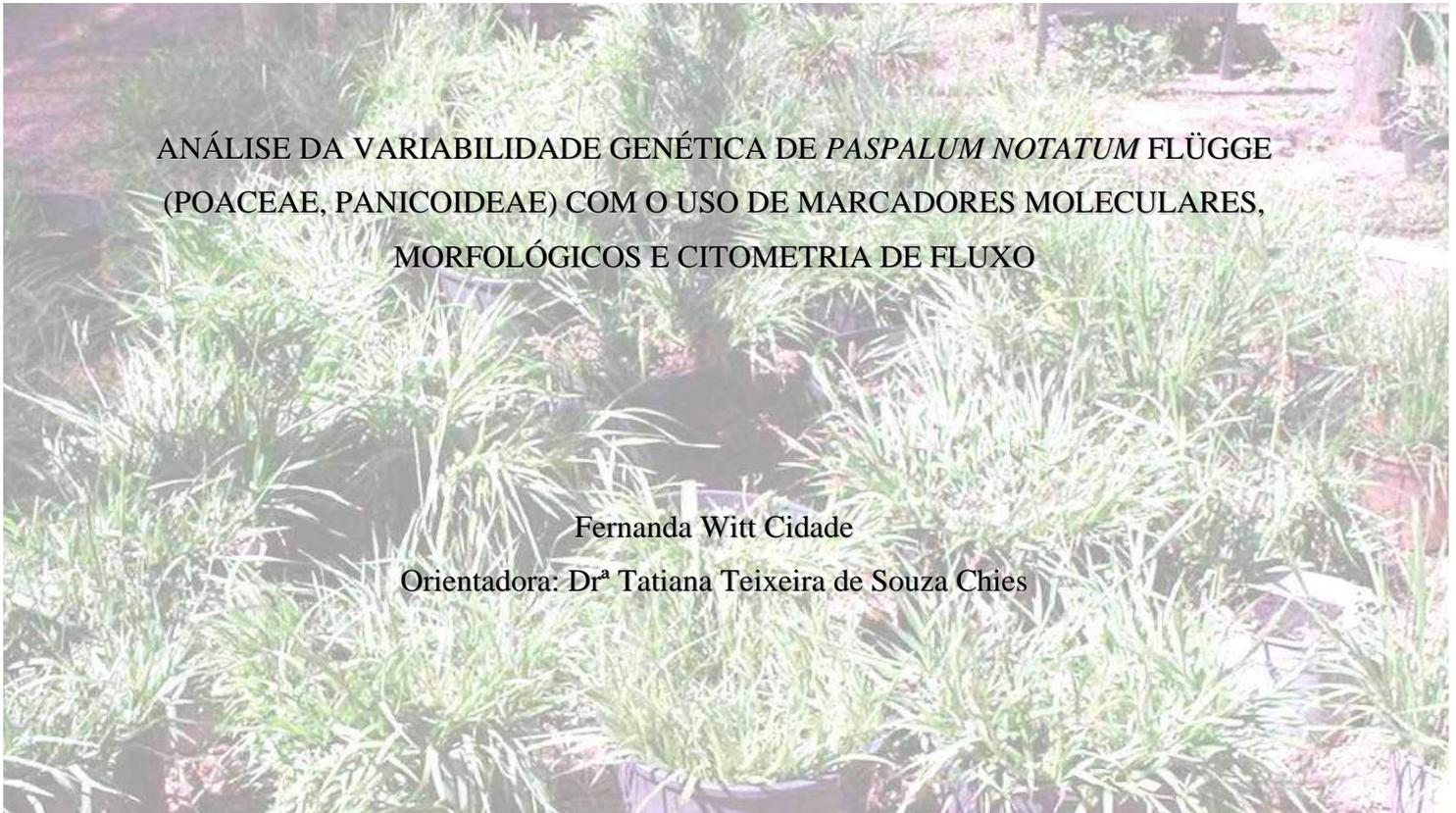


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Botânica



ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *PASPALUM NOTATUM* FLÜGGE  
(POACEAE, PANICOIDEAE) COM O USO DE MARCADORES MOLECULARES,  
MORFOLÓGICOS E CITOMETRIA DE FLUXO

Fernanda Witt Cidade

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Tatiana Teixeira de Souza Chies

Porto Alegre

2006

Fernanda Witt Cidade

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *PASPALUM NOTATUM* FLÜGGE  
(POACEAE, PANICOIDEAE) COM O USO DE MARCADORES MOLECULARES,  
MORFOLÓGICOS E CITOMETRIA DE FLUXO

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Botânica da  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul, para a obtenção do grau de  
mestre.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Tatiana Teixeira de Souza Chies,  
PPG-Botânica, UFRGS

UFRGS, Porto Alegre

2006

*Dedico este trabalho aos meus Pais,  
Francisco e Leontina, que me deram todas as  
oportunidades de crescer como ser humano e sem  
os quais eu não chegaria aonde cheguei.*

## Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para que esta Dissertação se realizasse, em especial:

- À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Tatiana T. T. de Souza Chies, pela orientação, amizade, compreensão e o apoio que me deu nos momentos mais difíceis. E também, por ter me apresentado o grande e lindo mundo dos *Paspalum*.
- À Professora Dr<sup>a</sup> Thaís Scotti do Canto-Dorow que me deu as primeiras orientações quanto à análise morfológica em *Paspalum*.
- À Professora Dr<sup>a</sup> Fernanda Bered, pela incansável paciência ao me orientar na análise dos dados;
- Ao Professor Dr. Miguel Dall'Agnol e aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Plantas Forrageiras) da Faculdade de Agronomia, pela ajuda durante o cultivo do material.
- A todos os professores do Laboratório de Genética Vegetal;
- Ao Elmo e à Ellen, pelo apoio, carinho e amizade.
- À Silvia, por todo apoio e orientação laboratorial, além dos agradáveis momentos de conversa e descontração.
- Aos colegas e amigos do Departamento de Genética e do Departamento de Botânica.
- Ao Andrés, pela ajuda com as análises de citometria de fluxo.
- Ao Zeca, por ter me cedido espaço no termociclador, em um momento crítico do trabalho.
- À minha amiga Bianca a qual me ajudou muito durante todo o Mestrado, principalmente nos momentos mais difíceis.
- À Carmen e ao Vinícius, pelo auxílio que me prestaram.
- Aos meus irmãos, Francisco e Fabiana, pela amizade e compreensão principalmente durante a fase de conclusão do trabalho.
- Aos meus Pais que, além de terem me dado a oportunidade de estudar e crescer, viabilizando a minha chegada ao Mestrado, sempre estiveram presentes oferecendo-me apoio, amor, carinho e amizade.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRAT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. <i>Paspalum</i> .....	9
1.2. <i>Paspalum notatum</i> Flügge.....	11
1.3. Marcadores Moleculares.....	19
1.4. Citometria de Fluxo.....	23
1.5. Objetivos .....	24
ARTIGO .....	25
Resumo .....	27
Abstract .....	28
Introdução .....	29
Material e métodos .....	33
Resultados e discussão .....	40
Conclusões.....	54
Referências bibliográficas .....	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64

## RESUMO

O gênero *Paspalum* L. compreende aproximadamente 400 espécies no mundo e cerca de 220 no Brasil. *Paspalum* é ecologicamente e economicamente importante e tem sido utilizado como pastagem. *Paspalum notatum* Flüggé (grama-forquilha) é uma valorosa gramínea forrageira nos subtrópicos. Esta espécie consiste de vários biótipos sexuais (diplóides) e apomíticos (tetraplóides, ocasionalmente tri e pentaplóides). Neste trabalho, os *Inter Simple Sequence repeat* (ISSR) foram utilizados para acessar a diversidade genética da grama-forquilha (*Paspalum notatum*). Os tecidos vegetativos de 95 acessos de grama-forquilha foram obtidos de vários locais da América do Sul (Brasil, Argentina e Uruguai). Um total de 91 de fragmentos reproduzível ISSR foi observado. Oitenta e nove fragmentos (97,5% do total observado) foram polimórficos. A análise de agrupamento (UPGMA) foi realizada para o conjunto de dados ISSR. Os resultados ilustram as relações genéticas entre 95 acessos de *Paspalum notatum*. A comparação entre dados moleculares, morfológicos e nível de ploidia foi realizada. Em resumo, os marcadores moleculares ISSR mostraram-se eficientes para distinção dos genótipos analisados e observou-se uma variabilidade ampla para a espécie. Estes resultados adicionam novas informações sobre a diversidade genética em *Paspalum notatum*, conseqüentemente contribuindo para o conhecimento biológico desta espécie e fornecendo subsídios para futuros programas de melhoramento genético e para programas de conservação.

Palavras chave: Citometria de fluxo; Diversidade genética; Marcadores moleculares ISSR; *Paspalum* L.; *Paspalum notatum* Fl..

## ABSTRACT

The genus *Paspalum* L. comprises approximately 400 species worldwide and about 220 in Brazil. *Paspalum* is ecologically and economically important, and has been very useful as pasture and *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) is a valuable forage grass in the subtropics. This species consists of several sexual (diploid) and apomictic (tetraploid, occasionally tri and pentaploids) biotypes. In this work, inter Simple Sequence Repeats (ISSR) markers were used to assess the genetic variability of a bahiagrass (*Paspalum notatum*) collection. Vegetative tissues of 95 bahiagrass accessions were obtained from various locations in South America (Brazil, Argentina and Uruguay). A total of 91 reproducible ISSR fragments were observed and eighty nine fragments (97.5% of the total observed) were polymorphic. Cluster analyses (UPGMA) were performed from the ISSR data set and the results illustrate the genetic relationships among the 95 accessions of *Paspalum notatum*. A comparison among molecular, morphological and ploidy levels data were done. ISSR markers were effective in distinguishing the genotypes analyzed, and a wide variability was observed for this species. These results add new information regarding the genetic diversity in *Paspalum notatum*, thus contributing towards the biological knowledge of this species, and providing with subsidies for future plant breeding and conservation programs.

Key Words: Flow citometry; Genetic diversity; Molecular markers ISSR; *Paspalum* L.; *Paspalum notatum* Fl..

## 1. INTRODUÇÃO

Os campos naturais do Rio Grande do Sul ocupam cerca de 10.500 milhões de hectares, correspondendo a 37% da superfície do Estado e são de extrema importância para a atividade pecuarista (Boldrini, 1997). Esses campos apresentam grande diversidade, possuindo cerca de 400 espécies de gramíneas e 150 espécies de leguminosas (Boldrini, 1997).

As gramíneas são predominantes nos campos nativos do Estado do Rio Grande do Sul, sendo que o gênero *Paspalum* L. ocupa um lugar de destaque, pois apresenta o maior número de espécies nativas e de interesse agrônomo, e são as principais gramíneas utilizadas como pastagem nativa nas Américas tropical e subtropical.

*Paspalum notatum* Fl. é a espécie mais comum na formação dos campos nativos do Rio Grande do Sul (Barreto, 1974; Boldrini *et al.*, 1985; Mohrdieck, 1993), responsável por 20 a 40% da cobertura herbácea das pastagens naturais do Estado (Barreto, 1974), e, segundo o mesmo autor, a tendência é que a área coberta por *Paspalum notatum* aumente, visto que a espécie é favorecida pelo pastejo. Otero (1961) relatou a resistência da espécie *P. notatum* ao pisoteio, ao fogo, ao corte e pouca exigência quanto à qualidade do solo, também mencionou o bom valor forrageiro e sua boa aceitação pelo gado, sendo citado como a espécie útil que abrange a maior área de campos do Estado do Rio Grande do Sul.

O interesse pelo cultivo de boas espécies forrageiras nativas é crescente, devido, basicamente, à boa adaptação destas às condições edafoclimáticas da sua região de origem (Nabinger, 1997), para tanto as relações genéticas entre os diferentes tipos morfológicos e/ ou tipos ecológicos encontrados para a espécie de interesse é necessário

a fim de contribuir ao planejamento de futuros programas de melhoramento genético. Além disso, a variação morfológica de *Paspalum notatum* apresenta muitos problemas para a taxonomia da mesma, sendo importante à realização de estudos de diversidade a fim de contribuir à solução dos problemas taxonômicos deste complexo.

### **1.1. PASPALUM L.**

O gênero *Paspalum* L. encontra-se entre os mais importantes da tribo Paniceae (subfamília Panicoideae) da família Poaceae, sendo que as suas espécies se destacam entre as gramíneas brasileiras por englobar o maior número de espécies nativas e por reunir o maior número de espécies com bom valor forrageiro (Valls, 1987). De acordo com Barreto (1974), no Rio Grande do Sul as espécies de *Paspalum* estão distribuídas em todas as regiões fisiográficas e fazem parte de todas as formações campestres.

O gênero possui cerca de 315 espécies (Clayton & Renvoize, 1986; Zuloaga *et al.*, 2004) com o principal centro de diversidade no Novo Mundo Tropical. Chase (1929) estimou cerca de 400 espécies para o gênero, as quais ocorrem em regiões tropicais a temperadas, de ambos os hemisférios, e são particularmente abundantes no sul do Brasil, Paraguai, norte da Argentina e Uruguai (Barreto, 1974). Segundo Aliscioni (2002), a falta de um estudo taxonômico global para este gênero faz com que seja difícil estimar o número total de espécies na atualidade. No Brasil, não há estudos com informações detalhadas sobre o número total de espécies. No entanto, Valls & Pozzobon (1987) estimaram a ocorrência de cerca de 220 espécies. Tais espécies ocorrem em, praticamente, todas as comunidades herbáceas dos diferentes ecossistemas do país, sendo dominantes e responsáveis, em muitas comunidades, pela formação da maior parcela de forragem disponível (Valls, 1987). As espécies de *Paspalum*, além de

apresentarem interesse pelo seu valor forrageiro, são também utilizadas como ornamentais, em gramados e jardins, parques e quadras de esporte.

De acordo com Prestes *et al.* (1976), o gênero *Paspalum* apresenta importante valor agrônomico, servindo como base alimentar para bovinos, além de suas sementes consistirem em importante fonte alimentar para pássaros.

As espécies deste gênero são dominantes em campos abertos, mas também estão presentes em borda de florestas e em ambientes salinos, ocorrendo desde o nível do mar até 4600 metros de altitude, nos Andes (Zuloaga *et al.*, 2004).

O gênero apresenta grande diversidade morfológica, o que resultou em sua divisão em subgêneros, secções ou grupos de espécies afins, bem como a transferência de determinadas espécies para outros gêneros (Canto-Dorow, 1993; Canto-Dorow *et al.*, 1996; Essi, 2003). Chase (1929) dividiu o gênero *Paspalum* em 25 grupos sem categoria taxonômica formalizada, os quais têm sido utilizados por agrostologistas e taxonomistas como “grupos informais”. Estes grupos, citados por Chase (1929) para as espécies de *Paspalum* da América do Norte, foram considerados em trabalhos posteriores, geralmente com pequenos ajustes, conforme a flora local, ainda que em muitos casos os agrupamentos sejam artificiais e o posicionamento de alguns táxons bastante controverso. Para as espécies de *Paspalum* do Rio Grande do Sul, Barreto (1974) adaptou o esquema de Chase (1929), adotando outros nove grupos, considerando um total de vinte grupos.

O gênero *Paspalum* vem sendo estudado há décadas quanto ao potencial agrônomico das espécies e à variabilidade genética, tanto no nível citológico quanto morfológico. É notória a existência de distintos níveis de ploidia em algumas espécies, e o seu modo de reprodução pode estar associado a esse fato. Convivem espécies diplóides sexuais, poliplóides apomíticos e, apesar de sexualidade ser um fato raro no

gênero em nível elevado de ploidia esta pode ser constatada em algumas espécies. Os citótipos tetraplóides são geralmente os mais comuns e os mais amplamente distribuídos em cada espécie (Norrman *et al.*, 1989), e muitos apresentam co-específicos sexuais diplóides e auto-incompatíveis (Quarin & Norrman, 1990).

De grande interesse, principalmente para a área subtropical, o grupo Notata é composto de espécies diplóides, tetraplóides, hexaplóides e octaplóides, com ocorrência de apomixia e de sexualidade. Várias espécies apresentam mais de um nível de ploidia (Valls & Pozzobon, 1987).

O grupo Notata foi citado por Chase (1929) baseado em dados morfológicos. Posteriormente, Zuloaga *et al.* (2004), também baseado em dados morfológicos expandiu grupo Notata, incluindo espécies do grupo Linearia. Porém, em trabalhos mais recentes, baseados em seqüências de DNA e marcadores moleculares (Essi & Souza-Chies, 2006; Ferreira & Souza-Chies, 2005) o grupo Notata *sensu* Chase (1929) e *sensu* Zuloaga *et al.* (2004) não se mostraram monofiléticos.

