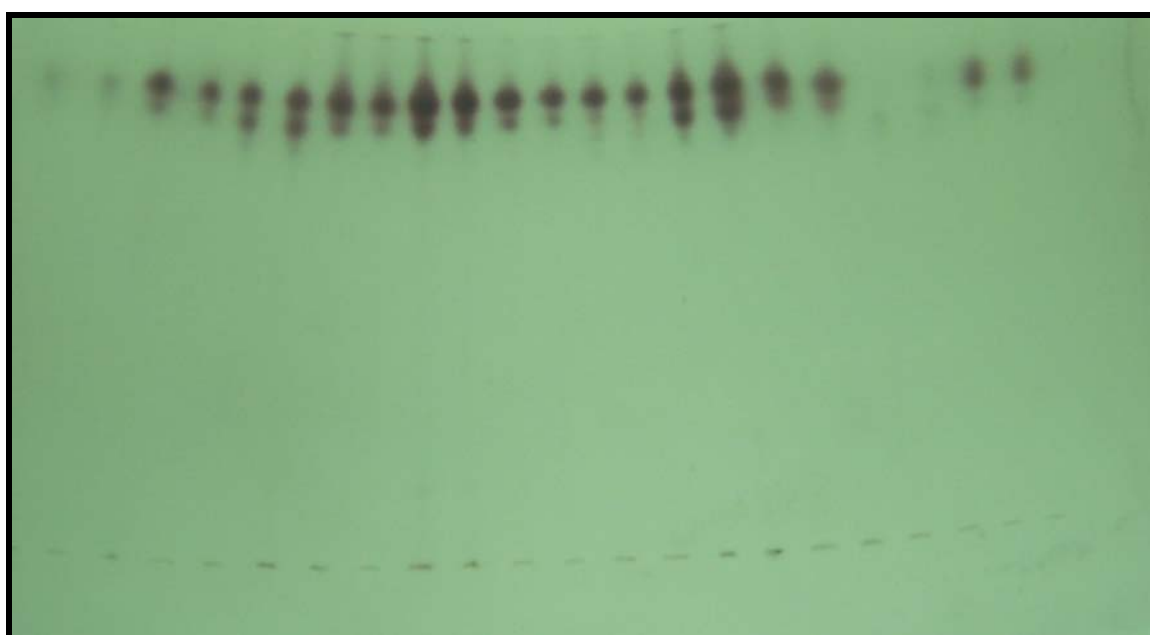


FIGURA 12 – Gel para avaliação dos padrões de esterase (EST). Da esquerda para a direita os padrões de cinco indivíduos e duas repetições dos acessos 15 e 13.

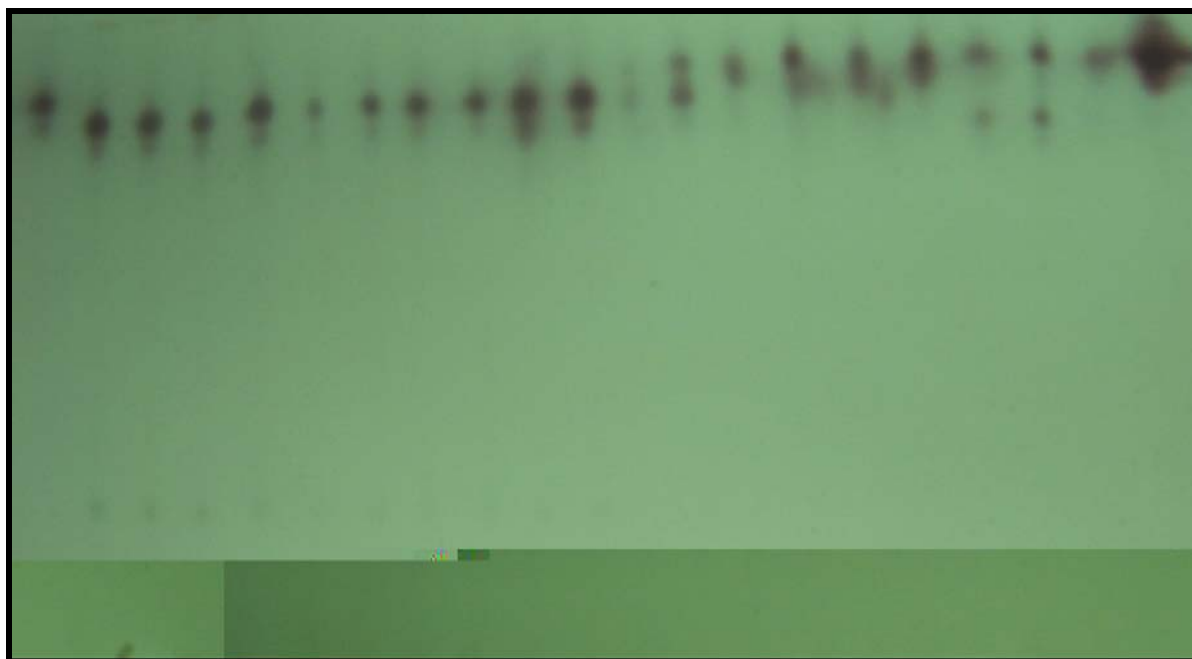


FIGURA 13 – Gel para avaliação dos padrões de esterase (EST). Da esquerda para a direita os padrões de cinco indivíduos e duas repetições dos acessos 07 e 09.

A banda ocorrente no MR= 0.98 e MR=1.01 (EST12 e EST13) foi exclusiva para o acesso 03, podendo estas então, serem consideradas marcadores para este acesso.

As bandas que se apresentaram mais monomórficas foram as ocorrentes no MR=0.87 e 0.90, apresentando-se em sete dos 09 acessos.

Rivas (2001) encontrou bandas com o sistema esterase com variável nível de polimorfismo, sendo que nenhuma se apresentou monomórfica.

A TABELA 13 mostra a matriz de similaridade de Jaccard e a FIGURA 14, o fenograma resultante da análise do sistema esterase nos 9 acessos de *Bromus auleticus*.

TABELA 13 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase, incluindo 13 isoenzimas para 9 acessos de *Bromus auleticus*.

	3	4	6	7	9	13	14	15	16
3	1,00								
4	0,13	1,00							
6	0,10	0,67	1,00						
7	0,25	0,50	0,57	1,00					
9	0,33	0,38	0,44	0,71	1,00				
13	0,14	0,00	0,13	0,33	0,25	1,00			
14	0,17	0,30	0,50	0,40	0,45	0,33	1,00		
15	0,09	0,22	0,44	0,33	0,40	0,25	0,78	1,00	
16	0,38	0,67	0,50	0,57	0,63	0,13	0,36	0,30	1,00

Como observado na FIGURA 14, com os resultados da análise de agrupamento ocorreu a formação de dois grandes grupos, e dentro de um grupo, ocorreu a formação de três subgrupos. No primeiro, está o acesso 03; no segundo grupo, estão os acessos 04, 06, 07, 09 e 16; e no terceiro agruparam-se os acessos 14 e 15. O acesso 13 ficou num grupo individual.

O maior índice de similaridade observado ocorreu entre os acessos 14 e 15 e 07 e 09, onde se obteve índice de 0,78 e 0,71, respectivamente. Da mesma forma, quando se avaliou o sistema peroxidase, os índices de similaridade obtidos foram baixos se comparados aos estudos realizados com a mesma espécie por Dalagnol (2000). Este resultado pode ser devido ao número de sistemas avaliados e devido à origem dos materiais avaliados. Dalagnol (2000) avaliou 11 acessos de *B. auleticus* provenientes do Uruguai e introduzidos desde 1986 na Estação Experimental da EPAGRI S/A – Lages – SC, testando 23 sistemas enzimáticos e utilizando nove destes sistemas para a obtenção dos resultados.

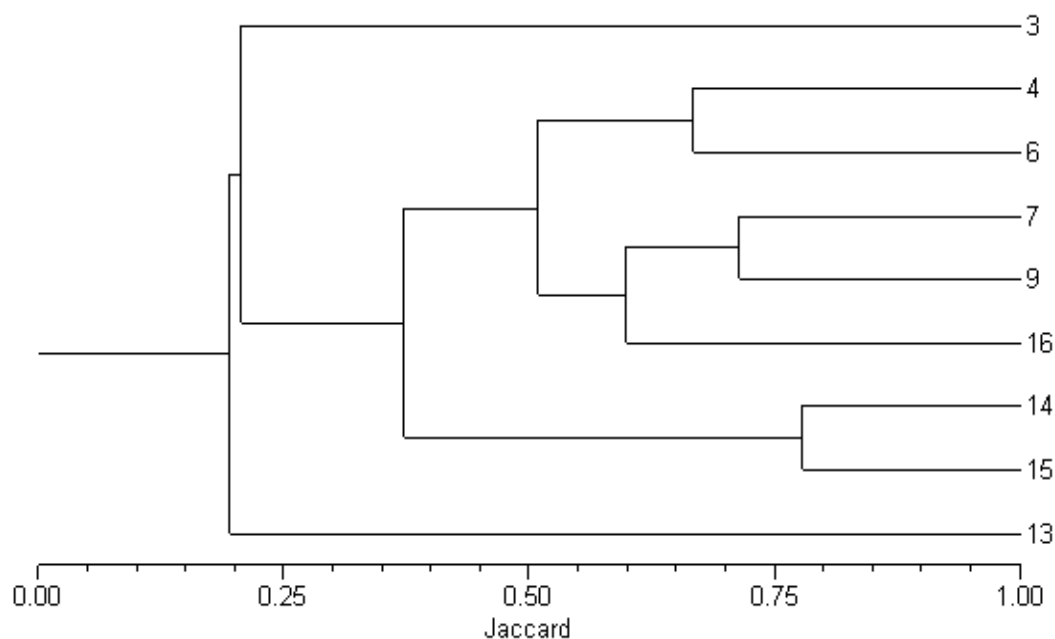


FIGURA 14 – Fenograma de similaridade genética utilizando o coeficiente de Jaccard de 9 acessos de *Bromus auleticus* para o sistema Esterase.

O agrupamento sugerido pelo sistema esterase foi mais concordante com as regiões de coleta do que o agrupamento com o sistema peroxidase. Considerando os diferentes controles genéticos e fisiológicos dos diferentes sistemas, pode-se justificar os diferentes resultados obtidos com os dois sistemas. Em um mesmo indivíduo, diferentes sistemas podem se comportar diferentemente.

Quando comparados os dois resultados, observou-se que os acessos 04 e 06 e 07 e 09 agrupam-se em ambos sistemas, porém com coeficientes de similaridade distintos (0,43 e 0,40 para peroxidase e 0,67 e 0,71 para esterase, respectivamente). Diferentemente, os acessos 03 e 13 quando

avaliados pelo sistema peroxidase, agrupam-se e no sistema esterase formam grupos totalmente distintos.

Os resultados dos agrupamentos dos acessos 04 e 06 e 07 e 09 concordaram com as respectivas distâncias geográficas apresentadas na TABELA 10 (28,33 e 47,72km). Porém, vale ressaltar que este não é um parâmetro de comparação a ser utilizado como referência devido a diversos fatores, anteriormente citados, como diferentes condições de topografia e de vegetação local, considerando que os acessos 03 e 13 apresentaram uma distância de 97,31km e mesmo assim se agruparam em grupos totalmente distintos.

Um outro fator a ser considerado é que em ambos sistemas observaram-se o agrupamento em grupos diferentes de acessos coletados em uma mesma região. É o que ocorre com os acessos 03 e 15, ambos coletados em Santana do Livramento, porém nos dois sistemas estes acessos se agruparam em grupos distintos, e apresentaram coeficientes de similaridade relativamente baixos, 0,071 e 0,091, respectivamente para o sistema peroxidase e esterase.

4.1.4. Sistema Esterase (EST) – análise dentro de cada acesso

Foram avaliados cinco indivíduos dentro de cada acesso, e em todos os casos, foi observada uma alta variabilidade entre os indivíduos e um baixo índice de bandas monomórficas (APÊNDICE 59), indicando um alto nível de polimorfismo detectado pelo sistema em questão, e portanto, uma alta diversidade intrapopulacional.

Nas FIGURAS 11, 12 e 13 são apresentados os diferentes padrões de bandas em cinco indivíduos dentro de cada acesso.

Semelhantemente ao sistema peroxidase, este sistema apresentou uma alta variabilidade entre os indivíduos do acesso 15 e 03, sendo que este último não apresentou nenhuma banda monomórfica entre os indivíduos avaliados. Os indivíduos que obtiveram índice de similaridade igual a um (1) com a análise do sistema esterase estão relacionados a seguir:

Acessos: 06.4 e 06.5
09.1 e 09.2
09.4 e 09.5
13.1 e 13.5
13.3 e 13.4
14.1 e 14.2
16.2 e 16.4

Estes indivíduos representam grupos de plantas idênticas, observadas dentro de determinados acessos, ou seja, nos acessos de cevadilha vacariana avaliados, além de uma alta variabilidade entre os indivíduos, também foi observada a existência de indivíduos idênticos e, portanto, plantas de um mesmo acesso são semelhantes em relação a esta característica.

Latorre (1996) apresentou através de análise isoenzimática que plantas de uma mesma progênie podem ser tão semelhantes quanto plantas de progênies diferentes e plantas de uma mesma progênie não pertencem a um único grupo de similaridade.

Na TABELA 11, ao comparar os resultados obtidos com o sistema peroxidase, pode-se observar que com o sistema esterase houve uma menor variabilidade para alguns dos acessos avaliados.

O sistema peroxidase apresentou-se mais polimórfico que o esterase, indicando uma menor variabilidade detectada deste entre os indivíduos, embora ambos sistemas tenham apresentado índices de similaridade relativamente baixos.

Lange e Schifino-Wittmann (2000) também observaram para o sistema esterase uma alta variabilidade dentro dos acessos do gênero *Trifolium* L..

As matrizes de similaridade e seus respectivos fenogramas que agrupam os diferentes indivíduos podem ser vistos entre os APÊNDICES 22 a 39, onde se destaca, em diversos acessos, um baixo índice de similaridade entre indivíduos pertencentes a um mesmo acesso, demonstrando a alta variabilidade existente entre indivíduos, ainda sendo os mesmos pertencentes a acessos semelhantes.

4.1.5. Avaliação entre acessos considerando os dois sistemas

A avaliação das populações considerando os dois sistemas juntos, mostrou que alguns agrupamentos observados nos sistemas isolados se mantiveram.

A matriz de similaridade é demonstrada na TABELA 14 e o fenograma na FIGURA 15.

TABELA 14 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para os sistemas Esterase e Peroxidase, incluindo 45 isoenzimas para 9 acessos de *Bromus auleticus*.

	3	4	6	7	9	13	14	15	16
3	1,00								
4	0,09	1,00							
6	0,11	0,50	1,00						
7	0,29	0,29	0,43	1,00					
9	0,25	0,15	0,24	0,50	1,00				
13	0,26	0,00	0,07	0,29	0,25	1,00			
14	0,21	0,17	0,31	0,26	0,31	0,28	1,00		
15	0,08	0,23	0,32	0,20	0,22	0,13	0,38	1,00	
16	0,26	0,26	0,25	0,37	0,43	0,26	0,50	0,16	1,00

Através da FIGURA 15 observa-se a formação de dois grupos: o primeiro formado pelos acessos 04, 06 e 15; e o segundo formado por quatro subgrupos: o primeiro composto pelos acessos 07 e 09; o segundo formado pelos acessos 14 e 16; e os acessos 03 e 13 formando dois grupos individuais.

