

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

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE *ADESMIA* DC. POR
RAPD.**

PAULA MENNA BARRETO DIAS
Bióloga (UFRGS)

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de
mestre em Zootecnia, área de concentração Plantas Forrageiras

Porto Alegre (RS) Brasil
Março, 2003

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de estudos concedida;

À minha orientadora Maria Teresa Schifino-Wittmann, pela amizade, confiança e principalmente pelo exemplo de amor à ciência.

Ao meu co-orientador Miguel Dall'Agnol pela confiança, ajuda, companheirismo e por seu entusiasmo contagiante.

Aos meus queridos colegas e amigos do Laboratório de Citogenética e Eletroforese, Elaine Biondo, Carine Simione, Tatiana Boff e todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

As colegas do Laboratório de Análise Genética, Fernanda Bortolini e Fabiana Yanaka e especialmente para minhas amigas e bolsistas Fernanda Guedes e Doriane Sacheto, que foram imprescindíveis na execução deste trabalho, pela sua amizade e dedicação.

Aos meus colegas de mestrado Paulo Roberto da Silva, Rúbia Patrícia Coser e Daniele Costenaro, pelas horas de estudo compartilhadas e principalmente pela sua amizade.

Aos meus amigos, Eduardo, Daniela, Ane Cláudia e Kelly, pela sua amizade e seu amor.

Aos meus pais, Clemar e Maria pelo seu amor, incentivo e exemplo.

Aos meus irmãos por seu incentivo, companheirismo e amor.

Ao Egidio, pelo companheirismo e incentivo.

À minha filhota Luísa, pelo seu amor, pela sua compreensão nos momentos de ausência e pelo seu sorriso animador nos momentos de cansaço.

À todos aqueles que colaboraram para a execução deste trabalho.

CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE *ADESMIA* DC. POR RAPD.¹

Autora: Paula Menna Barreto Dias
Orientadora: Maria Teresa Schifino-Wittmann
Co-orientador: Miguel Dall'Agnol

RESUMO

O gênero *Adesmia*, leguminosa exclusivamente sul-americana, possui 17 espécies brasileiras, com distribuição restrita ao sul do Brasil. Este trabalho teve como objetivos: caracterizar através de marcador molecular do tipo RAPD, as espécies brasileiras de *Adesmia*, avaliar a variabilidade dos marcadores RAPD entre espécies e entre diferentes populações da mesma espécie, relacionar dados de diversidade dos marcadores RAPD com dados de modo de reprodução e taxonômicos. Foram analisadas populações de 15 indivíduos nas espécies (*A. paranensis*, *A. reitziana*, *A. sulina* e *A. vallsii*) e duas populações de 15 indivíduos com locais de coleta distintos para as espécies (*A. araujoi*, *A. arillata*, *A. bicolor*, *A. ciliata*, *A. incana*, *A. latifolia*, *A. muricata*, *A. paranensis*, *A. psoraleoides*, *A. riograndensis*, *A. rocinhensis*, *A. securigerifolia*, *A. tristis*). Os resultados obtidos indicaram que a similaridade genética média intrapopulacional para as 17 espécies variou de 0,35 (índice de Jaccard) a 0,80. A similaridade interpopulacional para as 13 espécies avaliadas variou de 0,19 a 0,89. A similaridade genética média entre as 17 espécies foi de 0,56 (Índice de Dice). Os resultados de variabilidade intrapopulacional e interpopulacional concordaram, de um modo geral, com o modo de reprodução indicado para as espécies. Os marcadores RAPD utilizados foram eficientes e separaram as populações e espécies de *Adesmia*.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Plantas Forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (130p.) Março, 2003.

CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN SPECIES OF *ADESMIA* DC. WITH RAPD.¹

Author: Paula Menna Barreto Dias
Adviser: Maria Teresa Schifino-Wittmann
Co-adviser: Miguel Dall'Agnol

ABSTRACT

Adesmia is a southamerican genus of legumes with 17 species restricted to the southern of Brazil. This work aimed, molecular characterization, with RAPD molecular markers, of the genetic variability of Brazilian species of *Adesmia*, evaluate the RAPD markers variability within populations and among species, verify relationships between morfologicals and mode of reproduction dates with RAPD markers diversity. Thirty populations (15 individuals each) were analised of *A. paranensis*, *A. reitziana*, *A. sulina*, *A. vallsii*, *A. araujoi*, *A. arillata*, *A. bicolor*, *A. ciliata*, *A. incana*, *A. latifolia*, *A. muricata*, *A. paranensis*, *A. psoraleoides*, *A. riograndensis*, *A. rocinhensis*, *A. securigerifolia* and *A. tristis*. The results showed that genetic similarity within populations ranged from 0,35 to 0,80 (Jaccard). Genetic similarity among populations ranged from 0,19 to 0,89. Genetic similarity for 17 species was, in average, 0,56 (Dice). The results for genetic variability within and among populations agree with data for mode of reproduction. RAPD markers were able to separate the populations and species of *Adesmia*.

¹ Master of Science dissertation in Forage Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (130p.) March, 2003.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Considerações gerais sobre o gênero <i>Adesmia</i> DC.....	4
2.2 Espécies Avaliadas.....	7
2.2.1 <i>Adesmia bicolor</i> (Poir).....	7
2.2.2 <i>Adesmia incana</i> Vog. Var. <i>incana</i>	8
2.2.3 <i>Adesmia latifolia</i> (Spreng) Vog.....	8
2.2.4 <i>Adesmia punctata</i> (Poir) Dc var <i>punctata</i>	10
2.2.5 <i>Adesmia riograndensis</i> Miotto	10
2.2.6 <i>Adesmia securigerifolia</i> Hert.....	11
2.2.7 <i>Adesmia muricata</i> (Jacq) DC.....	11
2.2.8 <i>Adesmia araujo</i> Burk.....	12
2.2.9 <i>Adesmia ciliata</i> Vog.....	12
2.2.10 <i>Adesmia psoraleoides</i> Vog.....	12
2.2.11 <i>Adesmia rocinhensis</i> Burk.....	12
2.2.12 <i>Adesmia sulina</i> Miotto.....	13
2.2.13 <i>Adesmia tristis</i> Vog.....	13
2.2.14 <i>Adesmia reitziana</i> Burk.....	14
2.2.15 <i>Adesmia arillata</i> Miotto.....	14
2.2.16 <i>Adesmia paranensis</i> Burk.....	14
2.2.17 <i>Adesmia vallsii</i> Miotto.....	15
3. Caracterização de germoplasma no gênero <i>Adesmia</i>	15
4. Marcador molecular do tipo RAPD.....	18
5. Caracterização da variabilidade genética com a utilização de RAPD.....	20
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
6.1 Material vegetal.....	23
6.2 Preparo das sementes.....	24
6.3 Semeadura em casa de vegetação.....	24
6.4 Coleta de material e extração de DNA.....	27
6.5 Quantificação de DNA.....	27
6.6 Reação de amplificação de DNA.....	28
6.7 Visualização dos fragmentos gerados.....	30
6.8 Análise dos dados de RAPD.....	30
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
7.1 Análise individual dos acessos.....	33
7.2 Análise em conjuntos dos acessos de cada espécie.....	36
7.3 Avaliação comparativa dos <i>bulks</i> dos acessos de cada espécie.....	45
7.4 Análise em conjunto dos <i>bulks</i> dos acessos das diferentes espécies.....	48
7.5 Análise do conjunto dos acessos individuais.....	48
8. CONCLUSÕES.....	92
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
10. APÊNDICES.....	101

RELAÇÃO DE FIGURAS	Página
1. Vasos com plantas de <i>Adesmia</i> instalados em casa de vegetação.....	24
2. Dendogramas acessos 01 e 02 de <i>A. araujoii</i>	53
3. Dendogramas acessos 05 e 07 de <i>A. bicolor</i>	54
4. Dendogramas acessos 08 e 10 de <i>A. ciliata</i>	55
5. Dendogramas acessos 11 e 12 de <i>A. incana</i>	56
6. Dendogramas acessos 14 e 16 de <i>A. latifolia</i>	57
7. Dendogramas acessos 18 e 19 de <i>A. muricata</i>	58
8. Dendogramas acessos 20 e 21 de <i>A. arillata</i>	59
9. Dendogramas acessos 22 e 23 de <i>A. psoraleoides</i>	60
10. Dendogramas acessos 24 e 25 de <i>A. punctata</i>	61
11. Dendogramas acessos 26 e 27 de <i>A. riograndensis</i>	62
12. Dendogramas acessos 28 e 29 de <i>A. rocinhensis</i>	63
13. Dendogramas acessos 31 e 37 de <i>A. securigerifolia</i>	64
14. Dendograma acesso 33 de <i>A. sulina</i>	65
15. Dendogramas acessos 34 e 35 de <i>A. tristis</i>	66
16. Dendograma acesso 42 de <i>A. vallsii</i>	67
17. Dendograma acesso 43 de <i>A. reitziana</i>	68
18. Dendograma acesso 44 de <i>A. paranensis</i>	69
19. Dendograma análise comparativa acessos 01 e 02 de <i>A. araujoii</i>	70
20. Dendograma análise comparativa acessos 05 e 07 de <i>A. bicolor</i>	71
21. Dendograma análise comparativa acessos 08 e 10 de <i>A. ciliata</i>	72
22. Dendograma análise comparativa acessos 11 e 12 de <i>A. incana</i>	73
23. Dendograma análise comparativa acessos 14 e 16 de <i>A. latifolia</i>	74
24. Dendograma análise comparativa acessos 18 e 19 de <i>A. muricata</i>	75
25. Dendograma análise comparativa acessos 20 e 21 de <i>A. arillata</i>	76
26. Dendograma análise comparativa acesso 22 e 23 de <i>A. psoraleoides</i> ...	77
27. Dendograma análise comparativa acessos 24 e 25 de <i>A. punctata</i>	78
28. Dendograma análise comparativa acesso 26 e 27 de <i>A. riograndensis</i> ..	79
29. Dendograma análise comparativa acessos 28 e 29 de <i>A. rocinhensis</i> ...	80
30. Dendograma análise comparativa acesso 31 e 37 de <i>A. securigerifolia</i> ..	81
31. Dendograma análise comparativa acessos 34 e 35 de <i>A. tristis</i>	82
32. Dendograma análise dos bulks dos acessos todas as espécies	83
33. Dendograma geral análise de todas as espécies	84

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Relação do material de <i>Adesmia</i> , seus respectivos coletores, códigos de acesso e local de coleta.....	25
2. Número de indivíduos por acessos de <i>Adesmia</i>	26
3. Relação dos <i>primers</i> utilizados para estudo de caracterização de acessos de <i>Adesmia</i> DC.....	29
4. Número de <i>primers</i> , número de bandas, média de bandas por <i>primer</i> , tamanho dos fragmentos analisados, porcentagem de bandas polimórficas e similaridade média das análises individuais.....	35
5. Análises comparativas entre acessos, número de <i>primers</i> , número de bandas analisadas, similaridade média entre acessos e coeficiente de correlação.....	37
6. Similaridade genética média intrapopulacional e interpopulacional.....	38
7. Modo de reprodução das espécies de <i>Adesmia</i> adaptado de Tedesco <i>et al.</i> (2000).....	41
8. Análise comparativa dos <i>bulks</i> dos acessos de <i>Adesmia</i>	47

1. Introdução

Os campos nativos do estado do Rio Grande do Sul apresentam uma enorme diversidade, com seus ecossistemas heterogêneos, devido ao grande número de tipos de solos e à variação de altitude e clima. A riqueza da composição florística das diferentes comunidades vegetais é grande, incluindo cerca de 400 espécies de gramíneas e 150 espécies de leguminosas (Boldrini, 1997).

No entanto, apesar desta extensa riqueza em espécies nativas de gramíneas e leguminosas servir como a base alimentar para os rebanhos gaúchos, pouco ainda é conhecido a respeito de muitas dessas espécies. Associado ao pouco conhecimento, a maioria dessas espécies é de produção estival, ocasionando uma acentuada flutuação na disponibilidade de forragem nos meses mais frios do ano. O gênero *Adesmia* DC. compreende espécies de leguminosas nativas que são adaptadas às condições de solo e clima do Rio Grande do Sul. As espécies do gênero *Adesmia* são hibernais, vegetando e permanecendo verdes em baixas temperaturas, e representam deste modo, uma alternativa para produção de forragem nos períodos de escassez. Segundo Valls (1984), para o estudo do potencial das espécies do gênero, agora já com diversas populações representativas da maioria das espécies do sul do Brasil disponíveis em forma propagável, necessita-se de informações taxonômicas, citogenéticas, reprodutivas, ecológicas e agronômicas.

