

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

Ana Claudia Ambiel<sup>1\*</sup>, Luciana Machado Guaberto<sup>2</sup>, Talita Marques Vanderlei<sup>3</sup> e Nelson Barbosa Machado Neto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade do Oeste Paulista, 19067-175, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Curso de Graduação em Biologia, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. <sup>3</sup>Curso de Graduação em Zootecnia, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: ambiel@unoeste.br

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

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

**ABSTRACT. RAPD grouping of accesses and cultivars of three *Brachiaria* species.** The aim of this work was to determine intra and intergenetic similarity among three *Brachiaria* species for germplasm accesses and commercial cultivars using RAPD markers. Seeds were used as DNA source. 10 decamer ‘primers’ were selected among 120 ‘primers’, and 107 polymorphic bands were used to perform the analysis of molecular variance (Amova), Jaccard similarity coefficient and species fixation index. 24.4% of the total variability was contained between species and 75.6% within species, with a species fixation index (FST) of 0.24. The tree showed that two major branches were formed: one with the three outgroup species and another with the species, the latter split into three minor branches: one with all *B. ruziziensis* samples; another with all *B. decumbens* accessions and three of *B. brizantha*; and the last with two *B. brizantha* accesses, all commercial cultivars and *B. decumbens* cv. ‘Basilisk’. It was possible to group, through RAPD, *Brachiaria* accesses and cultivars. The genetic variability index between species was considered low, and somewhat low when compared with autogamous species. *B. brizantha* showed the highest genetic variability and the lowest FST, which means that there is a higher intra specific genetic flux than the others.

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

### Introdução

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

Sete espécies africanas perenes (*B. arrecta*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola*, *B. mutica* e *B. ruziziensis*) têm sido amplamente utilizadas como forrageiras, especialmente, na América tropical, e em menores proporções na Ásia, no Sul do Pacífico e na Austrália. Na América do Sul e Central, as principais gramíneas tropicais utilizadas pertencem ao gênero *Brachiaria*. Somente, no Brasil, existem, aproximadamente, 40 milhões de ha de pastagem de

*Brachiaria*, sendo que mais de 85% ocupados por *B. decumbens* cv. 'Basilisk' e *B. brizantha* cv. 'Marandu' (Keller-Grein et al., 1996).

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

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

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

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

Com o objetivo de avaliar a variabilidade existente, vários autores trabalharam com diferentes variáveis como Valle (1990) que utilizou descritores morfológicos, não-afetados pelo meio ambiente, ou

seja, características de origem genética para avaliar 73 acessos de *B. brizantha*, *B. ruziziensis*, *B. jubata* e *B. decumbens*. *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*, classificando-as de forma distinta. Alguns acessos apresentaram pequena distância filogenética, permitindo o intercâmbio gênico entre espécies, desde que as ploidias coincidam e exista sexualidade. *B. jubata*, contudo, apresentou maior individualidade quando comparado com as outras três espécies. Na análise intra-específica, observou-se que *B. brizantha*, com maior número de acessos, apresentou maior variabilidade nas características estudadas, quando comparadas *B. decumbens* e *B. ruziziensis*.

De forma análoga, Assis et al. (2003) analisaram 301 acessos, pertencentes a seis diferentes espécies de *Brachiaria*. Entre os grupos de caracteres estudados, os vegetativos e reprodutivos foram os mais discriminantes para as espécies. Assim, *B. decumbens* e *B. humidicola* só foram discriminados pelos caracteres de pilosidade; *B. jubata* e *B. dictyoneura* foram completamente discriminadas pelos caracteres vegetativos e *B. brizantha* e *B. ruziziensis* foram discriminadas pelos caracteres reprodutivos. Porém, nenhum caractere foi capaz de separar em grupos diferentes as espécies *B. humidicola* e *B. dictyoneura*.

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

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

e de custo relativamente baixo que pode ser utilizado onde as informações moleculares ainda são escassas.