Alguns agrupamentos, comparados às análises individuais dos sistemas enzimáticos, se mantiveram. É o caso dos acessos 04 e 06 e 07 e 09 que se agruparam juntos quando se avaliou individualmente o sistema peroxidase e esterase e quando foram avaliados os dois sistemas juntos. Os acessos 03 e 13 ficaram em grupos isolados, resultado este que concorda com a análise individual do sistema esterase.

Os acessos 14 e 16 quando analisados pelo sistema peroxidase ficaram agrupados e este resultado se repetiu ao analisar os dois sistemas.

O resultado da análise considerando os dois sistemas foi similar com os resultados da análise do sistema esterase. Considerando os dois sistemas, obteve-se agrupamentos mais coerentes com a localização geográfica, embora

estas ainda não tenham sido suficientes para justificar os agrupamentos, e com os diferentes acessos avaliados, como já discutidos anteriormente.

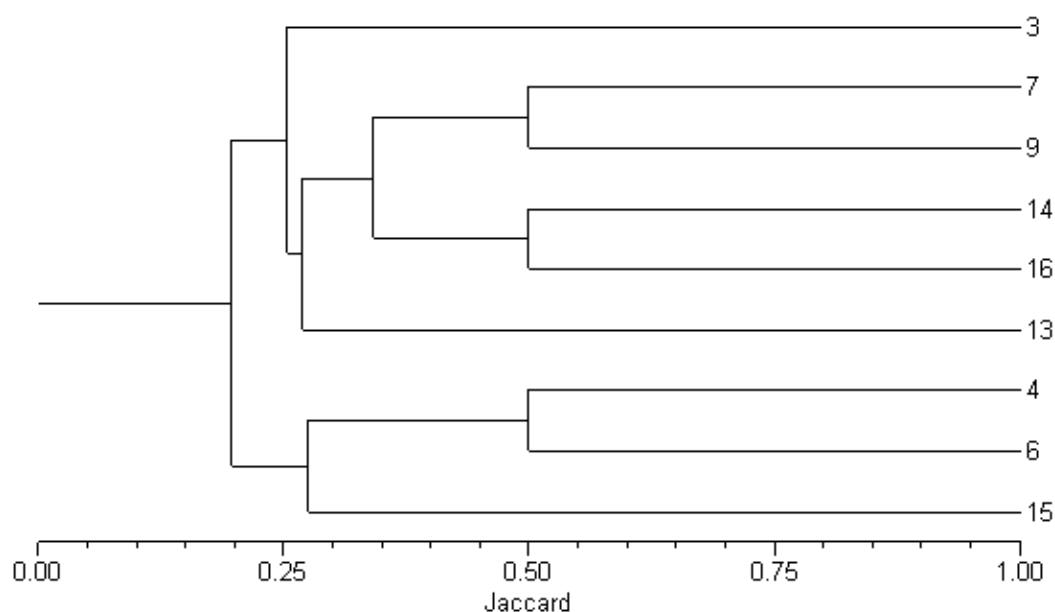


FIGURA 15 – Fenograma de similaridade genética utilizando o coeficiente de Jaccard de 9 acessos de *Bromus auleticus*, considerando os sistemas Esterase e Peroxidase.

A similaridade entre os acessos foi maior nas avaliações com o sistema esterase (TABELA 09). Unindo os dois sistemas, observou-se uma redução nos valores de similaridade (0,57 para o sistema esterase e 0,50 para os dois sistemas juntos), porém, houve um agrupamento destes acessos mais adequadamente

Dalagnol (2000) encontrou índices de similaridade que variavam de 0,577 a 0,944 entre 11 acessos de *B. auleticus* provenientes do Uruguai e introduzidos na Estação Experimental da EPAGRI S/A – Lages – SC em 1986. Estes valores são superiores aos valores obtidos neste trabalho. Este fato,

como discutido anteriormente, provavelmente é devido ao número de sistemas avaliados. Dalagnol (2000) avaliou 23 sistemas enzimáticos e utilizou nove destes para obter os resultados de caracterização que, comparados aos dois sistemas do presente trabalho, são visivelmente superiores. Porém, Rivas (2001) também utilizou apenas dois sistemas enzimáticos (peroxidase e esterase) e considerou os resultados bem fundamentados visto os significativos índices de polimorfismo e a variação significativa entre plantas e dentro das progênies avaliadas.

4.1.6. Avaliação dentro dos acessos considerando os dois sistemas

Assim como os resultados dos sistemas peroxidase e esterase indicaram um alto nível de bandas polimórficas e, portanto uma grande variabilidade detectada dentro dos acessos por estes dois sistemas, quando os dados foram analisados com os dois sistemas conjuntamente, estes resultados não diferiram.

Nos APÊNDICES 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 e 56 estão apresentadas as matrizes de similaridade genética obtidas através dos dados do coeficiente de similaridade de Jaccard e na TABELA 11, observam-se os coeficientes de similaridade médios de cada acesso. Este coeficiente foi intermediário entre valores do sistema peroxidase e esterase.

Matos *et al.* (2001) utilizaram dados isoenzimáticos para comparar cultivares de arroz através de dados de diversidade genética e confirmou a

eficiência dos dados de isoenzimas para determinar a existência de variabilidade dentro das populações.

Um outro fator que deve ser salientado é que para todas as análises foi mantido um controle para evitar erros na técnica, tais como, coletas de amostras de tecidos de diferentes fases de desenvolvimento, pH dos tampões, corrente elétrica, dentre outros, que foram padronizados e mantidos os padrões para evitar erros.

Com estes resultados, considerou-se que no presente estudo obteve-se, apesar do pequeno número de sistemas avaliados, dados isoenzimáticos que concordam com a alta variabilidade morfológica já observada pela cevadilha vacariana, indicando que esta variabilidade não reside apenas em características morfológicas, mas sim, uma variabilidade de origem genética que pode estar ou não relacionada com as variáveis morfológicas.

4.2. Marcadores de RAPD

Para a obtenção dos dados de RAPD foram inicialmente avaliados nove iniciadores (*primers*) sendo que destes, apenas um não amplificou produtos visíveis via PCR, e revelaram um total de 36 bandas (média de 4,5 bandas por iniciador). Os tamanhos de fragmentos obtidos variaram de 1070 a 1760 pares de bases.

Dalagnol (2000) testou 46 iniciadores e obteve 136 bandas para 37 iniciadores tendo uma média de 2,7 bandas por iniciador utilizado.

Neste trabalho optou-se pela utilização de conjuntos de DNA (*bulk*) para as análises, e segundo Michelmore *et al.*(1991), nestas análises, os

fragmentos observados em frequências abaixo de 10% ou 14% (Loarce *et al.*, 1996) não são amplificados.

Por esta razão, quando se amplificam amostras de conjuntos de DNA, ocorre uma redução no número de fragmentos amplificados (Matos *et al.*, 2001).

Nas FIGURAS 16 e 17 estão representados, respectivamente, os padrões de RAPD observados com análise em conjunto (*bulk*) e com análise entre indivíduos. Estes padrões mostram que a espécie, quando avaliada em conjunto, apresenta quantidade de fragmentos amplificados reduzidos se comparadas ao número de fragmentos amplificados quando o mesmo acesso é avaliado individualmente.

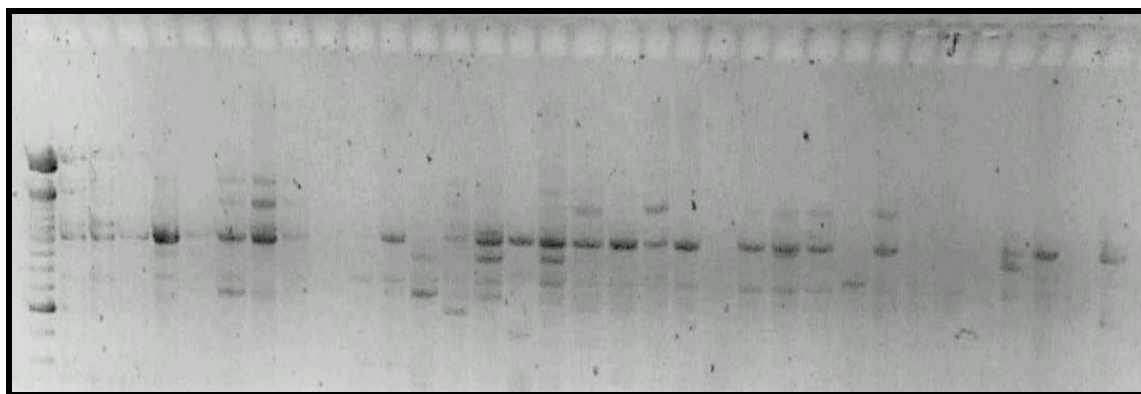


FIGURA 16 – Padrões de bandas obtidos com o iniciador D para 17 indivíduos do acesso 03 e 16 indivíduos do acesso 05. A primeira linha foi utilizada como padrão (100pb).



FIGURA 17 – Padrões de bandas obtidos com o iniciador D para conjuntos de indivíduos dos acessos 01, 02, 03, 04, 05, 06, 17 (não incluído na análise final), 08 e 09. Nas sete primeiras linhas não foi observado nenhum fragmento amplificado.

A escolha do coeficiente de similaridade a ser utilizado para comparar os acessos foi baseada na natureza dos dados deste trabalho. Considerando que o coeficiente de Jaccard presta-se melhor para comparar populações dentro de uma mesma espécie, este índice foi o escolhido para as análises de similaridade entre os diferentes.

Existem também diversos métodos de agrupamentos cujos princípios gerais são o de maximizar a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos. O método escolhido foi o método das médias das distâncias (*Unweighted pair group method using an arithmetic average - UPGMA*). Dias (1998) citou que o método da média das distâncias proporcionou o melhor ajuste entre o fenograma e a matriz de distâncias, se comparado com o método do vizinho mais próximo, que é outro método bastante utilizado.

Na TABELA 15 pode-se visualizar a matriz de similaridade genética obtida também pelo coeficiente de Jaccard. A similaridade média obtida foi de 0,56. Os acessos que se apresentaram mais próximos foram os acessos 03 e 05, ambos de Livramento, com coeficiente de similaridade de 0,71. Por outro

lado, os acessos que apresentaram menor similaridade (0,15) foram os acessos 01 e 16, respectivamente de Bagé e de Quaraí.

Estes valores de similaridade foram semelhantes com os obtidos por Dalagnol (2000) que ficaram entre 0,150 e 0,778.

A FIGURA 18 apresenta o fenograma obtido através da análise dos dados do coeficiente de Jaccard. Esta análise revela a formação de três grandes grupos. O primeiro formado pelos acessos 01, 08, 09 e 15; o segundo formado pelos acessos 02, 07, 12, 16 e 10; e o terceiro formado pelos acessos 03, 05 e 06.

Os agrupamentos observados no fenograma com dados de RAPD não foram concordantes com as respectivas distâncias geográficas apresentadas na TABELA 10. Este fato se justifica por esta não ser uma característica confiável para a determinação dos agrupamentos, visto que, como já citado anteriormente, existem outras características que podem estar associadas aos locais de coleta e que podem influenciar sobre os resultados dos marcadores RAPD.

Os grupos formados não estão de acordo com os respectivos locais de coleta (TABELA 1). Vale ressaltar novamente que o local de origem continua sendo uma característica que pode ter muitos outros fatores envolvidos, tais como vegetação local, e que podem influenciar na variabilidade genética das plantas.

A avaliação de um mesmo conjunto de população em outros ambientes pode ocasionar uma estruturação populacional diferente (Crochemore *et al.*, 1998).

Steiner e Garcia de los Santos (2001) avaliando genótipos de cornichão utilizando marcadores morfológicos e RAPD, observaram que a distância geográfica entre os locais de coleta dos genótipos não foram associados às respectivas distâncias genéticas, porém a similaridade ecológica dos locais tiveram associação, sugerindo que os germoplasmas adaptados a habitats semelhantes (mesmo que geograficamente distantes) adquirem fenótipos similares. Estes autores ainda citaram a importância da combinação de diversos dados (morfológicos, ecogeográficos, moleculares, etc...) para obtenção de dados eficazes na caracterização de germoplasma.

Julier *et al.* (1995) mostraram que as origens geográficas dos materiais de alfafa avaliados foram suficientes para obtenção de uma estruturação em grupos concordantes. Porém, Crochemore *et al.* (1998), avaliando populações selvagens e cultivadas de alfafa, obtiveram resultados semelhantes aos do presente estudo, onde as origens geográficas dos acessos não foram concordantes com o fenograma formado. Estes autores obtiveram grupos mais relacionados com as condições climáticas (dormência) do que com a localização geográfica.

Semelhante aos resultados apresentados com a cevadilha vacariana, Crochemore *et al.* (1998) obtiveram como resultado, avaliando materiais selvagens de alfafa, uma alta variabilidade para características de RAPD e morfológica, resultados estes que demonstram que as populações selvagens podem representar uma grande fonte de variabilidade para futuros melhoramentos das espécies.

Steiner e Garcia de los Santos (2001) também ressaltaram a importância de germoplasmas nativos para o desenvolvimento de cultivares e para a utilização como repositores genéticos em programas de melhoramento.

Portanto, através das análises dos marcadores de RAPD, também se pôde confirmar uma alta variabilidade existente entre os diferentes acessos de cevadilha vacariana. Não foram obtidos dados dentro dos acessos, pois foram realizadas análises em conjunto (*bulk*) e conforme Matos *et al.* (2001) apesar deste tipo de análise ser mais econômico e rápido, só é possível obter a variabilidade genética entre populações. Estes autores ainda ressaltam a eficácia da técnica de RAPD para estudos entre populações de arroz.

TABELA 15 – Matriz de similaridade genética obtida através dos dados do coeficiente de Jaccard, para 12 acessos de *B. auleticus*.

	01	02	03	05	06	07	08	09	10	12	15	16
01	1,00											
02	0,56	1,00										
03	0,43	0,50	1,00									
05	0,44	0,38	0,71	1,00								
06	0,38	0,38	0,40	0,43	1,00							
07	0,15	0,60	0,27	0,31	0,31	1,00						
08	0,60	0,46	0,30	0,37	0,22	0,41	1,00					
09	0,56	0,64	0,50	0,38	0,29	0,33	0,69	1,00				
10	0,27	0,55	0,33	0,47	0,40	0,35	0,27	0,46	1,00			
12	0,17	0,44	0,29	0,44	0,22	0,57	0,33	0,33	0,56	1,00		
15	0,38	0,43	0,36	0,50	0,33	0,50	0,60	0,53	0,45	0,50	1,00	
16	0,15	0,55	0,22	0,24	0,21	0,62	0,32	0,42	0,31	0,63	0,37	1,00

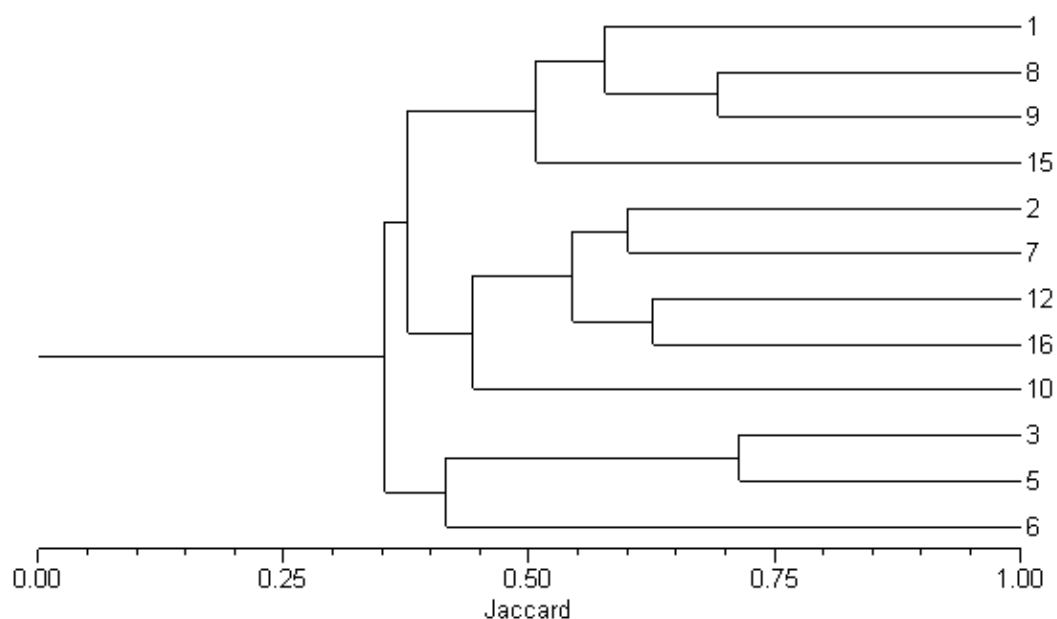


FIGURA 18 – Fenograma de similaridade genética obtido através de dados do coeficiente de Jaccard, utilizado para a análise de agrupamento, para 12 acessos de *B. auleticus*.