Nesse sentido, diversos estudos têm sido conduzidos recentemente para avaliação das características de algumas espécies do gênero, visando um possível uso forrageiro.

Dentre as avaliações necessárias nos bancos de germoplasma, das espécies nativas do gênero *Adesmia*, a caracterização e a avaliação da variabilidade genética são essenciais para o conhecimento, avaliação, manejo, utilização e conservação dos recursos genéticos disponíveis. Para as espécies do gênero, os estudos de caracterização de germoplasma e avaliação da variabilidade genética, já realizados, basearam-se principalmente em estudos citológicos, aspectos morfológicos e de modo de reprodução.

Além do estudo das características morfológicas para a avaliação de germoplasma, em estudos mais recentes, os marcadores moleculares também têm sido amplamente utilizados.

O desenvolvimento exponencial da biologia molecular, principalmente após o advento da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), possibilitou a sua utilização nas mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética, quanto em programas de melhoramento de plantas.

Atualmente diversas técnicas da biologia molecular servem como ferramenta para a detecção de variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Dentre as técnicas disponíveis, e uma das mais utilizadas, está o marcador molecular denominado RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990; Welsh & Mclelland, 1990), o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso.

Dentro do gênero *Adesmia*, as técnicas moleculares ainda não foram empregadas na caracterização de germoplasma e na análise da diversidade genética das espécies brasileiras que compõem o gênero.

Portanto os objetivos deste trabalho foram:

- Caracterizar, com a utilização de marcador molecular do tipo RAPD, as espécies brasileiras do gênero *Adesmia* DC.
- Com base nestas informações estabelecer relações de diversidade genética entre as espécies e entre os acessos analisados.
- Relacionar dados de diversidade com dados morfológicos e de reprodução.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Considerações gerais sobre o gênero *Adesmia* DC.

Dentre as espécies de leguminosas nativas adaptadas ao solo e ao clima do estado do Rio Grande do Sul, estão as espécies do gênero *Adesmia* DC. O gênero *Adesmia* pertence à tribo *Adesmieae* (Benth.) Hutch., família *Leguminosae-Faboideae*, e possui cerca de 230 espécies (Miotto & Leitão Filho, 1993) sendo todas sul-americanas. A maior concentração de espécies, ou o centro de diversidade do gênero, situa-se na cordilheira chileno-argentina e nas regiões semi-áridas argentinas (Burkart, 1967).

A caracterização taxonômica das espécies do gênero *Adesmia* DC. ocorrentes no Brasil foi realizada por Miotto (1991) em sua tese de doutorado.

No Brasil, ocorrem 17 espécies nativas e uma variedade, distribuídas nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina (Miotto & Leitão Filho, 1993). As espécies brasileiras do gênero pertencem a quatro séries: *Muricatae* Burkart, *Subnudae* Burkart, *Bicolores* Burkart e *Psoraleoides* Burkart.

Estudos dos padrões fitogeográficos sobre o gênero, no Brasil, indicaram que as primeiras três séries representam uma clara extensão aos subtrópicos brasileiros, da distribuição relativamente ampla nas províncias biogeográficas do sul (Patagônica) e do oeste (Andina), mostrando um número menor de espécies e uma distribuição restrita ao sul. A série *Psoraleoides* é endêmica do sul do Brasil e apresenta um número relativamente alto de espécies, algumas das quais estão restritas a regiões montanhosas particulares (Miotto & Waechter, 1996).

No Brasil, o interesse pela coleta e conservação de germoplasma do gênero *Adesmia* foi motivado, além do conhecimento botânico, também pelo potencial forrageiro de algumas espécies, para as regiões de clima temperado, com estações bem definidas, invernos frios e ocorrência de geadas. Nestas condições, que são características da região sul do Brasil, muitas das espécies do gênero tem sido encontradas vegetando e permanecendo verdes (Miotto & Leitão Filho, 1993).

O valor forrageiro das espécies herbáceas de *Adesmia* tem sido também mencionado mais recentemente em publicações da Argentina, Uruguai e sul do Brasil.

No Uruguai, Coll & Zarza (1992) avaliaram oito espécies de *Adesmia* nativas e consideraram *Adesmia bicolor* como a espécie mais promissora com valores de 18% de Proteína Bruta (PB) e 78% de digestibilidade “in vitro” de matéria orgânica (DIVMO).

No Brasil, algumas espécies de *Adesmia* foram avaliadas em diversos estádios por Dall’Agnol & Gomes (1994) e apresentaram bons valores, destacando-se *Adesmia latifolia* com 18,6% de PB e 70,8% de DIVMO, no estádio de florescimento. Os percentuais de PB no estádio vegetativo foram os mesmos para *Adesmia latifolia*, no entanto, os valores de DIVMO tiveram um acréscimo para 78,1%. Para o sul do Brasil, existem indicações de outras espécies do gênero que merecem ser investigadas no seu aspecto forrageiro (Scheffer-Basso, 1999). Dall’Agnol *et al.* (2002) fazem uma síntese das características que foram estudadas para a avaliação do potencial forrageiro de

algumas espécies de leguminosas nativas, incluindo-se nelas, espécies do gênero *Adesmia*.

Com relação à caracterização morfofisiológica, Scheffer-Basso *et al.* (2002) analisaram *A. latifolia*, *A. tristis* e *A. punctata*, descreveram o padrão de crescimento e caracterizaram o modelo de desenvolvimento morfológico e de acúmulo e repartição de biomassa. Seus resultados indicaram que nas espécies estoloníferas *A. latifolia* e *A. punctata*, o padrão de acúmulo e repartição da biomassa é caracterizado, principalmente, pela produção de matéria seca de folhas, sendo que o acúmulo de forragem, está diretamente correlacionado com o índice de área foliar. Na espécie *A. tristis*, para o padrão de acúmulo e repartição de biomassa, as frações de caule e raiz demonstram igual importância. Scheffer-Basso (1991) indicou ainda *A. latifolia* como sendo uma espécie detentora de características únicas que a qualificam, dentre as espécies estudadas, para a utilização em programa intensivo de melhoramento.

Outros estudos recentes incluem, ainda, aspectos como superação de dormência de sementes (Scheffer-Basso & Vendrúsculo, 1997; Montardo *et al.*, 1998; Tedesco *et al.*, 2001), modo de reprodução (Tedesco *et al.*, 1998, 2000), comportamento meiótico e fertilidade de pólen (Tedesco *et al.*, 2002), resposta à adubação fosfatada (Dutra *et al.*, 1998 a; Ben *et al.*, 1998), densidade de semeadura (Dutra *et al.*, 1998b), tolerância ao alumínio (Milan *et al.*, 1991, Vidor & Pérez, 1998, Scheffer-Basso *et al.*, 2000), ontogenia floral (Moço & Mariath, 1999), ontogenia de semente (Izaguirre *et al.*, 1994), comportamento de florescimento e produção e forragem em *A. latifolia*

(Menezes, 2001), e finalmente degradabilidade ruminal da matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) (Ribeiro *et al.*, 1996).

Estes estudos ilustram a importância e a necessidade de conhecimento dos diversos aspectos de um gênero ou espécie que se pretenda utilizar em pesquisas futuras em programas de melhoramento genético de plantas forrageiras.

2.2 Espécies Avaliadas

A seguir serão descritas resumidamente, as espécies estudadas neste trabalho, seguindo a classificação nas diferentes séries descritas por Miotto & Leitão Filho (1993).

Série Bicolores

As espécies pertencentes à série bicolores são : *Adesmia bicolor*, *Adesmia incana*, *Adesmia latifolia* e *Adesmia punctata*.

2.2.1 *Adesmia bicolor* (Poir) DC.

Adesmia bicolor foi citada por Araújo (1940), em seu estudo sobre leguminosas forrageiras do Rio Grande do Sul, como sendo uma forrageira bastante utilizada e reconhecidamente útil nos campos finos e baixos da fronteira sul do Estado e por Valls (1984) como ocorrendo ao longo da fronteira com o Uruguai.

No Uruguai, das nove espécies de *Adesmia* existentes, *Adesmia bicolor* é citada por Coll & Zarza (1992) como uma das mais amplamente distribuída e a mais promissora por suas características forrageiras, sendo uma planta com grande habilidade colonizadora de solos degradados ou subsolo exposto por erosão ou remoção mecânica.

2.2.2 *Adesmia incana* Vog. var. *incana*

No Brasil esta é a única variedade da espécie. A outra variedade existente (*incana* var. *grisea*) ocorre somente na Argentina e no Uruguai (Miotto, 1991).

Comumente encontrada no litoral, serra do sudeste e campanha do Rio Grande do Sul (Valls, 1984). Segundo Araújo (1940), é uma excelente fixadora de dunas propagando-se por talos rasteiros, cobrindo totalmente o terreno em pouco tempo.

2.2.3 *Adesmia latifolia* (Spreng) Vog.

Esta espécie que ocorre no Brasil, possui ampla distribuição no estado do Rio Grande do Sul, ocorrendo no litoral, região da campanha e depressão central. Sua ocorrência também se dá no sul do estado de Santa Catarina, sendo muito freqüente nos municípios de São Joaquim e Urubici (Valls, 1984).

Para o Brasil, é uma das espécies que ocorre em campos alagadiços e banhados (Miotto & Leitão Filho, 1993). *Adesmia latifolia* é também encontrada na Argentina e no Uruguai.

Devido ao seu grande potencial forrageiro, o que foi demonstrado recentemente em diversos estudos (Dall'Agnol & Gomes 1994, Scheffer-Basso, 1998; Menezes, 2001), *A. latifolia* tem sido amplamente analisada, a despeito de outras espécies de *Adesmia*, em estudos complementares e de avaliações a campo.

A. latifolia é considerada uma espécie de versatilidade reprodutiva (Tedesco *et al.*, 1998), podendo reproduzir-se tanto pelo mecanismo de

fecundação cruzada (alogamia), quanto pelo mecanismo de autofecundação (autogamia).

Estudos de avaliação a campo, tanto em cultivo extremo (Menezes, 2001) quanto em melhoramento de campo nativo (Dutra *et al.*, 1998c; Dutra *et al.*, 1998d) indicaram que *A. latifolia* é uma espécie com grande potencial para a produção de forragem.

Estudos para verificação de eficiência na utilização de fósforo e tolerância ao alumínio (Milan *et al.*, 1991; Scheffer-Basso *et al.*, 2000), indicaram que *A. latifolia* apresenta grande eficiência na utilização de fósforo e tolerância para as doses de alumínio testadas.

Outros estudos recentes, incluem ainda aspectos como efeitos do condicionamento osmótico no armazenamento de sementes (Franke *et al.*, 2001), efeitos da polinização entomófila na produção e rendimento de sementes (Camacho *et al.* 2002), análise de padrões de desenvolvimento floral (Moço & Mariath, 1999) e análise de diferentes profundidades de semeadura (Aguinaga *et al.*, 2002).

Bellaver *et al.* (1998), em sua análise de crescimento em estágio inicial de *Adesmia latifolia*, indicaram que, em relação às espécies estudadas, esta espécie possui grande potencial forrageiro devido ao conjunto de suas características, como por exemplo, hábito estolonífero, tamanho das folhas, quantidade de matéria seca produzida e o rápido estabelecimento após germinação.

2.2.4 *Adesmia punctata* (Poir.) DC var. *punctata*

Esta espécie, segundo Valls (1984), é bastante freqüente na serra geral no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, estendendo-se ao Uruguai e ao nordeste da Argentina. Segundo Araújo (1940), é conhecida pelo nome popular de babosinha e ainda que esta espécie fosse julgada como recusada pelo gado, devido à sua pilosidade e abundância de glândulas oleosas, o mesmo autor faz relatos de exemplares com evidentes sinais de terem sido pastejados.