## **1.2. PASPALUM NOTATUM Flügge**

*Paspalum notatum* é uma gramínea rizomatosa nativa da América do Sul, sendo um importante componente das pastagens naturais da Argentina, sul do Brasil e Paraguai (Burton, 1948).

### 1.2.1 A diversidade da espécie



Figura 1: *Paspalum notatum* Fl.

De acordo com Barreto (1957; 1974), *Paspalum notatum* é uma espécie polimórfica, comum a todas as pastagens naturais dos países de clima quente e temperado da América. Assim, em diferentes condições ecológicas ocorrem morfotipos também diversos desta importante espécie. Os caracteres mais significativos que permitem diferenciar estas formas estão relacionados com o

aspecto, vigor, dimensões e pilosidade das folhas; altura dos colmos floríferos, número e comprimento dos racemos, dimensões e coloração das espiguetas (Barreto, 1974).

Parodi (1948) considerou três variedades para a espécie, aceitando a variedade *latiflorum* descrita por Döll (1877), a variedade *notatum* e descreveu uma nova variedade, *Paspalum notatum* var. *saurae* Parodi. Posteriormente, Parodi (1969) elevou esta última variedade à espécie, nomeando-a como *Paspalum saurae* Parodi.

Araújo (1971) aceitou as variedades propostas por Parodi (1948), porém, mencionou os ecótipos encontrados em diferentes localidades do Estado do Rio Grande do Sul, salientando os de Lagoa Vermelha, Capivari, André da Rocha e Uruguaiana.

Assim como Parodi (1948) e Araújo (1971), Otero (1961) mencionou “variedades” ou “tipos” encontrados para a espécie, porém não as nomeou, apenas as caracterizou em seu trabalho.

Diversos autores citaram a variabilidade morfológica de *Paspalum notatum*, sendo que a maioria refere-se a esta como um fator relacionado a características

ecológicas. Uma confirmação disto é que as variações encontradas são tratadas ecótipos (Otero, 1961; Araújo, 1971).

Barreto (1974) não considerou as variedades descritas anteriormente para a espécie, pois não constatou caracteres fixos para as mesmas. O autor tratou a variação morfológica como diferentes “formas morfológicas” apresentadas pela espécie e aceitou a espécie *Paspalum sauræ* descrita por Parodi (1969). Assim como Barreto, outros estudiosos referiram-se a diferentes “formas” ou “tipos” apresentadas pela espécie, (Otero, 1961; Araújo, 1971; Moraes-Fernandes, 1971; Moraes-Fernandes *et al.*, 1974; Soares, 1986; Boldrini & Maraschin, 1986).

Canto-Dorow (1993) e Canto-Dorow *et al.* (1996) aceitaram apenas duas variedades para a espécie, que se diferenciam, principalmente, quanto ao nível de ploidia, *Paspalum notatum* var. *notatum* ( $2n=4x=40$ ) e *Paspalum notatum* var. *sauræ* ( $2n=2x=20$ ). A variabilidade morfológica encontrada na variedade *notatum* foi considerada como diferentes biótipos, inclusive com chave sistemática separando a variedade em quatro biótipos. Canto-Dorow (1993) mencionou em seu trabalho a diferença entre ecótipo e biótipo, e justificou a sua separação em biótipos pela manutenção das características originais da espécie em condições homogêneas de cultivo. Araújo (1971) já havia chamado atenção para uma “forma” pilosa encontrada em campos arenosos e pobres dos municípios de Júlio de Castilhos e Tupanciretã, no Estado do Rio Grande do Sul. Esta “forma”, transplantada para solos mais argilosos, perdia toda a pilosidade em pouco tempo, porém no trabalho de Canto-Dorow (1993) também foram incluídas “plantas pilosas”, que mantiveram o indumento em cultivo.

Atualmente são consideradas duas variedades para *Paspalum notatum*. A forma mais comum encontrada para espécie é *Paspalum notatum* var. *notatum*, que é tetraplóide e apomítica e a variedade diplóide e sexual *Paspalum notatum* var. *sauræ*.

### 1.2.2. Caracterização exomorfológica

As seguintes sinonímias são conhecidas para *Paspalum notatum*: *Paspalum notatum* var. *latiflorum* Döll, *Paspalum saltense* Arechav., *Paspalum uruguayense* Arechav. (Canto-Dorow, 1993).

Utilizou-se a descrição botânica de Canto-Dorow *et al.* (1996) para a espécie *Paspalum notatum*.

Perene, 19,0-70,0 (100,0cm) de altura, com rizomas horizontais fortemente arraigados ao solo. Colmos floríferos eretos, 10,5-65,0 (95,0cm) de comprimento, glabros, 2-4 nós glabros e castanho-escuros. Inovações extravaginais. Prefoliação convoluta. Folhagem esverdeada, às vezes verde-violácea. Bainhas foliares 4,0-6,5cm de comprimento, 6,0-10,0mm de largura, pouco estriada, esverdeada ou violácea, glabras, às vezes pilosa nas margens, com tricomas de 1,0-3,0mm de comprimento nos bordos da região ligular. Lâminas planas, 4,5-25,0cm de comprimento, 2,0-8,0 (10,0mm) de largura, glabras a densamente pubescentes nas faces dorsal e/ou ventral, ascendentes, lanceoladas, agudas, com nervuras laterais geralmente pouco marcadas. Lígula membranosa, 0,5mm de comprimento, com cílios de 0,5mm de comprimento atrás, na base da face ventral da lâmina.

Inflorescência com 2 (3-5) ramos unilaterais espiciformes ascendentes conjugados ou subconjugados, 5,0-13,5cm de comprimento, com tricomas curtos e/ou longos, hialinos na axila, esta geralmente com um par de escamas foliares; ráquis estreita, 1,0mm de largura, glabra, com os bordos levemente escabros, esverdeada ou violácea. Espiguetas 2-seriadas, 2,6-3,7mm de comprimento, 1,6-2,7mm de largura, glabras, esverdeadas, às vezes violáceas, suborbiculares ou oval-lanceoladas, plano-convexas, brevemente pediceladas. Gluma I ausente, ou mais raramente presente e reduzida (podendo ocorrer as duas formas em um mesmo colmo florífero), 1,0-2,0mm

de comprimento, 0,8-1,0mm de largura, obtusa ou aguda; gluma II 2,6-3,7mm de comprimento, 1,6-2,7mm de largura, 3-nervada, obtusa. Lema I 2,3-3,6mm de comprimento, 1,5-2,6mm de largura, 3-5-nervado. Antécio II oval-lanceolado, obtuso, brilhante; lema II 2,0-3,5mm de comprimento, 1,4-2,5mm de largura, raramente com uma reentrância nas margens; pálea 1,8-3,3mm de comprimento, 1,2-2,3mm de largura. Lodícula 2, obtusas, erosas. Estames 3, anteras 1,0-1,2mm de comprimento, bicolores (roxas externamente e amarelas internamente) ou, raramente, amarelas. Cariopse 2,3-3,2mm de comprimento, 1,2-2,3 mm de largura, oval-lanceolada, com hilo punctiforme.

Floresce e frutifica nos meses de novembro a maio.



Figura 2: *P. notatum* Fl. com três e quatro ramos espiciformes na inflorescência

### 1.2.3. Caracterização morfo-anatômicas

Utilizou-se a caracterização morfo-anatômica descrita por Santos (2000) para *Paspalum notatum* var. *notatum*.

As raízes em *Paspalum notatum* var. *notatum* apresentam cerca de 12cm de comprimento e partem da base dos nós do caule. Na raiz, vista em corte transversal, distinguem-se epiderme, córtex e estelo. Na epiderme destacam-se os pêlos absorventes formando uma densa cobertura.

O caule, do tipo rizoma, espalha-se na superfície do solo. Por vezes, ele fica coberto pelo solo e apresenta-se bastante ramificado, com inovações emergindo dos nós.

Os entrenós são curtos, cerca de 15mm de comprimento, e estão geralmente envolvidos por bainhas foliares, mesmo em regiões distantes do ápice, onde se mantêm restos de bainhas secas. Nesta região encontra-se o chamado meristema intercalar das gramíneas, e as bainhas desempenham a função de proteção. A região do nó é facilmente distinguível do entrenó devido a uma saliência formando um anel de onde partem as folhas e as raízes adventícias.

As folhas de *Paspalum notatum* var. *notatum* são constituídas por bainhas, cuja base mantém-se envolvendo o caule, e lâmina, de forma lanceolada, entre as quais há uma lígula membranosa com uma linha de cílios atrás. Frequentemente, a lâmina foliar dispõe-se em relação à superfície do solo, em ângulo de cerca de 50°-80°, ou seja, quase perpendicular à mesma.

A epiderme das lâminas foliares apresenta uma grande variedade de componentes estruturais: células buliformes, estômatos, células curtas (silicosas e suberosas), células longas, papilas e diferentes tipos de tricomas. Todos os tipos de células epidérmicas encontram-se alinhadas na direção base-ápice da lâmina foliar, acompanhando a disposição paralela das nervuras.

#### **1.2.4. Biologia reprodutiva e citogenética**

*Paspalum notatum* é considerada um complexo agâmico, pois apresenta vários níveis de ploidia e um sistema reprodutivo complexo, com citótipos diplóides ( $2n=2x=20$ ) auto-incompatíveis e de reprodução sexuada, autotetraplóides apomíticos (Burton, 1948), triplóides e pentaplóides ocasionais (Quarin *et al.* 1989; Tischler & Burson, 1995). As formas diplóides (*Paspalum notatum* var. *saurae* Parodi) são sexuais e meioticamente estáveis com dez bivalentes na meiose (Moraes-Fernandes, 1971; Moraes-Fernandes *et al.*, 1974), enquanto que poliplóides reproduzem-se por apomixia apospórica obrigatória (Forbes & Burton 1961) ou facultativa (Quarin *et al.*, 1984).

Tischler & Burson (1995) estudaram 23 acessos de *Paspalum notatum*, alguns provenientes da América do Sul, dos quais 17 (74%) foram tetraplóides, quatro (17%) diplóides, um triplóide ( $2n=3x=30$ ) e um pentaplóide ( $2n=5x=50$ ).

Pozzobon & Valls (1997) examinaram 127 acessos de *Paspalum notatum*, e encontraram 116 (91%) acessos tetraplóides ( $2n=4x=40$ ) e 11 diplóides com 20 cromossomos. Estes últimos foram considerados como provável escape do cultivo da Pensacola (*Paspalum notatum* var. *saurae*), amplamente produzida no Estado do Rio Grande do Sul.

Os tetraplóides apresentam uma ampla distribuição, estendendo-se desde o México até a Argentina e Índia Ocidental (Chase, 1929). Os diplóides são, considerados, provavelmente, originários das Províncias de Corrientes, Entre Rios e Santa Fé, na Argentina (Burton, 1967).

Plantas tetraplóides sexuais foram produzidas experimentalmente pela duplicação cromossômica de variedades sexuais com colchicina (Forbes & Burton *et al.*, 1961; Quarin *et al.*, 2003) e, ocasionalmente, plantas octaplóides (80 cromossomos) foram produzidas (Quarin, 1999). Martinez *et al.* (1994) obtiveram plantas pentaplóides

e hexaplóides através das plantas sexuais (40 cromossomos) com pólen de plantas com 20 e 40 cromossomos.

Os primeiros estudos sobre apomixia em *Paspalum notatum* foram realizados por Burton & Forbes (1960) a partir do cruzamento entre plantas autotetraplóides sexuais, obtidas mediante duplicação cromossômica de diplóides com colchicina, e genótipos apomíticos naturais. Com o advento da biologia molecular, vários pesquisadores vêm concentrando esforços para desvendar os genes que controlam a apomixia e aposporia em *Paspalum notatum* (Ortiz *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2001; Quarin *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2004).

### **1.2.5. Importância Econômica da Espécie**

Graças ao bom valor forrageiro e à rapidez de estabelecimento de uma densa cobertura do solo, inúmeros acessos de *Paspalum notatum* têm sido incorporados a experimento de cunho agrônomico e há cultivares comerciais da espécie, algumas das quais pertencem à variedade *saurae* (Valls & Pozzobon, 1987), como por exemplo, as cultivares Pensacola e Tifton 9, ambas diplóides sexuais. Há centenas de artigos publicados quanto à caracterização agrônômica em *Paspalum notatum*, dentre os quais pode-se citar os trabalhos de Soares *et al.*, 1986; Vendramini *et al.* 1999; Haddad *et al.*, 1999; Pakiding & Hirata, 1999 ; Hirata & Pakiding, 2003.

Recentemente, Steiner (2005) avaliou a produção de matéria seca de dois ecótipos de *Paspalum notatum* var. *notatum* em comparação à cultivar comercial Pensacola. O ecótipo vulgarmente denominado “Bagual” apresentou produção de matéria seca significativamente superior à variedade Pensacola (*Paspalum notatum* var. *saurae*) e ao ecótipo André da Rocha, demonstrando que variedades nativas fornecem

bons subsídios para a investigação em projetos de melhoramento e cultivo de gramíneas forrageiras nativas.

### **1.3.MARCADORES MOLECULARES**

A variabilidade genética, além de importante para a evolução, pode ser utilizada como instrumento de investigação por ecólogos e sistematas em diversos ramos como, por exemplo, na verificação das afinidades e os limites entre as espécies, e detecção sobre os modos de reprodução e estrutura familiar, para estimar níveis de migração e dispersão nas populações (Avice, 1994).

O grau de variabilidade genética é uma questão discutida e investigada desde os primórdios do século XX. Na primeira metade desse século, técnicas de genética clássica eram utilizadas. A partir da segunda metade desse mesmo século, novas descobertas e novas técnicas foram surgindo, permitindo o acesso direto às informações do DNA, RNA e proteínas.

A eletroforese de isoenzimas (1966) foi a primeira técnica “molecular” utilizada em estudos de variabilidade genética (Solferini & Scheepmaker, 2001).

No final da década de 1960, a descoberta das enzimas de restrição por Linn & Arber (1968) e Meselson & Yuan (1968) revolucionou a emergente Biologia Molecular. Em 1974, Gradzicker *et al.*, a partir da descoberta das enzimas de restrição, utilizaram pela primeira vez a técnica atualmente denominada de RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”) (Arias & Infante Malachias, 2001).

Entretanto o advento que revolucionou e acelerou os estudos moleculares, juntamente com a tecnologia do DNA recombinante, foi a criação da técnica da PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”), em 1985, pelo bioquímico Kary B. Mullis, o que lhe

rendeu o Prêmio Nobel de Química, em 1993. Desde então, novas técnicas baseadas em PCR vêm surgindo.

Atualmente, muitas técnicas são utilizadas para detectar a variabilidade genética, seja através de meios clássicos de genética de populações, seja através de dados obtidos por técnicas moleculares. Estas últimas são de grande interesse, pois permitem o acesso direto aos genomas dos organismos.

Marcadores moleculares surgiram devido à necessidade de detecção de polimorfismo diretamente no DNA e são definidos como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso (proteínas, por vezes, consideradas como marcadores bioquímicos), segmentos específicos de DNA ou RNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Atualmente, os marcadores moleculares são utilizados com os mais diversos enfoques, incluindo estudos de variabilidade genética, programas de melhoramento vegetal e estudos evolutivos, entre outros.

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), marcadores moleculares apresentam vantagens sobre os marcadores morfológicos, pois geralmente são neutros em relação aos efeitos fenotípicos, e o nível de polimorfismo para cada *loci* estudado é geralmente alto, além disso, facilitam a construção de mapas genéticos, pois a fonte de polimorfismo molecular em populações segregantes é teoricamente “ilimitada”.

Os diversos tipos de marcadores moleculares disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada, pela habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade. Segundo Milach (1998), a metodologia utilizada para identificar os tipos de marcadores moleculares dividem-se em dois grupos: hibridização ou amplificação de DNA.

Entre os marcadores mais conhecidos identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minissatélites ou

locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*; Jeffreys *et al.*, 1985). Entre os mais conhecidos, revelados por amplificação, estão os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*; Williams *et al.*, 1990) e os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*; Litt & Luty, 1989). Mais recentemente, dois marcadores baseados em amplificação estão sendo amplamente utilizados: os AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*; Vos *et al.*, 1995) e os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*; Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Os marcadores moleculares vêm sendo utilizados em espécies do gênero *Paspalum* com a finalidade de esclarecer as relações entre as espécies (Ferreira & Souza-Chies, 2005; Jarret *et al.*, 1998) e analisar a diversidade genética entre diferentes ecótipos. Entre esses últimos, Liu *et al.* (1994) analisaram diferentes ecótipos de *Paspalum vaginatum* Sw., Casa *et al.* (2002) estudaram a diversidade de *Paspalum dilatatum* Poir. com diferentes níveis de ploidia e Miz & Souza-Chies (2006) analisaram a diversidade de *Paspalum dilatatum* Poir. e espécies afins.