4.2.1. Comparação da análise de isoenzimas e RAPD

Os acessos avaliados para os sistemas isoenzimáticos não foram os mesmos utilizados nas análises de RAPD em virtude de problemas apresentados com a germinação das sementes e com a manutenção das plantas em casa de vegetação. Portanto, os acessos comuns em que foram avaliados tanto para isoenzimas como para RAPD foram os acessos 03, 06, 07, 09, 15 e 16, os quais serão utilizados para comparar os resultados das duas técnicas.

A TABELA 16 apresenta os coeficientes de similaridade para a análise de isoenzimas (utilizando os dois sistemas conjuntamente) e para os dados de RAPD. Nesta comparação, são visíveis os maiores valores de similaridade obtidos pelos marcadores RAPD comparados aos valores obtidos

pelos marcadores isoenzimáticos. Os fenogramas formados com os valores dos coeficientes de Jaccard não correspondem para os dois marcadores utilizados, porém, para alguns acessos, os índices de similaridade foram próximos.

A similaridade média obtida com os dados de RAPD foi de 0,57, comparada à similaridade média obtida com dados de isoenzimas que foi de 0,47. Apesar desta diferença, em ambas avaliações, os índices de similaridade foram relativamente baixos, indicando uma baixa semelhança entre os acessos e, conseqüentemente, uma alta variação entre eles.

Diferentemente, Dalagnol (2000) encontrou índices de similaridade de 0.982 para isoenzimas e 0.816 para RAPD sendo estes superiores aos encontrados no presente trabalho, e que indicaram uma alta semelhança entre os grupos avaliados.

TABELA 16 – Coeficientes de similaridade de Jaccard para os acessos comuns nas análises de isoenzimas e RAPD (células hachuradas).

	03		06		07		09		15		16	
03	1,00	1,00										
06	0,11	0,40	1,00	1,00								
07	0,29	0,27	0,43	0,31	1,00	1,00						
09	0,25	0,50	0,24	0,29	0,50	0,33	1,00	1,00				
15	0,08	0,36	0,32	0,33	0,20	0,50	0,22	0,53	1,00	1,00		
16	0,26	0,22	0,25	0,21	0,37	0,62	0,43	0,42	0,16	0,37	1,00	1,00

Os diferentes resultados obtidos com marcadores isoenzimáticos e RAPD podem ser explicados pela pequena cobertura do genoma proporcionada pelos marcadores isoenzimáticos, quando comparados aos marcadores de DNA (Dundley, 1994).

Um outro fator que pode ter diferenciado os resultados deste trabalho com o de Dalagnol (2000) é a utilização de conjuntos de DNA que, segundo Matos *et al.* (2001), pode influenciar a estimativa das distâncias genéticas entre cultivares.

O fato de somente ter sido utilizado dois sistemas enzimáticos para as análises pode também ter influenciado a superioridade do polimorfismo detectado pelas isoenzimas, quando comparados ao polimorfismo gerado pelos RAPD.

Os resultados mostraram a presença de uma alta variabilidade nas populações de cevadilha vacariana nativa do estado. Este fator se confirmou através dos dados isoenzimáticos e dos dados moleculares (RAPD), sendo que a primeira análise ainda indicou a existência de uma alta variabilidade intrapopulacional.

Considerando que a espécie já vem sendo avaliada e tem demonstrado uma alta variabilidade em seus caracteres morfológicos e agronômicos, através dos presentes resultados, pode-se afirmar que esta variabilidade pode estar relacionada com a variabilidade genética.

Os dados obtidos com ambas análises podem servir de subsídios para a escolha de progenitores em programas de melhoramento através da

utilização dos índices de similaridade obtidos. Neste caso, populações mais distintas (com menor similaridade), poderiam ser utilizadas como progenitoras visando a manutenção da variabilidade.

Portanto, sugere-se a realização de novas coletas de germoplasma para uma ampliação da base genética e uma melhor representatividade desta espécie. Estas informações seriam úteis para obtenção de resultados mais rigorosos a respeito da similaridade inicialmente encontrada no presente estudo.

Finalmente, é importante ainda ressaltar que são necessárias avaliações destas populações com um maior número de sistemas enzimáticos e de outros marcadores moleculares, juntamente com dados morfológicos e agronômicos, que proporcionariam um avanço no conhecimento científico desta espécie e novos dados para o melhoramento genético.

5. CONCLUSÕES

Os acessos de *Bromus auleticus* foram polimórficos para os dois sistemas enzimáticos avaliados, tanto individualmente como em conjunto, indicando a alta variabilidade existente entre os acessos e dentro de cada um.

A análise em conjunto (*bulk*) de RAPD indicou uma alta variabilidade interpopulacional da espécie.

Ambos padrões (isoenzimas e RAPD) foram eficazes para demonstrar a alta variabilidade existente entre os acessos de *Bromus auleticus*.

Os dados demonstraram a eficiência da técnica de isoenzimas para estudos da variabilidade intrapopulacional e dos dados em conjunto de RAPD para análises interpopulacionais.

Através dos dados isoenzimáticos e moleculares, pôde-se estabelecer relações entre os acessos avaliados e agrupá-los conforme os dados de similaridade obtidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINOUCHE, M.; MISSET, M.T.; HUON, A. Genetic diversity in Mediterranean diploid and tetraploid *Bromus* L. (section *Bromus* Sm.) populations. **Genome**, Ottawa, v.38, p.879-888, 1995.
- AINOUCHE, M.L.; BAYER, R.J.; GOURRET, J.P. *et al.* The allotetraploid invasive weed *Bromus hordeaceus* L. (Poaceae): genetic diversity, origin and molecular evolution. **Folia Geobotanica**, Rep. Tcheca, v. 34, p.405-419, 1999.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W. *et al.* **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG : SIF : UFV, 1991. 242p.
- ALLEGRI, M.; FORMOSO, F. **Gramíneas perennes en el noreste**. [S.l.] : CIAAB, 1984. p.37. (Misceláneas, 56).
- ARMSTRONG, K.C. Chromosome evolution in *Bromus*. In: TSUCHIYA, T.; GUPTA, P.K. **Chromosome engineering in plants: genetics breeding, evolution**. Amsterdam : Elsevier, 1991. Part B, p.363-377.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York : Chapman & Hall, 1994. 511pp.
- BARRETO, I.L. As principais espécies de Gramíneas e Leguminosas das pastagens naturais do Rio Grande do Sul. In: ASSOCIAÇÃO GABRIELENSE DE MELHORAMENTO E RENOVACÃO DE PASTAGENS. **Anuário 1963**. São Gabriel,RS, 1963. p. 65-77.
- BECKMANN, J.S. Genomic genetics and plant genetic improvement. In: SCHOOK, L.B.; LEWIN, H.A. ; MCLAREN, D.G.(Eds.). **Gene-mapping techniques and applications**. New York : M. Dekker, 1991. p. 201-230.
- BUSO, G.S.C.; RANGEL, P.H. ; FERREIRA, M.E. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p.107-117, 1998.
- BUSTOS, A.; CASANOVA, C.; SOLER, C. *et al.* RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 96, p. 101-111, 1998.
- CAMPOS-DE-QUIROZ, H.; ORTEGA-KLOSE, F. Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers. **Euphytica**, Dordrecht, v.122, p.61-67, 2001.

- CROCHEMORE, M.L.; HUYGHE, C.; ÉCALLE, C. *et al.* Structuration of alfalfa genetic diversity using agronomic and morphological characteristics. Relationship with RAPD markers. **Agronomie**, Les Ulis, FR, v.18, p. 79-94, 1998.
- CROFT, A.M.; PANG, E.C.K.; TAYLOR, P.W.J. Molecular analysis of *Lathyrus sativus* L. (grasspea) and related *Lathyrus* species. **Euphytica**, Dordrecht, v.107, p.167-176, 1999.
- DAHER, R.F.; MORAES, C.F.; CRUZ, C.D. *et al.* Diversidade morfológica e isoenzimática em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.26, n.2, p.255-264, 1997.
- DALAGNOL, G.L. **Diversidade genética de 11 acessos e progênes e performance agrônômica de dois sintéticos de *Bromus auleticus* Trinius**. Florianópolis, SC : Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. 102f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.
- DIAS, L.A.S. Variância de frequências alélicas. In: ALFENAS, A.C., **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa : UFV, 1998. p. 381-475.
- DÍAZ, O.; SUN, G.; SALOMÓN, B. *et al.* Levels and distribution of allozyme and RAPD variation in populations of *Elymus fibrous* (Schrenk) Tzvel. (Poaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.47, p. 11-24, 2000.
- DUNDLEY, J.W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. SYMPOSIUM OF THE ANALYSIS OF MOLECULAR DATA. **Proceedings...** Corvallis, OR : American Society for Horticultural Science : Crop Science Society of America, 1994. p.3-7. (Joint Plant Breeding Symposia Series)
- ELISIÁRIO, P.C.; JUSTO, E.M.; LEITÃO, J.M. Identification of mandarin hybrids by isozyme and RAPD analysis. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.81, p. 287-299, 1999.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. p.220.
- FRANKEL, O.H.; BENNETT, E. **Genetic resources in plants-their exploration and conservation**. Oxford : Blackwell Scientific, 1970. (IBP Handbook, 11).

- FREYRE, A.; METHOL, M. **Evaluación primaria de *Bromus auleticus***. Montevideo, UR : Facultad de Agronomía da Universidad de la República, 1982. 124f. Tesis (Ingeniero Agronomo) - Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, UR, 1982.
- FUENTES, J.L.; ESCOBAR, F.; ALVAREZ, A. *et al.* Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD and AFLP markers. **Euphytica**, Dordrecht, v.109, p. 107-115, 1999.
- GAUER, L.; ALBARUS, M.H.; CAVALI-MOLINA, S. Variabilidade isoenzimática em progênies de biótipos apomíticos de *Paspalum dilatatum* (Poaceae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.799-804, 2001.
- GILLESPIE, J.H.; LANGLEY, C.H. A general model for enzyme variation in natural population. **Genetics**, Bethesda, MD, v.76, p. 837-884, 1974.
- GOMES, K.E.; OLIVEIRA, J.C.P.; GUGLIERI, A. *et al.* Coleta Botânica de Germoplasma de Plantas Forrageiras Nativas do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 51., 2000, [Brasília]. **Resumos...** Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, 2000. p. 89.
- GOMEZ, C.; SAENZ DE MIERA, L.; PEREZ DE LA VEGA, M. Estimation of isozymatic genetic variability of a Spanish *Avena sativa* germplasm collection. **Plant Breeding**, Berlin, v.106, p. 293-300, 1991.
- GONÇALVES, J.O.N.; GIRARDI-DEIRO, A.M.; GONZAGA, S.S. **Campos naturais ocorrentes nos diferentes tipos de solo no município de Bagé, RS**: Caracterização, localização e principais componentes da vegetação. Bagé: EMBRAPA-CNPO, 1988. 28p. (EMBRAPA-CNPO. Boletim de Pesquisa, 12).
- GONZÁLEZ, A.C. **Caracterização isoenzimática de algumas espécies de *Lathyrus* L. e *Vicia* L. ocorrentes no Rio Grande do Sul**. 1994. 90f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.
- GONZÁLEZ, A.C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Isoenzymatic characterization of some *Lathyrus* L. and *Vicia* L. species (Leguminosae) occurring in Rio Grande do Sul (Southern Brazil). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, p.283-288, 1996.
- GOTTLIEB, L.D. Genetic differentiation, sympatric speciation and the origin of a diploid species of *Stephanomeria*. **American Journal of Botany**, Chicago, v.60, p. 545-553, 1973.
- GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P. *et al.* Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor**

- Lab. Symposia Quantitative Biology**, Plainview, NY, v.39, p. 439-446, 1974.
- GUSTINE, D.L.; HUFF, D.R. Genetic variation within and among white clover populations from managed permanent pastures of the northeastern USA. **Crop Science**, Madison, v.39, n.2, p. 524-530, 1999.
- GUSTINE, D.L.; SANDERSON, M.A. Quantifying spatial and temporal genotypic changes in white clover populations by RAPD technology. **Crop Science**, Madison, v.41, n.1, p. 143-148, 2001.
- HADRYS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology**, Oxford, UK, v.1, p.55-63, 1992.
- HUANG, H.; DANE, F.; KUBISIAK, T.L. Allozyme and RAPD analysis of the genetic diversity and geographic variation in wild populations of the American chestnut (Fagaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, OH, v.85, n. 7, p.1013-1021, 1998.
- JAASKA, V. Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities in *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.44, p. 557-574, 1997.
- JENCZEWSKI, E.; PROSPERI, J.M.; RONFORT, J. Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. **Molecular Ecology**, Oxford, UK, v.8, p.1317-1330, 1999.
- JOBIN-DÉCOR, M.P.; GRAHAM, G.C.; HENRY, R.J. *et al.* RAPD and isozyme analysis of genetic relationships between *Carica papaya* and wild relatives. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.44, p.1-7, 1997.
- JULIER, B.; PORCHERON, A.; ECALLE, C. *et al.* Genetic variability for morphology, growth and forage yield among perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). **Agronomie**, Les Ulis, FR, v.15, p.295-304, 1995.
- KÖLLIKER, R.; STADELMANN, F.J.; REIDY, B. *et al.* Genetic variability of forage grass cultivars: A comparison of *Festuca pratensis* Huds., *Lolium perenne* L., and *Dactylis glomerata* L. **Euphytica**, Dordrecht, v.106, p. 261-270, 1999.
- KONGKIATNGAM, P.; WATERWAY, M.J.; COULMAN, B.E. *et al.* Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. **Euphytica**, Dordrecht, v.89, p.355-361, 1996.