Comparando os métodos tradicionalmente utilizados para determinação da pureza genética e identificação de cultivares, McDonald (1995) defende algumas vantagens da utilização de RAPDs: (i) marcadores RAPD proporcionam grande potencial para a discriminação de cultivares já que a composição de nucleotídeos de um gene está sendo diretamente determinada em vez do produto da expressão do gene, como uma enzima; (ii) a versatilidade da análise de RAPD é maior do que da eletroforese de proteína. Mais de 700 “primers” estão disponíveis, contra apenas 20 sistemas enzimáticos; (iii) a análise de RAPD requer os mesmos equipamentos gerais e qualidade profissional que a técnica de eletroforese de proteína, apenas alguns equipamentos adicionais são necessários, como o termociclador; (iv) o custo e o tempo, para uma análise completa de RAPD, são equivalentes aos protocolos atuais de eletroforese de proteínas.

Esse trabalho teve como objetivo determinar a similaridade genética entre acessos de germoplasma e cultivares comerciais de três espécies de *Brachiaria* (inter e intraespecífica), por meio de marcadores RAPD.

## Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, em Presidente Prudente – Estado de São Paulo.

Utilizaram-se, como fonte de DNA, sementes de cinco diferentes acessos das espécies de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* cedidas pela Embrapa – Gado de Corte (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte) e de cultivares comerciais das mesmas espécies, além de uma amostra da *Brachiaria* híbrida cv. ‘Mulato’, duas cultivares comerciais de *Panicum maximum*, ‘Mombaça’ e ‘Tanzânia’ e folhas de *B. arrecta*, totalizando 27 amostras (Tabela 1).

Para a extração de DNA, utilizou-se o método de Doyle e Doyle (1987) com adaptações. Utilizaram-se de seis a oito sementes por amostra, as quais foram maceradas em cadinho de porcelana; exceto *B. arrecta*, da qual aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de folha foi macerado em nitrogênio líquido. Após maceração, o material foi transferido para microtubos de 1,5 mL, contendo 700 µL de tampão CTAB 2% a 65°C. O material foi homogeneizado e mantido a 65°C por 40 min. Acrescentaram-se, então, 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico

(24:1) e homogeneizaram-se por inversão. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 min., sendo a porção aquosa recuperada e transferida para outro tubo, acrescentando-se 8% de acetato de amônio a 7,5 M e 54% do volume total de isopropanol absoluto a -20°C, mantendo-se nesta temperatura por 24h. Posteriormente, o material foi centrifugado a 14000 rpm por 5 min., o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 700 µL de etanol 70% a 8°C, centrifugando-se novamente a 14000 rpm por 1 min. O etanol foi descartado e o precipitado seco em fluxo de ar à temperatura ambiente. O DNA foi hidratado em 100 µL de tampão TE em banho seco por 1h a 55°C e quantificado em espectrofotômetro, a 260 nm, e diluído com TE para a concentração de 10 ng µL<sup>-1</sup>.

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

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

As condições de amplificação foram baseadas em Williams *et al.* (1990) com modificações. O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação

de 25  $\mu$ L, contendo 10% de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), 1,5 mM  $MgCl_2$ , 0,4  $\mu$ M de “primer” (oligonucleotídeos), 0,2  $\mu$ M de cada dNTP, uma unidade de Taq DNA Polimerase e DNA molde. As reações de RAPD foram amplificadas em termociclador “MJ – PTC 100” programado para 43 ciclos com passo inicial de desnaturação a 94°C por 3 min., seguidos por 1 min. a 94°C para desanelamento, 1 min. a 37°C para anelamento com “primers” e 30 segundos a 72°C para alongação da cadeia, dando-se após 43 ciclos um passo final de extensão a 72°C por 5 min. As ampliações foram feitas em duas condições com 25 e 50 ng de DNA molde, consideradas apenas as bandas presentes nas duas ampliações.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em geis de agarose 1,5% ( $p v^{-1}$ ), utilizando o tampão de corrida TBE  $\frac{1}{2} X$ . O ladder Amresco 100 pb foi utilizado como marcador de peso molecular. Os geis foram corados com brometo de etídeo e visualizados em câmara com iluminação ultravioleta (câmara CCD Alpha-Inmotech), e as imagens foram capturadas pelo software Chemilmager.