Em estudos de mapeamento genético, os marcadores moleculares têm sido utilizados principalmente na detecção de genes relacionados à apomixia e à aposporia. Especificamente, em *Paspalum notatum*, poucos trabalhos sobre a diversidade genética foram realizados com o auxílio de marcadores moleculares. Pode-se citar os trabalhos de Daurélio *et al.* (2004), onde foram analisadas populações de *Paspalum notatum* apomíticas e sexuais, simpátricas e alopátricas, e o trabalho de Steiner (2005), onde foram analisados acessos de *Paspalum notatum*, procedentes, principalmente, do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), ambos utilizando marcadores RAPD. Marcadores RAPD também foram utilizados por Ortiz *et al.* (1997) como “*fingerprinting*” para detectar o modo de reprodução em *Paspalum notatum*.

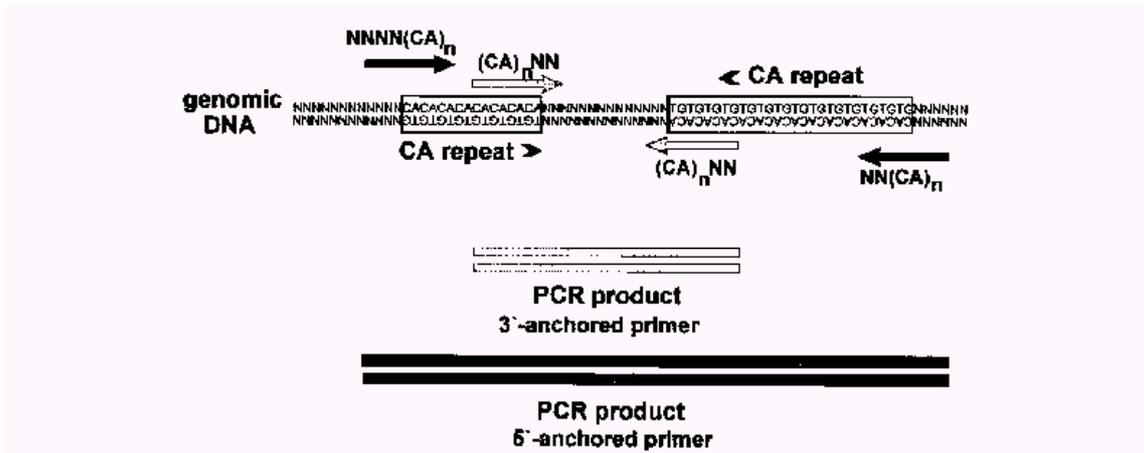


Figura 3: Desenho esquemático de marcadores ISSR (Zietkiewicz *et al.*, 1994)

Os ISSR são marcadores arbitrários *multiloci* produzidos por amplificação por PCR com *primers* (inicializadores) correspondentes a microssatélites. Os ISSR apresentam abundante polimorfismo, não requerem conhecimento genômico prévio, possuem alta reprodutibilidade e, além disso, são de custo relativamente baixo (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet & Branchard, 2001).

Os microssatélites são dispersos no genoma de forma relativamente proporcional. Entretanto, regiões de grande abundância destas seqüências têm sido encontradas e são nomeadas de “SSR hot spots” (Bornet *et al.*, 2002a; Zietkiewicz *et al.*, 1994). Tais regiões, provavelmente, contribuem como fonte de marcadores ISSR. A técnica de ISSR é baseada na amplificação de regiões (10- 3000pb) orientadas inversamente, espaçadas proximamente aos microssatélites. Um único “*primer*” (16- 18pb) consistindo de várias seqüências microssatélites (SSR-*Simple sequence repeat*) é utilizado para a amplificação. Essa seqüência pode corresponder a qualquer motivo microssatélite 5’ ou 3’, ancorado por dois a quatro nucleotídeos arbitrários. Entretanto “*primers*” não ancorados também são utilizados (Bornet *et al.*, 2002b).

Os marcadores ISSR comportam-se geralmente como dominantes, e o produto da amplificação não é conhecido, ou seja, são marcadores randômicos, assim como os

RAPD. Porém são mais vantajosos, pois os “*primers*” são maiores e a temperatura de anelamento é mais elevada, conseqüentemente a confiabilidade e reprodutibilidade da técnica são superiores aos RAPD. Tais marcadores são altamente úteis para diferentes propósitos como estudos filogenéticos, avaliação da diversidade genética e identificação de cultivares, entre outros.

Esselman *et al.* (1999) e Assefa *et al.*(2003) utilizaram marcadores ISSR para acessar a diversidade genética de *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* Swallen. e *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter, respectivamente, ambos representantes da família Poaceae, e obtiveram alto nível de polimorfismo. Esselman *et al.* (1999) utilizaram aloenzimas e RAPD e, comparando-os aos ISSR, evidenciaram menor polimorfismo nos primeiros. Além destes dois autores, outros como Li & Ge (2001) Wu *et al.* (2004) utilizaram ISSR para avaliar o polimorfismo genético de espécies da família Poaceae, obtendo resultados bastante satisfatórios.

#### **1.4. CITOMETRIA DE FLUXO**

A citometria de fluxo foi originalmente desenvolvida no final da década de 50 para contagem e análise de células sangüíneas humanas. A técnica envolve a análise de propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem em suspensão líquida. A medição em fluxo permite análise em alta velocidade e garante que os citomas (qualquer tipo de partícula - estruturas celulares, órgãos ou indivíduos) sejam selecionados aleatoriamente de toda a população da amostra, sem qualquer subjetividade associada (Doležel, 1997; Doležel & Bartos, 2005).

Com a evolução da técnica, e com o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização desta instrumentação estendeu-se a outras áreas e ao estudo

com outras células, como células vegetais e microbianas (Doležel, 1997). Apesar da utilização da citometria de fluxo em células vegetais ter ocorrido apenas no início dos anos 80, o número de aplicações têm aumentado continuamente, sendo, hoje em dia, uma técnica rotineiramente utilizada em vários laboratórios por todo o mundo (Doležel, 1991; Doležel & Bartos, 2005).

A técnica de citometria de fluxo é baseada no uso de fluorocromos de DNA específico e na análise de intensidade de fluorescência relativa dos núcleos marcados. O conteúdo de DNA está relacionado ao nível de ploidia, logo, a determinação de conteúdo de DNA por citometria de fluxo pode ser utilizada como uma alternativa à contagem de cromossomos e outros métodos convencionais para a determinação do nível de ploidia (Doležel, 1991).

## **1.5 OBJETIVOS**

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade e relações genéticas entre os táxons classificados como *Paspalum notatum*. Para tanto foram utilizados marcadores moleculares do tipo ISSR, comparando-os a dados morfológicos e nível de ploidia.

**ARTIGO :**

**Diversidade genética do complexo *Paspalum notatum* Flüge (Poaceae,  
Panicoideae)**

**Diversidade genética do complexo *Paspalum notatum* Flüggé (Poaceae,  
Panicoideae)**

Autores:

Fernanda Witt Cidade \*<sup>1</sup>

Miguel Dall'Agnol

Fernanda Bered

Tatiana Teixeira de Souza Chies \*<sup>2</sup>

Instituição:

1- Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2- Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Endereço Institucional:

1, 2- Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale da UFRGS, Departamento de Botânica, Prédio 43433, 91501-970, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS, Brasil.

Endereço para correspondência: Tatiana Teixeira de Souza Chies

e-mail address: [tatiana.chies@ufrgs.br](mailto:tatiana.chies@ufrgs.br)

Telephone: 55-51-3316-7569

Fax number: 55-51-3316-7686

## RESUMO

O gênero *Paspalum* L. compreende aproximadamente 400 espécies no mundo e cerca de 220 no Brasil. *Paspalum* é ecologicamente e economicamente importante e tem sido utilizado como pastagem. *Paspalum notatum* Flüggé (grama-forquilha) é uma valorosa gramínea forrageira nos subtrópicos. Esta espécie consiste de vários biótipos sexuais (diplóides) e apomíticos (tetraplóides, ocasionalmente tri e pentaplóides). Neste trabalho, os *Inter Simple Sequence repeat* (ISSR) foram utilizados para acessar a diversidade genética da grama-forquilha (*Paspalum notatum*). Os tecidos vegetativos de 95 acessos de grama-forquilha foram obtidos de vários locais da América do Sul (Brasil, Argentina e Uruguai). Um total de 91 de fragmentos reproduzível ISSR foi observado. Oitenta e nove fragmentos (97,5% do total observado) foram polimórficos. A análise de agrupamento (UPGMA) foi realizada para o conjunto de dados ISSR. Os resultados ilustram as relações genéticas entre 95 acessos de *Paspalum notatum*. A comparação entre dados moleculares, morfológicos e nível de ploidia foi realizada. Em resumo, os marcadores moleculares ISSR mostraram-se eficientes para distinção dos genótipos analisados e observou-se uma variabilidade ampla para a espécie. Estes resultados adicionam novas informações sobre a diversidade genética em *Paspalum notatum*, conseqüentemente contribuindo para o conhecimento biológico desta espécie e fornecendo subsídios para futuros programas de melhoramento genético e para programas de conservação.

**Palavras chave:** Citometria de fluxo; Diversidade genética; Marcadores moleculares ISSR; *Paspalum* L.; *Paspalum notatum* Fl..

## ABSTRACT

The genus *Paspalum* L. comprises approximately 400 species worldwide and about 220 in Brazil. *Paspalum* is ecologically and economically important, and has been very useful as pasture and *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) is a valuable forage grass in the subtropics. This species consists of several sexual (diploid) and apomictic (tetraploid, occasionally tri and pentaploids) biotypes. In this work, inter Simple Sequence Repeats (ISSR) markers were used to assess the genetic variability of a bahiagrass (*Paspalum notatum*) collection. Vegetative tissues of 95 bahiagrass accessions were obtained from various locations in South America (Brazil, Argentina and Uruguay). A total of 91 reproducible ISSR fragments were observed and eighty nine fragments (97.5% of the total observed) were polymorphic. Cluster analyses (UPGMA) were performed from the ISSR data set and the results illustrate the genetic relationships among the 95 accessions of *Paspalum notatum*. A comparison among molecular, morphological and ploidy levels data were done. ISSR markers were effective in distinguishing the genotypes analyzed, and a wide variability was observed for this species. These results add new information regarding the genetic diversity in *Paspalum notatum*, thus contributing towards the biological knowledge of this species, and providing with subsidies for future plant breeding and conservation programs.

**Key Words:** Flow citometry; Genetic diversity; Molecular markers ISSR; *Paspalum* L.; *Paspalum notatum* Fl..

## INTRODUÇÃO

As espécies pertencentes ao gênero *Paspalum* L. destacam-se entre as gramíneas brasileiras por englobar o maior número de espécies nativas, e também por reunir o maior número de espécies com bom valor forrageiro (Valls, 1987). Estima-se cerca de 400 espécies descritas para o gênero (Chase, 1929), as quais ocorrem em regiões tropicais a temperadas, sendo a maioria de origem americana e particularmente abundantes no sul do Brasil, Paraguai, norte da Argentina e Uruguai (Barreto, 1974). Tais espécies ocorrem em praticamente todas as comunidades herbáceas dos diferentes ecossistemas do Brasil, sendo dominantes e responsáveis, em muitas comunidades, pela formação da maior parcela de forragem disponível (Valls, 1987).

*Paspalum notatum* Fl. é uma gramínea rizomatosa nativa da América do Sul, sendo um importante componente das pastagens naturais da Argentina, do sul do Brasil e do Paraguai (Burton, 1948). É utilizada como forrageira devido à boa qualidade, resistência ao pisoteio e crescimento favorecido pelo pastejo.

*Paspalum notatum* é uma espécie polimórfica, o que resultou na sua divisão em diferentes variedades (Parodi, 1948), ecótipos ou “formas” (Barreto, 1974; Araújo, 1971), biótipos (Canto-Dorow, 1993), e até mesmo desmembrada em espécies diferentes (Parodi, 1969; Arechavaleta, 1898). Devido à grande variação morfológica encontrada para esta espécie, torna-se difícil sua delimitação. Além do polimorfismo encontrado, *Paspalum notatum* é considerada um “complexo agâmico”, apresentando vários níveis de ploidia e um sistema reprodutivo complexo, com citótipos diplóides ( $2n=2x=20$ ) auto-incompatíveis e de reprodução sexual, autotetraplóides apomíticos (Burton, 1948), além de triplóides e pentaplóides ocasionais (Quarin *et al.* 1989; Tischler & Burson, 1995). As formas diplóides (*Paspalum notatum* var. *saurae*) são

sexuais e estáveis durante a meiose (Moraes Fernandes, 1971; Moraes Fernandes *et al.*, 1974), enquanto que plantas poliplóides reproduzem-se por apomixia apospórica obrigatória (Forbes & Burton 1961) ou facultativa (Quarin, 1984).

A poliploidia notada em *Paspalum notatum* é comum no gênero *Paspalum*, sendo a maioria das espécies tetraplóides. A poliploidia e a apomixia são importantes mecanismos de evolução no gênero. Desde a década de 40, esforços tem sido feito para conhecimento de aspectos biológicos do gênero *Paspalum*, principalmente, aspectos reprodutivos, incluindo apomixia. Vários artigos relatam estudos filogenéticos e citológicos em *Paspalum* (Burton, 1946; 1948; Forbes & Burton, 1961; Bennet & Bashaw, 1960; Burson & Bennett, 1972; Burson *et al.*, 1973; Burson, 1978; 1979; 1983; 1991; Souza-Chies *et al.*, 2006; Essi & Souza-Chies, 2006).

Nas últimas décadas, os marcadores moleculares vêm sendo uma alternativa para acessar a diversidade genética das espécies no nível de genoma, contribuindo para estudos evolutivos, planejamento de estratégias de melhoramento genético e conservação de bancos de germoplasma. A utilização destes marcadores apresenta vantagens sobre marcadores morfológicos, por serem pouco ou nada afetados pelos efeitos epistáticos, pleiotrópicos e ambientais (Milach, 1998).

A partir do surgimento da técnica de marcadores moleculares, estudos de espécies do gênero *Paspalum* foram realizados com o auxílio desta ferramenta. Ferreira & Souza-Chies (2005) utilizaram marcador RFLP-PCR para analisar diversidade e relações genéticas entre as espécies do Grupo Notata e Linearia, os seus resultados evidenciaram a artificialidade dos grupos taxonômicos do gênero *Paspalum*, baseado nesses dados, uma nova circunscrição dos grupos Notata e Linearia foi proposta.. Essi & Souza Chies (2006), a partir de dados obtidos através de seqüências de DNA, também constataram a artificialidade desses dois grupos.

Jarret *et al.* (1998) analisaram a diversidade genética de 51 acessos, representando 29 espécies de paspalum, com o auxílio de marcadores RFLP, neste trabalho foi encontrada uma alta variabilidade entre as espécies estudadas. Liu *et al.* (1994) utilizaram marcadores RAPD para analisar diferentes ecótipos de *Paspalum vaginatum* Swartz, os resultados ilustraram as relações genéticas entre os ecótipos e suas origens geográficas. Os ecótipos da África foram diferenciados dos ecótipos dos Estados Unidos e a maioria dos argentinos. Com poucas exceções os ecótipos coletados na Argentina, Havaí, Flórida e Texas foram separados dentro de agrupamentos distintos.

Casa *et al.*(2002) utilizaram 86 *primers* RAPD para revelar a variabilidade genética de biótipos sexuais e apomíticos de *Paspalum dilatatum* Poir. e constaram altas similaridades genéticas entre os biótipos apomíticos. Entretanto, Miz & Souza-Chies (2006) também utilizaram marcadores RAPD para analisar relações e diversidade genéticas entre biótipos de *Paspalum dilatatum* Poir. e espécies afins. No referido trabalho foi constatada uma extensa variabilidade entre as espécies estudadas. Os biótipos de *Paspalum dilatatum* não formaram um agrupamento único.

Em estudos de mapeamento genético, os marcadores moleculares têm sido utilizados principalmente na detecção de genes relacionados à apomixia e aposporia. Os marcadores RFLP e RAPD foram utilizados por Ortiz *et al.* (1997) como “*fingerprinting*” para detectar o modo de reprodução em *Paspalum notatum*.