- LANGE, O. **Caracterização isoenzimática de oito espécies do gênero *Trifolium* L. ocorrentes no Rio Grande do Sul.** 2001. 182f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- LANGE, O.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Isozyme variation in wild and cultivated species of the genus *Trifolium* L. (Leguminosae). **Annals of Botany**, Oxford, UK, v.86, p.339-345, 2000.
- LATORRE, M.M.R. **Estudio del sistema reproductivo y estructura poblacional de *Bromus auleticus* Trinius (ex – Nees) 1829 mediante isoenzimas.** Montevideo, UR : Facultad de Agronomía da Universidad de la República, 1996. 110f. Tesis (Maestria) - Programa de Desarrollo de las Ciencias Basicas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, UR, 1996.
- LOARCE, Y.; GALLEGO, R.; FERRER, E. A comparative analysis of genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. **Euphytica**, Dordrecht, v.88, p.107-115, 1996.
- LONGHI-WAGNER, H.M. *Gramineae* Tribo *Poeae*. Flora ilustrada do Rio Grande do Sul/17. **Boletim do Instituto de Biociências**, Porto Alegre, n.14, p.1-191, 1987.
- LU, Z.X.; REIGHARD, G.L.; BAIRD, W.V. *et al.* Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 31, n.1, p.127-129, 1996.
- MACHADO, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N. *et al.* Genetic relationship of Mediterranean mandarins *Citrus deliciosa* Tenore using RAPD markers. **Euphytica**, Dordrecht, v.92, p.321-326, 1996.
- MATOS, M.; PINTO-CARNIDE, O.; BENITO, C. Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. **Hereditas**, Lund, Sweden, v.134, p. 229-236, 2001.
- METHOL, M.; FREIRE, A. Evolução primária de *Bromus auleticus*. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE CAMPO NATURAL, 2., 1990, Tacuarembó, UR. **Anais...** Montevideo : Hemisfério Sur, 1990. p. 77-82.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulk segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating

- populations. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 88, p. 9828-9832, 1991.
- MILLOT, J.C.; MAJÓ, G.; CARRIQUIRY, E. *et al.* Diversidade genética en la producción de semillas de *Bromus auleticus*. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE CAMPO NATURAL, 2., 1990, Tacuarembó, UR. **Anais...** Montevideo : Hemisfério Sur, 1990. p. 95-104.
- MILLOT, J.C. *Bromus auleticus*: uma nova espécie domesticada. In: REUNIÃO TÉCNICA INTERNACIONAL SOBRE O GÊNERO *BROMUS*, 2000, Bagé, **Anais...** Bagé-RS : EMBRAPA Pecuária Sul ; [Montevideo] : Facultad de Agronomía de Montevideo, 2000. p.7-11.
- MOLINA, S.C. Marcadores genéticos e o melhoramento de plantas. In: SACCT, A.M.O.F. **Genética para que te quero?** Porto Alegre: Ed. Da UFRGS, 1999. p.127-132.
- MOLITERNO, E.A.; RIVAS, M.; RUCKS, F. Evaluación agronómica de cultivares de *Bromus auleticus*. In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL – ZONA CAMPOS, 17., 1998, Lages,SC. **Anais...** Lages : Epagri : UDESC, 1998. 156p. Separata.
- MOORE, G.A.; COLLINS, G.B. New challenges confronting plant breeders. In: ORTON, T. ; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding..** Amsterdam : Elsevier, 1983. Part A, p.25-58.
- MORAES, C.O.; OLIVEIRA, J.C.P. **Avaliação preliminar de genótipos de *Bromus auleticus* Trinius.** Bagé: EMBRAPA/CNPO, 1990. 20p (EMBRAPA/CNPO. Circular Técnica, 5).
- MORAES, C.O.C.; OLIVEIRA, J.C.P.; PAIM, N. Comparação de *Bromus auleticus* Trinius com espécies perenes de inverno. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu : SBU, 1998. p.125-127.
- MORENO-GONZALEZ, J.; CUBERO, J.I. Selection strategies and choice of breeding materials. In: HAYWARD, M.D. ; BOSEMARK, N.O.; ROMAGOSA, I. (Eds.). **Plant Breeding: principles and prospects.** London : Chapman&Hall, 1993. p.281-313.
- MÖSGES, G.; FRIEDT, W. Genetic “fingerprinting” of sunflower lines and F1 hybrids using isozymes, simple and repetitive sequences as hybridization probes, and random primers for PCR. **Plant Breeding**, Berlin, v. 113, p.114-124, 1994.
- OJA, T. Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities in the section *Bromus* of the genus *Bromus* (Poaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, UK, v.26, p. 403-413, 1998.

- OJA, T.; JAASKA, V. Isoenzyme data on the genetic divergence and allopolyploidy in the section *Genea* of the grass genus *Bromus* (Poaceae). **Hereditas**, Copenhagen, v.125, p.249-255, 1996.
- OJA, T.; JAASKA, V. Allozyme diversity and phylogenetic relationships among diploid annual bromes (*Bromus*, Poaceae). **Annales Botanici Fennici**, Helsinki, v.35, p.123-130, 1998.
- OLIVEIRA, J.C.P.; MORAES, C.O.C. Distribuição da produção e qualidade de forragem de *Bromus auleticus* Trinius. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.3, p.391-398, 1993.
- OLIVEIRA, J.C.P.; SILVEIRA, L.R.M.; MORAES, C.O.C. *et al.* Determinação do modo de reprodução de *Bromus auleticus*. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 2., [1999, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA/Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 1 CD-ROM.
- OLMOS, F. Forrajera de invierno para la region noreste. In: *BROMUS auleticus*. Tacuarembó, UR : INIA, 1993. p.1-22. (Serie técnica, 35).
- PATERSON, A.H.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, San Diego, CA, v.55, p.39-90, 1995.
- RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Agricultura. Departamento de Produção Animal. Estação Experimental de Vacaria, RS. **Relatório Anual de Atividades**. Vacaria, 1952.
- RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Agricultura. Departamento de Produção Animal. Estação Experimental de Vacaria, RS. **Relatório Anual de Atividades**. Vacaria, 1953.
- RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Agricultura. Departamento de Produção Animal. Estação Experimental de Vacaria, RS. **Relatório Anual de Atividades**. Vacaria, 1954.
- RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Agricultura. Departamento de Produção Animal. Estação Experimental de Vacaria, RS. **Relatório Anual de Atividades**. Vacaria, 1956.
- RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Agricultura. Departamento de Produção Animal. Estação Experimental de Vacaria, RS. **Relatório Anual de Atividades**. Vacaria, 1958.

- RIVAS, M. Sistema reproductivo y estructura genetica de poblaciones de *Bromus auleticus* Trinius ex – Nees (Poaceae). Estudio mediante isoenzimas. **Agrociencia**, Montevideo, v.5, n.1, p.32-40, 2001.
- ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. p. 329-380.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York : [s.n.], 1997. Version 2.10. Applied Biostatistic
- ROSENGURTT, B. **Estudios sobre praderas naturales del Uruguay**. 5. Contribución. [S.l. : s.n.], 1946. p.473.
- ROSENGURTT, B. **Tablas de comportamiento de las especies e plantas de campos naturales en el Uruguay**. Montevideo, UR: Facultad de Agronomia [de la] Universidad de la Republica, 1979. p.86.
- ROSENGURTT, B.; ARRILLAGA de MAFFEO, B.; IZAGUIRRE de ARTUCIO, P. **Gramíneas uruguayas**. Montevideo, UR: Universidad de La Republica, 1970. 489p.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plant: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, n.1, p.37-79, 1969.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; FREITAS, L.H.C.; SIMIONI, C. Isoenzymatic characterization of hybrids between *Leucaena leucocephala* and *Leucaena diversifolia* spp. *diversifolia* grown in Rio Grande do Sul (Southern Brazil). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p. 475-478, 1996.
- SELANDER, R.K. Genetic variation in natural population. In: AYALA, F.J. **Molecular evolution**. Massachusetts : Sinauer, 1976. p. 21-45.
- SIMPSON, M.J.A.; WITHERS, L.A. Characterization of plant genetic resources using isozyme electrophoresis: a guide to the literature. In: INTERNATIONAL Board for Plant Genetic Resources. Roma : [s.n.], 1986. 102p.
- SMITH, L.B.; WASSHAUSEN, D.C.; KLEIN, R.M. Gramíneas, gêneros: 1.*Bambusa* até 44. *Chloris*. In: REITZ, R. **Flora ilustrada de Santa Catarina**. Itajaí : [s.n.], 1981. Parte I, p.207-209.
- SOARES, G.C.; DALL'AGNOL, M.; MORAES, C.O. Caracterização da produção de forragem de uma população de cevadilha vacariana (*Bromus auleticus* Trinius). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2000, Viçosa, MG. **Anais...** Disponível em:

<http://www.sbz.org.br/anais2000/forragem/704.pdf> Acesso em: junho de 2002.

- SOARES, G.C. **Caracterização agronômica e melhoramento genético de uma população de cevadilha vacariana (*Bromus auleticus* Trinius)**. 1999. 123f. Dissertação (Mestrado – Plantas Forrageiras) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. **Isoenzymes in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1989. p. 268.
- SPINOSA, A.; PIGNONE, D.; SONNANTE, G. Assessment of genetic variation in a working collection of *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. By isozyme and RAPD analyses. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.45, p.347-354, 1998.
- STEBBINS, G.L. Chromosomes and evolution in the genus *Bromus* (*Gramineae*). **Botanische Jahrbuecher fuer Systematik**, Stuttgart, v. 102, p. 359-379, 1981.
- STEINER, J.J.; GARCIA DE LOS SANTOS, G. Adaptive ecology of *Lotus corniculatus* L. genotypes: I.Plant morphology and RAPD marker characterizations. **Crop Science**, Madison, v.41, n.2, p.552-563, 2001.
- THOMSON, D.; HENRY, R. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. **BioTechniques**, Westboro, MA, v.19, n.3, p.394-400, 1995.
- TRAVERSO, J.E.; VON DER PAHLEN, A. **Variabilidad en *Bromus auleticus* (Trin. Ex Nees)**. [Pergamino, AR] : INTA. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino, Argentina, 1982. 12p. (Publicación Técnica, 41)
- WEEDEN, N.F.; WENDEL, J.F. Genetics of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. **Isozymes in plant biology**. London: Chapman&Hall, 1990. p. 46-72.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v.18, n. 22, p.6531-6535, 1990.
- YAMAMOTO, K.; FUJIWARE, T.; BLUMENREICH, I.D. Isozymic variation and interspecific crossability in annual species of the genus *Lathyrus* L. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM IBEAS: *Lathyrus* and *lathyrism*. **Proceedings...** [S.l. : s.n.], 1986. p.118-129.

7. APÉNDICES

APÊNDICE 1 – Composição do Tampão A e Tampão B utilizados para preparo dos géis de poliacrilamida (Schifino-Wittmann *et al.*, 1996).

TAMPÃO A: Borato de Lítio pH = 8,3		
Hidróxido de Lítio	PM 41,96	1,20 g
Ácido Bórico (anidro)	PM 61,83	11,89 g
Água destilada		1 L
TAMPÃO B: Tris citrato pH = 8,3		
Tris	PM 121,10	6,20 g
Ácido Cítrico	PM 192,13	1,60 g
Água destilada		Até 1 L

APÊNDICE 2 – Solução utilizada para revelação dos géis para o sistema Esterase (EST) (Schifino-Wittmann *et al.*, 1996).

Água destilada	40 ml
Tampão C + D (50 ml C + 10 ml D)	60 ml
β -naftil acetato 1%	2 ml
Fast Blue RR Salt	0,05 g
TAMPÃO C: 27,8 g NaH₂PO₄ em 1 L de água destilada	
TAMPÃO D: 56,63 g Na₂HPO₄ 7 H₂O em 1 L de água destilada	

Solução de β -naftil acetato 1%0,3 g de β -naftil acetato

15 ml de água destilada

15 ml de acetona

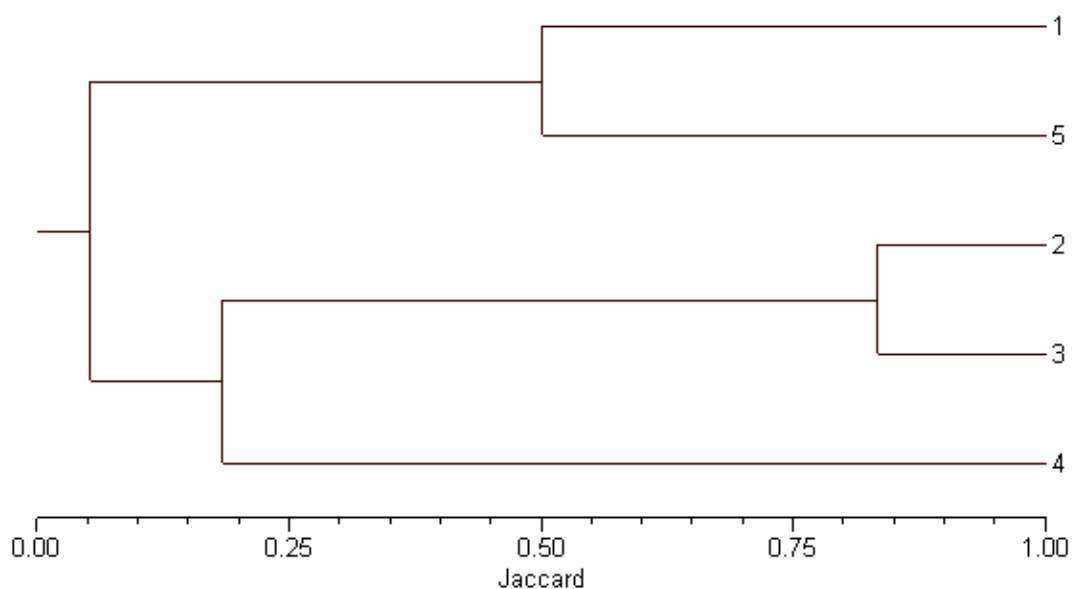
APÊNDICE 3 – Solução utilizada para revelação dos géis para o sistema
Peroxidase (PO) (Gottlieb, 1973).

Tampão acetato de sódio 0,2M pH 5,0	85 ml
3-amino-9-etil-carbazol	0,065 g
Dimetilformamida	5 ml
CaCl ₂ 0,1M	2 ml
H ₂ O ₂ 30 vol	4

gotas

APÊNDICE 4 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 03 de *Bromus auleticus*.

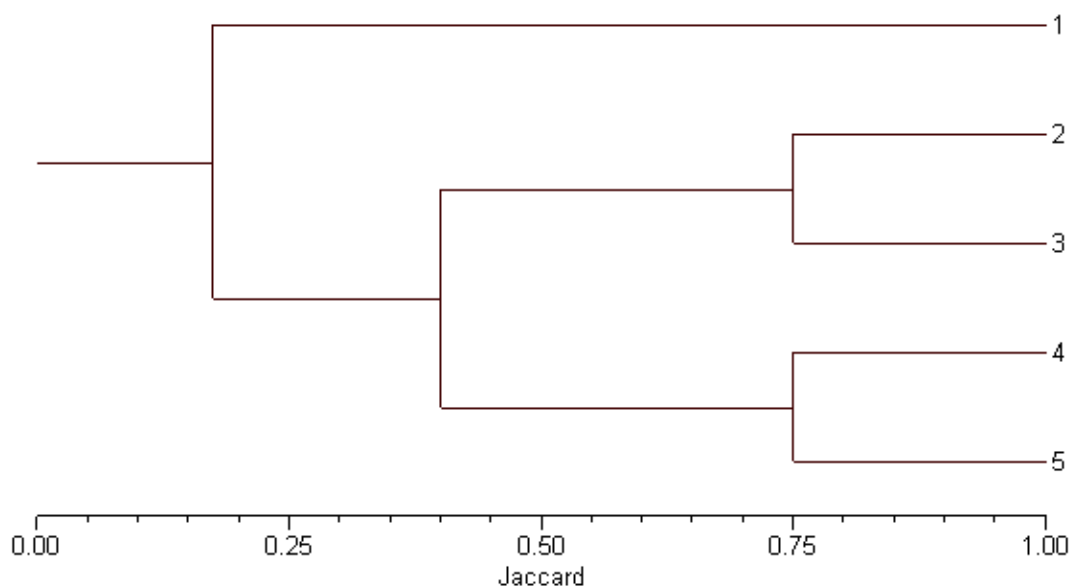
acessos	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5
3.1	1,00				
3.2	0,17	1,00			
3.3	0,14	0,83	1,00		
3.4	0,00	0,20	0,17	1,00	
3.5	0,50	0,00	0,00	0,00	1,00



APÊNDICE 5 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 03 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Peroxidase.