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

A presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos foi usada para a construção de uma matriz de similaridade com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando “1” como a presença da banda no gel e “0” como sua ausência. A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, com a matriz de similaridade, foi construído um dendrograma com o algoritmo de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average), utilizando-se para essa análise o programa NTSYS 2.0 (Rohlf, 1998).

A análise da variância molecular (Amova) foi calculada pela decomposição total nos seus componentes entre e dentro de espécies, utilizando-

se as distâncias ao quadrado (Excoffier et al., 1992), com auxílio do programa Arlequim (Excoffier et al., 2006). Foi realizada para os 15 acessos do banco de germoplasma da Embrapa – Gado de Corte e todas cultivares comerciais e para *B. arrecta*, excluídas as *Panicum*, sendo o híbrido cv. ‘Mulato’ analisado junto com o grupo de *B. brizantha*.

## Resultados e discussão

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

O Grupo 2 subdividiu-se em três subgrupos. O primeiro composto por todas amostras de *B. ruziziensis*; o segundo por todas as *B. decumbens* e por três acessos de *B. brizantha*, todos eles com origem em banco de germoplasma e o terceiro reunindo os dois acessos de *B. brizantha* restantes, as *B. brizantha* comerciais, inclusive o híbrido cv. ‘Mulato’ e a *B. decumbens* cv. ‘Basilisk’.

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

Considerando que as cultivares ‘MG5’ e ‘Xaraés’ tem a mesma origem (acesso CIAT 26110), estão registradas com o mesmo número (04509) no cadastro Nacional de Cultivares e são apomíticas, estas deveriam apresentar alto coeficiente de similaridade, o que não foi observado. Isto pode ser explicado pela extração de DNA de um “bulk” de sementes comerciais, sujeito à contaminação do



polimórficas, verificou-se que 24,40% da variabilidade genética total estão contidas entre as espécies de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. arrecta* analisadas e 75,60% do total estão contidas nas espécies (entre os acessos e as cultivares comerciais das mesmas espécies), conforme Tabela 3.

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

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

Estudos sobre estrutura genética já demonstraram que a distribuição da variação genética não é aleatória dentro das populações. De acordo com Hamrick (1983), ela é determinada pelas seguintes características: sistema reprodutivo, distribuição geográfica da espécie, tamanho efetivo das populações, modo de reprodução e fluxo gênico por meio da dispersão do pólen. Sendo também resultado de um conjunto de fatores evolutivos, que atuam na diversidade genética, introduzindo novos alelos ou modificando as frequências sendo eles: mutação, migração, seleção natural e deriva genética (Weir, 1990).

Espécies alógamas são, por definição, muito mais variáveis que as autógamas (Yanaka et al., 2005). Em algumas populações de espécies alógamas, pode ser encontrada variabilidade intrapopulacional maior que interpopulacional, como em *Lolium perenne* (Sweeney e Dannenberger, 1994), *Trifolium pratense* (Kongkiatngam et al., 1995), *Medicago sativa* (Crochemore et al., 1996). Fernandez e Coulman (2002), também, detectaram variabilidade por RAPD e AFLP maior dentro das populações que entre as populações analisadas de *B. inermis* e *B. riparius*. Dados semelhantes foram obtidos por Vieira et al. (2004) em *Lolium multiflorum*, uma alógama cultivada em largas extensões, 98% da diversidade total estão contidas em populações, enquanto que a diversidade genética entre as populações foi de apenas 2%. Isto reduz a possibilidade de deriva genética e de endogamia, contribuindo dessa maneira para a manutenção da alta diversidade genética dentro das populações. Em várias outras espécies de forrageiras, observou-se alta variabilidade dentro das populações, em *Bromus inermis*, (Diaby e Casler, 2005); bromegrass (*Bromus riparius* Rehm.) (Fernandez et al., 2001), grama azul (*Bouteloua gracilis* Tion.) (Phan, 2000), buffalograss (*Buchloë dactyloides*

(Peakall et al., 1995); *B. auleticus* (Rivas, 2001), *Lolium perenne* L. (Huff, 1997; Kubik et al., 2001), *Chloris gayana* K. (Ubi et al., 2003) e *Pascopyrum smithii* (Larson et al., 2003).