Poucos trabalhos sobre a diversidade genética da espécie *Paspalum notatum* foram realizados com auxílio de marcadores moleculares. Daurélio *et al.* (2004) analisaram populações de *Paspalum notatum*, uma das populações apomítica isoladas das demais e outras duas populações em simpatria, uma sexual e outra apomítica, nesse trabalho foi constatada uma maior diversidade genética entre os indivíduos da população sexual, seguido da simpátrica apomítica e alopátrica apomítica. A distância

genética entre todos os indivíduos analisados foi relativamente pequena. Em contrapartida, Steiner (2005) analisou acessos de *Paspalum notatum*, procedentes, principalmente, do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil) e constatou uma ampla variabilidade genética entre os acesso analisados, ambos autores referidos anteriormente utilizaram marcadores RAPD.

Os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) são marcadores arbitrários *multiloci* produzidos por amplificação por PCR com “primers” (inicializadores) correspondentes a microssatélites. Os ISSR apresentam abundante polimorfismo, não requerem conhecimento genômico prévio, possuem alta reprodutibilidade e são de custo relativamente baixo (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet & Branchard, 2001). Devido a essas características, mais recentemente, esses marcadores moleculares estão sendo utilizados em larga escala em estudos que abordam a diversidade genética e relações filogenéticas.

Como citado anteriormente, *Paspalum notatum* apresenta indivíduos com diferentes níveis de ploidia e a técnica de citometria de fluxo tem sido útil para a rápida verificação do nível de ploidia de espécies vegetais. Esta técnica envolve a análise de propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem em suspensão líquida. A medição em fluxo permite analisar em alta velocidade e garante que os citomas (qualquer tipo de partícula - estruturas celulares, órgãos ou indivíduos) sejam selecionados aleatoriamente de toda a população da amostra, sem qualquer subjetividade associada (Doležel, 1997; Doležel & Bartos, 2005).

A técnica de citometria de fluxo para analisar conteúdo de DNA foi originalmente desenvolvida para células humanas. Durante a década de 80, foi adaptada para a análise de células vegetais. Esta metodologia é baseada no uso de fluorocromos de DNA específico e na análise de intensidade de fluorescência relativa dos núcleos

marcados. O conteúdo do DNA está relacionado ao nível de ploidia logo a determinação de conteúdo de DNA por este método pode ser utilizado como uma alternativa à contagem de cromossomos e outros métodos convencionais para a determinação do nível de ploidia (Doležel, 1991).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade e relações genéticas entre os táxons classificados como *Paspalum notatum*. Para tanto foram utilizados marcadores moleculares do tipo ISSR, comparando-os a dados morfológicos e nível de ploidia.

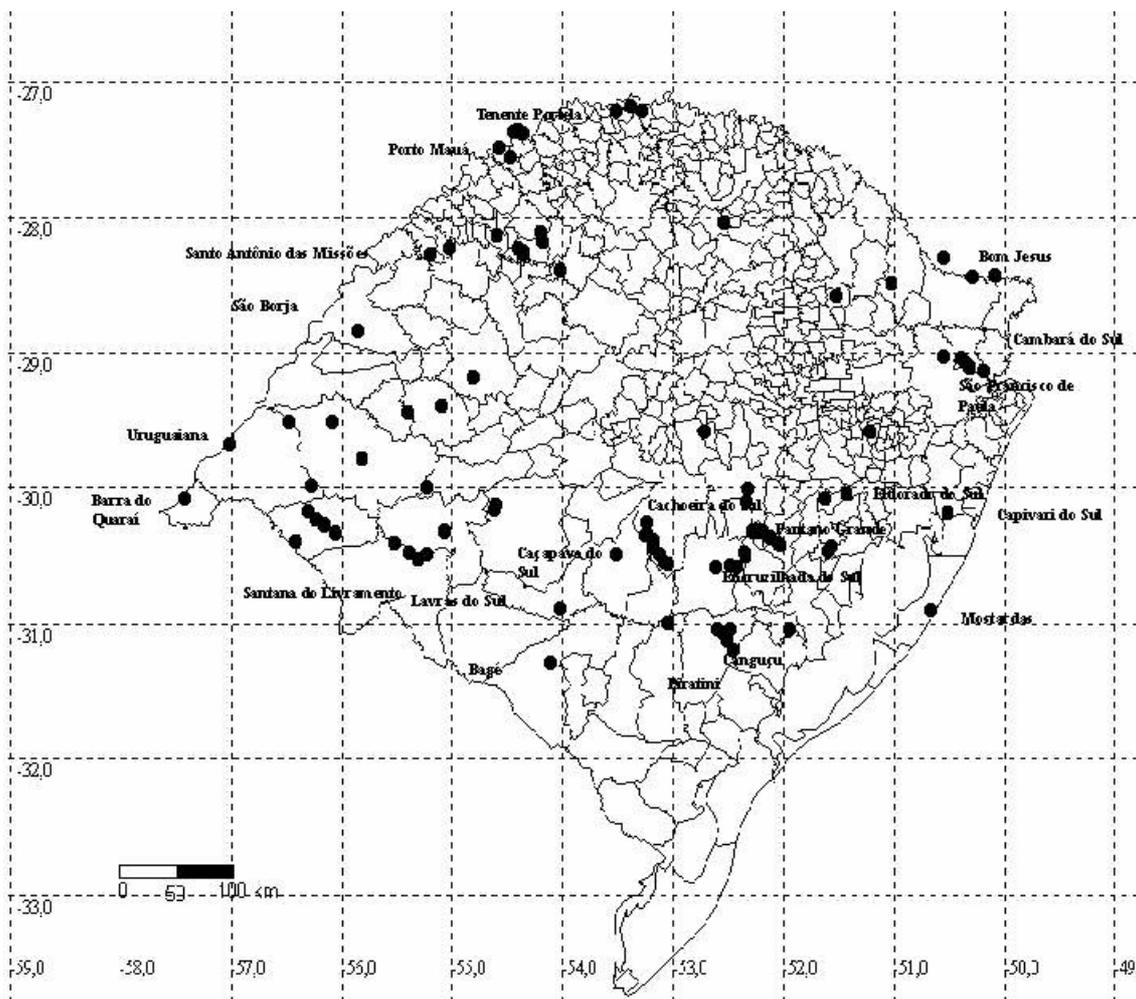
## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material Vegetal:**

Cento e quatorze acessos procedentes, principalmente, do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 1 e Tabela.1) foram analisados. A metodologia de coleta envolveu a confecção de exsiccatas, armazenamento de lâminas foliares em sílica gel para posterior extração de DNA, e a confecção de mudas, que estão sendo cultivadas na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **Extração do DNA total:**

O material foliar seco em sílica gel foi depositado em cadinhos de porcelana e macerado com o auxílio de nitrogênio líquido. A extração do DNA genômico foi realizada por mini-preparação utilizando a técnica de CTAB (Doyle & Doyle, 1987) modificada, adaptada a tubos Eppendorf de 2 ml. A qualidade e quantidade do DNA genômico foram verificadas em gel de agarose 0,8%. A concentração das amostras foi estimada por comparação visual pela intensidade de fluorescência de fragmentos de DNA com concentrações conhecidas (DNA do fago  $\lambda$  a 25ng, 50ng, 100ng e 250ng).



**Figura 1:** Locais de coleta dos acessos de *Paspalum notatum* procedentes do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Código	Código de Acesso	Local	Coordenadas
1	TS, MD, FC 1	Camaquã - RS	Long. - 51,58 Lat. - 30,50
4	TS, MD, FC 4	Camaquã - RS	Long. - 51,55 Lat. - 30,44
6	TS, MD, FC 6	Camaquã - RS	Long. - 51,55 Lat. - 30,44
10	TS, MD, FC 10	Chувиска - RS	Long. - 52,08 Lat. - 30,39
13	TS, MD, FC 13	Dom Feliciano - RS	Long. - 52,10 Lat. - 30,38
18	TS, MD, FC 18	Dom Feliciano - RS	Long. - 52,10 Lat. - 30,37
27	TS, MD, FC 27	Dom Feliciano - RS	Long. - 52,17 Lat. - 30,33
30	TS, MD, FC 30	Dom Feliciano - RS	Long. - 52,23 Lat. - 30,33
36	TS, MD, FC 36	Dom Feliciano - RS	Long. - 52,26 Lat. - 30,34
40	TS, MD, FC 40	Rio Pardo - RS	Long. - 52,30 Lat. - 30,03
48	TS, MD, FC 48	Encruzilhada do Sul - RS	Long. - 52,34 Lat. - 30,49
60	TS, MD, FC 60	Encruzilhada do Sul - RS	Long. - 52,41 Lat. - 30,59
63	TS, MD, FC 63	Encruzilhada do Sul - RS	Long. - 52,47 Lat. - 30,59
64	TS, MD, FC 64	Encruzilhada do Sul - RS	Long. - 52,47 Lat. - 31,06
68	TS, MD, FC 68	Canguçu - RS	Long. - 52,51 Lat. - 31,10
75	TS, MD, FC 75	Canguçu - RS	Long. - 52,44 Lat. - 31,21
83	TS, MD, FC 83	Canguçu - RS	Long. - 52,49 Lat. - 31,14
85	TS, MD, FC 85	Canguçu - RS	Long. - 52,53 Lat. - 31,08
88	TS, MD, FC 88	Piratini - RS	Long. - 52,58 Lat. - 31,06

91	TS, MD, FC 91	Piratini - RS	Long. - 53,03 Lat. - 31,01
96	TS, MD, FC 96	Santana da Boa Vista - RS	Long. - 53,03 Lat. - 30,57
99	TS, MD, FC 99	Santana da Boa Vista - RS	Long. - 53,06 Lat. - 30,56
103	TS, MD, FC 103	Santana da Boa Vista - RS	Long. - 53,10 Lat. - 30,50
105	TS, MD, FC 105	Santana da Boa Vista - RS	Long. - 53,17 Lat. - 30,46
109	TS, MD, FC 109	Santana da Boa Vista - RS	Long. - 53,17 Lat. - 30,40
112	TS, MD, FC 112	Santana da Boa Vista - RS	Long. - 53,23 Lat. - 30,35
116	TS, MD, FC 116	Santana da Boa Vista - RS	Long. - 53,22 Lat. - 30,28
122	TS, MD, FC 122	Cachoeira do Sul - RS	Long. - 52,57 Lat. - 30,16
124	TS, MD, FC 124	Pantano Grande - RS	Long. - 52,31 Lat. - 30,13
126	TS, MD, FC 124	Eldorado do Sul	Long. - 51,06 Lat. - 30,01
135	TS, MD, FC 135	São Francisco de Paula - RS	Long. - 50,53 Lat. - 29,05
140	TS, MD, FC 140	Lageado Grande - RS	Long. - 50,37 Lat. - 29,06
151	TS, MD, FC 151	Bom Jesus - RS	Long. - 50,30 Lat. - 29,13
154	TS, MD, FC 154	Cambará do Sul - RS	Long. - 50,17 Lat. - 29,15
175	TS, MD, FC 175	Jaquirana - RS	Long. - 50,27 Lat. - 28,45
193	TS, MD, FC 193	São José do Ausentes - RS	Long. - 50,07 Lat. - 28,44
206	TS, MD, FC 206	Vacaria - RS - RS	Long. - 50,54 Lat. - 28,31
223	TS, MD, FC 223	Rosário do Sul - RS	Long. - 54,60 Lat. - 30,19
224	TS, MD, FC 224	Rosário do Sul - RS	Long. - 55,10 Lat. - 30,34
226	TS, MD, FC 226	Rosário do Sul - RS	Long. - 55,21 Lat. - 30,49
230	TS, MD, FC 230	Santana do Livramento - RS	Long. - 55,29 Lat. - 30,53
235	TS, MD, FC 235	Santana do Livramento - RS	Long. - 55,37 Lat. - 30,48
238	TS, MD, FC 238	Santana do Livramento - RS	Long. - 55,50 Lat. - 30,42
242	TS, MD, FC 242	Santana do Livramento - RS	Long. - 56,04 Lat. - 30,35
243	TS, MD, FC 243	Quaraí - RS	Long. - 56,14 Lat. - 30,28
244	TS, MD, FC 244	Quaraí - RS	Long. - 56,21 Lat. - 30,26
247	TS, MD, FC 247	Quaraí - RS	Long. - 56,28 Lat. - 30,19
248	TS, MD, FC 248	Quaraí - RS	Long. - 56,28 Lat. - 30,19
252	TS, MD, FC 252	Quaraí - RS	Long. - 56,28 Lat. - 30,19
255	TS, MD, FC 255	Uruguaiiana - RS	Long. - 56,26 Lat. - 30,01
259	TS, MD, FC 259	Uruguaiiana - RS	Long. - 56,46 Lat. - 29,53
261	TS, MD, FC 261	Itaqui - RS	Long. - 56,06 Lat. - 29,53
268	TS, MD, FC 268	Alegrete - RS	Long. - 55,22 Lat. - 30,02
271	TS, MD, FC 271	Rosário do Sul - RS	Long. - 54,59 Lat. - 30,14
C1	FC 001	Sarandi - RS	Long. - 52,51 Lat. - 28,06
C3	FC 003	Palmitinho - RS	Long. - 53,37 Lat. - 27,20
C4	FC 004	Tenente Portela - Rs	Long. - 53,50 Lat. - 27,23
C6	FC 006	Santo Ângelo - RS	Long. - 54,16 Lat. - 28,19
C9	FC 009	Tuparendi - RS	Long. - 54,34 Lat. - 27,40
C10	FC 010	Tuparendi - RS	Long. - 54,34 Lat. - 27,40
C12	FC 012	Porto Mauá - RS	Long. - 54,43 Lat. - 27,38
C13	FC 013	Alecrim - RS	Long. - 54,44 Lat. - 27,42
C15	FC 015	Porto Lucena - RS	Long. - 54,55 Lat. - 27,51
C16	FC 016	Cândido Godói - RS	Long. - 54,45 Lat. - 27,58
C17	FC 017	São Luiz Gonzaga - RS	Long. - 54,58 Lat. - 28,14
C18	FC 018	São Luiz Gonzaga - RS	Long. - 54,58 Lat. - 28,14
C19	FC 019	Caibaté - RS	Long. - 54,39 Lat. - 28,24
C20	FC 020	São Miguel das Missões - RS	Long. - 54,33 Lat. - 28,28
C21	FC 021	São Miguel das Missões - RS	Long. - 54,34 Lat. - 28,26
C22	FC 022	Caibaté - RS	Long. - 54,38 Lat. - 28,24
C23	FC 023	São Luiz Gonzaga - RS	Long. - 55,01 Lat. - 28,25
C24	FC 024	Santo Antônio das Missões - RS	Long. - 55,17 Lat. - 28,29
C25	FC 025	São Francisco de Assis - RS	**
C26	FC 026	São Francisco de Assis - RS	**
C28	FC 028	São Francisco de Assis - RS	**
M1	V14244 "A"	Uruguaiiana - RS	Long. - 57,0 Lat. - 29,7
M2	V14244 "E"	Uruguaiiana - RS	Long. - 57,0 Lat. - 29,7
M4	V14310	Barra do Quaraí - RS	Long. - 57,4 Lat. - 30,1
M5	V14326	Capivari do Sul - RS	Long. - 50,5 Lat. - 30,2
M6	V14329	Capivari do Sul - RS	Long. - 50,5 Lat. - 30,2
M7	V14327	Capivari do Sul - RS	Long. - 50,5 Lat. - 30,2
M8	V14614	Itaquirá - MS	Long. - 54,1 Lat. - 23,3
M9	V14783	Vale do Sol - RS	Long. - 52,7 Lat. - 29,6

M11	V14282	Candói - PR	Long. - 52,0 Lat. - 25,5
M17	V14870	Capivari do Sul - RS	Long. - 50,5 Lat. - 30,2
M18	V14871	Capivari do Sul - RS	Long. - 50,5 Lat. - 30,2
M23	MD s/n	Encruzilhada do Sul - RS	Long. - 52,6 Lat. - 30,6
M24	MD s/n	Encruzilhada do Sul - RS	Long. - 52,6 Lat. - 30,6
M25	MD s/n	Lavras do Sul - RS	Long. - 54,0 Lat. - 30,9
M26	MD s/n	Caçapava do Sul - RS	Long. - 53,5 Lat. - 30,5
M27	MD s/n	Lavras do Sul - RS	Long. - 54,0 Lat. - 30,9
M28	MD s/n	Caçapava do Sul - RS	Long. - 53,5 Lat. - 30,5
M29	MD s/n	Lavras do Sul - RS	Long. - 54,0 Lat. - 30,9
M30	MD s/n	Bagé - RS	Long. - 54,1 Lat. - 31,3
M31	MD s/n	André da Rocha - RS	Long. - 51,5 Lat. - 28,6
M32	MD s/n	Barretos - SP	Long. - 48,6 Lat. - 20,5
M33	MD s/n	Vacaria - RS	Long. - 51,0 Lat. - 28,5
M35	MD s/n	São Borja - RS	**
M36	CN s/n	San Tomé - AR	**
M37	CN s/n	San Tomé - AR	**
M39	CN s/n	San Tomé - AR	**
M41	CN s/n	San Tomé - AR	**
M42	CN s/n	San Tomé - AR	**
M44	CN s/n	San Tomé - AR	**
M49	CN s/n	Mostardas	**
M50	CN s/n	Piracicaba - SP	Long. - 47,9 Lat. - 22,7
M51	CN s/n	Possadas - AR	**
M54	St s/n	Eldorado Sul - RS	Long. - 51,6 Lat. - 30,1
M55	V14921	Quaraí - RS	Long. - 56,4 Lat. - 30,4
M56	V14931	Alegrete - RS	Long. - 55,8 Lat. - 29,8
M67	MD s/n	Colônia - UY	**
M69	MD s/n	São José do Hortêncio - RS	Long. - 51,2 Lat. - 29,6
Bag2	Cultivada Agronomia-UFRGS	**	**
Ar4	CN s/n	André da Rocha - RS	**
Pens9	St s/n	Viamão - RS	Long. - 50,8 Lat. - 30,0

\* V – Valls, J.F.M.; CN – Nabinger, C.; MD – Dall’Agnol, M.; St – Steiner, M.G.; FC – Cidade, F.W.; TS – Souza-Chies, T.T.; \*\* não disponível;

**Tabela 1:** Acessos de *Paspalum notatum*, códigos dos coletores, origem e coordenadas geográficas.

### Amplificação do DNA genômico total

Foram utilizados quatro “*primers*” correspondentes a seqüências de microssatélites sintetizados pela empresa Promega: (CT)<sub>8</sub>G, (AC)<sub>8</sub>T, (GA)<sub>8</sub>G e (CTC)<sub>6</sub>RC.