Existem duas variedades: *A. punctata* var. *punctata* e *A. punctata* var. *hilariana*. Esta última ocorre em campos limpos e arbustivos, pedregosos, em afloramentos de rochas, em locais úmidos, em áreas de transição entre campo e mata, sendo mais amplamente distribuída que *A. punctata* var. *punctata* (Miotto, 1991).

Série *Subnudae*

As espécies pertencentes à série *Subnudae* são: *A. riograndensis* e *A. securigerifolia*.

2.2.5 *Adesmia riograndensis* Miotto

Adesmia riograndensis foi descrita como uma espécie nova do gênero, por Miotto (1993) e sua ocorrência até o momento, foi relatada somente no extremo sul do Brasil, no sudoeste do estado do Rio Grande do Sul. A autora sugere que, com a ampliação das coletas, *A. riograndensis* seja encontrada no Uruguai, nas regiões limítrofes com o Rio Grande do Sul.

Ocorre em ambientes de campo úmido na encosta de cerro; em morro rochoso, em vegetação rupícula, baixa, com colchão de musgos; em afloramentos de arenito (Miotto & Leitão Filho, 1993).

2.2.6 *Adesmia securigerifolia* Hert.

Adesmia securigerifolia ocorre no Brasil, no sudeste do Rio Grande do Sul próximo à fronteira com o Uruguai. Na Argentina na província de Entre Rios e no Uruguai (Miotto & Leitão Filho, 1993).

Esta é uma das espécies de *Adesmia*, que no Brasil, apresenta endemismo, ocorrendo somente nos campos secos de Bagé (Boldrini *et al.*, 2002).

Estudos da ontogenia da semente de *Adesmia securigerifolia*, realizados por Izaguirre (1994) e do modo de reprodução realizados por Tedesco *et al.* (2000) indicaram que esta espécie é de autofecundação.

Série *Muricatae*

A série *Muricatae* possui apenas uma única espécie: *A. muricata*

2.2.7 *Adesmia muricata* (Jacq.) DC.

Encontrada no litoral do Rio Grande do Sul, no Uruguai e na Argentina (Valls, 1984). Segundo Miotto & Leitão Filho (1993), esta espécie é característica das planícies pampeanas e serras da Argentina central e norte, ocorrendo em campos gramíneos a arbustivos; campos arbustivos perturbados, área de campo e matinha arbustiva; entre rochas no campo; campos pedregosos, pantanosos ou arenosos; dunas marítimas. Ocorre em altitudes entre 1300 a 1400m.

Série *Psoraleoides*

As espécies que pertencem à série *Psoraleoides* são: *A. araujoii*, *A. ciliata*, *A. psoraleoides*, *A. rocinhensis*, *A. sulina*, *A. tristis*, *A. reitziana*, *A. arillata*, *A. paranensis* e *A. vallsii*. As espécies da série, segundo Miotto & Leitão Filho (1993), são endêmicas do sul do Brasil.

2.2.8 *Adesmia araujoii* Burk.

Sua distribuição geográfica, segundo Miotto (1991), no Brasil, é nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Segundo Araújo (1940), *A. araujoii* é uma espécie que possui raízes grossas e lenhosas, adaptadas a terrenos com escassez de água durante alguns meses do ano. Em seu hábitat produz uma massa de forragem verde muito boa, principalmente durante os meses frios até fins da primavera.

2.2.9 *Adesmia ciliata* Vog.

Adesmia ciliata, segundo Miotto (1993), tem distribuição contínua nos Estados do sul do Brasil, uma vez que a espécie ocorre desde o centro do Rio Grande do Sul, distribuindo-se desde Santa Catarina até o estado do Paraná. É também freqüente na borda da Serra Geral e avançando daí para o oeste de Santa Catarina (Valls, 1984).

2.2.10 *Adesmia psoraleoides* Vog.

Segundo Miotto & Leitão Filho (1993) a distribuição de *Adesmia psoraleoides* é no norte e nordeste do estado do Rio Grande do Sul ocorrendo também nos estados de Santa Catarina e Paraná.

2.2.11 *Adesmia rocinhensis* Burk.

Adesmia rocinhensis é uma espécie de ocorrência muito rara e restrita. Apesar de ser encontrada nos três estados do sul do Brasil, ocorre sempre de forma localizada (Miotto & Leitão Filho, 1993). Ocorre no nordeste do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e no sul do Paraná. Segundo Valls (1984) esta é uma espécie próxima de *A. ciliata*, diferindo pelo número menor de folíolos por folha e ainda segundo Miotto & Leitão Filho (1993), esta espécie se distingue de *A. ciliata* principalmente pelo hábito e também pelo tamanho sempre maior dos folíolos.

2.2.12 *Adesmia sulina* Miotto

Espécie nova de *Adesmia* descrita por Miotto (1993), tem sua distribuição no noroeste do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e sul do Paraná. Segundo Miotto & Leitão Filho (1993) esta é uma espécie de distribuição bastante ampla quando comparada a *A. araujoii* e *A. vallsii*, que formam um grupo de espécies aparentemente, muito próximas entre si. No entanto, quando analisado um número maior de caracteres, verifica-se que as três são espécies distintas e bem delimitadas.

2.2.13 *Adesmia tristis* Vog.

Esta espécie, segundo Valls (1984), é bastante difundida em Lages (SC) e municípios vizinhos, aparentemente não alcançando a borda da Serra Geral, é também freqüente no Rio Grande do sul. Miotto & Leitão Filho (1993) descrevem esta espécie como sendo amplamente difundida nos três Estados do sul do Brasil.

A. tristis é a espécie que tem, junto com *A. ciliata*, a maior área de ocorrência no Brasil (Miotto & Leitão Filho, 1993).

2.2.14 *Adesmia reitziana* Burk.

Esta espécie destaca-se das demais pelo seu aspecto particular: caule sublenhoso, coberto de cicatrizes foliares aproximadas, proeminentes e restos das estípulas persistentes, folhas relativamente grandes, folíolos terminando em múcron alongado e racemos subcorimbiformes, contraídos, densifloros, apicais, inferiormente revestidos por folhas (Miotto & Leitão Filho, 1993).

A espécie *Adesmia reitziana*, até o momento, é considerada endêmica do Morro da Igreja, município de Urubuci, estado de Santa Catarina, no entanto segundo Valls (comunicação pessoal), já houve coletas em locais próximos como o Campo dos Padres. Valls (1984), citou ainda que o local de ocorrência conhecido é extremamente diminuto.

2.2.15 *Adesmia arillata* Miotto

Adesmia arillata foi também descrita por Miotto (1993), e a autora relatou que esta espécie foi encontrada nos estados de Santa Catarina e Paraná, em zonas de campos gramíneos e arbustivos, campos sobre afloramentos rochosos, áreas perturbadas, em transição de campo e mata, em altitudes que variam em 950 a 1190m.

2.2.16 *Adesmia paranensis* Burk.

Segundo Valls (1984), esta espécie difere de outras espécies da série *Psoraleoides* pelas partes vegetativas completamente glabras e inflorescências setulosas. Miotto & Leitão Filho (1993) descreveram *A. paranensis* como sendo de distribuição nos estados de Santa Catarina e Paraná, ocorrendo em campos gramíneos a subarbustivos ou com capões de

mata; campos secos ou brejosos; em vale raso, entre coxilhas; campos com afloramentos de rocha e áreas mal drenadas; barrancos dominados por caraguatás e gramíneas altas.

2.2.17 *Adesmia vallsii* Miotto

Adesmia vallsii foi descrita por Miotto (1993), tendo sua distribuição nos estados de Santa Catarina e sul do Paraná. Segundo Miotto & Leitão Filho (1993), esta espécie habita campos secos, graminosos, densos ou altos, sem pastejo e não queimados ou com touceiras altas de *Stipa* spp. e *Bromus* spp.; campos graminosos com estrato herbáceo diversificado; faixa de domínio com vegetação campestre secundária; em áreas de transição de campo e mata de pinheiros; campos com afloramentos de rocha.

3. Caracterização de germoplasma no gênero *Adesmia*

O Brasil situa-se, hoje, entre os países com maior variabilidade genética disponível para a pesquisa agrícola e correlata, mas o uso dessa variabilidade é ainda incipiente (Valls, 1988).

Uma das principais causas apontadas por Valls (1988), para o uso limitado dos acessos mantidos em bancos de germoplasma, é a falta de informação adequada sobre estes, com relação a diversos aspectos de caracterização de germoplasma, como identificação botânica e taxonômica, caracterização morfológica de caracteres botânicos de alta herdabilidade e caracterização do modo de reprodução.

A caracterização de germoplasma é de extrema importância para os programas de melhoramento genético. Além de proporcionar melhor conhecimento do germoplasma disponível, essencial para seu uso mais intenso

em etapas subseqüentes, a caracterização e avaliação bem conduzidas permitem a identificação de acessos duplicados em bancos, o estabelecimento de coleções nucleares representativas da diversidade genética reunida em uma espécie (Valls, 1988).

Os dados de diversidade genética, auxiliam na classificação, nos estudos de distância genética entre populações e ainda no estabelecimento de relações filogenéticas entre espécies (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Atualmente, as espécies do gênero *Adesmia*, estão sendo utilizadas em vários estudos de caracterização de germoplasma.

Com relação aos aspectos morfológicos, Tedesco (2000) realizou a avaliação de descritores do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das 17 espécies de *Adesmia*, verificando que a característica tamanho de folíolos em comprimento e largura apresenta alta variabilidade intraespecífica no gênero *Adesmia*. Outras características como o número de folíolos por folha apresentou baixa variabilidade intraespecífica, ocorrendo maior variação entre os indivíduos, dentro de cada acesso examinado.

Os aspectos sobre o modo de reprodução, número cromossômico e comportamento meiótico foram definidos, para diversas espécies, em estudos recentes. Segundo Tedesco *et al.* (1998 e 2000), as espécies de *Adesmia* apresentam variações com relação ao modo de reprodução, sendo que algumas espécies reproduzem-se por fecundação cruzada ou necessitam de estímulo de polinizador (*A. tristis*, *A. ciliata*, *A. psoraleoides*, *A. rocinhensis* e *A. sulina*), outras permitem tanto a fecundação cruzada quanto a autofecundação

(*A. bicolor*, *A. punctata* e *A. latifolia*) e outras espécies reproduzem-se por autofecundação (*A. securigerifolia*, *A. riograndensis* e *A. muricata*).

Com relação ao número cromossômico Miotto & Forni-Martins (1994), realizaram a contagem do número cromossômico em 11 espécies do gênero e indicaram que o número cromossômico para todas as espécies estudadas foi $2n=20$, sugerindo ainda um número básico $x=10$ para o gênero.

Coelho *et al.* (1998), realizaram a avaliação citogenética para algumas espécies de *Adesmia* (*A. latifolia*, *A. bicolor*, *A. incana* var. *incana* e *A. punctata* var. *hilariana*) e reportaram pela primeira vez para *A. latifolia* e *A. incana*, o número cromossômico de $2n=2x=20$, sendo que para as demais espécies estudadas os resultados obtidos concordaram com as contagens anteriores.

Os aspectos de comportamento meiótico ou fertilidade do pólen das 17 espécies foram também estudados por Tedesco *et al.* (2002). A autora indicou para as espécies estudadas (*A. araujoii*, *A. bicolor*, *A. incana*, *A. latifolia*, *A. psoraleoides*, *A. riograndensis*, *A. rocinhensis*, *A. securigerifolia*, *A. tristis* e *A. vallsii*) um comportamento meiótico regular e uma alta fertilidade de pólen, sugerindo que, se essas espécies forem incluídas em programas de melhoramento não ocorrerão problemas nos cruzamentos devido a irregularidades meióticas. No entanto, a autora ressaltou que do ponto de vista taxonômico, o número cromossômico e o comportamento meiótico não poderiam ser utilizados para se fazer uma distinção entre os taxa analisados. Esta afirmação concorda com Miotto & Forni-Martins (1994), que afirmam que a

constância do número cromossômico dificulta a utilização destes dados para uma interpretação evolutiva do gênero.