APÊNDICE 6 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 04 de *Bromus auleticus*.

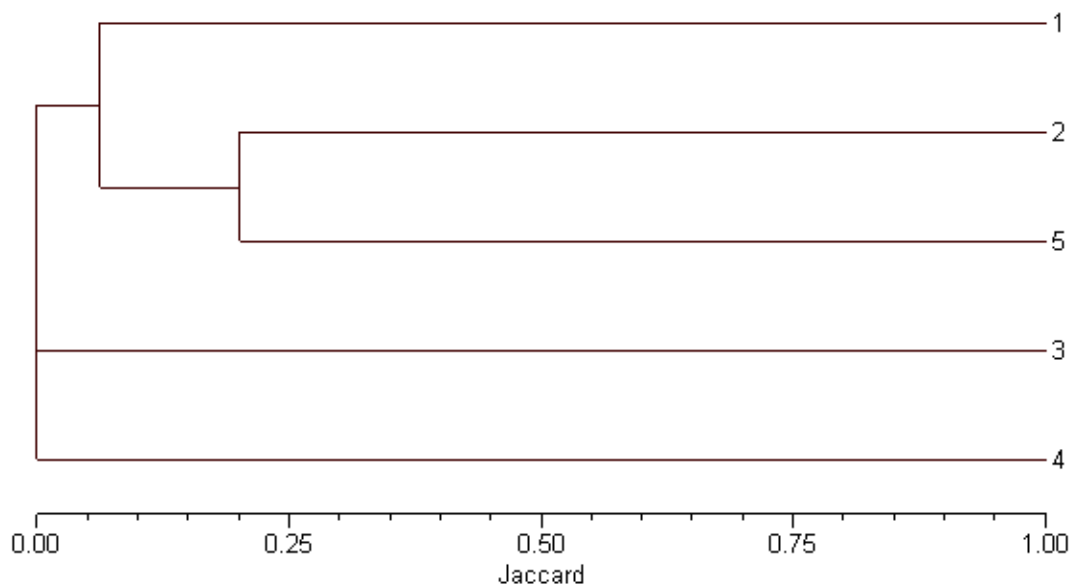
acessos	04.1	04.2	04.3	04.4	04.5
04.1	1,00				
04.2	0,14	1,00			
04.3	0,13	0,75	1,00		
04.4	0,29	0,40	0,60	1,00	
04.5	0,14	0,20	0,40	0,75	1,00



APÊNDICE 7 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 04 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Peroxidase.

APÊNDICE 8 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 06 de *Bromus auleticus*.

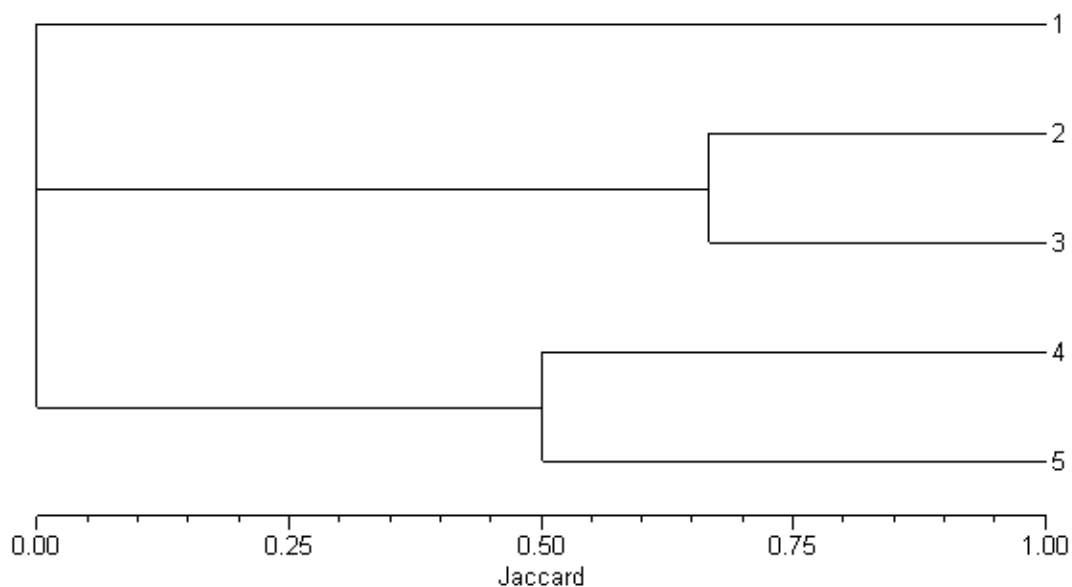
acessos	06.1	06.2	06.3	06.4	06.5
06.1	1,00				
06.2	0,13	1,00			
06.3	0,00	0,00	1,00		
06.4	0,00	0,00	0,00	1,00	
06.5	0,00	0,20	0,00	0,00	1,00



APÊNDICE 9 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 06 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Peroxidase.

APÊNDICE 10 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 07 de *Bromus auleticus*.

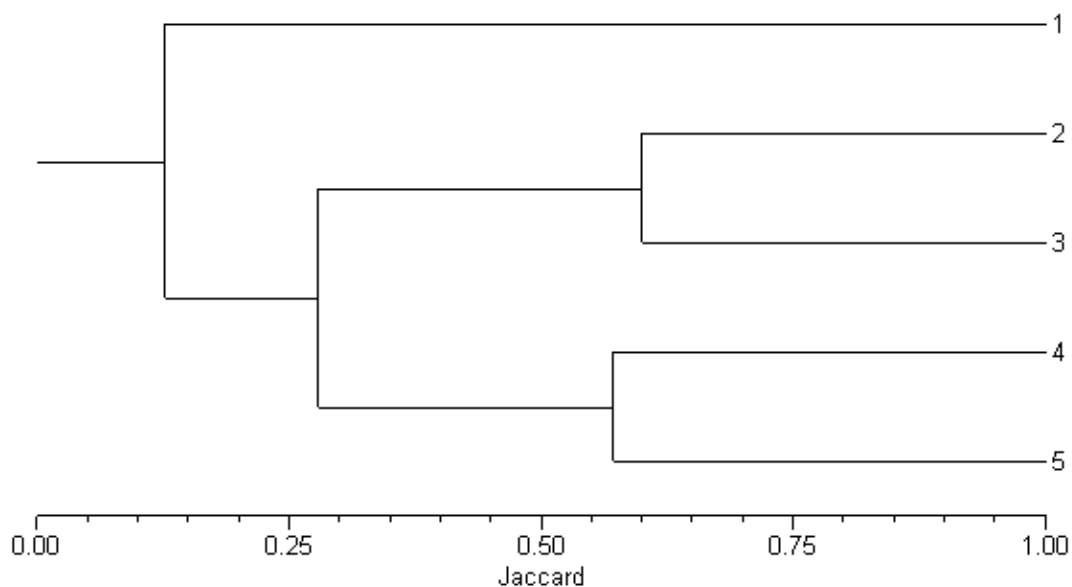
acessos	07.1	07.2	07.3	07.4	07.5
07.1	1,00				
07.2	0,00	1,00			
07.3	0,00	0,67	1,00		
07.4	0,00	0,00	0,00	1,00	
07.5	0,00	0,00	0,00	0,50	1,00



APÊNDICE 11 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 07 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Peroxidase.

APÊNDICE 12 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 09 de *Bromus auleticus*.

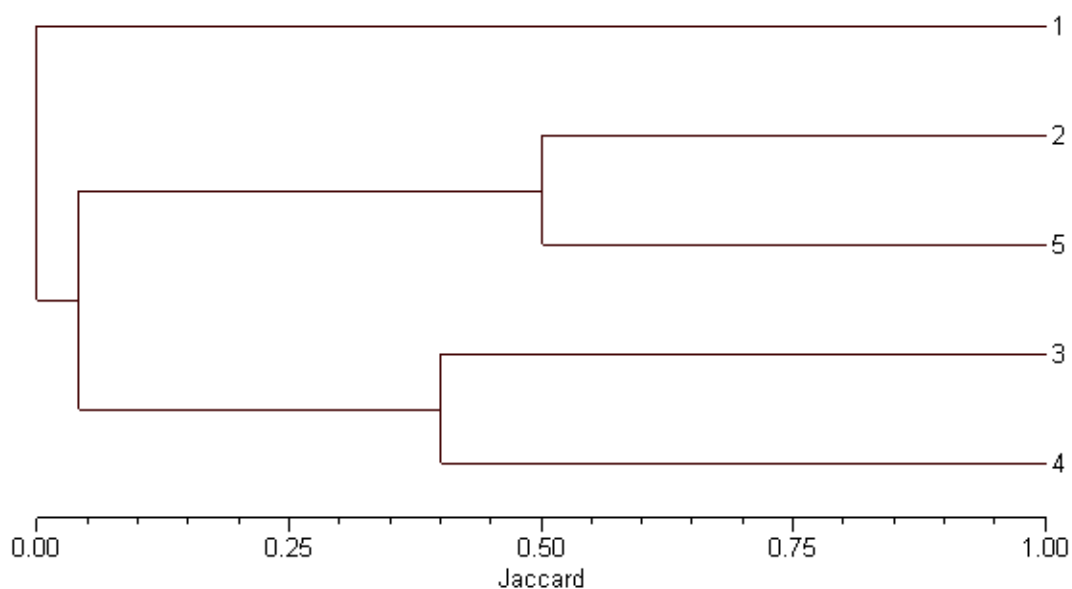
acessos	09.1	09.2	09.3	09.4	09.5
09.1	1,00				
09.2	0,14	1,00			
09.3	0,00	0,60	1,00		
09.4	0,14	0,33	0,33	1,00	
09.5	0,22	0,22	0,22	0,57	1,00



APÊNDICE 13 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 09 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Peroxidase.

APÊNDICE 14 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 13 de *Bromus auleticus*.

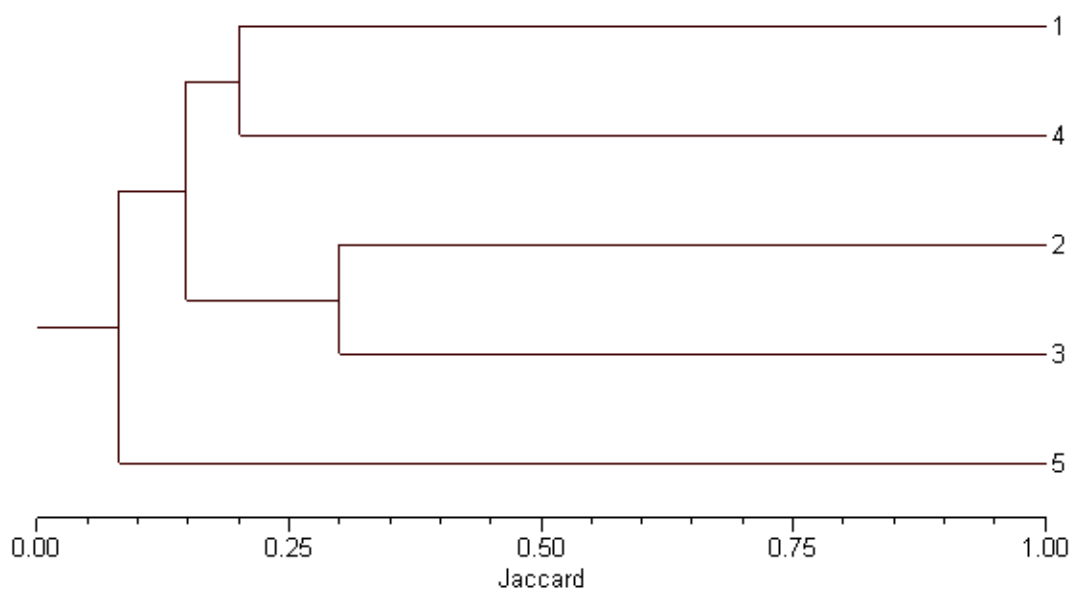
acessos	13.1	13.2	13.3	13.4	13.5
13.1	1,00				
13.2	0,00	1,00			
13.3	0,00	0,00	1,00		
13.4	0,00	0,00	0,40	1,00	
13.5	0,00	0,50	0,00	0,17	1,00



APÊNDICE 15 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 13 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Peroxidase.

APÊNDICE 16 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 14 de *Bromus auleticus*.

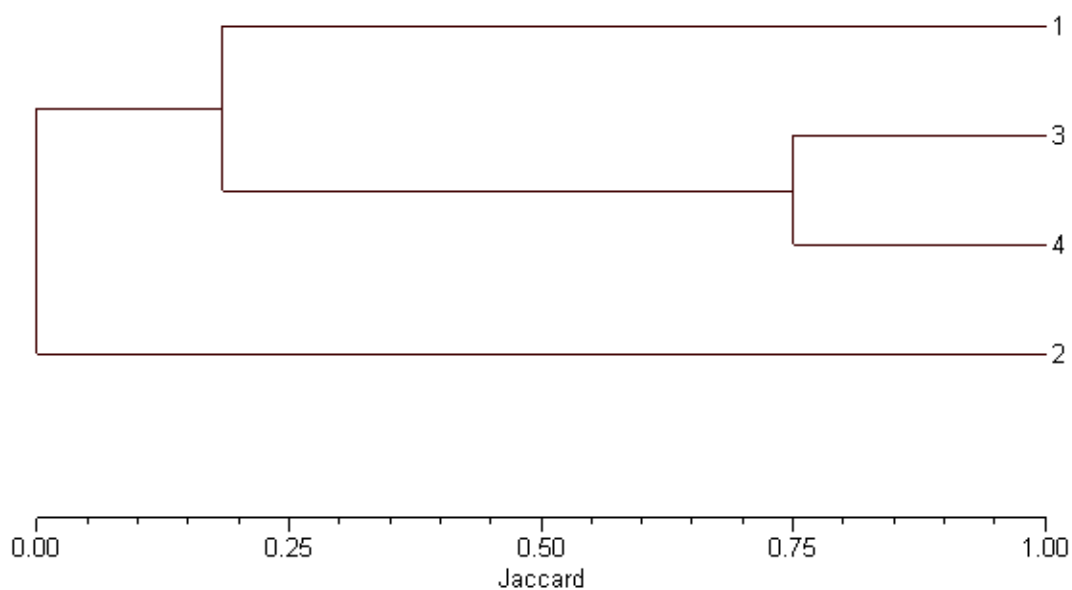
acessos	14.1	14.2	14.3	14.4	14.5
14.1	1,00				
14.2	0,20	1,00			
14.3	0,00	0,30	1,00		
14.4	0,20	0,09	0,30	1,00	
14.5	0,08	0,08	0,08	0,08	1,00



APÊNDICE 17 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 14 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Peroxidase.

APÊNDICE 18 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 4 indivíduos do acesso 15 de *Bromus auleticus*.