As reações foram realizadas para um volume de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10x PCR Buffer; 0,75 µl de DMSO (96%); 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1µl de dNTPs (10mM), 1µl de *Primer* (10 pmol/µl); 0,25 µl de Taq polimerase Cenbiot (5U/µl); 10 a 30 ng de DNA genômico; água MilliQ estéril para completar o volume de 25 µl.

### Condições de Amplificação:

As ampliações foram realizadas em termociclador da Applied Biosystems (Gene AMP PCR System 2400). As reações foram submetidas a 40 ciclos de amplificação após a desnaturação inicial a 94°C por 5 min. Cada ciclo consistiu de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 48-50°C e 2 minutos a 72°C (desnaturação, anelamento e extensão das fitas de DNA, respectivamente). Ao final, foi realizada uma extensão de 5 minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%), migraram em tampão TBE 1X (50mM Tris, 50mM ácido bórico, 2,5mM EDTA, pH 8,3) sob voltagem constante de 100 volts por 3 horas. O marcador “Ladder” 100bp (Gibco) foi utilizado como marcador de peso molecular. O gel de agarose, corado com brometo de etídio foi visualizado sob luz UV e fotografado.

### **Análise dos Dados:**

A partir da leitura dos géis gerou-se uma matriz binária em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas (fragmentos de DNA amplificados). A matriz foi utilizada para calcular a porcentagem de polimorfismo obtido com cada *primer* analisado, através da seguinte fórmula:  $P = npb/nbt$ , onde P é o índice de polimorfismo, npb é o número de bandas polimórficas e nbt é o número total de bandas.

A matriz binária foi analisada com o auxílio do Programa NTSYS-PC versão 2.1 (Rohlf, 2000). Foi utilizado o coeficiente de similaridade de Jaccard para gerar as matrizes de similaridade. Para a construção do dendograma, foi utilizado o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*).

Com a finalidade de verificar a consistência dos agrupamentos gerados no dendograma, foi montada uma matriz de distância cofenética, utilizando o módulo

COPH do programa NTSYS. Com o auxílio do módulo MXCOMP a matriz de similaridade original foi correlacionada com a matriz de distância cofenética.

### **Citometria de fluxo**

Os acessos analisados com a técnica de citometria de fluxo estão expressos no dendograma obtido a partir dos dados moleculares (Figura 4) e suas origens geográficas estão destacadas na Tabela 1. Apenas os acessos que permaneceram vivos durante o cultivo foram analisados com esta técnica, pois há necessidade de material foliar fresco.

### **Preparação da suspensão de núcleos intactos e análise das amostras:**

As amostras para análise de citometria de fluxo foram preparadas de acordo com Doležel and Göhde (1995).

Cerca de 50 mg de tecido foliar (folhas jovens) foi selecionado. O tecido foliar foi “picado” com lâmina afiada em 0,5 ml de tampão OTTO I (0,1M de ácido cítrico, 0,5% de Tween20) em placa de Petri. A suspensão de núcleos foi filtrada em membrana de nylon 37 µm em tubos eppendorf de 2 ml.

Posteriormente adicionou-se tampão OTTO II (0,4M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*12H<sub>2</sub>O), RNase (50 µg/ml) e Iodeto de Propídio (50 µg/ml). O volume total foi transferido para tubos de polietileno de 5 ml e levados ao citômetro. A intensidade de fluorescência dos núcleos marcados foi analisada usando o citômetro FACScalibur, Becton Dickinson. O citômetro foi calibrado utilizando-se uma planta de nível de ploidia conhecido, neste caso, utilizou-se *Paspalum notatum* var. *saurae* (2n=2x=20).

O nível de ploidia das amostras foi estimado pela comparação da posição dos picos em G1 com o padrão.

### **Dados morfológicos:**

Buscou-se na literatura características relevantes as quais poderiam ajudar na classificação de biótipos de *Paspalum notatum*.

Neste trabalho considerou-se o “acesso” como “unidade operacional” (OTU). Foram utilizadas plantas coletadas em diferentes localidades da América do Sul, principalmente, no Estado do Rio Grande do Sul (Tabela 1).

Os caracteres considerados úteis para a separação de biótipos de *Paspalum notatum* corresponderam à altura do colmo florífero, número de ramos da inflorescência, média dos comprimentos dos ramos da inflorescência, comprimento e largura de lâmina foliar e comprimento e largura das espiguetas, em alguns casos a presença ou ausência de tricomas nas lâminas foliares foi útil. Os caracteres mencionados são apresentados na Tabela 2, para análise por taxonomia numérica.

Foram analisados 95 acessos (Figura 2) quanto a características morfológicas. Para alguns acessos, tinha-se apenas a exsicata como fonte de informação, e em outra parcela do material foi possível adquirir as medida diretamente das plantas cultivadas em vasos com substrato comercial na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi utilizada régua milimetrada para obtenção das medidas, estas foram realizadas no estágio de florescimento pleno, compreendendo os meses de dezembro de 2005 a fevereiro de 2006, visando a padronização das medições com o estágio fenológico das plantas.

CARACTERES	ESTADOS
1. Altura do colmo florífero (cm)	
2. Número de ramos da inflorescência	(0) 2 (1) 2 ou mais
3. Média dos comprimentos dos ramos da inflorescência (cm)	
4. Comprimento da lâmina foliar (2º folha abaixo da bandeira) (cm)	

5. Largura da lâmina foliar (2ª folha abaixo da bandeira) (mm)	
6. Pilosidade da lâmina foliar	(0) glabra (1) pilosidade parcial (2) densa pilosidade
7. Comprimento da espiguetta (mm)	
8. Largura da espiguetta (mm)	

**Tabela 2:** Caracteres utilizados para análise de Taxonomia Numérica.

Na matriz de dados, com 95 OTU's e oito caracteres, os caracteres qualitativos foram codificados em estados, sendo usado um só algarismo para cada código, enquanto os caracteres quantitativos foram incluídos pelos seus valores reais, resultando em uma matriz com dados mistos. Devido a isto, a mesma teve que ser padronizada no modo Stand do NTSYS 2.1 (Rohlf, 2000).

As técnicas numéricas utilizadas incluíram análise de agrupamento (UPGMA), baseada no coeficiente de distância Euclidiana. As análises foram realizadas no programa NTSYS 2.1 (Rohlf, 2000). As análises de estatística descritiva e contribuição relativa dos caracteres para divergência genética foram realizadas com o auxílio do Programa Genes (Cruz, 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Dados de citometria de fluxo:

A espécie *Paspalum notatum* apresenta citótipos sexuais diplóides ( $2n=2X=20$ ), agamospérmicos tetraplóides ( $2n=4X=40$ ), e ocasionalmente, encontram-se na natureza triplóides e pentaplóides (Quarin, 1989; Tischler & Burson, 1995).

A técnica de citometria de fluxo foi realizada com o intuito de caracterizar os acessos de *Paspalum notatum* quanto ao nível de ploidia, para contribuir ao tratamento taxonômico dado ao Complexo *Paspalum notatum* e a unidade espécie.

Os níveis de ploidia observados para os acessos analisados através da técnica de citometria são apresentados junto ao dendograma dos ISSR (Figura 4). A predominância de acessos tetraplóides é visível. Cerca de 97,6% das plantas analisadas são tetraplóides. Observou-se um indivíduo hexaplóide (88). Martinez *et al.* (1994), em cruzamentos experimentais entre plantas diplóides e tetraplóides, obteve plantas hexaplóides. Se experimentalmente, através de cruzamento entre plantas de diferentes níveis de ploidia, obteve-se indivíduos hexaplóides talvez seja possível se encontrar tal citótipo na natureza.

Embora Pozzobon & Valls (1997) tenham encontrado indivíduos diplóides no Estado do Rio Grande do Sul (sul do Brasil), os referidos autores consideraram duvidosa a ocorrência natural de diplóides, porém, dificilmente todos os acessos diplóides encontrados em campos nativos desse Estado sejam escape da cultivar Pensacola (*Paspalum notatum* var. *saurae*). Neste trabalho comprovou-se a ocorrência de um indivíduo diplóide em Uruguaiana (fronteira do Brasil e Argentina) e um em Capivari do Sul (Região do litoral do Estado do Rio Grande do Sul – Brasil). O último município mencionado tem investido na recuperação de pastagens nativas e há anos não ocorre o plantio de forragem cultivada nesta localidade. Segundo Valls (comunicação pessoal) a região de Capivari do Sul é um local de grande diversidade da espécie.

O conhecimento do nível de ploidia em espécies de interesse agrônomo é útil para programar estratégias de melhoramento genético, e a citometria de fluxo pode ser uma ferramenta rápida para esta finalidade, desde que a técnica esteja bem padronizada para evitar a obtenção de falsos resultados.

#### **Dados morfológicos:**

A distância genética entre os acessos de *Paspalum notatum* foi estimada pelo coeficiente de distância euclidiana. A matriz de distância genética foi utilizada para

gerar o dendograma (Figura 2). A maior distância observada foi de 9,37 entre os acessos Pensacola (Pens) e o M39 e a menor foi de 0,11 entre os acessos M56 e M67.

O ponto e corte foi estimado em 3,59, através da média das distâncias entre todos os acessos. A partir deste ponto observa-se a formação de 8 grupos (Figura 2).

**Grupo 1 :** Caracteriza-se por apresentar comprimento dos ramos da inflorescência variando de 2 a 7,2 cm, altura do colmo florífero de 10,5 a 33,5 cm, lâminas foliares, em geral, medindo 2,5 a 7,2 cm de comprimento e 2,3 a 7 mm de largura, comprimento e largura da espiguetas entre 2,0 a 3,2 mm e 1,5 a 2,2 mm, respectivamente. Lâminas foliares glabras a pubescentes.

**Grupo 2:** Ramos da inflorescência medindo 5,5 a 15 cm, colmo florífero de 27 a 62 cm, largura da lâmina foliar de 5 a 10 mm e comprimento de 9 a 36 cm, comprimento e largura da espiguetas de 3 a 4 mm e de 2 a 3 mm, respectivamente. Lâminas foliares glabras a levemente pubescentes.

**Grupo 3:** é representado por plantas com ramos da inflorescência medindo de 4,3 a 6,75 cm, colmo florífero de 21 a 24 cm, comprimento da lâmina foliar de 13,8 a 27 cm e largura de 7 mm, espiguetas com 2 a 3 mm de comprimento e 1,9 a 2,9 mm de largura. Lâminas foliares levemente pubescentes.

**Grupo 4 :** as plantas pertencentes a este grupo apresentam ramos da inflorescência variando de 9 a 12 cm, colmo florífero de 34 a 45 cm, comprimento da lâmina foliar de 27 a 36 cm e largura de 8 a 10 mm, espiguetas com 3 a 4 mm de comprimento e 2 a 2,5 mm de largura. Lâminas foliares glabras.

**Grupo 5:** é constituído apenas pelo acesso Ar4 de André da Rocha. Apresentando ramos da inflorescência medindo 10 cm, colmo florífero com 43 cm, lâmina foliar com 25 cm de comprimento e 10 mm de largura e espiguetas com 4 mm de comprimento e 2,8 mm de largura. Lâminas foliares glabras a levemente pubescentes.

**Grupo 6:** representado pelo acesso M49, apresentando ramos da inflorescência medindo 8 cm, colmo florífero 38,2 cm, lâmina foliar com 22 cm de comprimento e 8 mm de largura, espiguetas com 2,5 mm de comprimento e 1,5 mm de largura. Lâminas foliares pubescentes.

**Grupo 7:** representado pelo acesso M54, com ramos da inflorescência medindo 8,75 cm, colmo florífero 30 cm, lâmina foliar com 19,2 cm de comprimento e 10 mm de largura, espiguetas com 3,2 mm de comprimento e 2,2 mm de largura. Lâminas foliares glabras.

**Grupo 8:** representado pelo acesso Pens9 (*Paspalum notatum* var. *saurae*), apresentando ramos da inflorescência medindo 8,75 cm, colmo florífero com 59,5 cm, lâminas foliares com 25,4 cm de comprimento e 4 mm de largura, espiguetas com 2,8 mm de comprimento e 1,5 mm de largura. Lâminas foliares glabras.

O coeficiente de correlação cofenética, o qual indica o quanto o agrupamento dos acessos apresentados no dendograma representa a estimativa da similaridade genética a partir de determinado marcador foi de 0,91.

Variáveis	Média	Mínimo	Máximo	CV	Variância	DP
ACFL	26,72	9,5	62,00	37,15	98,57	9,92
NRINF	0,03	0	1	556,71	0,03	0,18
MCRINF	6,02	2,00	15,00	46,09	7,70	2,78
CLF	11,52	3,30	38,00	67,92	61,22	7,82
LLF	5,66	2,30	12,00	33,72	3,64	1,91
PLF	0,51	0	2	128,70	0,42	0,65
CESP	3,06	2,00	4,00	12,15	0,14	0,37
LESP	2,03	1,50	3,00	12,96	0,07	0,26

ACFL = altura do colmo florífero, NRINF = números de ramos da inflorescência, MCRINF = média do comprimento dos ramos da inflorescência, CFL = comprimento da lâmina foliar, LFL = largura da lâmina foliar, PLF = pilosidade da lâmina foliar, CESP = comprimento da espiguetas, LESP = largura da espiguetas. CV = co-variância, DP = desvio padrão.