4. Marcador Molecular do tipo RAPD

Os marcadores moleculares, baseados na amplificação de seqüências polimórficas de DNA com a utilização de seqüências iniciadoras, têm sido amplamente utilizados em diversos estudos de caracterização da diversidade genética tanto para o estudo de populações naturais, quanto para obtenção de novas fontes de variabilidade em programas de melhoramento de espécies cultivadas. Estes marcadores apresentam inúmeras vantagens, destacando-se o fato de não serem influenciados pelo ambiente e serem independentes do estágio de desenvolvimento da planta.

Dentre os marcadores moleculares baseados em amplificação de seqüências no DNA (PCR), um dos mais utilizados atualmente é o RAPD. Esta técnica permite a avaliação da estrutura e da diversidade genética em populações naturais, populações melhoradas e germoplasma em bancos, além disso, permite a obtenção de “fingerprints” ou “impressões digitais” genômicas, de indivíduos, variedades e populações, podendo ainda ser utilizado para o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica de RAPD distingue-se das demais técnicas de PCR pelo fato de utilizar seqüências iniciadoras com 10 pares de bases de extensão, cuja seqüência nucleotídica é arbitrária, ao contrário das outras que requerem informações a respeito da seqüência do DNA alvo para o desenho de seqüências iniciadoras específicas (Williams *et al.*, 1990).

As principais vantagens do RAPD, com relação a outras técnicas, são a sua facilidade, rapidez, a necessidade de quantidades mínimas de DNA e principalmente a grande quantidade de polimorfismo gerado por um único marcador.

O polimorfismo do RAPD é de natureza dominante, ou seja, apenas são detectados os indivíduos homocigotos, uma vez que ao se observar uma banda RAPD em gel de agarose, não é possível distinguir se aquele segmento se originou a partir de uma ou duas cópias da seqüência amplificada. A natureza molecular do polimorfismo do RAPD ainda não é inteiramente conhecida. Entretanto, segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), evidências experimentais indicam que a diferença de apenas um par de bases (mutação de ponto) são suficientes para causar a não complementaridade da seqüência iniciadora com o sítio de iniciação, o que pode impedir a amplificação de um segmento.

Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação presentes no DNA alvo ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela em que a enzima DNA polimerase é capaz de percorrer e amplificar o segmento (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Deste modo, o polimorfismo RAPD é detectado somente pela presença de segmentos de DNA que são amplificados em alguns indivíduos e em outros não.

5. Caracterização da variabilidade genética com a utilização de RAPD

Diversos trabalhos têm sido publicados, com a utilização de marcador molecular do tipo RAPD, sobre a avaliação de polimorfismo nas mais diversas culturas e populações naturais (Michelmore *et al.*, 1991; Lanham *et al.*, 1992; Haley *et al.*, 1994; Thompson & Randall, 1998; Thompson *et al.*, 1998; Bartish *et al.*, 1999; Gauer & Cavalli-Molina, 2000; del Rio & Bamberg, 2000).

Em espécies forrageiras, diversos estudos vêm sendo conduzidos, tanto para a caracterização da variabilidade quanto para o estabelecimento de relações entre as diferentes espécies e cultivares. Em trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.), marcadores RAPD foram utilizados por Kongkiatngam *et al.* (1995), para a caracterização da variação genética em dois cultivares sendo observado um alto nível de diversidade dentro de cada cultivar e uma menor variação entre as diferentes cultivares.

Gustine *et al.* (2002) avaliaram a variação genética dos marcadores RAPD em coleções e cultivares de trevo-branco (*Trifolium repens*) e verificaram similaridades genéticas surpreendentes, segundo os autores, para as oito populações derivadas de diferentes regiões geográficas e climáticas. Segundo os autores, esta similaridade poderia indicar uma origem européia comum para os trevos brancos encontrados nas pastagens norte-americanas.

Esta mesma técnica foi também utilizada por Gustine & Sanderson (2001) para a obtenção de dados de variabilidade genética em populações de

trevo branco, sendo que foi verificado que a diversidade genética foi afetada pela variação espacial e temporal dos clones na população.

Mengoni *et al.*(2000) utilizaram dados de RAPD para verificar as relações genéticas entre populações de alfafa (*Medicago sativa*). Os autores verificaram que foi possível a identificação de indivíduos dentro da população e ainda foram encontrados valores altos de variação genética intrapopulacional e interpopulacional.

Outras espécies forrageiras como as pertencentes aos gêneros *Lathyrus*, *Stylosanthes* e *Poa* tiveram também inúmeros estudos com a utilização de marcadores moleculares do tipo RAPD publicados. Em *Lathyrus*, Chtourou-Ghorbel *et al.* (2002) caracterizaram a variação genética em cinco espécies e verificaram que a variação está proporcionalmente distribuída entre as espécies e foi ainda possível estabelecer grupos de maior similaridade entre as espécies estudadas.

Liu (1997) utilizou a técnica de RAPD para caracterizar acessos brasileiros, venezuelanos e colombianos de *Stylosanthes scabra*. Este estudo mostrou que a variação genética entre os acessos brasileiros foi muito menor do que aquelas entre os acessos venezuelanos e colombianos. Segundo o autor, isto sugere que, em comparação com os acessos brasileiros, a variação genética de *S. scabra* tanto nos acessos da Colômbia quanto nos da Venezuela é menos representada pelas pequenas coleções existentes.

Em *Poa pratensis*, Johnson *et al.* (2002) relataram que, com a utilização de RAPD e marcadores morfológicos, foi possível a caracterização da coleção de germoplasma da USDA (*United States Department of*

Agriculture) com 228 acessos de 26 diferentes países. Os autores verificaram que os grupos formados não foram associados fortemente com regiões particulares de origem, especialmente para os dados de RAPD. No entanto, os autores ressaltaram que a correlação entre os dados morfológicos e os de RAPD foi altamente significativa e indicaram ainda que, tanto os dados morfológicos quanto os de RAPD são importantes para acessar a variabilidade.

Não existem trabalhos com marcadores moleculares nas espécies do gênero *Adesmia*. A obtenção deste tipo de dado pode auxiliar no conhecimento da diversidade genética das populações das diferentes espécies do gênero e as informações obtidas poderiam ser relacionadas com os dados de modo de reprodução e distribuição geográfica que já estão disponíveis.

6. Material e Métodos

6.1 Material vegetal

As sementes dos acessos de *Adesmia* utilizados foram provenientes da coleção de Germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) EMBRAPA- Brasília e de coleções de trabalho de pesquisadores de Lages, Bagé e Passo Fundo e também sementes que foram multiplicadas em outros estudos e encontravam-se disponíveis no Laboratório de Citogenética e Eletroforese do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia (UFRGS). Alguns acessos foram coletados durante o período de realização deste trabalho e têm “voucher” disponível no herbário do Departamento de Botânica (ICN), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os acessos foram numerados de 01 a 44 e sua identificação encontra-se na TABELA 1.

Foram utilizados, sempre que possível, 15 indivíduos por acesso e foram analisados 29 acessos de diferentes espécies do gênero *Adesmia* e seis indivíduos da espécie *A. paranensis*. Em alguns acessos, não foi possível estabelecer 15 indivíduos para análise devido a problemas com a germinação das sementes. O número de indivíduos analisados em cada acesso encontra-se na TABELA 2. Para *A. paranensis*, foram utilizados folíolos de seis indivíduos provenientes de material de herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Somente para 13 das 17 espécies de *Adesmia* foi possível analisar mais de um acesso.

6.2 Preparo das Sementes

As sementes de cada acesso foram escarificadas manualmente com lixa fina, para superação de dormência. Após a escarificação, as sementes foram colocadas em placas de Petri esterilizadas e forradas com papel filtro umedecido com água destilada e então mantidas em câmara de germinação com temperatura constante de 25 °C , com 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

6.3 Semeadura em casa de vegetação

Após a germinação, as plântulas, com aproximadamente 3 cm, foram transferidas para copos plásticos com capacidade de 350ml e após 45 dias foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 3500g de solo seco e peneirado. Foi colocada uma planta por vaso com 15 repetições para cada acesso (FIGURA 1).



FIGURA 1 – Vasos instalados em casa de vegetação.

TABELA 1- Relação do material de *Adesmia* utilizado, seus respectivos coletores, códigos de acesso e local de coleta.

Código	Espécie	Coletor ¹	Código de Acesso ²	Local
01	<i>A araujoi</i>	V10730	BRA-000817	Soledade- RS
02	<i>A. araujoi</i>	n	BRA-	Capingui-RS
05	<i>A bicolor</i>	D. Real 559		Uruguai
07	<i>A. bicolor</i>	n	BRA-	Bagé-RS
08	<i>A. ciliata</i>	STS 1966	BRA-	São José dos Ausentes -RS
10	<i>A. ciliata</i>	STS 1968	BRA-	São Francisco de Paula- RS
11	<i>A incana</i>	V 9636	BRA-000604	Santana do Livramento-RS
12	<i>A incana</i>	Ds/nº	BRA-	Caçapava do Sul-RS
14	<i>A latifolia</i>	Te 003	BRA-001538	Mariluz - RS
16	<i>A latifolia</i>	ZM 1777	BRA-001422	Tramandaí -RS
18	<i>A muricata</i>	V 10289	BRA-001058	Caçapava do Sul - RS
19	<i>A muricata</i>	V9570	BRA-000485	Canguçu-RS
20	<i>A. arillata</i>	V 11318	BRA-000825	Guarapuava -SC
21	<i>A. arillata</i>	V11426	BRA-000868	Abelardo Luz- SC
22	<i>A psoraleoides</i>	V 8003	BRA-	
23	<i>A psoraleoides</i>	EEL 57	BRA-001562	Lages-SC
24	<i>A. punctata</i>	V6885	BRA-001104	Vacaria-RS
25	<i>A. punctata</i>	V10812	BRA-001112	Vacaria-RS
26	<i>A riograndensis</i>	V9590	BRA-000761	Santana da Boa Vista-RS
27	<i>A riograndensis</i>	n	BRA-	Lages-SC
28	<i>A rocinhensis</i>	V10805	BRA-001155	Bom Jesus-RS
29	<i>A rocinhensis</i>	V 11507	BRA-001163	Palmas-PR
31	<i>A securigerifolia</i>	V 10283	BRA-001180	Dom Pedrito-RS
33	<i>A. sulina</i>	V11316	BRA-	Guarapuava-SC
34	<i>A. tristis</i>	STS 1969	BRA-	São Francisco de Paula-RS
35	<i>A tristis</i>	KM 14,3	BRA-	São Joaquim-SC
37	<i>A securigerifolia</i>	V 6978	BRA-000060	Bagé-RS
42	<i>A. vallsii</i>	V11439	BRA-001368	Palmas-PR
43	<i>A. reitziana</i>	Ds/nº	BRA-	Urubici-SC
44.1	<i>A. paranensis</i>	V11246	ICN 92975	Castro –PR
44.2	<i>A. paranensis</i>	V10607	ICN 92976	Água Doce –PR
44.3	<i>A. paranensis</i>	V12864	ICN 98854	Santiago-RS
44.4	<i>A. paranensis</i>	STS 1605	ICN 120448	Palmeira –PR
44.5	<i>A. paranensis</i>	V11485	ICN 98474	Água Doce –PR
44.6	<i>A. paranensis</i>	ZM 1236	ICN 92974	São Francisco de Assis-RS

¹ V= José Francisco Montenegro Valls, STS= Silvia Miotto, DReal= Daniel Real, D= Miguel Dall' Agnol, Te= Solange Tedesco, ZM=L.A. Zago Machado, n= acessos sem identificação do coletor, EEL= Estação Experimental de Lages/SC. BRA² = código de acesso do CENARGEN, ICN= número de exsicata do herbário do ICN.

TABELA 2 – Número de indivíduos por acesso de *Adesmia*

Acesso	Número de Indivíduos analisados
01	10
02	15
05	15
07	09
08	15
10	15
11	07
12	11
14	15
16	15
18	12
19	15
20	13
21	07
22	13
23	13
24	05
25	04
26	15
27	14
28	05
29	11
31	15
33	10
34	14
35	15
37	15
42	13
43	15
44	06

6.4 Coleta de material e extração de DNA

De cada planta, foram coletados folíolos jovens num total de 100mg de tecido e sempre que possível, imediatamente processados para extração de DNA. Quando não foi possível realizar imediatamente a extração, as amostras foram estocadas em freezer para posterior utilização.