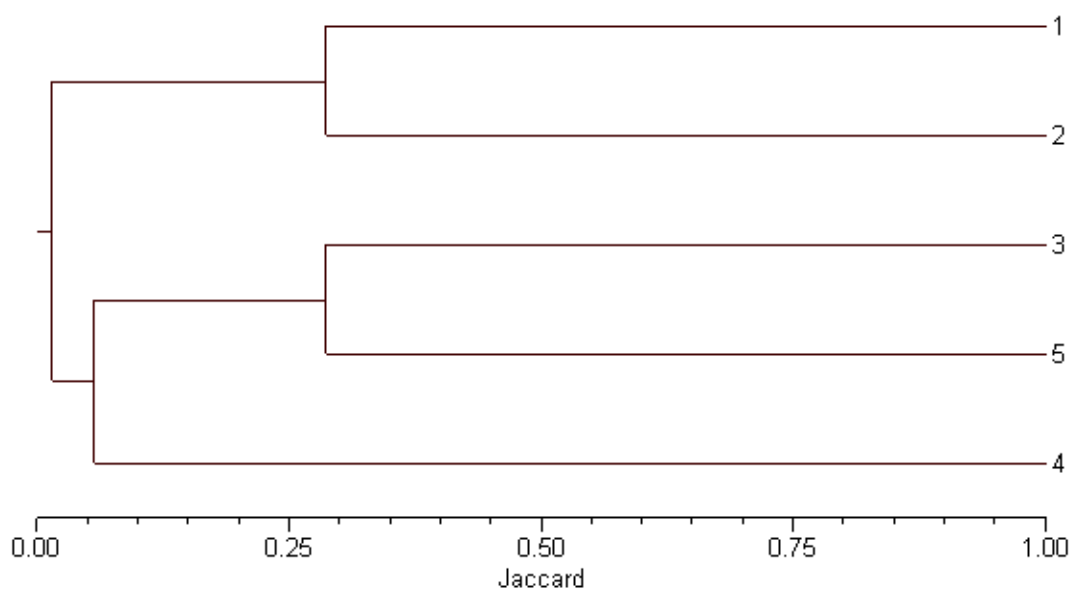
acessos	15.1	15.2	15.3	15.4
15.1	1,00			
15.2	0,00	1,00		
15.3	0,17	0,00	1,00	
15.4	0,20	0,00	0,75	1,00



APÊNDICE 19 – Fenograma de similaridade genética de 4 indivíduos do acesso 15 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Peroxidase.

APÊNDICE 20 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 16 de *Bromus auleticus*.

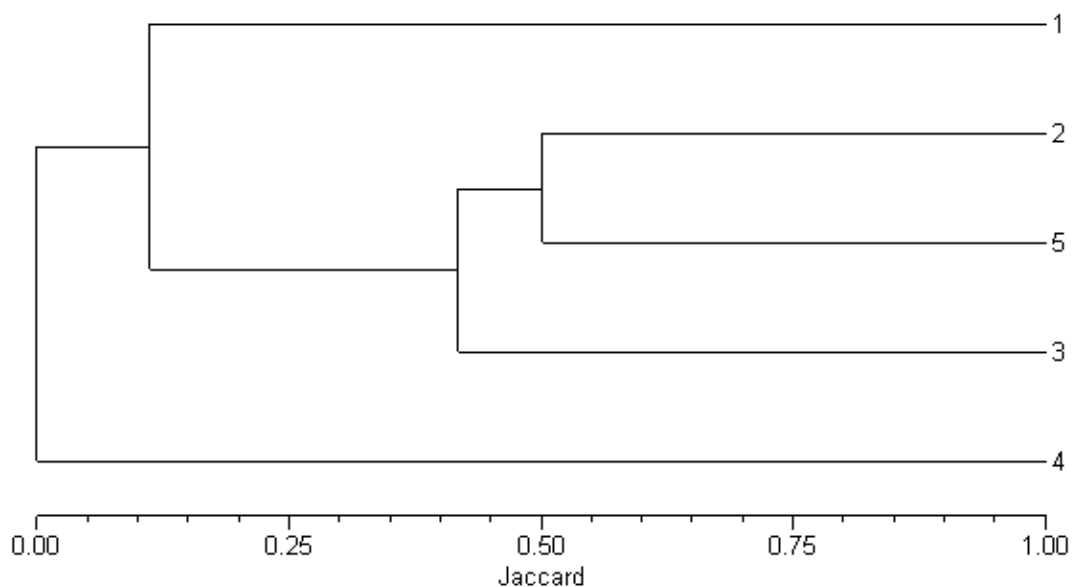
acessos	16.1	16.2	16.3	16.4	16.5
16.1	1,00				
16.2	0,29	1,00			
16.3	0,00	0,00	1,00		
16.4	0,00	0,00	0,00	1,00	
16.5	0,00	0,09	0,29	0,11	1,00



APÊNDICE 21 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 16 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Peroxidase.

APÊNDICE 22 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 03 de *Bromus auleticus*.

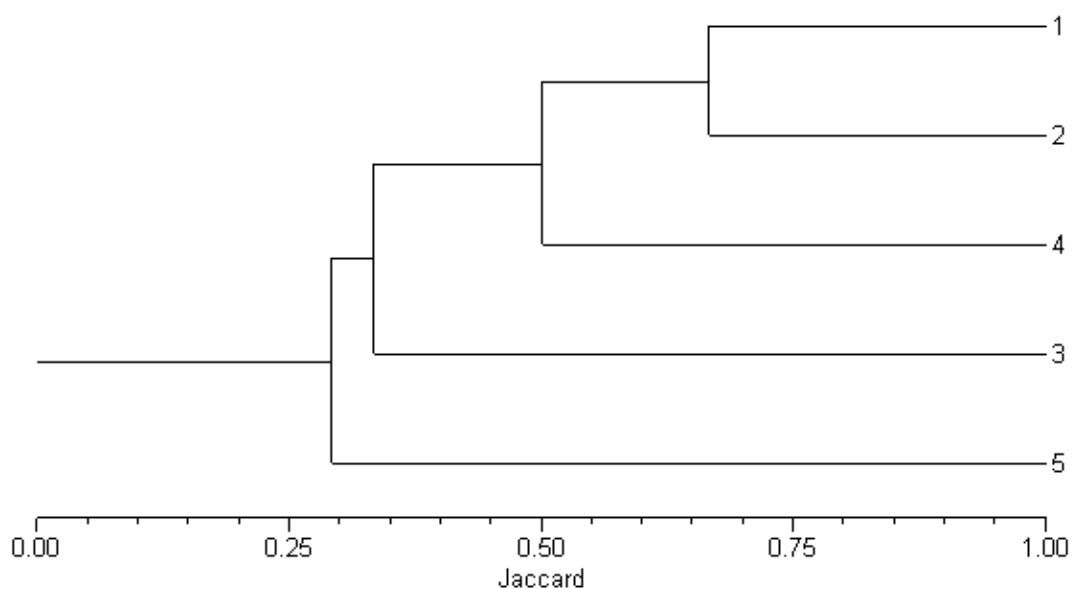
acessos	03.1	03.2	03.3	03.4	03.5
03.1	1,00				
03.2	0,00	1,00			
03.3	0,33	0,33	1,00		
03.4	0,00	0,00	0,00	1,00	
03.5	0,00	0,50	0,50	0,00	1,00



APÊNDICE 23 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 03 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase.

APÊNDICE 24 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 04 de *Bromus auleticus*.

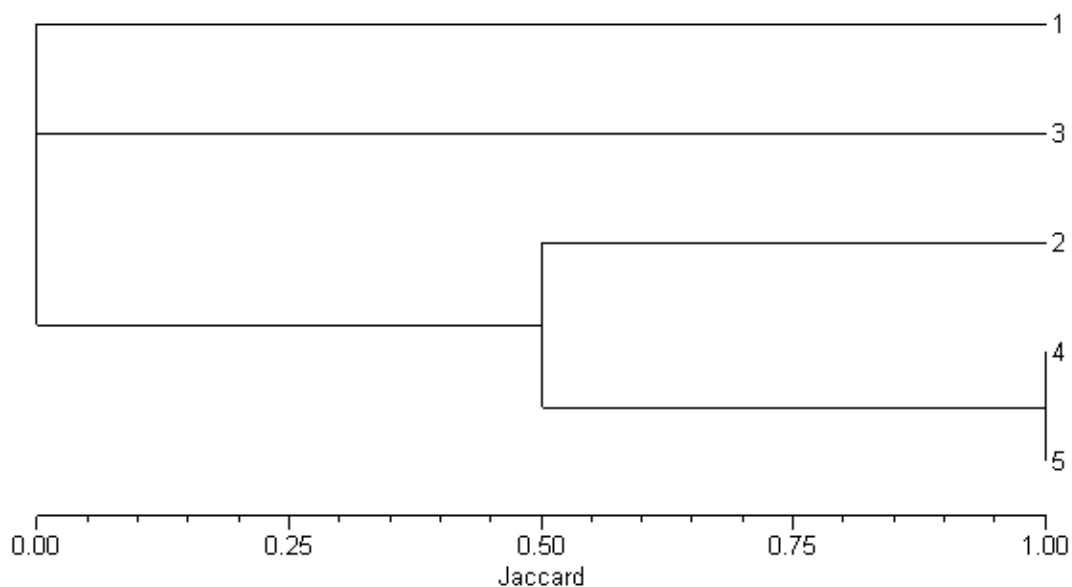
acessos	04.1	04.2	04.3	04.4	04.5
04.1	1,00				
04.2	0,67	1,00			
04.3	0,50	0,25	1,00		
04.4	0,67	0,33	0,25	1,00	
04.5	0,25	0,33	0,25	0,33	1,00



APÊNDICE 25 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 04 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase.

APÊNDICE 26 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 06 de *Bromus auleticus*.

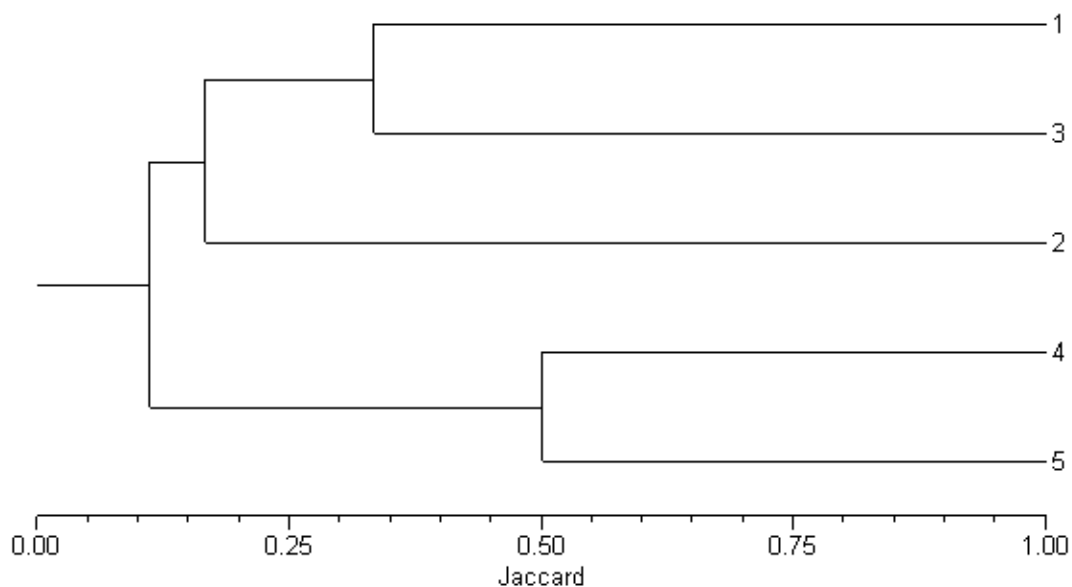
acessos	06.1	06.2	06.3	06.4	06.5
06.1	1,00				
06.2	0,00	1,00			
06.3	0,00	0,00	1,00		
06.4	0,00	0,50	0,00	1,00	
06.5	0,00	0,50	0,00	1,00	1,00



APÊNDICE 27 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 06 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase.

APÊNDICE 28 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 07 de *Bromus auleticus*.

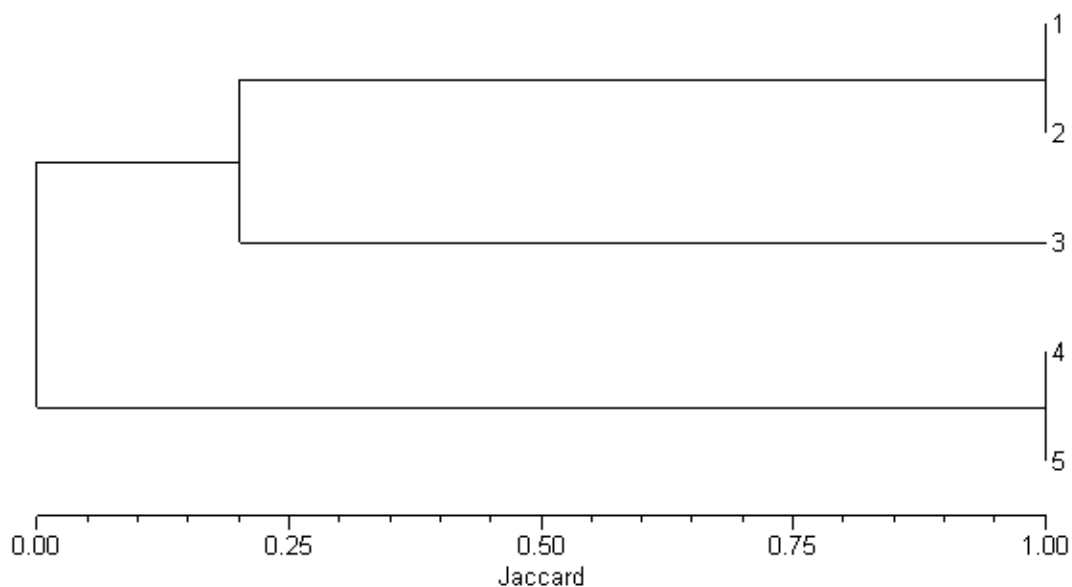
acessos	07.1	07.2	07.3	07.4	07.5
07.1	1,00				
07.2	0,00	1,00			
07.3	0,33	0,33	1,00		
07.4	0,33	0,00	0,33	1,00	
07.5	0,00	0,00	0,00	0,50	1,00



APÊNDICE 29 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 07 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase.

APÊNDICE 30 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 09 de *Bromus auleticus*.

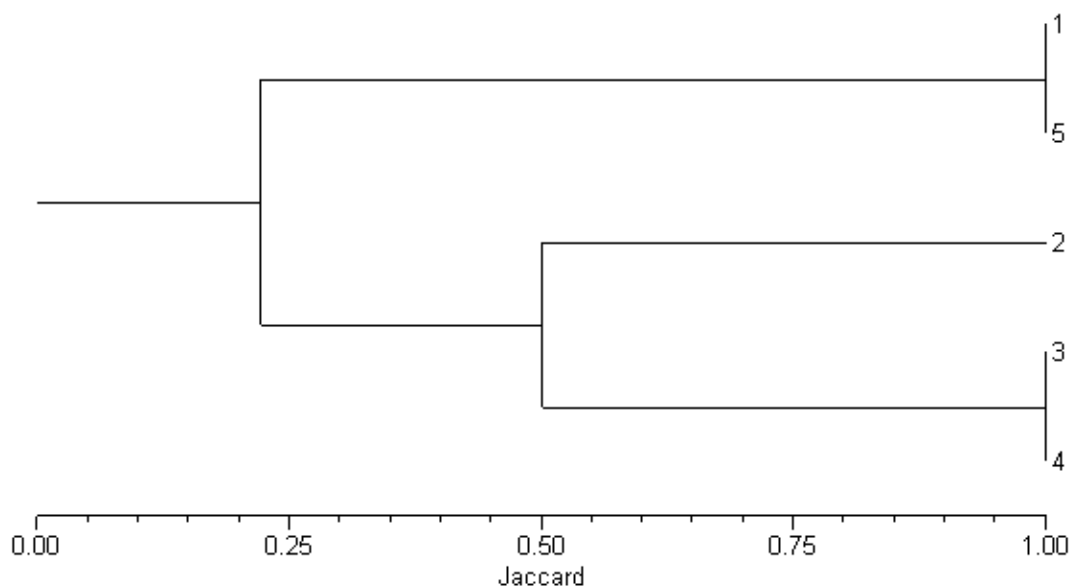
acessos	09.1	09.2	09.3	09.4	09.5
09.1	1,00				
09.2	1,00	1,00			
09.3	0,20	0,20	1,00		
09.4	0,00	0,00	0,00	1,00	
09.5	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00



APÊNDICE 31 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 09 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase.