**Tabela 3:** Estatística descritiva obtida pela análise de distância euclidiana

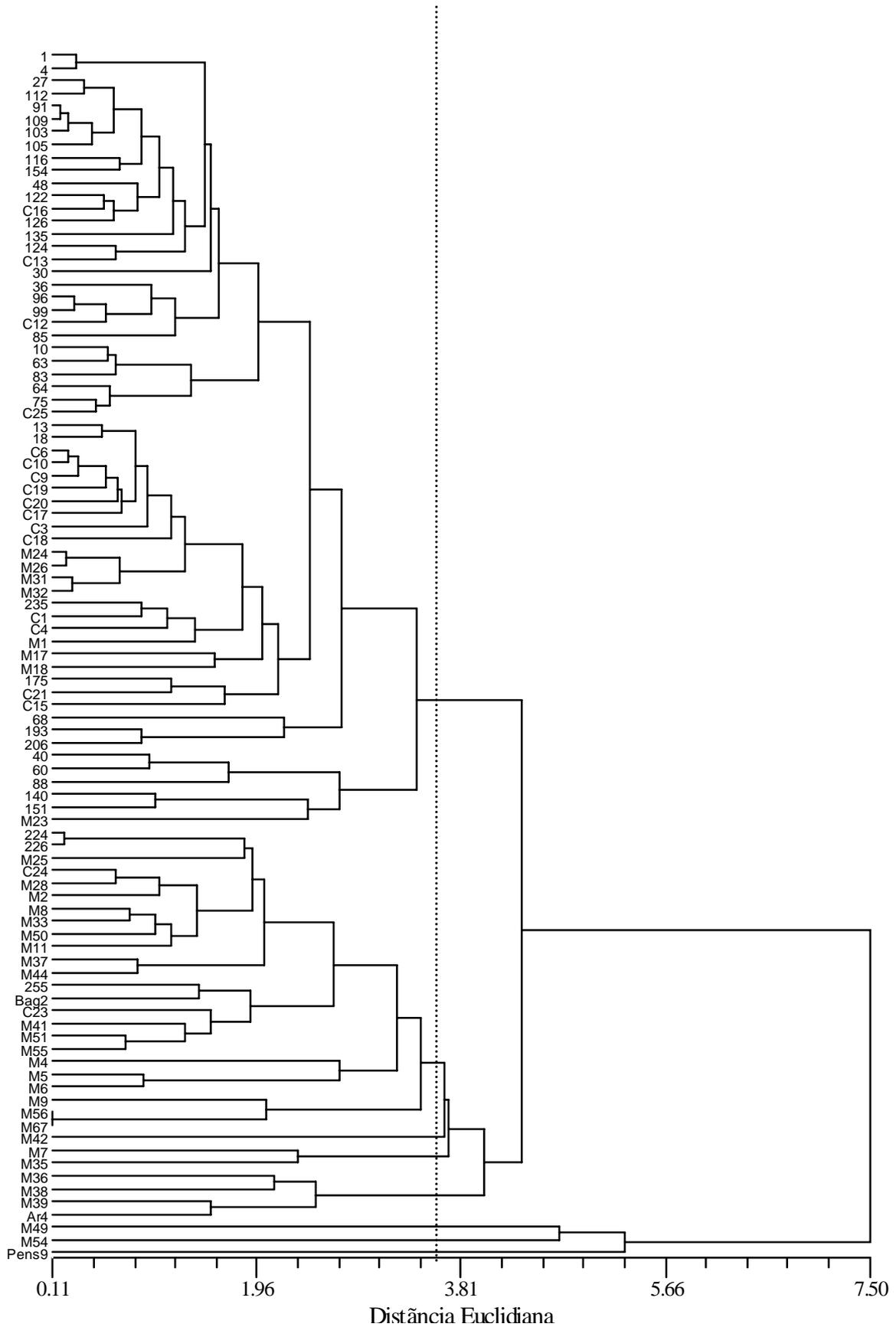
Analisando a tabela acima (Tabela 3) se pode observar que o caráter que apresentou maior variação corresponde à altura do colmo florífero, a qual obteve valor de 98,57, variando de 9,5 a 62 cm, sendo seguida pelo comprimento da lâmina foliar, 67,22 e pela média do comprimento dos ramos da inflorescência com valor de 7,70.

Steiner (2005) apresentou cinco características as quais contribuíram em maior proporção para a divergência genética entre os acessos de *Paspalum notatum*, que foram: comprimento dos ramos da inflorescência (18,10%), comprimento da espiguetta (15,05%), largura da lâmina foliar (14,05%) e comprimento da lâmina foliar (12,05%). Tais características foram igualmente mencionadas por Barreto (1974) e Canto-Dorow (1993) como fontes de informação úteis para a separação de biótipos de *Paspalum notatum*.

Na tabela abaixo (Tabela 4) é apresentada a contribuição relativa das características avaliadas para a divergência genética entre os acessos estudados. Neste caso se destacam a altura do colmo florífero, o comprimento da lâmina foliar, a média do comprimento dos ramos da inflorescência e a largura da lâmina foliar, que somadas contribuíram para 96,39% da divergência entre os acessos.

Variáveis	Contribuição relativa para a divergência genética
Altura do colmo florífero	50,51%
Número de Ramos da Inflorescência	1,25%
Média dos comprimentos dos ramos da inflorescência	7,59%
Comprimento da lâmina foliar (2º folha abaixo da bandeira)	30,70%
Largura da lâmina foliar (2º folha abaixo da bandeira)	5,33%
Pilosidade da lâmina foliar	1,80%
Comprimento da espiguetta	1,50%
Largura da espiguetta	1,32%

**Tabela 4:** Contribuição relativa dos caracteres para divergência genética



**Figure 2:** Dendrograma UPGMA baseados no coeficiente de similaridade de Jaccard entre os acessos de *Paspalum notatum* obtido a partir dos dados morfológicos **Marcadores moleculares ISSR**

Um total de 91 fragmentos foram escorados para os quatro “*primers*” analisados, com variação de 18 [(CT)<sub>8</sub>G] a 27 [(CTC)<sub>6</sub>RC] fragmentos (média de 22,75 fragmentos) por “*primer*”.

Foi possível detectar um amplo polimorfismo para os marcadores ISSR em acessos de *Paspalum notatum* (Tabela 5). Somente 2 fragmentos foram monomórficos (2,2%) entre todos os acessos, os quais foram gerados pelos *primer* (CT)<sub>8</sub>G e (AC)<sub>8</sub>T. A Figura 3 ilustra o padrão eletroforético obtido com o “*primer*” ISSR (CT)<sub>8</sub> G para acessos de *Paspalum notatum*.

Primers 5' → 3'	Número de bandas	Bandas polimórficas	Índice de polimorfismo (%)
(CT) <sub>8</sub> -G	18	17	94,4
(AC) <sub>8</sub> -T	20	19	95
(GA) <sub>8</sub> -G	26	26	100
(CTC) <sub>6</sub> -RC	27	27	100
TOTAL	91	89	97,8

**Tabela 5:** Seqüência dos Primers, número absoluto e polimorfismo de bandas amplificadas pelos marcadores ISSR, índice de polimorfismo obtido para *Paspalum notatum*.

O coeficiente de similaridade de Jaccard variou de 0,43 a 0,97, com uma média de 0,59. A proporção relativamente ampla de fragmentos polimórficos e o baixo coeficiente de similaridade entre alguns biótipos sugerem que existe uma considerável variação genética dentro da espécie *Paspalum notatum*.

Espinosa *et al.* (2006) analisaram acessos de *Paspalum notatum* com auxílio de marcadores moleculares AFLP, onde a distância genética entre os genótipos variou de 0,01 a 0,36, indicando uma diversidade genética relativamente pequena. Estes resultados contrastam com os obtidos no presente trabalho. Essas diferenças podem ser, provavelmente, devido as diferentes técnicas utilizadas, bem como ao número de



*Paspalum notatum*, contudo há co-específicos sexuais diplóides alógamos (Burton, 1946; 1948). E, eventualmente, tetraplóides com apomixia facultativa (Quarin, 1992).

Quarin (1992) sugeriu que as espécies autotetraplóides de *Paspalum* devem ter surgido em um curso de dois passos: Diplóides sexuais de fecundação cruzada eventualmente desenvolvem sacos embrionários apospórico. Ocasionalmente a oosfera não reduzida é fertilizada por núcleos espermáticos reduzidos de um diplóide, formando um triplóide ( $2n, 2x+n=3x$ ). O triplóide produziria uma prole que em combinação com pólen de diplóides formariam os tetraplóides ( $2n, 3x+n=4x$ ). Assim, novos genótipos autotetraplóides surgiriam. Esta teoria vem sendo reforçada em *Paspalum notatum* pelas descobertas da ocorrência de triplóides em populações naturais (Quarin, 1989; Tischler and Burson, 1995).

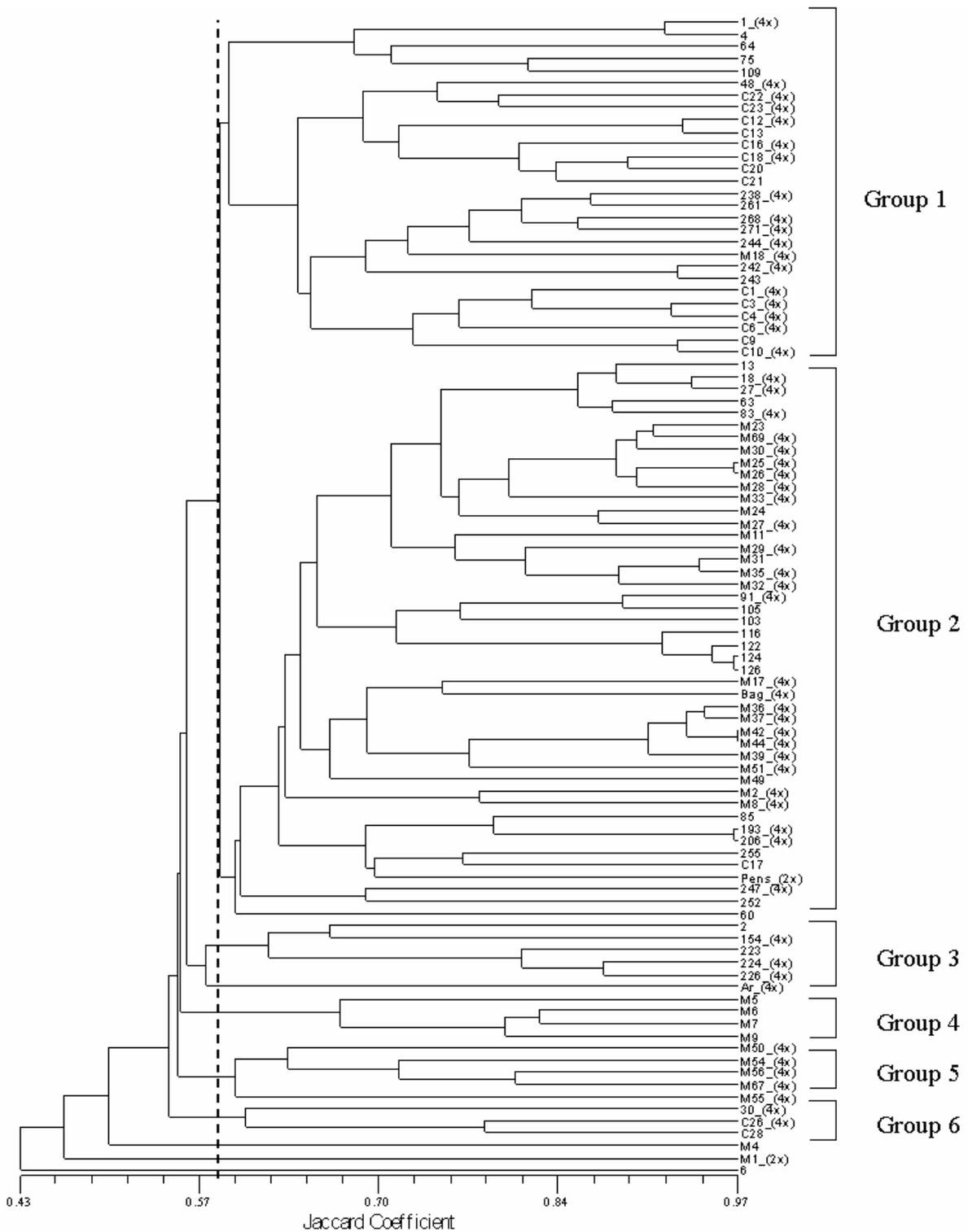
Daurelio *et al* (2004) ao avaliar a diversidade genética em três populações de *Paspalum notatum* com auxílio de RAPD, das quais duas populações apomíticas tetraplóides, sendo uma destas em simpatria com uma população de diplóides sexuais. Os autores observaram uma taxa de variabilidade superior na população apomítica simpátrica em relação à população isolada de tetraplóides apomíticos. Os resultados do referido trabalho indicaram que a co-existência de diplóides sexuais e tetraplóides apomíticos devem aumentar a variabilidade no sistema apomítico. Os novos genótipos que surgem através deste sistema agâmico, favorecem a seleção de genótipos superiores adaptados aos mais diversos ambientes.

Pode-se observar na Figura 4 que os acessos coletados na região de Capivari do Sul apresentaram-se dispersos nos diferentes grupos formados no dendograma, provavelmente, alguns desses acessos devem ter se originado de eventos independentes de autoploidização. Por outro lado, a variação existente entre os diferentes acessos analisados pode ser devido ao modo de reprodução apomítica que, teoricamente, causa

um isolamento, impedindo o fluxo gênico e, conseqüentemente a divergência genética entre as diferentes populações. Além disso, os supostos fundadores de populações de mesma origem geográfica podem ser mais distantes entre si do que entre indivíduos de outras regiões.

### **Agrupamentos formados no dendograma**

No Estado do Rio Grande do Sul encontramos uma ampla variedade de formas para a espécie *Paspalum notatum*, o que levou alguns autores a propor a subdivisão da espécie em nível intra-específico. Barreto (1974) considerou quatro diferentes “formas” para a espécie, onde as características apresentadas por estas permaneciam constantes, porém o autor mencionou que não havia caracteres fixos que permitiriam a divisão da espécie em variedades. Mais tarde, Canto-Dorow (1993) avaliou um grande número de acessos de *Paspalum notatum* propondo uma nova classificação intra-específica, a referida autora considerou um total de quatro diferentes biótipos para *Paspalum notatum* var. *notatum*. As classificações propostas pelos autores mencionados acima foram utilizadas para a caracterização intra-específica dos acessos de *Paspalum notatum* analisados neste trabalho. A similaridade média entre os indivíduos analisados de *P. notatum* foi utilizada para formar os agrupamentos. Observa-se a formação de seis grupos principais (Figura 4)



**Figure 4:** Dendrograma UPGMA baseados no coeficiente de similaridade de Jaccard entre os acessos de *Paspalum notatum* obtido a partir dos marcadores moleculares ISSR. 2x=diploid e 4x=tetraploid (resultados obtidos pela análise de citometria de fluxo).

O grupo 1 é formado por acessos provenientes das Regiões da Encosta do Sudeste, Campanha e Missões no Estado do RS. As características morfológicas

apresentadas pelos acessos do grupo 1 permitem a divisão deste em dois subgrupos. O agrupamento disposto no ápice do dendograma compreende acessos da Encosta do Sudeste, os quais caracterizam-se por apresentar colmo florífero de 19.0-25.0 cm, inflorescência com ramos de 3.0-6.0 cm, lâminas foliares de 5.0-7.0 cm de comprimento e 2.0-4.0 mm de largura, glabras a levemente pubescentes, espiguetas de 3.0 mm de comprimento e 2.0 mm de largura. Tais características correspondem à “forma” comum proposta por Barreto (1974) e com o biótipo “C” e “D” conforme Canto-Dorow (1993). O segundo subgrupo apresenta acessos com colmo florífero de 20.0-33.0 cm, ramos de inflorescência de 4-7 cm, lâminas foliares de 8.0-14.0 cm de comprimento e 3.0-5.0 mm de largura, glabras a pubescentes, espiguetas de 2.8-3.2 mm de comprimento e 1.5-2.0 mm de largura. Correspondem à “forma” comum (Barreto, 1974) e aos biótipos “B” e “D” (Canto-Dorow, 1993).

O segundo grande grupo (grupo 2) compreende acessos de várias regiões fisiográficas do RS, com ampla variação morfológica. No geral, as plantas pertencentes a esse grupo apresentam lâminas foliares largas, algumas das quais são longas, glabras a pubescentes. Pode-se distinguir dois subgrupos principais. O primeiro que compreende os acessos de número 13 a 126, que apresentam colmo florífero de 17.0-30.0 cm, ramos de 3.0-7.0 cm, lâminas foliares de 5.0-14.0 cm de comprimento e 5.0-8.0 mm de largura, glabras a pubescentes, espiguetas de 2.0-3.5 mm de comprimento e 1.5-2.3 mm de largura. Alguns acessos correspondem a “forma” comum (Barreto, 1974) e ao biótipo “D” (Canto-Dorow, 1993), porém, apesar da semelhança nas medidas das estruturas, alguns dos acessos não possuem tricomas e não existem biótipos descritos por Canto-Dorow (1993) para o padrão encontrado nos acessos desse subgrupo. A maioria dos acessos deste subgrupo apresenta folhas curtas e largas (maiores que 5.0 mm de largura).