Inicialmente foram testados alguns protocolos de extração de DNA (Guidet, 1994; Steiner *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1993; Doyle & Doyle, 1987) utilizados para diversas espécies de plantas, para realizar a escolha do protocolo ideal para extração de DNA de *Adesmia*, uma vez foi observada a presença de contaminantes que, segundo Fang *et al.*(1992), podem interferir na reação de RAPD diminuindo ou até mesmo inibindo a ação da enzima DNA polimerase. No presente trabalho, o protocolo utilizado para extração de DNA foi o de Doyle & Doyle (1987), com modificações.

Juntamente com a análise do DNA de cada indivíduo, foi realizada a análise do DNA dos indivíduos de cada acesso misturados em proporções iguais (*bulk*) para a verificação da robustez e reprodutibilidade dos fragmentos gerados com a utilização de cada *primer* ou seqüência iniciadora. Os indivíduos tiveram o DNA extraído e foram misturados em proporções iguais e estes *bulks* foram submetidos à análise.

6.5 Quantificação de DNA

Para o controle da qualidade e estimativa da concentração do DNA, após a extração, foi realizada a quantificação com a utilização de espectrofotômetro Espectronic Gênese 2. Para a quantificação, foi realizada uma diluição de 5 µl da solução de DNA extraído, em 495 µl de água MilliQ

realizando-se medições nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, para a determinação da concentração e pureza respectivamente de DNA e proteína.

A proporção destas duas medições (OD260/OD280) indica a qualidade do DNA. Após a verificação da pureza e concentração, as amostras de DNA foram padronizadas em 3 concentrações de 200ng/μl, 100ng/μl e 50ng/μl. Foram montadas soluções de trabalho de cada uma na concentração final de 3ng/μl.

6.6 Reação de Amplificação de DNA

Para a reação de PCR foi utilizado o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1996), com modificações. Os componentes para reação consistiram em 5,0 μl da solução de DNA (15 ng/μl), 1,30 μl de tampão PCR 10x, 0,39 μl de MgCl₂ (50mM), 1,8 μl de *primer* (5 ng/μl), 0,20 μl de Taq DNA polimerase (5U/μl) e 0,26 μl de 10 mM dNTP mix contendo os quatro nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), cada um numa concentração de 2,5 mM. O volume final dos tubos de reação foi completado para 10 μl com água MilliQ autoclavada.

As seqüências de DNA de cada indivíduo de cada acesso e dos *bulk* dos acessos foram amplificadas em termocicladores PTC-100 (Programmable Thermal Controller MJ Research, INC.) com os diferentes *primers* (TABELA 3), do Kit OPA de 20 *primers* da Empresa Operon Technologies (Alameda, CA).

Cada ciclo de amplificação foi composto de 1 minuto a 93°C para desnaturação, 1 minuto a 36°C para anelamento do iniciador com o DNA e 2 minutos a 72°C para extensão do fragmento. Este processo compreendeu 40 ciclos no total e ao final do 40º ciclo, um ciclo de 5 minutos à 72°C foi realizado

para completar a reação. Por fim, a temperatura foi estabilizada em 4°C por tempo indefinido. Foram testados 20 *primers*, que foram utilizados para os estudos de caracterização e avaliação da diversidade das 17 espécies de *Adesmia* estudadas tanto nos indivíduos, quanto nos *bulks* de cada acesso.

TABELA 3 - Relação dos *primers* utilizados para estudo de caracterização de acessos de *Adesmia* DC.

<i>Primer</i>	Sequencia
<i>Primer</i> OPA-01	5' –CAGGCCTTC – 3'
<i>Primer</i> OPA-02	5' –TGCCGAGCTG – 3'
<i>Primer</i> OPA-03	5' –AGTCAGCCAC – 3'
<i>Primer</i> OPA-04	5' –AATCGGGCTG – 3'
<i>Primer</i> OPA-05	5' –AGGGGTCTTG – 3'
<i>Primer</i> OPA-06	5' –GGTCCCTGAC– 3'
<i>Primer</i> OPA-07	5' – GAAACGGGTG– 3'
<i>Primer</i> OPA-08	5' –GTGACGTAGG – 3'
<i>Primer</i> OPA-09	5' –GGGTAACGCC – 3'
<i>Primer</i> OPA-10	5' – GTGATCGCAG– 3'
<i>Primer</i> OPA-11	5' – CAATCGCCGT– 3'
<i>Primer</i> OPA-12	5' –TCGGCGGATAG – 3'
<i>Primer</i> OPA-13	5' – CAGCACCCAC – 3'
<i>Primer</i> OPA-14	5' –TCTGTGCTGG– 3'
<i>Primer</i> OPA-15	5' –TTCCGAACCC – 3'
<i>Primer</i> OPA-16	5' – AGCCAGCGAA– 3'
<i>Primer</i> OPA-17	5' – GACCGCTTGT– 3'
<i>Primer</i> OPA-18	5' –AGGTGACCGT – 3'
<i>Primer</i> OPA-19	5' – CAAACGTCCG– 3'
<i>Primer</i> OPA-20	5' – GTTGCGATCC– 3'

6.7 Visualização dos fragmentos gerados

As seqüências amplificadas de DNA foram separadas em gel de agarose 1,5 %, submetido a uma tensão elétrica de 100 Volts, em tampão TBE 1x (Tris, Ácido bórico, EDTA e água) padronizando-se a corrida de cada gel em 10cm a partir do ponto de aplicação. Os géis foram corados em Brometo de Etídio (0.15µl/ml) e fotografados sob iluminação UV. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados com a utilização do programa Kodak EDAS 290 (Electrophoresis Documentation and Analysis System) comparando-se com o padrão de 100 pares de base (Gibco BRL).

6.8 Análise dos Dados de RAPD

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

O coeficiente para cálculo de similaridade utilizado para a análise dos indivíduos e dos diferentes acessos da mesma espécie de *Adesmia* foi o de Jaccard e o coeficiente de similaridade utilizado para a análise das diferentes espécies de *Adesmia* foi o de Dice. Com os dados de similaridade foi realizada a análise de agrupamento (módulo SAHN do NTSYS), utilizando o método da média das distâncias (UPGMA- *Unweighted Pair-Group Method using an Arithmetic Average*), e construção dos dendrogramas com o auxílio do programa computacional "*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*" NTSYSpc versão 2.1 (Rohlf, 2001).

Para a verificação da consistência dos dendrogramas gerados a partir de cada matriz de similaridade de *bulk* e das espécies, foi gerada a partir

do módulo COPH do programa NTSYS, uma matriz cofenética. Foi também realizado o cálculo do coeficiente de correlação entre a matriz original de similaridade e a matriz de distância cofenética usando o módulo MXCOMP do programa que verifica de maneira subjetiva a consistência dos agrupamentos gerados nos dendrogramas (Johnson *et al.* 2002).

7. Resultados e Discussão

Para a verificação dos dados de similaridade genética, foram realizadas análises intrapopulacionais, ou seja, dentro de cada acesso de cada espécie de *Adesmia*; análises intraespecíficas realizadas entre os acessos de cada espécie; e análises interespecíficas com avaliações do conjunto dos acessos das 17 espécies. Para a análise em conjunto dos acessos de cada espécie, os genótipos foram reunidos e verificaram-se as bandas de ocorrência mútua para os acessos.

A análise em *bulk* de cada acesso foi também realizada para verificar as relações de diversidade entre as espécies e foi utilizada também para verificar a robustez e reprodutibilidade das bandas. Para a comparação dos dados de indivíduos analisados separadamente e dos *bulks*, foi realizada uma análise intraespecífica comparando os *bulks* de cada acesso e uma análise interespecífica com avaliações de todos os *bulks*. Para tanto, foram utilizados em todas as análises os fragmentos que apresentaram polimorfismo e aqueles que não apresentaram polimorfismo ou monomórficos.

Os resultados obtidos a partir dos estudos realizados com as 17 espécies brasileiras de *Adesmia* serão apresentados em cinco itens: análise individual dos acessos, análise comparativa entre os acessos de cada espécie, avaliação comparativa dos *bulk* dos acessos de cada espécie e análise do conjunto dos acessos individuais e análise dos *bulk* das 17 espécies de *Adesmia*.

7.1 Análise individual dos acessos

Os resultados obtidos na análise individual de cada acesso das 17 espécies de *Adesmia* encontram-se na TABELA 4. Observando-se os resultados, verifica-se que para os 30 acessos analisados houve uma variação na similaridade genética média intrapopulacional de 0,28 a 0,80 (Índice de Jaccard). O número de *primers* utilizados na análise intrapopulacional foi, de um modo geral, alto variando de 07 a 20 bem como o número de bandas analisadas que variou de 20 a 102.

Nos dendrogramas gerados a partir dos dados de similaridade genética (FIGURAS 2 a 18), a formação dos grupos, tomando a similaridade genética média como ponto de corte, ocorreu a partir de valores de similaridade média acima de 0,50. Os dados de similaridade genética estão apresentados nos apêndices (1 a 42).

Nos indivíduos de *A. paranensis* (Figura 18) o valor de similaridade média entre os seis genótipos testados foi de 0,28. O menor valor de similaridade genética média ocorreu no material proveniente de exsicatas de herbário, sendo que os seis genótipos testados foram coletados em locais distintos (TABELA 1). Considerou-se nesse caso, cada indivíduo da espécie como um acesso.

Em algumas espécies, nos dendrogramas, houve a formação de grupos de indivíduos que se mantiveram na análise comparativa entre os acessos da espécie. Um exemplo disto foi *A. araujo* (acesso nº 01) em que a similaridade média entre os 10 genótipos avaliados foi de 0,56 para todos os possíveis pares de genótipos e no dendrograma, baseado nos valores de

similaridade genética, os genótipos separaram-se em dois grupos distintos, utilizando a similaridade genética média entre todos os possíveis pares como ponto de corte (FIGURA 2). Os genótipos (1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.9) formaram um grupo (G1) e os genótipos (1.6, 1.7, 1.8, 1.10) outro grupo (G2). O grupo 1 (G1) manteve-se no dendrograma obtido na análise comparativa dos acessos (FIGURA 20).

7.2 Análise em conjunto dos acessos de cada espécie

A análise do conjunto dos acessos foi realizada em 13 das 17 espécies de *Adesmia*, somente para aquelas em que foi possível estabelecer dois acessos para comparação. Os resultados para a análise em conjunto dos acessos estão nas TABELAS 5 e 6 e nas FIGURAS 19 a 31. O número de *primers* analisados variou de 05 a 20, o número de bandas analisadas de 11 a 44 e a similaridade média entre os acessos variou de 0,19 a 0,89.

De um modo geral, os resultados obtidos para a partição da variabilidade na análise comparativa da similaridade genética entre os acessos das diferentes espécies de *Adesmia*, concordaram com aqueles esperados conforme o modo de reprodução de cada espécie. Segundo Stoskopf *et al.* (1993) o modo de reprodução leva a distintos atributos em plantas e em populações. Nas plantas a repetida autofecundação resulta em plantas homozigotas, assim como a fecundação cruzada geralmente resulta em plantas heterozigotas.

Na partição da variabilidade para as populações, as populações de espécies alógamas são caracterizadas pela grande heterogeneidade, sendo

que cada indivíduo na população é altamente heterozigótico e distinto dos demais. As espécies alógamas são consideradas mais flexíveis, por gradativamente otimizarem sua frequência gênica para o ambiente onde são cultivadas (Bórem, 1997).

Já as populações de espécies autógamas, segundo Pinto (1995), apresentam variabilidade intrapopulacional menor, quando comparadas com as alógamas. A variabilidade interpopulacional, segundo Pinto (1995), compreende o conjunto de diferenças genéticas entre plantas de duas ou mais populações distintas. Para as espécies autógamas a variabilidade interpopulacional é maior do que para as espécies alógamas, ou seja, as populações são mais distintas uma vez que as espécies autógamas são mais adaptadas ao ambiente existente, imediato, já que a ausência de dominância (pela ausência de heterozigose) tende a otimizar o desempenho das plantas em ambientes específicos (Pinto, 1995).