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

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

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

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

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

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

Os valores absolutos do FST das espécies de

*Brachiaria* variaram de 0,244 a 0,380, com valor médio de 0,244 (Tabela 4). *B. brizantha* apresentou o menor índice de fixação gênica, sendo 11,413% inferior ao médio, revelando ainda ter o maior número de bandas polimórficas, indicando maior fluxo gênico e por consequência maior variabilidade genética, fato também observado no dendrograma (Figura 1).

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

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

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

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

## Conclusão

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

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

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

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

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

## Agradecimentos

Ao Programa de Pós-graduação da Universidade do Oeste Paulista, pela disponibilização de recursos financeiros e equipamentos para a realização das análises moleculares. E a Embrapa – Gado de Corte que, gentilmente, cedeu material do banco de germoplasma, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

## Referências

- ASSIS, G.M.L. *et al.* Análise discriminante e divergência genética em espécies de *Brachiaria*. In: SCHENK, M.A.M. (Ed.). *Despertando vocações: a Embrapa Gado de Corte pesquisando com o estudante*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p. 18 (Documentos).
- ASSIS, G.M.L. *et al.* Discriminação de espécies de *Brachiaria* baseada em diferentes grupos de caracteres morfológicos. *Rev. Soc. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 576-584, 2003.
- CROCHEMORE *et al.* Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex. *Agronomie*, Paris, v. 16, n. 7, p. 421-432, 1996.
- DIABY, M.; CASLER, M.D. RAPD marker variation among divergent selections for fiber concentration in smooth bromegrass. *Crop Sci.*, Madison, v. 45, n. 1, p. 27-35, 2005.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.*, Saint Louis, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.
- EXCOFFIER, L. *et al.* Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, Austin, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.
- EXCOFFIER, L. *et al.* *Arlequin ver 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis (software)* Bern: University of Berne Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), 2006. Disponível em: <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>>. Acesso em: 27 jan. 2007.
- FERDINANDEZ, Y.S.N.; COULMAN, B.E. Evaluating genetic variation and relationships among two bromegrass species and their hybrid using RAPD and AFLP markers. *Euphytica*, Wageningen, v. 125, n. 2, p. 281-291, 2002.
- FERDINANDEZ, Y.S.N. *et al.* Estimating the genetic relationship of hybrid bromegrass to smooth bromegrass and meadow bromegrass using RAPD markers. *Plant Breed.*, Berlin, v. 120, p. 149-153, 2001.
- GARRIS, A.J. *et al.* Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*, Austin, v. 169, n. 3, p. 1631-1638, 2005.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural forest population. In: SCHONEWALD-COX, C.M. *et al.* (Ed.). *Genetics and conservation*. Menlo Park; Benjamin/Cummings, 1983. p. 335-348.
- HUFF, D.R. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. *Crop Sci.*, Madison, v. 37, n. 3, p. 557-564, 1997.