O segundo subgrupo (M17 a M49) reúne acessos que não apresentam um fragmento de DNA presente na maioria dos acessos tetraplóides de *Paspalum notatum*, com exceção de M49 (Fig. 2). Este mesmo fragmento também se encontra ausente em ambos acessos diplóides analisados. Os acessos pertencentes a esse subgrupo são provenientes de San Tomé e Posadas (Argentina), Capivari do Sul e Mostardas (Litoral do Rio Grande do Sul, Brasil). Os representantes desse subgrupo caracterizam-se por apresentarem lâminas longas (12.5-36.0 cm de comprimento) e largas (7.0-10.0 mm de largura), glabras ou levemente pubescentes, colmo florífero de 20.0-62.0 cm, ramos da inflorescência de 7.2-15.0 cm, espiguetas de 3.0-4.0 mm de comprimento e 2.0-2.8 mm de largura. Os representantes deste subgrupo correspondem às "formas" gigante e/ou Uruguaiana descritas por Barreto (1974) e ao biótipo "A" proposto por Canto-Dorow (1993), porém algumas das plantas analisadas para este subgrupo apresentam leve pubescência nas lâminas foliares e ambos os autores referidos anteriormente consideram lâminas foliares glabras para estas formas (Barreto 1974) e biótipo (Canto-Dorow 1993).

Os acessos M2 e M8 e o 247 e 252 compartilham as mesmas características mencionadas para o subgrupo acima descrito. Por algum motivo os acessos 85, 193 e 106, os quais correspondem a "forma" comum (Barreto, 1974) e ao biótipo "D" (Canto-Dorow, 1993) agruparam-se mais próximos aos acessos 255, C17 e Pens, onde os dois primeiros correspondem ao biótipo "A" (Canto-Dorow 1993) e a "forma" gigante (Barreto, 1974), e o Pens corresponde a *Paspalum notatum* var. *saurae* (diplóide). Provavelmente o número de marcadores utilizados neste trabalho podem ter sido insuficiente para uma clara separação de biótipos.

No grupo 3 encontram-se os acessos 2 (Encosta do Sudeste), 154 (Campos de Cima da Serra), os quais correspondem ao biótipo "D" (Canto-Dorow, 1993). Os

acessos 223 a 226 são de Rosário do Sul (Região da Campanha do Estado do Rio Grande do Sul) e correspondem ao biótipo “A” (Canto-Dorow), apresentando colmo florífero de 31.0-49.0 cm, ramos da inflorescência em média com 9.5 cm, lâminas foliares 17.0 cm de comprimento e 7-10 mm de largura, glabras, espiguetas 3.2-3.8 mm de comprimento e 2.0-2.8 mm de largura.

O acesso AR (André da Rocha, RS, Brasil) apresentou colmo florífero de 31.0 cm, ramos com 9.5 cm, lâmina foliar de 16.5 cm de comprimento e 9.5 mm de largura, glabras e espiguetas 3.8 mm de comprimento e 2.8 mm de largura.

Os representantes do grupo 4 caracterizam-se por apresentar colmo florífero de 24.0-30.0 cm, ramos de 7.0-13.0 cm de largura, lâminas foliares de 8-14 cm de comprimento e de 7.0-9.0 mm de largura, pubescentes, espiguetas de 2.9-3 mm de comprimento e de 1.7-2.0 mm de largura. Os acessos M5, M6 e M7 são da localidade de Capivari do Sul (Litoral do Rio Grande do Sul) e o acesso M9 é procedente do Estado do Mato Grosso. Este último corresponde ao biótipo “D” e, apesar de os acessos de Capivari do Sul apresentarem lâminas foliares pubescentes, as suas dimensões não correspondem ao biótipo descrito por Canto-Dorow (1993).

Os representantes do grupo 5 caracterizam-se por possuírem colmo florífero de 28-30 cm, ramos em média de 8.5 cm, lâminas foliares glabras, de 11.0-15.0 cm de comprimento e 7.0-12 mm de largura, espiguetas de 3.0-3.5 mm de comprimento e 2-2.5 mm de largura. As dimensões apresentadas pelos representantes deste grupo são semelhantes ao biótipo “A” (Canto-Dorow, 1993) e a “forma” gigante e/ou Uruguaiana (Barreto, 1974). Neste grupo encontram-se acessos de Piracicaba (SP), Eldorado do Sul (Depressão Central do RS), Alegrete e Quaraí (Campanha do RS) e Colônia (Uruguai).

Os acessos incluídos no grupo 6 correspondem ao biótipo “D” (Canto-Dorow 1993), apresentando lâminas foliares pubescentes, curtas e largas. Os acessos C26 e C28

são procedentes de São Francisco de Assis (Depressão Central do RS) e o 30 de Dom Feliciano (Encosta do Sudeste).

## CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram uma variação morfológica e genética em *Paspalum notatum* relativamente ampla, considerando que a espécie constitui um Complexo agâmico. Não houve uma clara correlação geográfica dos acessos analisados com o dendograma obtido a partir de dados moleculares, porém, pode-se explicar a inclusão de acessos dos Estados de São Paulo e Mato Grosso junto aos acessos do Rio Grande do Sul e Argentina, pois se supõem que o centro de origem e diversidade da espécie seja o sul do Brasil e noroeste da Argentina. A dispersão da espécie deve ter ocorrido a partir desses locais, do sul para o norte, logo o centro de origem e diversidade pode apresentar genótipos extremamente relacionados aos genótipos de outras localidades mais distantes.

Os resultados moleculares comparados aos dados morfológicos não confirmam totalmente os biótipos propostos por Canto-Dorow (1993) e as “formas” apresentadas por Barreto (1974), pois a variação morfológica existente em *Paspalum notatum* é superior a retratada por esses autores. Além disso, alguns dos acessos morfológicamente semelhantes, provavelmente, devem ter se originado de indivíduos com pool gênico diferenciado. Uma análise morfológica mais apurada deve ser feita a fim de aprimorar a circunscrição dos biótipos propostos por Canto-Dorow (1993).

Apesar da ampla variação existente em *Paspalum notatum* observa-se que independente do nível de ploidia e de diferenças morfológicas existentes, não se pode

desmembrar a espécie em novas variedades, pois não há separação definida nem mesmo entre os acessos diplóides e tetraplóides.

Em resumo, os marcadores moleculares ISSR mostraram-se eficientes para distinção dos genótipos analisados e observou-se uma variabilidade ampla para a espécie. Estes resultados adicionam dados sobre a diversidade genética existente em *Paspalum notatum*, contribuindo para o conhecimento biológico da espécie e fornecendo subsídios para futuros programas de melhoramento genético e de conservação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A.A. **Principais gramíneas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Sulina. 1971. 255p.
- ARECHEVALETA, Y. **Las Gramíneas Uruguayas**. Montevideo: Oriental, 1898.
- ASSEFA, K.;MERKER, A.; TEFERA, H. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. **Hereditas**, **139**: 174-183. 2003.
- BARRETO, I. L. **O gênero Paspalum (Gramineae) no Rio Grande do Sul**. Tese de Livre-Docência em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 1974. 258 p.
- BENNETT, H.W.; BASHAW, E.C. An interspecific hybrid in *Paspalum*. **The Journal of Heredity** **3(2)**: 81-85. 1960.
- BORNET, B. & BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprintin. **Plant Molecular Biology Reporter**, **19**: 209-215. 2001.
- BURSON, B.L. Genome relations between *Paspalum conspersum* and two diploid *Paspalum* species. **Can J Genet Cytol** **20**: 365-372. 1978.
- BURSON, B.L. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. intermedium* and *P. dilatatum* x *P. paniculatum*. **Crop Science** **1**: 534-538. 1979
- BURSON, B.L. Phylogenetic investiation of *Paspalum dilatatum* and related species. In: Smith JA and Hays VW (eds), **Proc. 14<sup>th</sup> Int. Grassl. Congr.**, Lexington KY. Westview Press, Boulder, CO, USA, pp. 170-173. 1983.
- BURSON, B.L. Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. **Botanical Gazette**, **152(2)**: 219-223. 1991.

- BURSON, B.L.; BENNETT, H.W. Cytogenetics and reproduction of three *Paspalum* species. **Can J Genet Cytol** **20**: 365-372. 1970.
- BURSON, B.L.; BENNETT, H.W. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. juergensii* and *P. urvillei* x *P. vaginatum* hybrids. **Crop Science** **12**: 105-108. 1972.
- BURSON, B.L.; LEE, H.; BENNETT, H.W. Genome relations between tetraploid *Paspalum dilatatum* and four diploid *Paspalum* species. **Crop Science** **13**: 739-743. 1973.
- BURTON, G. W. Bahiagrass types. **Journal American Society of Agronomy**, **38**: 273–281. 1946.
- BURTON, G.W. The method of reproduction of common Bahia grass, *Paspalum notatum*. **Journal American Society of Agronomy**, **40**: 443-452. 1948.
- BURTON, G.W. A search for the origin of Pensacola bahiagrass. **Economic Botany**, **21**: 319-382. 1967.
- CANTO-DOROW, T. S. **Revisão taxonômica das espécies sul-riograndenses de *Paspalum* L. (grupo Notata) Poaceae - Paniceae, com ênfase na análise da variação intra-específica de *Paspalum notatum* Flüge**. Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1993. 172p.
- CASA, A. M; MITCHELL, S. E.; LOPES, C. R; VALLS, J. F. M. RAPD analysis reveals genetic variability among sexual and apomitic *Paspalum dilatatum* Poiret biotypes. **The Journal of Heredity**, **93** (4) 300-302. 2002.
- CHASE, A. The North American species of *Paspalum*. **Contributions from the United States National Herbarium**, **28**: 1-310, I-XVII. 1929.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes – versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001.

- DAURELIO, L.D.; ESPINOSA, F.; QUARIN, C.L.; PESSINO, S.C. Genetic diversity in sexual diploid and apomitic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. **Plant Systematics and Evolution**, **244**: 189-199. 2004.
- DOYLE, J.D. & DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.**, **29**: 11-15. 1987.
- DOLEŽEL, J. Flow Cytometry analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, **2**: 143-154. 1991
- DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, **38** (3): 285-302. 1997.
- DOLEŽEL, J.; GÖHDE, W. Sex determination in dioecious plants. *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. **Cytometry**, **19**: 103-106. 1995.
- DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, **95**: 99-110. 2005.
- ESPINOZA, F.; DAURELIO, L.D.; PESSINO, S.C.; VALLE, E.M.; QUARÍN, C.L. Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. **Plant Systematic and Evolution** **258**: 147-159. 2006.
- ESSI L.; SOUZA-CHIES, T.T. (2006) Phylogeny of Linearia and Notata groups of *Paspalum* L. (Poaceae, Panicoideae, Paniceae) and related species. **Genetic Resources and Crop Evolution** *in press*. 2006.
- FERREIRA T.F.; SOUZA-CHIES T.T. Genetic diversity among *Paspalum* L Species (Poaceae) belonging to the Notata and linearia groups based on fragment length polymorphism analyses. **Genetica**, **125**: 133-140. 2005.

- FORBES, I.; BURTON, G.W. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecific hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. **Crop Science**, **1**: 402–406. 1961.
- JARRET R.L.; LIU, Z.W.; WEBSTER, R.W. Genetic diversity among *Paspalum* spp. as determined by RFLPs. **Euphytica**, **104**: 119-125.1998.
- LIU Z.W. ; JARRET, R. L.; DUCAN, R.; KRESOVICH, S. Genetic relationships and variation among ecotypes of seashow *Paspalum* (*Paspalum vaginatum*) determined by Ransom Amplified Polymorphic DNA Markers. **Genoma** **37**: 1011-1016. 1994.
- MARTINEZ E.J; ESPINOZA F.; QUARIN C.L. B<sub>III</sub> progeny (2n+n) from apomitic *Paspalum notatum* obtained through early pollination. **Journal of Heredity**, **85**: 295-297. 1994.
- MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. 17-28. In: MILACH, S.C.K. 1998. **Marcadores Moleculares em Plantas**. 140p. 1998.
- MIZ, R.B.; SOUZA-CHIES, T.T. Genetic relationships and variation among biotypes of dallisgrass (*Paspalum notatum* Poir.) and related species using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**. *In press*, 2006.
- MORAES FERNANDES, M.I.B. **Citogenética e evolução no gênero *Paspalum* (Gramineae)**. Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 1971. 193p.
- MORAES FERNANDES, M.I.B.; BARRETO, I.S.; SALZANO, F. M.; SACCHET, A.M.O.F. Cytological e evolutionary relationships in brazilian forms of *Paspalum* (Gramineae). **Caryologia**, **27 (4)**: 455-464. 1974.

- ORTIZ, J.P.A.; PESSINO, S.C.; LEBLANC, O.; HAYWARD, M.D.; QUARIN, C.L. Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. **Theoretical and Applied Genetics**, **95**: 850–856. 1997.
- PARODI, L.R. Gramíneas Argentinas nuevas o críticas. I. La variación en *Paspalum notatum* Flüggé. **Revista Argentina de Agronomía**, **15**: 53-57. 1948.
- PARODI, L.R. Estudios sistemáticos sobre las Gramineae – Paniceae Argentinas y Uruguayas. **Darwiniana**, **15 (1/2)**: 65-111. 1969.
- POZZOBON, M.T.; VALLS, J.F.M. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). **Brazilian Journal of Genetics**, **20 (1)**: 29-34, 1997.
- QUARÍN, C.L. & NORRMANN, G.A. Cytology and reproductive behavior of *Paspalum equitans*, *P.ionanthum* and their hybrids with diploid an tetraploid cytotypes of *P.cromyorrhizon*. **Botanical Gazette**, **148 (3)**: 386-391. 1987.
- QUARIN, C.L.; NORRMANN, G.A.; URBANI, M.H. Polyploidization in aposporous *Paspalum*. **Apomixis Newsletter**, **1**: 28-29. 1989.
- QUARIN, C.L.; URBANI, M.H.; BLOUNT, A.R.; MARTÍNEZ, E.J.; HACK, C.M.; BURTON, G.W.; QUESENBERRY, K.H. Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of bahiagrass. **Crop Science**, **43**: 745–746. 2003.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.1**. 2000.
- SOUZA-CHIES, T.T.; LONGHI-WAGNER, H.M. (2003) Polimorfismo morfológico. 291-309. *In*: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Org.) **Genética & Evolução Vegetal**. UFRGS: Porto Alegre, 2003. 463p.

- STEINER, M.G. **Caracterização Agronômica, Molecular e Morfológica de acessos de *Paspalum notatum* Flüge e *Paspalum guenoarum* Arech.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Plantas Forrageiras), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005. 138p.
- TISCHLER, C.R.; BURSON, B.L. Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicutelar wax content. **Euphytica**, **84**: 229–235. 1995.
- VALLS, J.F.M. Recursos genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE PASPALUM, 1987, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: IZ, 1987, p.3-13.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, **20** (2): 176-183. 1994.
- WU, C.J.; CHENG, Z.Q.; HUANG, X.Q.; YIN, S.H.; CAO, K.M.; SUN, C.R. Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulata* from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of endangered species. **Plant Science**, **167** (1): 35-42. 2004.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

1. Através deste estudo confirmou-se a unidade da espécie *Paspalum notatum*, representada por indivíduos com diferentes níveis de ploidia, com reprodução sexual e apomítica e ampla variação morfológica.
2. Os marcadores moleculares utilizados neste trabalho podem ter sido insuficientes e/ou conservados para o tratamento intraespecífico, ou seja, insuficientes para separação dos biótipos em grupos morfológicos bem definidos, podendo em trabalhos futuros, ser incorporados um maior número de marcadores, além disso, devem ser incorporados acessos com distribuição geográfica mais ampla, incluindo mais acessos do Uruguai, Argentina, Paraguai e restante do Brasil. Em conjunto, dados morfológicos devem ser obtidos com maior detalhamento.
4. A técnica de citometria de fluxo com o intuito de analisar conteúdo de DNA como uma alternativa à contagem cromossômica, mostrou-se um método rápido e eficaz.
5. As escamas presentes na base dos ramos da inflorescência apresentam diferenças quanto ao tamanho, alguns acessos apresentaram dimensões extremamente reduzidas, enquanto outros, as possuíam muito desenvolvidas. Os tricomas hialinos presentes na base desses mesmos ramos, também demonstraram ampla variação, porém ambos dados não foram adquiridos para todos os acessos, logo, estes não foram tratados no trabalho. Futuramente, estes podem ser boas fontes de informação, pois aparentemente não sofrem pressão ambiental. A simetria dos ramos da inflorescência talvez seja um caráter interessante a ser investigado, pois alguns acessos demonstraram ramos exatamente iguais, enquanto em outros apresentaram ramos extremamente assimétricos.
6. Outro fator interessante a ser investigado diz respeito ao modo de reprodução dos acessos de *Paspalum notatum* do Estado do Rio Grande do Sul. É pertinente estimar

qual a porcentagem de indivíduos tetraplóides sexuais que estão presentes em populações naturais, se é que existem tetraplóides sexuais, ou se esses são exclusivamente apomíticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALISCIONI, S.S. Contribución a la filogenia del género *Paspalum* (POACEAE: PANICOIDEAE: PANICEAE). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, **89** (4): 504-523. 2002.
- ARAÚJO, A.A. **Principais gramíneas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Sulina. 1971. 255p.
- ARECHEVALETA, Y. **Las Gramíneas Uruguayas**. Montevideo: Oriental, 1898.
- ARIAS, M. C., INFANTE-MALACHIAS, M. E. (2001) O emprego de enzimas de restrição para análise de polimorfismos no DNA. 143-152. *In*: MATIOLI, S. R. (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Holos: Ribeirão Preto, 2001. 198p.
- ASSEFA, K.;MERKER, A.; TEFERA, H. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. **Hereditas**, **139**: 174-183. 2003.
- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. London: Chapman & Hall, 1994.
- BARRETO, I. L. **O gênero Paspalum (Gramineae) no Rio Grande do Sul**. Tese de Livre-Docência em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 1974. 258 p.
- BARRETO, I.L. Las espécies de *Paspalum* com racimos conjugados em Rio Grande del Sur (Brasil). **Revista Argentina de Agronomia**, **24** (3): 89-117. 1957.
- BENNETT, H.W.; BASHAW, E.C. An interspecific hybrid in *Paspalum*. **The Journal of Heredity** **3(2)**: 81-85. 1960.
- BOLDRINI, I.I. Campos do rio grande do Sul: Caracterização Fisionômica e Problemática ocupacional. **Boletim do Instituto de Biociências**, **56**: 1-39. 1997.