Tedesco *et al.* (1998,2000) estudaram o modo de reprodução de 16 das 17 espécies brasileiras de *Adesmia* utilizando três tratamentos (T1-polinização mútua, T2-estímulo mecânico e T3-controle) para seis espécies (*A. bicolor*, *A. incana*, *A. muricata*, *A. punctata*, *A. riograndensis* e *A. tristis*) e observando o florescimento e frutificação de outras nove espécies (*A. araujoi*, *A. arillata*, *A. ciliata*, *A. psoraleoides*, *A. securigerifolia*, *A. sulina*, *A. reitziana*, *A. rocinhensis* e *A. vallsii*) que foram mantidas isoladas de polinizadores em casa de vegetação. Seus resultados estão sintetizados na TABELA 7.

A análise comparativa dos acessos, indica que de um modo geral aquelas espécies que foram sugeridas como possíveis alógamas por Tedesco

et al. (2000), tiveram valores de similaridade genética menores dentro das populações e valores de similaridade genética maiores entre as populações comparadas, concordando com o modo de reprodução alógamo. Como por exemplo em *A. araujo* em que a similaridade intrapopulacional foi de 0,56 para o acesso nº 01 e de 0,35 para o acesso nº 02. Na análise interpopulacional o valor de similaridade foi de 0,75 (TABELA 6). Em estudo de Análise de Variância Molecular (AMOVA) realizado por Gustine *et al.* (2002) em trevo-branco (*Trifolium repens*) uma espécie alógama, os autores encontraram valores de variância genética altos dentro das populações (variando de 88 a 100%) e baixa variância genética entre pares de populações (variando de 0 a 12%). Para alfafa (*Medicago sativa*), outra espécie alógama muito estudada, Mengoni *et al.* (2000) também encontraram valores de diversidade genética altos dentro das populações.

Para *A. ciliata*, Tedesco *et al.* (2000) indicaram que, como não foi observada autofecundação espontânea, esta espécie poderia ser alógama obrigatória ou necessitaria de estímulo para autofecundação. Os dados de similaridade genética obtidos para *A. ciliata*, sugerem que para os acessos estudados, a distribuição da variabilidade genética está de acordo com aquela encontrada em espécies autógamas, onde a similaridade intrapopulacional é maior do que a interpopulacional.

Espécie	Modo de Reprodução
A. ARAUJOI	Alogamia ou necessidade de estímulo para autofecundação
A. ARILLATA	Alogamia ou necessidade de estímulo para autofecundação
A. BICOLOR	Alogamia preferencial e Autogamia
<i>A. ciliata</i>	Alogamia ou necessidade de estímulo para autofecundação
A. INCANA	Autogamia e alogamia
<i>A. latifolia</i>	Autogamia e alogamia
A. MURICATA	Alogamia preferencial
<i>A. paranensis</i>	–
<i>A. psoraleoides</i>	Alogamia ou necessidade de estímulo para autofecundação
A. PUNCTATA	Autogamia e alogamia
<i>A. reitziana</i>	Alogamia ou necessidade de estímulo para autofecundação
A. RIOGRANDENSIS	Autogamia preferencial e alogamia
<i>A. rocinhensis</i>	Alogamia ou necessidade de estímulo para autofecundação
A. SECURIGERIFOLIA	Autogamia
<i>A. sulina</i>	Alogamia ou necessidade de estímulo para autofecundação
<i>A. vallsii</i>	Alogamia ou necessidade de estímulo para autofecundação
A. TRISTIS	Alogamia preferencial e autogamia

Tabela 7- Modo de reprodução das espécies de *Adesmia* adaptado de Tedesco *et al.* (2000)

Para *A. incana*, os mesmos autores indicaram que apesar de não haver formação de frutos nos tratamentos 1 (polinização mútua) e 3 (controle), a hipótese de que esta espécie seja de autofecundação e que necessita de estímulo mecânico não pôde ser assumida e não descartaram a possibilidade de ocorrer fecundação cruzada. Deste modo o modo de reprodução de *A. incana* não pôde ser indicado com precisão.

Os dados de similaridade genética, obtidos para os acessos de *A. incana* mostraram uma similaridade de 0,82 entre os acessos, sugerindo que esta espécie poderia ser de fecundação cruzada. O dendrograma gerado para a comparação dos dois acessos demonstra que a maioria dos indivíduos formou um grupo com alta similaridade genética (0,76) entre os genótipos (FIGURA 22).

Os dados obtidos para *A. muricata* demonstram uma alta similaridade intrapopulacional e uma baixa similaridade (0,38) entre os acessos analisados sugerindo que esta espécie seria de autofecundação. No estudo de Tedesco *et al.* (2000) foi sugerido que esta espécie seria de fecundação cruzada preferencial, no entanto o fato de não ter havido emasculação, não descarta a possibilidade de alguns frutos terem sido formados por autofecundação.

Em *A. rocinhensis* os dados de similaridade entre os acessos sugerem uma alta similaridade e um modo de reprodução alógamo concordando com os resultados obtidos por Tedesco *et al.* (2000) que indicou a alogamia como uma das possibilidades para *A. rocinhensis*.

Os dados de similaridades obtidos em *A. tristis*, demonstram uma baixa similaridade entre os indivíduos das diferentes populações, o que sugere autogamia. Esse resultado, contrasta com o obtido por Tedesco *et al.* (2000) que indicaram que *A. tristis* seria uma espécie de fecundação cruzada preferencial. No entanto, o número de *primers* (05) e bandas (11) que foram analisados foram os mais baixos entre todos os acessos (TABELA 5).

Para as espécies *A. securigerifolia* e *A. riograndensis* os dados obtidos, concordam com os de Tedesco *et al.* (2000) e mostraram uma baixa similaridade entre as diferentes populações de cada espécie, o que sugere que estas espécies seriam de autofecundação. Os resultados obtidos concordaram através dos dados de similaridade genética concordaram, de um modo geral, com os modos de reprodução sugeridos para as espécies de *Adesmia*. No entanto, cabe ressaltar que diversos fatores, como a seleção natural, e a migração, influenciam no modo de reprodução e diversidade genética das espécies.

No gênero *Lathyrus*, que compreende muitas espécies autógamias, Chtourou-Ghorbel *et al.* (2002) em estudo realizado em cinco espécies do gênero, encontraram valores de distância genética interpopulacional que variaram de 0,138 a 0,774 e que foram maiores do que os valores de distância intrapopulacional que variaram 0,01 a 0,141. De modo semelhante, os valores

de similaridade interpopulacionais obtidos neste estudo para as espécies consideradas como autógamias variaram de 0,31 a 0,47 e foram menores do que os de similaridade intrapopulacionais que variaram de 0,58 a 0,75.

Em estudos de diversidade genética, o modo de reprodução é um fator determinante para a explicação da variação genética intrapopulacional (Bartish, *et al.* 1999).

Em *A. araujo* na análise em conjunto dos acessos a similaridade média entre os dois acessos foi de 0,75 (TABELA 5).

O dendrograma gerado através dos dados de similaridade (FIGURA 19), demonstrou que os 25 genótipos de *A. araujo* analisados, apesar de terem um valor de similaridade maior do que os acessos individuais, ainda são divididos em dois grupos. Nota-se que os genótipos (1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.9), continuam agrupados a exemplo do que ocorreu na análise individual dos acessos. O agrupamento dos genótipos (1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.9), tanto na análise intrapopulacional quanto na análise interpopulacional pode indicar que estes indivíduos são geneticamente mais similares, para os padrões de RAPD testados, do que o restante dos indivíduos analisados de *A. araujo*.

Os valores dos coeficientes de correlação entre a matriz cofenética e a matriz de similaridade genética (TABELA 5) demonstraram que, de um modo geral, os dendrogramas gerados para cada análise comparativa dos acessos das 17 espécies foram consistentes e foram representativos das matrizes de similaridade genética. A exceção ocorreu na avaliação comparativa entre os acessos de *A. arillata* e *A. psoraleoides* que tiveram valores de correlação

abaixo de 0,70 que é considerado por Rohlf (2001) como sendo indicativo de correlação entre as matrizes de similaridade e cofenética.

7.3 Avaliação comparativa dos “bulks” dos acessos de cada espécie

Os resultados das análises comparativas dos *bulk* dos acessos de cada espécie encontram-se na TABELA 8.

De um modo geral, os valores de similaridade média interpopulacional entre os acessos analisados em *bulk*, foram menores dos que aqueles obtidos na comparação dos indivíduos de cada acesso. Como por exemplo, em *A. araujoi* em que a similaridade média entre os acessos individuais foi de 0,75 e nos acessos analisados em *bulk* a similaridade média foi de 0,13 (TABELA 8).

Houve também, de um modo geral, uma redução no número de *primers* analisados e bandas amplificadas nos *bulk*. No entanto, apesar da redução do número de bandas nos *bulk*, em geral houve uma boa reprodutibilidade de fragmentos mais robustos que também foram encontrados na análise individual dos acessos. Um exemplo disto, ocorreu no acessos 11 e 12 de *A. incana* onde uma banda de 900pb, amplificada em ambos os acessos com a utilização do *primer* OPA04, ocorreu também na análise em *bulk* de ambos os acessos para o mesmo *primer*.

Michelmore *et al.* (1991) examinaram o limite de detecção de bandas específicas, em amostra de DNA em *bulk* preparando misturas de DNA que continham ou não o fragmento de interesse. Os autores indicaram que estes

fragmentos específicos tornaram-se não confiáveis ou não foram detectados quando se reduziu a concentração em aproximadamente 30% e indicaram ainda que alelos raros não são detectados na análise, quando estes compreendem menos de 4% da mistura.

Este comportamento dos *bulks*, também foi demonstrado por Sweeney & Danneberger (1994), em trabalho realizado comparando a análise individual e em *bulk* de cultivares de azevém (*Lolium perene*). Segundo os autores, os produtos amplificados nos *bulks* não foram simplesmente a soma dos produtos amplificados nos indivíduos e não refletiram toda a diversidade dentro e entre os cultivares. No mesmo estudo, os autores indicaram ainda a necessidade de utilizar análises individuais para avaliar com precisão a diversidade de cultivares sintéticos ou populações heterogêneas.

A análise em *bulk* (14 indivíduos) de cultivares de *Brassica napus* (Dulson *et al.*, 1998), revelou fragmentos que não foram reproduzidos em amostras duplicadas do mesmo *bulk*. Os autores indicaram que provavelmente estes fragmentos não estavam presentes em número suficiente de indivíduos, para serem amplificados com consistência e sugeriram que o ideal para esta análise seria utilizar mais indivíduos nos *bulks* (20 indivíduos) e *bulks* duplicados.

Os motivos que levariam a estas diferenças encontradas na análise individual e em *bulk*, foram levantados por diversos autores (Michelmore *et al.* 1991, Sweeney & Danneberger, 1994, Halldén *et al.* 1996, Dulson *et al.* 1998 e Perez *et al.* 1998) e um motivo geralmente levantado é que o número de sítios para amplificação disponíveis por reação varia tanto com a seqüência do

primer utilizado, quanto com a amostra de DNA utilizada. Isto geraria uma competição entre os sítios para amplificação, uma vez que pode alterar as chances de anelamento de qualquer sítio com o *primer* e a abundância do fragmento amplificado resultante. Em *A. tristis* a similaridade média encontrada na análise em *bulk* foi de 0,26 (Índice de Jaccard) (TABELA 8) que foi maior do que o valor encontrado na análise comparativa dos acessos da espécie 0,19 (Índice de Jaccard) (TABELA 5). Esta diferença encontrada entre os valores pode ser atribuída a diferença no número de *primers* e bandas analisadas uma vez que na análise em *bulk* foram analisados 11 *primers* e 38 bandas e na análise comparativa dos acessos foram 05 *primer* e 11 fragmentos gerados. No entanto, na análise individual e comparativa dos acessos houveram diversos problemas na amplificação dos indivíduos dessa espécie e muitas informações foram perdidas. Esses resultados indicam que para *A. tristis* os padrões RAPD deverão ser novamente verificados utilizando-se mais populações e indivíduos por acesso.

TABELA 8 – Análise comparativa dos *bulks* dos acessos.