APÊNDICE 32 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 13 de *Bromus auleticus*.

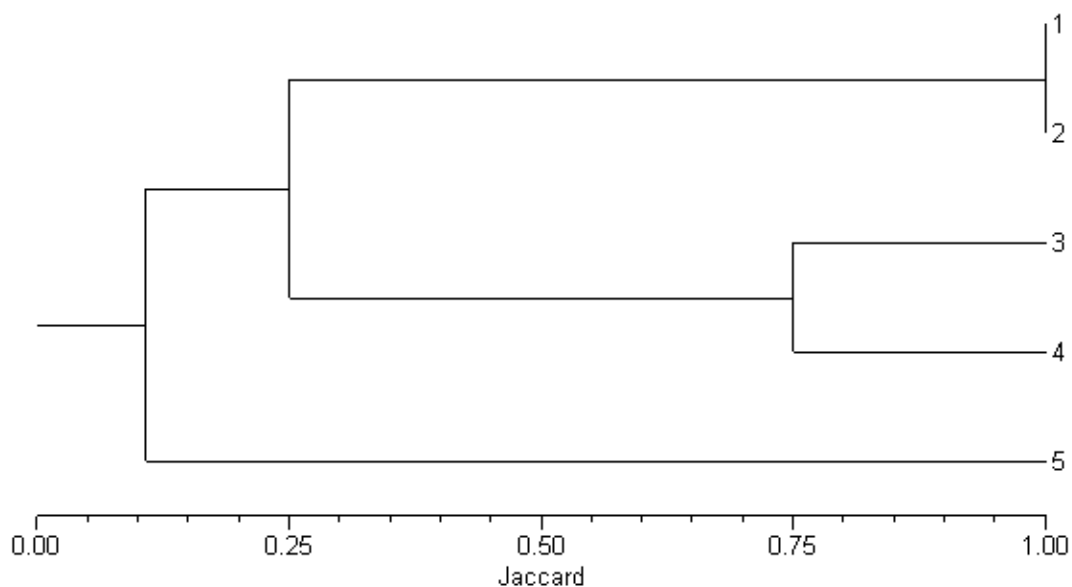
acessos	13.1	13.2	13.3	13.4	13.5
13.1	1,00				
13.2	0,00	1,00			
13.3	0,33	0,50	1,00		
13.4	0,33	0,50	1,00	1,00	
13.5	1,00	0,00	0,33	0,33	1,00



APÊNDICE 33 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 13 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase.

APÊNDICE 34 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 14 de *Bromus auleticus*.

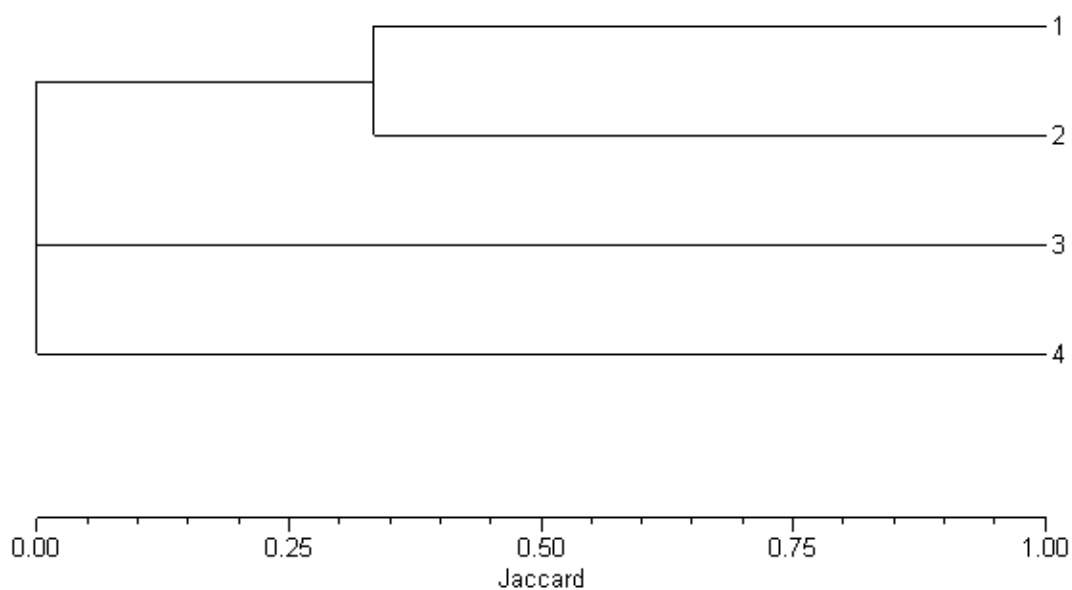
acessos	14.1	14.2	14.3	14.4	14.5
14.1	1,00				
14.2	1,00	1,00			
14.3	0,17	0,17	1,00		
14.4	0,33	0,33	0,75	1,00	
14.5	0,14	0,14	0,00	0,14	1,00



APÊNDICE 35 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 14 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase.

APÊNDICE 36 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase, incluindo 32 isoenzimas para 4 indivíduos do acesso 15 de *Bromus auleticus*.

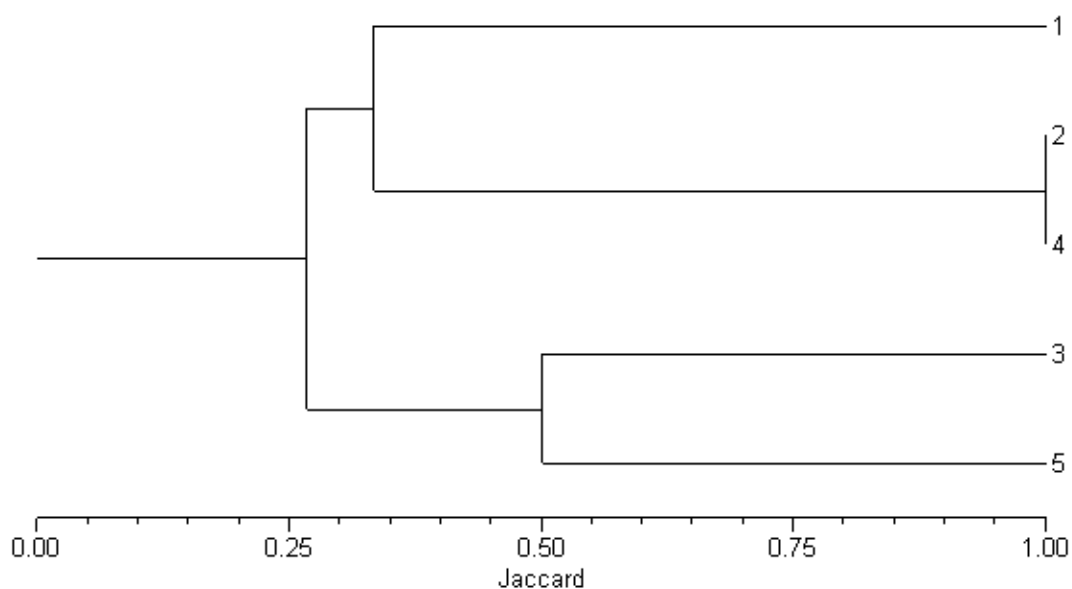
acessos	15.1	15.2	15.3	15.4
15.1	1,00			
15.2	0,33	1,00		
15.3	0,00	0,00	1,00	
15.4	0,00	0,00	0,00	1,00



APÊNDICE 37 – Fenograma de similaridade genética de 4 indivíduos do acesso 15 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase.

APÊNDICE 38 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 16 de *Bromus auleticus*.

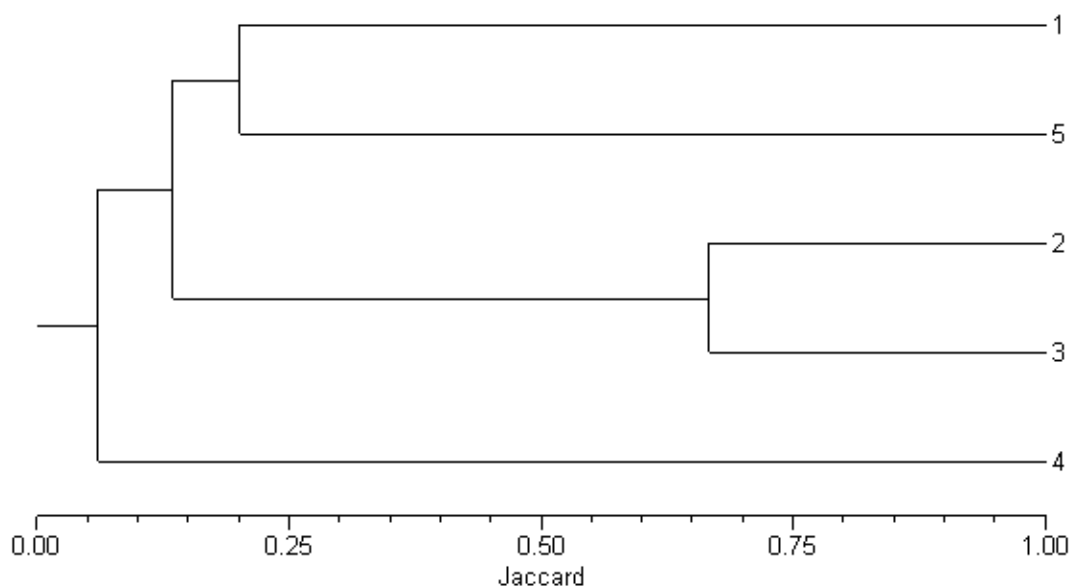
acessos	16.1	16.2	16.3	16.4	16.5
16.1	1,00				
16.2	0,33	1,00			
16.3	0,33	0,33	1,00		
16.4	0,33	1,00	0,33	1,00	
16.5	0,20	0,20	0,50	0,20	1,00



APÊNDICE 39 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 16 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase.

APÊNDICE 40 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase e Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 03 de *Bromus auleticus*.

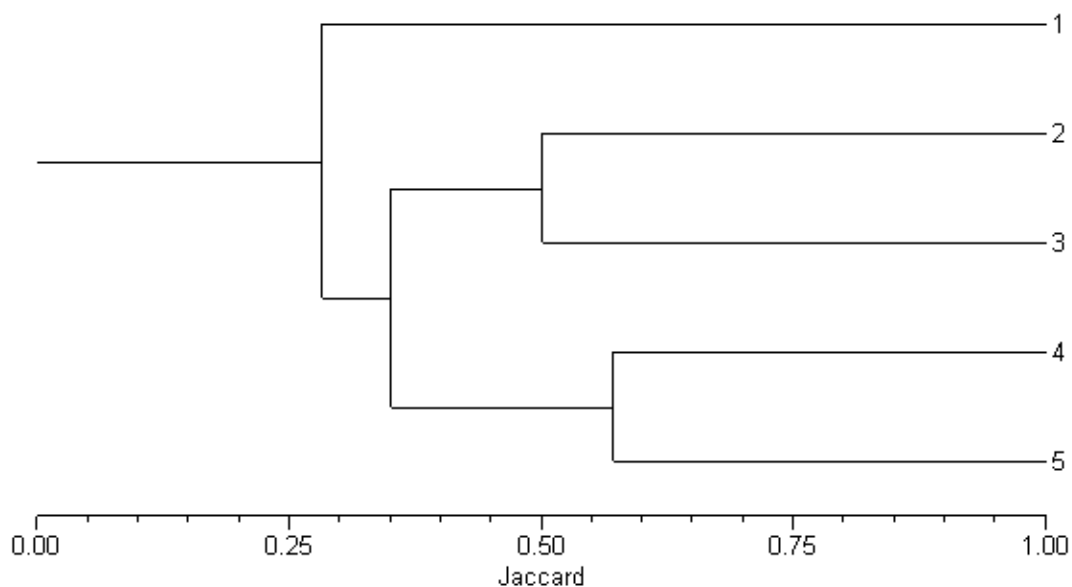
acessos	03.1	03.2	03.3	03.4	03.5
03.1	1,00				
03.2	0,10	1,00			
03.3	0,20	0,67	1,00		
03.4	0,00	0,13	0,11	1,00	
03.5	0,20	0,13	0,11	0,00	1,00



APÊNDICE 41 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 03 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase e Peroxidase.

APÊNDICE 42 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase e Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 04 de *Bromus auleticus*.

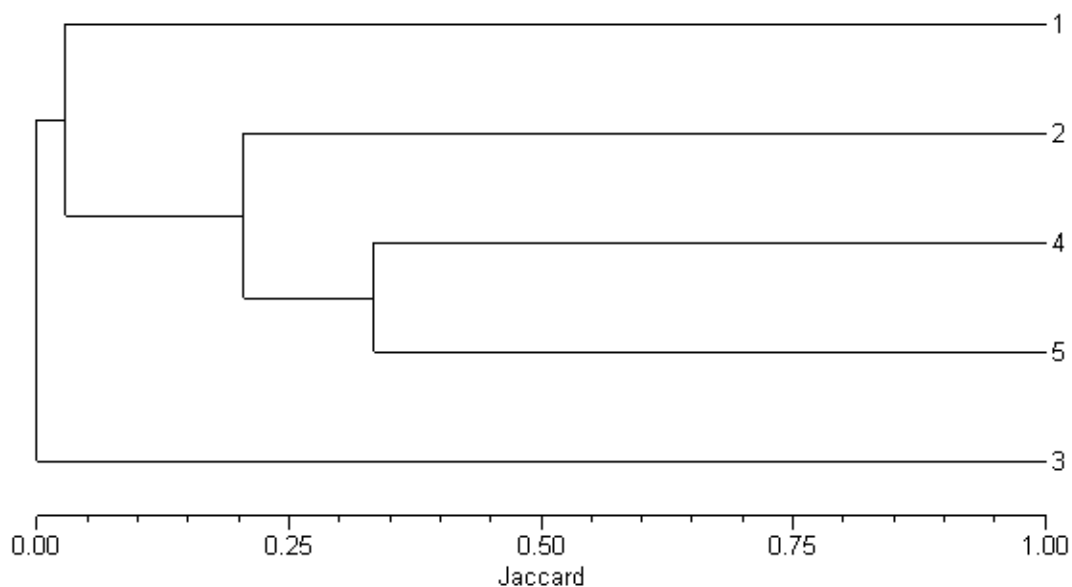
acessos	04.1	04.2	04.3	04.4	04.5
04.1	1,00				
04.2	0,30	1,00			
04.3	0,25	0,50	1,00		
04.4	0,40	0,38	0,44	1,00	
04.5	0,18	0,25	0,33	0,57	1,00



APÊNDICE 43 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 04 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase e Peroxidase.

APÊNDICE 44 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase e Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 06 de *Bromus auleticus*.