- BOLDRINI, I. & MARASCHIN, G.E. Introdução e avaliação de gramíneas nativas para o Sul do Brasil – I- *Paspalum plicatulum* Michx.; II- *Paspalum notatum* Fl. (preliminares). In: **Congresso Latinoamericano de Botânica**, 4., 1986, Medellín. Anais. Medellín. 1986.
- BOLDRINI, I.; MIOTTO, S.T.S.; BOECHAT, S.C. **Gramíneas e Leguminosas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Botânica. 140p. Apostila. 1985.
- BORNET, B. & BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, **19**: 209-215. 2001.
- BORNET, B.; GORAGUER, F.; JOLY, G.; BRANCHARD, M. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). **Genome** **45**: 481-484. 2002.
- BORNET, B.; MULLER, C.; PAULUS, F.; BRANCHARD, M. Highly informative and tetra-nucleotide primer from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *Botrytis* L.) **Genome** **45**: 890-896. 2002b.
- BURSON, B.L. Genome relations between *Paspalum conspersum* and two diploid *Paspalum* species. **Can J Genet Cytol** **20**: 365-372. 1978.
- BURSON, B.L. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. intermedium* and *P. dilatatum* x *P. paniculatum*. **Crop Science** **1**: 534-538. 1979
- BURSON, B.L. Phylogenetic investigation of *Paspalum dilatatum* and related species. In: Smith JA and Hays VW (eds), **Proc. 14<sup>th</sup> Int. Grassl. Congr.**, Lexington KY. Westview Press, Boulder, CO, USA, pp. 170-173. 1983.

- BURSON, B.L. Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. **Botanical Gazette**, **152(2)**: 219-223. 1991.
- BURSON, B.L.; BENNETT, H.W. Cytogenetics and reproduction of three *Paspalum* species. **Can J Genet Cytol** **20**: 365-372. 1970.
- BURSON, B.L.; BENNETT, H.W. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. juergensii* and *P. urvillei* x *P. vaginatum* hybrids. **Crop Science** **12**: 105-108. 1972.
- BURSON, B.L.; LEE, H.; BENNETT, H.W. Genome relations between tetraploid *Paspalum dilatatum* and four diploid *Paspalum* species. **Crop Science** **13**: 739-743. 1973.
- BURTON, G. W. Bahiagrass types. **Journal American Society of Agronomy**, **38**: 273-281. 1946.
- BURTON, G.W. The method of reproduction of common Bahia grass, *Paspalum notatum*. **Journal American Society of Agronomy**, **40**: 443-452. 1948.
- BURTON, G.W. A search for the origin of Pensacola bahiagrass. **Economic Botany**, **21**: 319-382. 1967.
- BURTON, G.W.; FORBES, I. 1960. The genetics and manipulation of obligate apomixis in common Bahia grass (*Paspalum notatum* Flüggé). **Proceedings of Eighth International Grassland Congress**, Session 2A/2: 66-71. 1960.
- CANTO-DOROW, T. S. **Revisão taxonômica das espécies sul-riograndenses de *Paspalum* L. (grupo Notata) Poaceae - Paniceae, com ênfase na análise da variação intra-específica de *Paspalum notatum* Flüggé.** Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1993. 172p.

- CANTO-DOROW, T. S.; LONGHI-WAGNER, H. M.; VALLS, J. F. M. Revisão taxonômica das espécies de *Paspalum* L. grupo Notata (Poaceae – Paniceae) do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, (47): 3-44. 1996.
- CASA, A. M; MITCHELL, S. E.; LOPES, C. R; VALLS, J. F. M. RAPD analysis reveals genetic variability among sexual and apomitic *Paspalum dilatatum* Poiret biotypes. **The Journal of Heredity**, 93 (4) 300-302. 2002.
- CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. **Genera Graminum : grasse of the world**. London: Royal Botanic Gardens, 1986.
- CHASE, A. The North American species of *Paspalum*. **Contributions from the United States National Herbarium**, 28: 1-310, I-XVII. 1929.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes** – versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001.
- DAURELIO, L.D.; ESPINOSA, F.; QUARIN, C.L.; PESSINO, S.C. Genetic diversity in sexual diploid and apomitic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. **Plant Systematics and Evolution**, 244: 189-199. 2004.
- DOLEŽEL, J. Flow Cytometry analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, 2: 143-154. 1991
- DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, 38 (3): 285-302. 1997.
- DOLEŽEL, J.; GÖHDE, W. Sex determination in dioecious plants. *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. **Cytometry**, 19: 103-106. 1995.
- DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, 95: 99-110. 2005.

- DOYLE, J.D. & DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.**, **29**: 11-15. 1987.
- ESSELMAN, E.J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D.L.; WINDUSS, J.L.; WOLFE, A.D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeats (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, **8**: 443-451. 1999.
- ESPINOZA, F.; DAURELIO, L.D.; PESSINO, S.C.; VALLE, E.M.; QUARÍN, C.L. Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. **Plant Systematic and Evolution** **258**: 147-159. 2006.
- ESSI, L. **Análise filogenética dos grupos Linearia e Notata de Paspalum L. (Poaceae, Panicoideae, Paniceae) e espécies relacionadas.** Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2003. 107p.
- ESSI L.; SOUZA-CHIES, T.T. (2006) Phylogeny of Linearia and Notata groups of *Paspalum* L. (Poaceae, Panicoideae, Paniceae) and related species. **Genetic Resources and Crop Evolution** *in press*. 2006.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético.** 1 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FERREIRA T.F.; SOUZA-CHIES T.T. Genetic diversity among *Paspalum* L. species (Poaceae) belonging to the Notata and linearia groups based on fragment length polymorphism analyses. **Genetica**, **125**: 133-140. 2005.

- FORBES, I.; BURTON, G.W. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecific hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. **Crop Science**, **1**: 402–406. 1961.
- HADDAD, C.M.; DOMINGUES, J.L.; CASTRO, F.G.F.; TAMASSIA, L.F.M. Características de produção e valor nutritivo do capim Pensacola (*Paspalum notatum* Fluegge var. *saurae* Parodi) em função da idade de corte. **Scientia Agrícola**, **56** (3). 1999.
- HIRATA, M.; PAKIDING, W. Responses of bahiagrass to nitrogen and defoliation. **Journal of Range Manage**, **56**: 608-615. 2003
- JARRET R.L.; LIU, Z.W.; WEBSTER, R.W. Genetic diversity among *Paspalum* spp. as determined by RFLPs. **Euphytica**, **104**: 119-125.1998.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable “minisatelite” regions in human DNA. **Nature**, **314**: 67-73. 1985.
- LIU Z.W. ; JARRET, R. L.; DUCAN, R.; KRESOVICH, S. Genetic relationships and variation among ecotypes of seashow *Paspalum* (*Paspalum vaginatum*) determined by Random Amplified Polymorphic DNA Markers. **Genoma** **37**: 1011-1016. 1994.
- LI, A.; GE, S. 2001. Genetic variation and clonal of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markeres. **Annals of Botany**, **85** (5): 585-590.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatelite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genitics**, **44**: 398-401. 1989.
- MARTÍNEZ, E.J.; HOPP, E.H.; STEIN, J.; Ortiz, J.P.A.; QUARIN, C.L. Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. **Molecular Breeding**, **12**: 319–327. 2003.

- MARTÍNEZ, E.J.; URBANI, M.H.; QUARIN, C.L.; ORTIZ, J.P.A. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. **Hereditas**, **135**: 19–25. 2001.
- MARTINEZ E.J; ESPINOZA F.; QUARIN C.L. BIII progeny (2n+n) from apomitic *Paspalum notatum* obtained through early pollination. **Journal of Heredity**, **85**: 295-295. 1994.
- MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. 17-28. In: MILACH, S.C.K. 1998. **Marcadores Moleculares em Plantas**. 140p. 1998.
- MIZ, R.B.; SOUZA-CHIES, T.T. Genetic relationships and variation among biotypes of dallisgrass (*Paspalum notatum* Poir.) and related species using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**. *In press*, 2005.
- MOHRDIECK, K.H. Formações Campestres do Rio Grande do Sul. In: **Campos Nativos: melhoramento e manejo**. IV. Porto Alegre: Federacite. p. 11-23. 1993.
- MORAES FERNANDES, M.I.B. **Citogenética e evolução no gênero *Paspalum* (Gramineae)**. Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 1971. 193p.
- MORAES FERNANDES, M.I.B.; BARRETO, I.S.; SALZANO, F. M.; SACCHET, A.M.O.F. Cytological e evolutionary relationships in brazilian forms of *Paspalum* (Gramineae). **Caryologia**, **27 (4)**: 455-464. 1974.
- MORAES, A.; MARASCHIN, G.E.; NABINGER, C. Pastagens nos ecossistemas de clima subtropical: pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: **Reunião Anual da SBZ**. Brasília. Anais...Brasília: SBZ. p147-200. 1995.

- NORRMANN, G.A.; QUARÍN, C.L.; BURSON, B.L. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races of six *Paspalum* species. **Journal of Heredity**, **80**: 24-28. 1989.
- ORTIZ, J.P.A.; PESSINO, S.C.; BHAT, V.; HAYWARD, M.D.; QUARIN, C.L. A genetic linkage map of diploid *Paspalum notatum*. **Crop Science**, **41**: 823–830. 2001.
- ORTIZ, J.P.A.; PESSINO, S.C.; LEBLANC, O.; HAYWARD, M.D.; QUARIN, C.L. Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. **Theoretical and Applied Genetics**, **95**: 850–856. 1997.
- OTERO, J.R. Informações sobre algumas plantas forrageiras. **Serviço de informação agrícola**. n. 11, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1961. 334 p.
- PAKIDING, W.; HIRATA, M. Tillering in bahia grass (*Paspalum notatum*) pasture under cattle grazing: results from the first two years. **Tropical Grasslands**, **33**: 170-176. 1999
- PARODI, L.R. Gramineas del genero *Paspalum*. **Revista del Museo de la Plata**, **1** (4): 211-244. 1937.
- PARODI, L.R. Gramíneas Argentinas nuevas o críticas. I. La variación en *Paspalum notatum* Flügge. **Revista Argentina de Agronomía**, **15**: 53-57. 1948.
- PARODI, L.R. Estudios sistemáticos sobre las Gramineae – Paniceae Argentinas y Uruguayas. **Darwiniana**, **15** (1/2): 65-111. 1969.
- POZZOBON, M.T.; VALLS, J.F.M. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). **Brazilian Journal of Genetics**, **20** (1): 29-34, 1997.

- PRESTES, P.J.Q.; FREITAS, E.A.G.; BARRETO, I.L. Hábito vegetativo e variação estacional do valor nutritivo das principais gramíneas da pastagem do Rio Grande do Sul. **Anuário Técnico do Instituto de Pesquisas Zootécnicas “Francisco Osório”**, Porto Alegre. v. 3, p. 516-531, julho 1976.
- QUARÍN, C.L. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. **Apomixis Newsletter 5**: 8-15. 1992.
- QUARIN, C.L. Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction, 11**: 331-335. 1999.
- QUARÍN, C.L. & NORRMANN, G.A. Cytology and reproductive behavior of *Paspalum equitans*, *P. ionanthum* and their hybrids with diploid and tetraploid cytotypes of *P. cromyorrhizon*. **Botanical Gazette, 148 (3)**: 386-391. 1987.
- QUARIN, C.L.; NORRMANN, G.A.; URBANI, M.H. Polyploidization in aposporous *Paspalum*. **Apomixis Newsletter, 1**: 28-29. 1989.
- QUARIN, C.L.; NORRMANN, G.A. Interspecific hybrids between five *Paspalum* species. **Botanical Gazette, 151**: 366-369. 1990.
- QUARIN, C.L.; ESPINOSA, F.; MARTÍNEZ, E.J.; PESSINO, S.C.; BOVO, O.A. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction, 13**: 243-249. 2001.
- QUARIN, C.L.; URBANI, M.H.; BLOUNT, A.R.; MARTÍNEZ, E.J.; HACK, C.M.; BURTON, G.W.; QUESENBERRY, K.H. Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of bahiagrass. **Crop Science, 43**: 745-746. 2003.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.1**. 2000.

- SANTOS, M. *Paspalum notatum* var. *notatum* (POACEAE) em ambientes com e sem rejeitos de mineração de carvão: morfo-anatomia e bioacumulação de metais pesados. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2000. 215p.
- SOARES, H.H.P.R.F.; SILVA, V.P.S.; BASSOLS, P.A.; GUTERRES, E.P.; PERES, P.S. Avaliação de ecotipos de *Paspalum notatum* FLÜGGE e *Paspalum nicorae* PARODI em comparação com pensacola (*Paspalum saurae* PARODI). **Anu. Téc. Inst. Pesq. Zootéc. “Francisco Osório”**, Porto Alegre, 13:87-119. 1986.
- SOLFERINI, V. N., SCHEEPMAKER, D. S. (2001) Polimosfismos de isozimas. 137-142. In: MATIOLI, S. R. (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Holos: Ribeirão Preto, 2001. 198p.
- SOUZA-CHIES, T.T.; LONGHI-WAGNER, H.M. (2003) Polimorfismo morfológico. 291-309. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Org.) **Genética & Evolução Vegetal**. UFRGS: Porto Alegre, 2003. 463p.
- STEIN, J.; QUARIN, C.L.; MARTINEZ, E.J. ; PESSINO, S.C.; ORTIZ; J.A.A. Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory controlling locus. **Theoretical and Applied Genetics**, **109**: 186-191. 2004.
- STEINER, M.G. **Caracterização Agronômica, Molecular e Morfológica de acessos de *Paspalum notatum* Flügge e *Paspalum guenoarum* Arech**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Plantas Forrageiras), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005. 138p.
- TISCHLER, C.R.; BURSON, B.L. Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicutelar wax content. **Euphytica**, **84**: 229–235. 1995.

- VALLS, J.F.M. & POZZOBON, M. T. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE PASPALUM, 1987, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: IZ, 1987, p.15-21.
- VALLS, J.F.M. Recursos genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE PASPALUM, 1987, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: IZ, 1987, p.3-13.
- VENDRAMINI, J.M.B.; HADDAD, C.M.; CASTRO, F.G.F.; VIEIRA, A.C.; HEISECKE, O.R.P.; TAMASSIA, L.F.M. Matéria seca, digestibilidade *in vitro* e composição químico-bromatológica do capim (*Paspalum notatum*) cv. 'tifton 9' com diferentes idades. **Scientia Agrícola**, **56 (3)**. 1999.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, **23 (21)**: 4407-4414. 1995.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, **20 (2)**: 176-183. 1994.
- ZULOAGA F.O; PENSIERO J., MORRONE O. Systematics of Paspalum Group Notata (Poaceae- panicoideae- Paniaceae). **Systematic Botany Monographs**, **71**: 1-75. 2004.
- WILLIAMS, J.G; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNAPolymorphism amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18**: 6531-6535. 1990.

WU, C.J.; CHENG, Z.Q.; HUANG, X.Q.; YIN, S.H.; CAO, K.M.; SUN, C.R. Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulata* from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of endangered species. **Plant Science**, **167** (1): 35-42. 2004.