Espécie	Acessos comparados	Nº de <i>primers</i> analisados	Nº de bandas analisadas	Similaridade média entre os acessos (Índice de Jaccard)
A.ARAUJOI	B01 e B02	08	23	0,13
A. BICOLOR	B05 e B07	11	31	0,19
A CILIATA	B08 e B10	10	27	0,07
<i>A. incana</i>	B11 e B12	8	27	0,19
A. LATIFOLIA	B14 e B16	13	50	0,16
<i>A. muricata</i>	B18 e B19	16	51	0,08
A. ARILLATA	B20 e B21	10	32	0,16
<i>A. psoraleoides</i>	B22 e B23	10	37	0,11
<i>A. punctata</i>	B24 e B25	12	35	0,03

A. RIOGRANDENSIS	B26 e B27	12	50	0,08
<i>A. rocinhensis</i>	B28 e B29	09	35	0,14
A. TRISTIS	B34 e B35	11	38	0,26
<i>A. securigerifolia</i>	B31 e B37	11	37	0,00

7.4 Análise do conjunto dos “bulks” dos acessos das diferentes espécies

Para a análise do conjunto dos *bulks* dos acessos das diferentes espécies de *Adesmia*, foram utilizados 19 *primers* e um total de 92 fragmentos avaliáveis. A similaridade genética média entre os *bulk* das 17 espécies foi de 0,20 (índice de Dice) e coeficiente de correlação foi de 0,63. O dendrograma gerado demonstra que a formação dos grupos, tomando como ponto de corte a similaridade genética média, ocorreu nos valores de similaridade baixos (0,10) (FIGURA 32). O coeficiente de correlação $r = 0,63$ indicou que o dendrograma não representa satisfatoriamente a matriz de distâncias genéticas. Portanto, os grupos formados não foram consistentes pelos baixos valores de similaridade e por não agruparem nem mesmo os acessos pertencentes à mesma espécie.

7.5 Análise do conjunto dos acessos individuais

Para as análises entre as diferentes espécies de *Adesmia* o índice escolhido foi o de Dice. A escolha de diferentes coeficientes foi devido aos diferentes objetivos propostos na pesquisa uma vez que o coeficiente de Jaccard não atribui importância às ausências (0) compartilhadas e presta-se melhor para comparar populações dentro da mesma espécie, enquanto que o coeficiente de Dice apesar de também desconsiderar às ausências compartilhadas, atribui maior importância à concordância positiva. Deste modo,

o coeficiente de Dice, presta-se melhor para comparar itens diversos como diferentes espécies, em que a probabilidade de ocorrência de bandas comuns é menor (Alfenas, 1998).

Para a análise foram utilizados 20 *primers* e um total de 147 fragmentos. Os resultados obtidos na análise dos acessos individuais das 17 espécies de *Adesmia* indicaram uma similaridade média entre as espécies de 0,56 (índice de Dice) com valores variando de 0,19 a 1,00. Os *primers* utilizados foram eficientes para separar todas as espécies e diferentes acessos da mesma espécie. No entanto, a utilização de dados faltantes podem levar a problemas na análise dos agrupamentos.

O dendrograma, baseado nos valores de similaridade genética, separou os acessos em oito grupos distintos, utilizando a similaridade média entre todos os possíveis pares como ponto de corte (FIGURA 33).

O grupo 1 (G1) foi formado pelos acessos (01, 11,12, 14, 16, 24, 28, 29, 02, 08, 10, 27 e 18), o grupo 2 (G2) foi formado pelos acessos (22, 26, 23 e 33), o grupo 3 (G3) foi formado pelos acessos (05 e 07), o grupo 4 (G4) pelos acessos (20, 21, 25), o grupo 5 (G5) pelos acessos (19, 34 e 35), o grupo 6 (G6) pelos acessos (31 e 37), o grupo 7 (G7) pelos acessos (42 e 43) e o grupo 8 (G8) pelo acesso 44.

De um modo geral, os grupos formados incluíram os acessos individuais de cada espécie e agruparam as espécies nas quatro categorias infragenéricas propostas por Miotto & Leitão Filho (1993). Dentro dos grupos, no entanto, as séries foram misturadas. No G1 que foi o que mais incluiu grupos, estão reunidas espécies das séries *Psoraleoides*, *Bicolores*, *Muricatae*

e *Subnudae*. No entanto, outros grupos incluíram somente espécies pertencentes à mesma série (G3, G5, G6, G7) e ainda grupos que incluíram somente uma espécie (G8).

Para todas as espécies, a formação de grupos ocorreu a partir do valor de similaridade de 0,30 (índice de Dice) e, entre as espécies pode ser verificado que algumas agruparam com maiores valores de similaridade como em *A. incana* e *A. latifolia* 0,75 (índice de Dice), *A. vallsii* e *A. reitziana* que agruparam com índice 0,56 de similaridade genética e *A. psoraleoides* e *A. sulina* com 0,65 de similaridade genética.

Os outros grupos, em geral, continham somente os dois acessos da mesma espécie ou acessos que ficaram em grupos separados o que não permitiu estabelecer a proximidade entre este com uma espécie ou outra. O valor de correlação entre a matriz de similaridade e a matriz cofenética foi de 0,83 o que indica que o agrupamento representou de forma consistente a matriz original de distâncias genéticas.

No entanto, não foi possível estabelecer relações entre as espécies que sejam sustentadas por dados morfológicos, uma vez que em muitos grupos estavam relacionadas espécies que pertenciam a séries diferentes. Muitas indicações de similaridade morfológicas descritas por Miotto & Leitão-Filho (1993) não foram demonstradas no dendrograma. Miotto & Leitão-Filho (1993) indicaram que algumas espécies como *A. arillata* e *A. ciliata* apresentam similaridade morfológica, diferindo em algumas características e na sua distribuição, o que não foi demonstrado no dendrograma, uma vez que as duas

espécies ficaram distantes, indicando que não houve relação entre a similaridade morfológica e genética.

A técnica de RAPD e o método de agrupamento UPGMA já foram utilizados para verificar as relações genéticas entre diversos gêneros e espécies (Crochemore *et al.* 1998, Buso *et al.* 1998, Bartish *et al.* 1999, Mengoni *et al.* 2000, Geraci *et al.* 2001, Chtourou-Ghorbel *et al.* 2002). No entanto, diversos autores têm sugerido cautela na interpretação de resultados na análise filogenética utilizando a técnica de RAPD. Gillies & Abbott (1998) avaliaram a técnica de RAPD para a identificação de espécies e para análise sistemática em *Stylosanthes* e indicaram que a natureza e a origem das bandas RAPD são importantes para a confiança nos resultados de análise sistemática, uma vez que foi demonstrado por Stammer *et al.* (1995) que as bandas podem ser originadas de seqüências repetitivas dentro do genoma e estas não são adequadas para análise sistemática.

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), na técnica de RAPD, a homologia entre as seqüências de mesmo peso molecular, ocorre apenas na região do DNA onde o *primer* hibridiza. Portanto, dois fragmentos RAPD amplificados como o mesmo *primer* e que possuam a mesma distância de migração eletroforética podem ou não apresentar homologia de seqüência.

Quando se realiza uma análise de distância genética baseada em marcadores RAPD a premissa feita é que fragmentos de mesmo tamanho na eletroforese, sejam de fato homólogos na região de hibridização do *primer*. Esta premissa foi comprovada em diversos estudos (Williams *et al.* 1993, Gillies & Abbott, 1998).

Na verificação da homologia das bandas realizada por Gillies & Abbott (1998), foi identificado para *Stylosanthes* uma homologia de 65% para os fragmentos comigrantes. Dentro das espécies, 85,7% dos fragmentos comigrantes tiveram homologia de seqüência, enquanto que a homologia entre as seqüências comigrantes foi menor em bandas amostradas para diferentes espécies 53,8%.

Assim sendo, as bandas comigrantes apresentaram maior homologia quando estas originam-se de acessos dentro das espécies de *Stylosanthes* do que entre espécies. Os autores sugeriram que, embora o uso da técnica de RAPD na análise filogenética de taxas relacionados mais distantes pareça não ser apropriada, a técnica pode ser extremamente útil para acessar as relações em níveis taxonômicos menos elevados.

Os dados de RAPD, em *Adesmia* não concordaram totalmente com a taxonomia clássica, uma vez que não agruparam as espécies dentro das categorias infragenéricas. No entanto, a técnica de RAPD foi eficiente na separação dos acessos e das espécies de *Adesmia* e concordaram (com algumas exceções) com a partição da variabilidade esperada de acordo com o modo de reprodução.

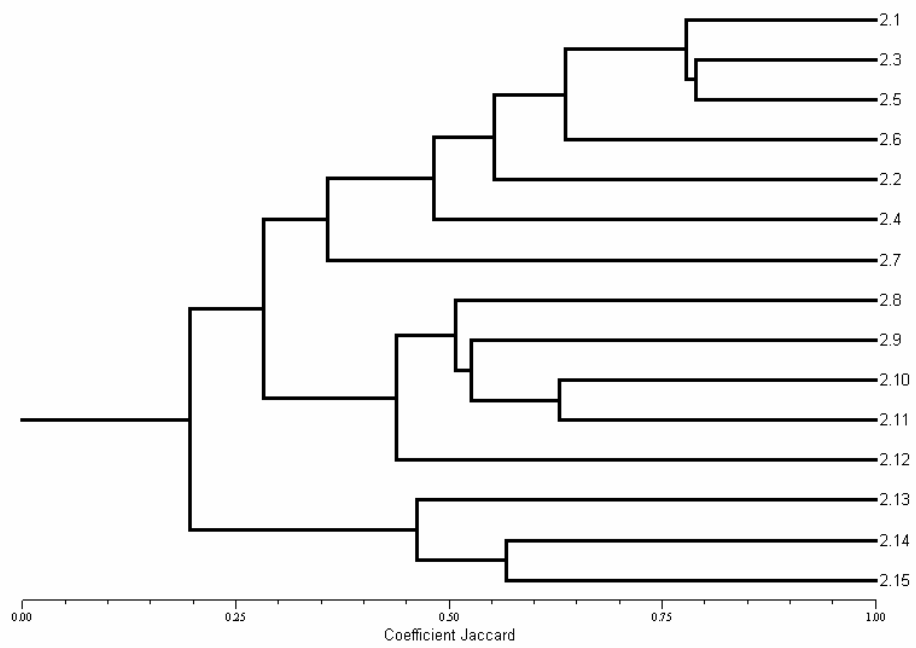
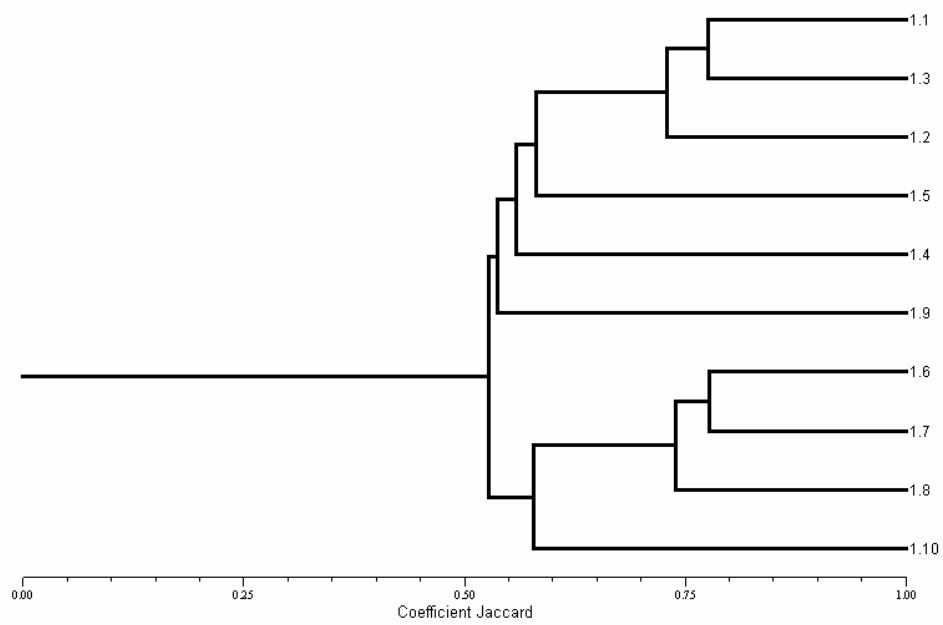