- KELLER-GREIN, G. et al. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J.W. et al. (Ed.). *Brachiaria: biology, agronomy, and improvement*. Cali: CIAT, 1996. p. 18-45.
- KONGKIATNGAM et al. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. *Euphytica*, Wageningen, v. 84, n. 3, p. 237-246, 1995.
- KUBIK, C. et al. Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. *Crop Sci.*, Madison, v. 41, p. 1565-1572, 2001.
- LARSON, S.R. et al. Identification of western wheatgrass cultivars and accessions by DNA fingerprinting and geographic provenance. *Crop Sci.*, Madison, v. 43, n. 1, p. 394-401, 2003.
- LIU, K.J. et al. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics*, Austin, v. 165, n. 4, p. 2117-2128, 2003.
- LIU, Z.J. et al. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 174, n. 1-2, p. 59-68, 1999.
- LU, Y. et al. Genetic variability is correlated with population size and reproduction in American wild-rice (*Zizania palustris* var. *palustris*, Poaceae) populations. *Am. J. Bot.*, Columbus, v. 92, n. 6, p. 990-997, 2005.
- MAASS, B.L. Identifying and naming *Brachiaria* species. In: MILES, J.W. et al. (Ed.). *Brachiaria: biology, agronomy, and improvement*. Cali: CIAT, 1996. p. 9-13.
- MACHADO NETO, N. B. et al. *Brachiaria* access germplasm distinction using SDS PAGE. *Acta Sci. Agron.*, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1439-1445, 2002.
- MARCOS FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: Fealq, 2005.
- McDONALD, M.B. Genetic purity: from protein electrophoresis to RAPDs. In: ANNUAL CORN & SORGHUM INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 50., 1995, Washington, D.C. *Proceedings...* Washington, D.C.: Department of Agriculture, 1995. p. 256-271.
- MENEZES, C.C.E. et al. Análise da pureza genética e discriminação de cultivares de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) usando "Random Amplified Polymorphic DNA" em DNA extraído de sementes e folhas. *Rev. Bras. Sementes*, Brasília, v. 24, n. 1, p. 279-285, 2002.
- NDIKUMANA, J.; LEEUW, P.N. Regional with *Brachiaria*: Sub-Saharan Africa. In: MILES, J.W. et al. (Ed.). *Brachiaria: biology, agronomy, and improvement*. Cali: CIAT, 1996. p. 247-257.
- OIKI, S. et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among populations of the insular endemic plant *Campanula microdonta* (Campanulaceae). *Ann. Bot.*, Oxford, v. 87, n. 5, p. 661-667, 2001.
- PEAKALL, R. et al. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloë dactyloides*. *Mol. Ecol.*, Vancouver, v. 4, n. 2, p. 135-148, 1995.
- PHAN, A.T. *Genetic diversity of blue grama (Bouteloua gracilis) and little bluestem (Schizachyrium scoparium) as affected by selection*. 2000. Thesis (PhD in Plant Science)-University of Manitoba, Canada, 2000.
- RENVOIZE, S.A. et al. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trinius) Griseberg. In: MILES, J. W. et al. (Ed.). *Brachiaria: biology, agronomy, and improvement*. Cali: CIAT, 1996. p. 1-17.
- RIVAS, M. Sistema reproductivo y estructura genética de poblaciones de *Bromus auleticus* Trinius ex-Nees (Poaceae). Estudio mediante isoenzimas. *Agrociencia*, Montevideo, v. 5, n. 1, p. 32-40, 2001.
- ROHLF, F.J. NTSYS-Pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0, user's guide. New York: Exeter Software, 1998. Disponível em: <<http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsysguide.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2007.
- SHELTON, M. *Brachiaria Decumbens*. 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/data/Pj000188.HTM>>. Acesso em: 30 jan. 2007.
- SWEENEY, P.M.; DANNEBERGER, T.K. Random amplified polymorphic DNA in perennial ryegrass: a comparison of bulk samples vs. individuals. *Hortscience*, Alexandria, v. 29, n. 6, p. 624-626, 1994.
- UBI, B.E. et al. Genetic diversity in diploid cultivars of rhodes grass determined on basis of amplified fragment length polymorphism markers. *Crop Sci.*, Madison, v. 43, n. 4, p. 1516-1522, 2003.
- VALLE, C.B. *Coleção de germoplasma de espécies de Brachiaria no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético*. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1990. (Documento, 46).
- VIEIRA, E.A. et al. Genetic structure of annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations estimated by RAPD. *Sci. Agric.*, Piracicaba, v. 61, n. 4, p. 407-413, 2004.
- WEEDEN, N.F. Inheritance and reliability of RAPD markers. In: SYMPOSIUM ON APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING, 1., 1992, Minneapolis. *Anais...* Minneapolis: Crop Science Society of America/American Society for Horticultural Science/American Genetic Association, 1992. p. 12.
- WEIR, B.S. *Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data*. Sunderland: Sinauer Associates, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- YANAKA, Y.F. et al. Variabilidade genética em populações naturais de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (Poaceae) com base em isoenzimas e marcadores RAPD. *Rev. Soc. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 1897-1904, 2005.

Received on April 03, 2007.

Accepted on October 16, 2007.