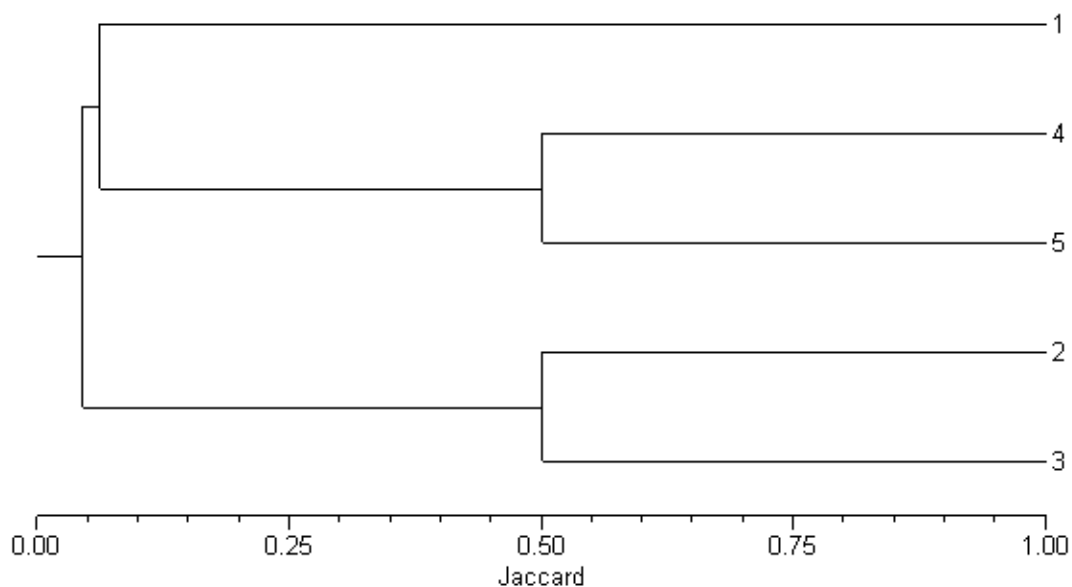
acessos	06.1	06.2	06.3	06.4	06.5
06.1	1,00				
06.2	0,08	1,00			
06.3	0,00	0,00	1,00		
06.4	0,00	0,13	0,00	1,00	
06.5	0,00	0,29	0,00	0,33	1,00



APÊNDICE 45 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 06 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase e Peroxidase.

APÊNDICE 46 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase e Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 07 de *Bromus auleticus*.

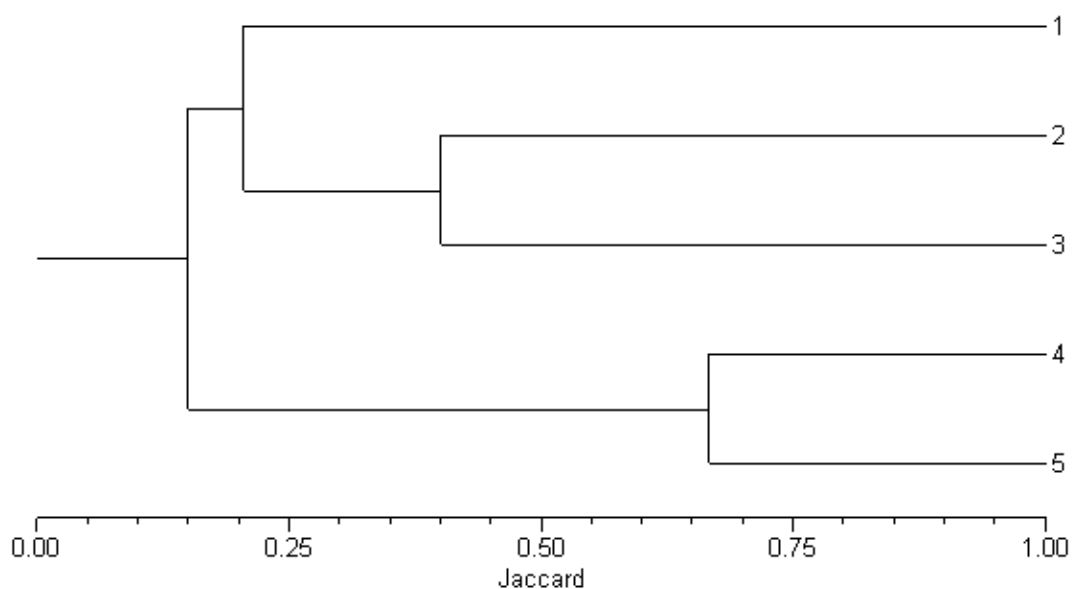
acessos	07.1	07.2	07.3	07.4	07.5
07.1	1,00				
07.2	0,00	1,00			
07.3	0,13	0,50	1,00		
07.4	0,13	0,00	0,14	1,00	
07.5	0,00	0,00	0,00	0,50	1,00



APÊNDICE 47 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 07 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase e Peroxidase.

APÊNDICE 48 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase e Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 09 de *Bromus auleticus*.

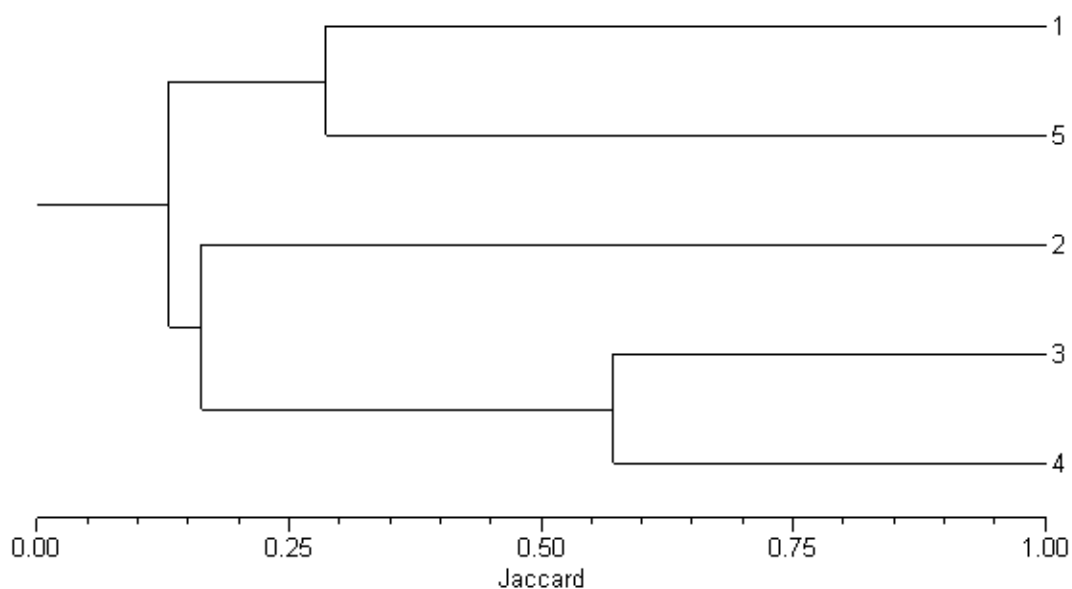
acessos	09.1	09.2	09.3	09.4	09.5
09.1	1,00				
09.2	0,33	1,00			
09.3	0,08	0,40	1,00		
09.4	0,09	0,20	0,17	1,00	
09.5	0,15	0,15	0,13	0,67	1,00



APÊNDICE 49 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 09 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase e Peroxidase.

APÊNDICE 50 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase e Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 13 de *Bromus auleticus*.

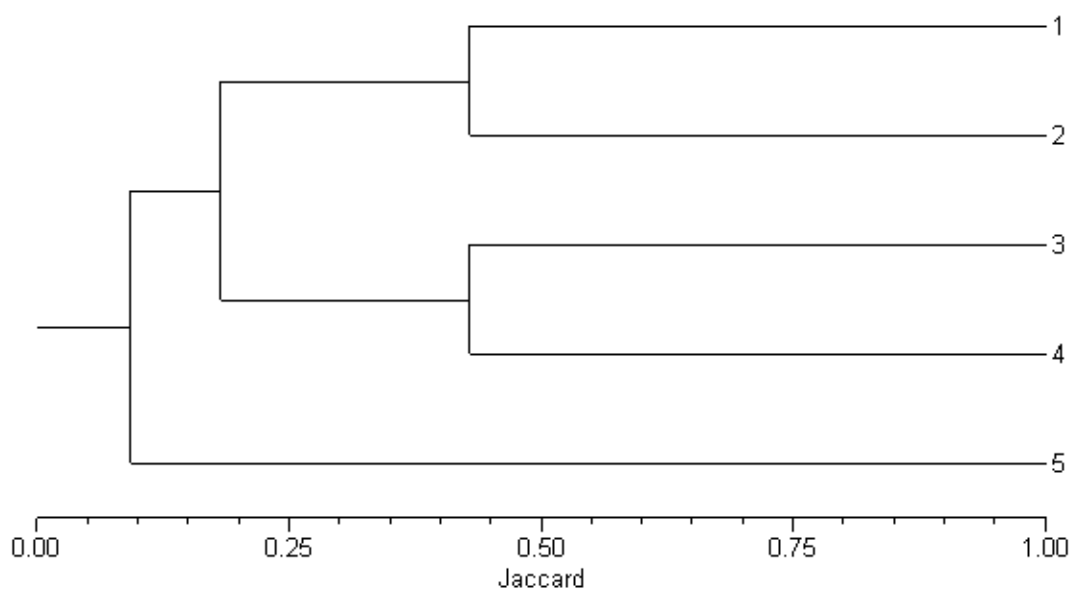
acessos	13.1	13.2	13.3	13.4	13.5
13.1	1,00				
13.2	0,00	1,00			
13.3	0,13	0,20	1,00		
13.4	0,09	0,13	0,57	1,00	
13.5	0,29	0,20	0,14	0,22	1,00



APÊNDICE 51 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 13 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase e Peroxidase.

APÊNDICE 52 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase e Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 14 de *Bromus auleticus*.

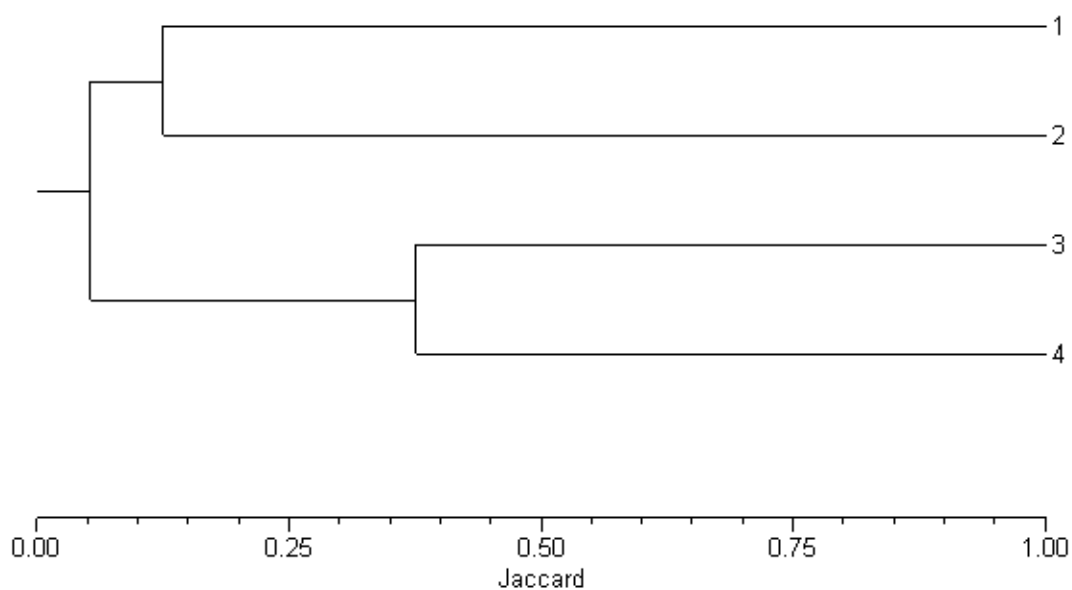
acesso	14.1	14.2	14.3	14.4	14.5
14.1	1,00				
14.2	0,43	1,00			
14.3	0,05	0,25	1,00		
14.4	0,25	0,18	0,43	1,00	
14.5	0,11	0,11	0,05	0,11	1,00



APÊNDICE 53 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 14 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase e Peroxidase.

APÊNDICE 54 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase e Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 4 indivíduos do acesso 15 de *Bromus auleticus*.

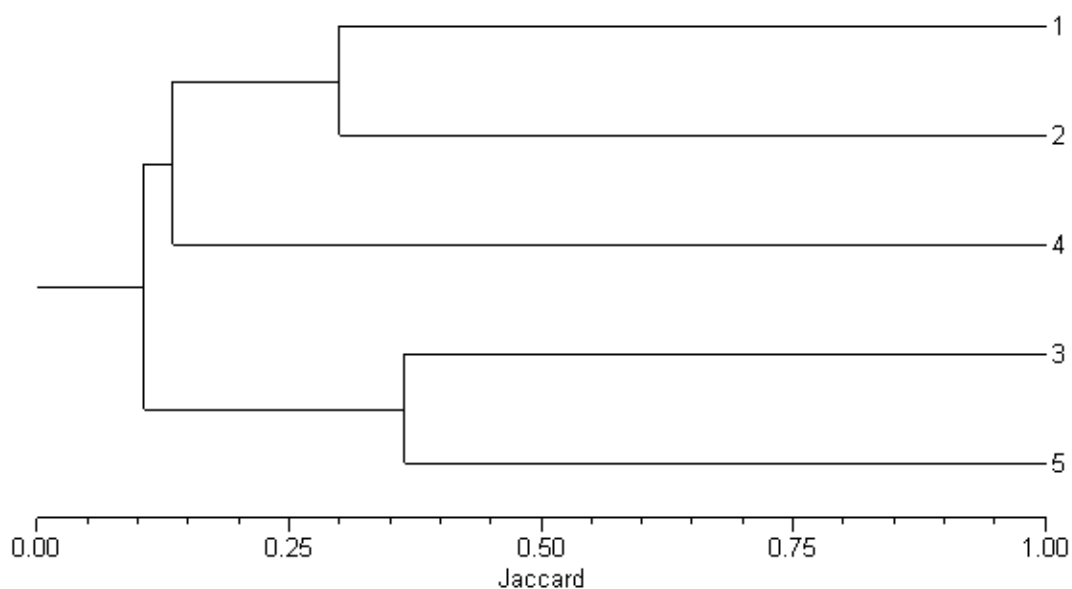
acessos	15.1	15.2	15.3	15.4
15.1	1,00			
15.2	0,13	1,00		
15.3	0,10	0,00	1,00	
15.4	0,11	0,00	0,38	1,00



APÊNDICE 55 – Fenograma de similaridade genética de 4 indivíduos do acesso 15 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase e Peroxidase.

APÊNDICE 56 – Matriz de similaridade genética obtida através de dados do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizada para a análise de agrupamento para o sistema Esterase e Peroxidase, incluindo 32 isoenzimas para 5 indivíduos do acesso 16 de *Bromus auleticus*.

acessos	16.1	16.2	16.3	16.4	16.5
16.1	1,00				
16.2	0,30	1,00			
16.3	0,11	0,08	1,00		
16.4	0,10	0,17	0,10	1,00	
16.5	0,07	0,13	0,36	0,14	1,00



APÊNDICE 57 – Fenograma de similaridade genética de 5 indivíduos do acesso 16 de *Bromus auleticus* utilizando o coeficiente de Jaccard para o sistema Esterase e Peroxidase.

APÊNDICE 59 – Variabilidade isoenzimática detectada em cinco indivíduos de cada um dos 11 acessos com o sistema

Esterase (EST)

acessos		03					04					06					07					09					13					14					15					16				
isoenzima	MR	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	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
EST13	1,01	--	--	--	--																																									
EST12	0,98	--	--																																											
EST11	0,94	--																																												
EST10	0,92						--	--	--								--	--																												
EST09	0,90	--					--	--		--	--	--											--	--											--											
EST08	0,88								--	--	--	--																	--	--																
EST07	0,87						--	--	--								--	--											--	--					--	--										
EST06	0,88											--					--	--					--	--											--											
EST05	0,90											--	--	--																					--											
EST04	0,82			--													--	--	--				--	--											--	--										
EST03	0,80																						--	--																						
EST02	0,79																												--	--																
EST01	0,76																												--	--																