Figura 2 – Dendrogramas acessos 01 e 02 de *A. araujo*

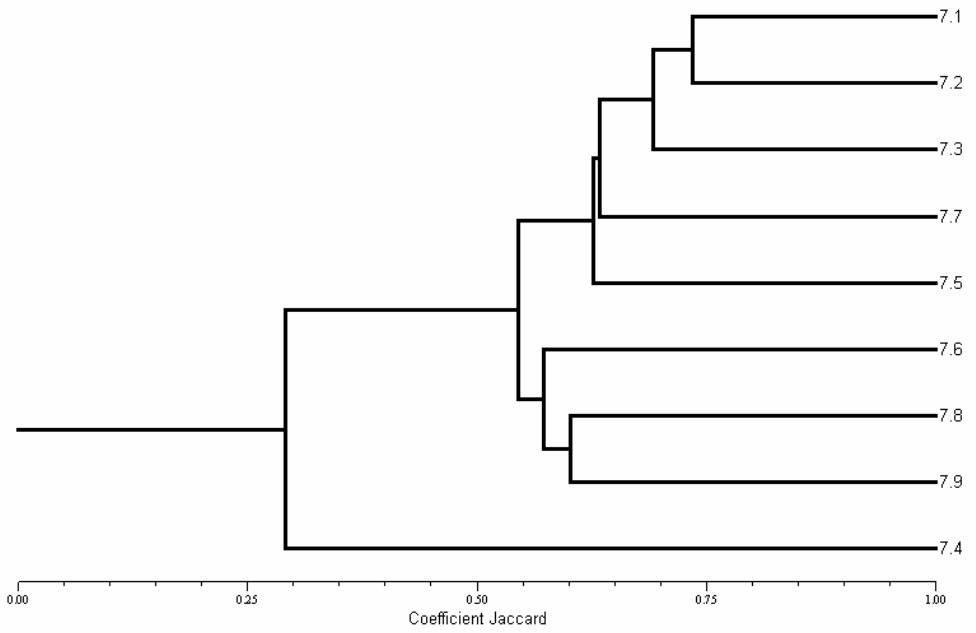
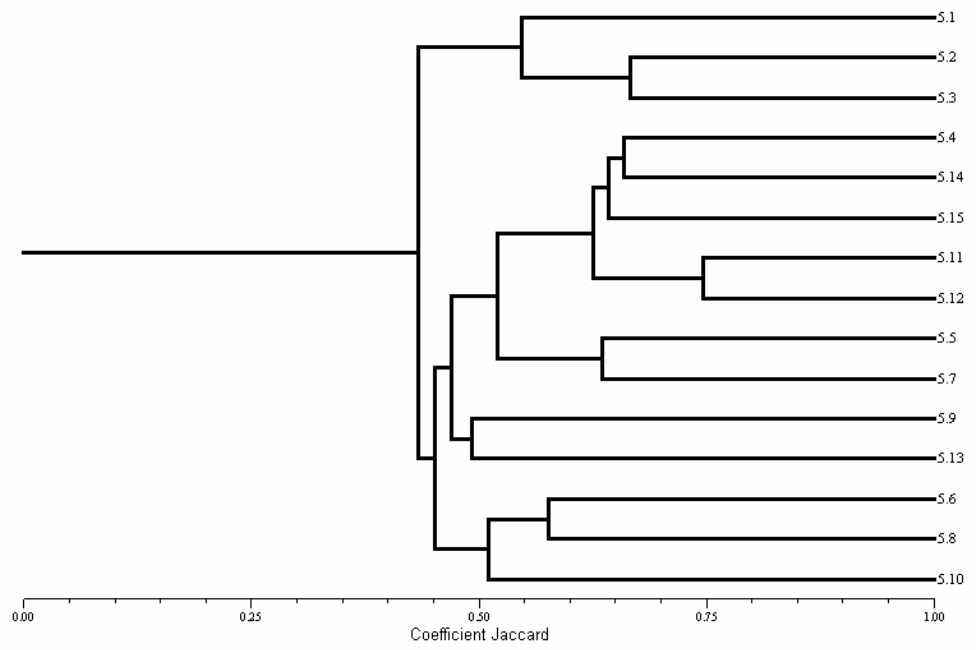


Figura 3 – Dendrogramas acessos 05 e 07 *A. bicolor*

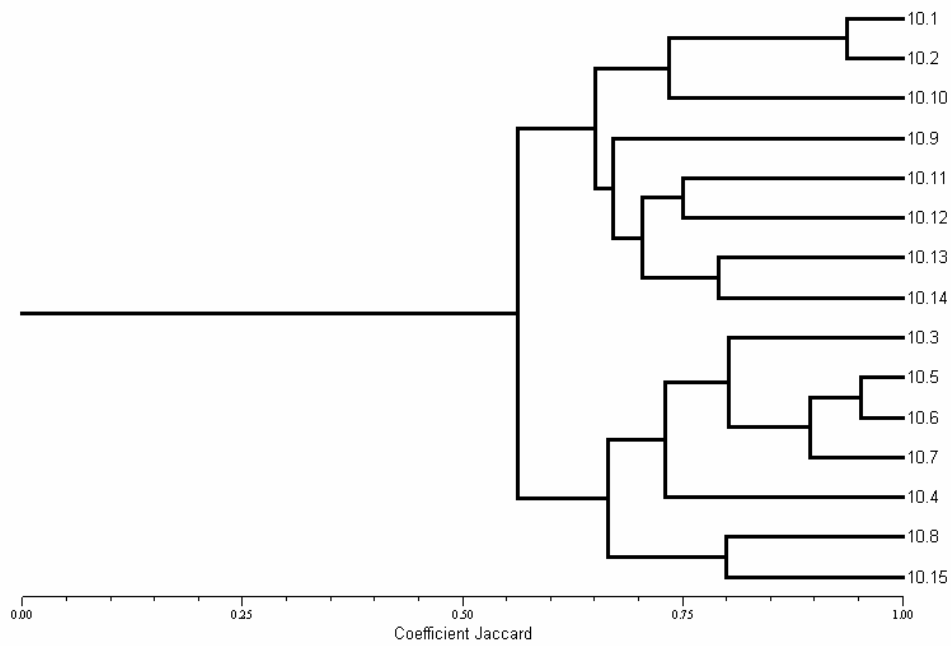
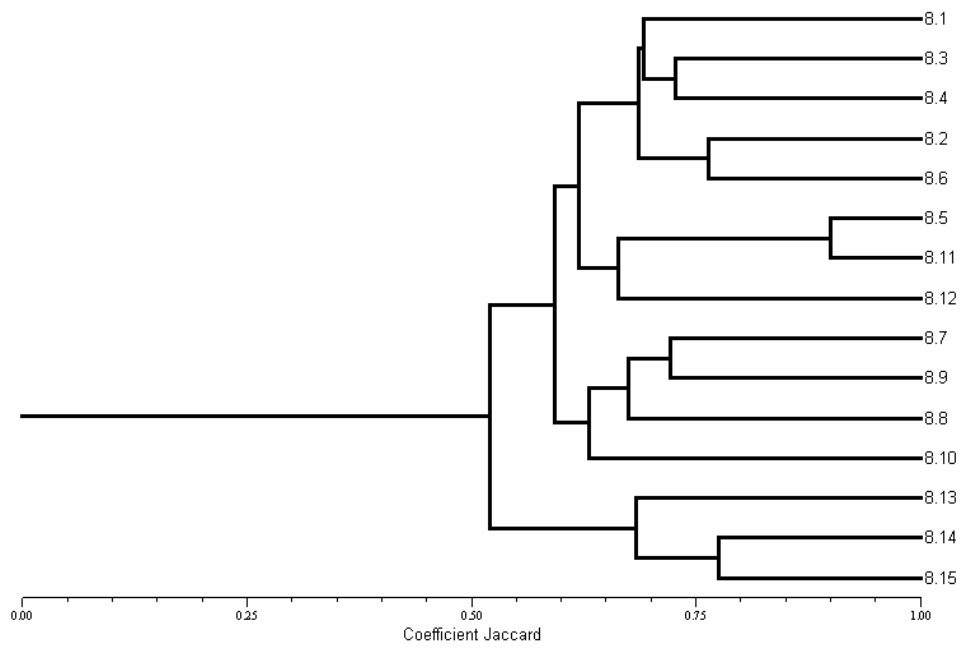


Figura 4 – Dendrogramas acessos 08 e 10 de *A. ciliata*

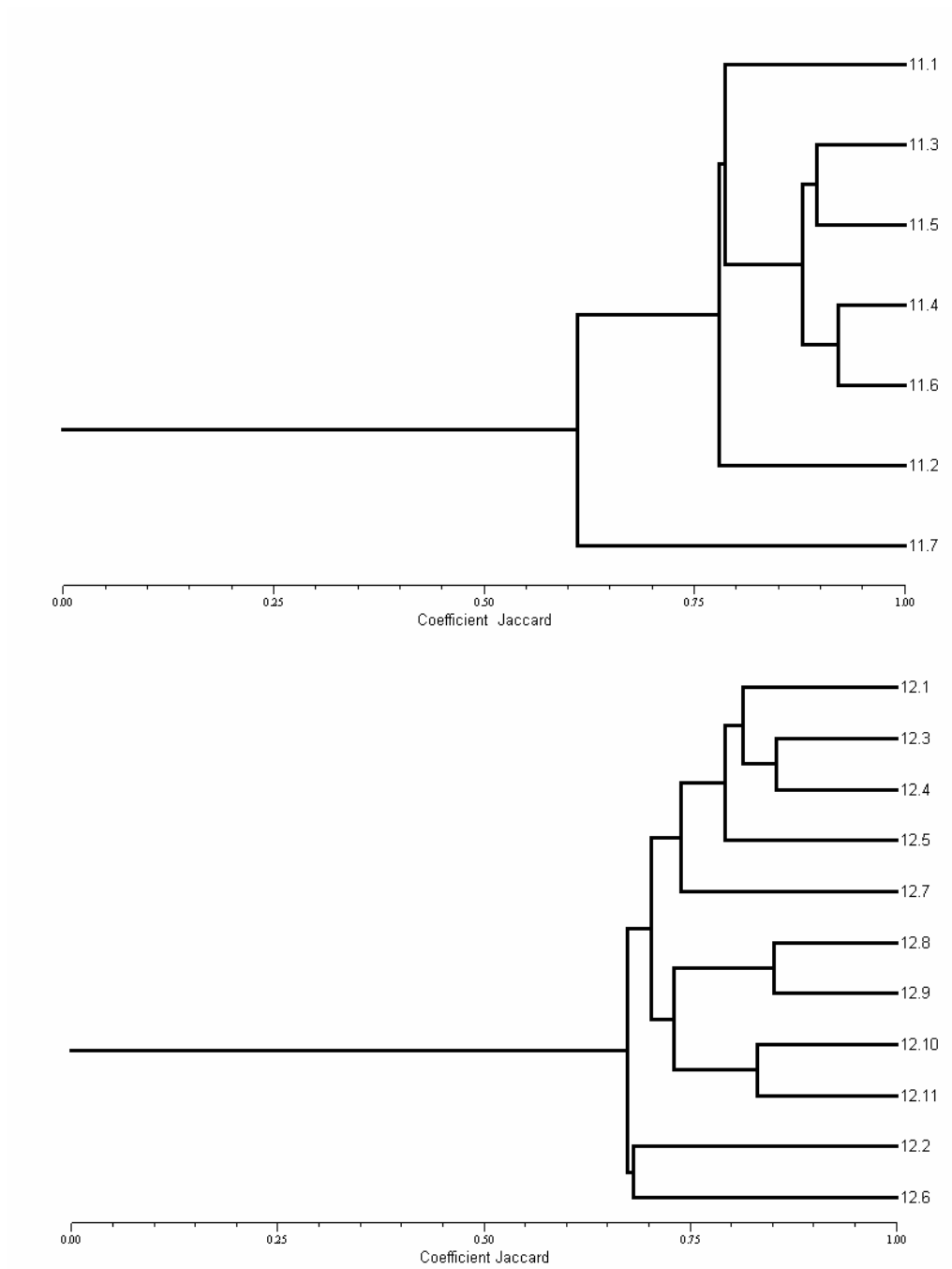


Figura 5 – Dendrogramas acessos 11 e 12 de *A. incana*

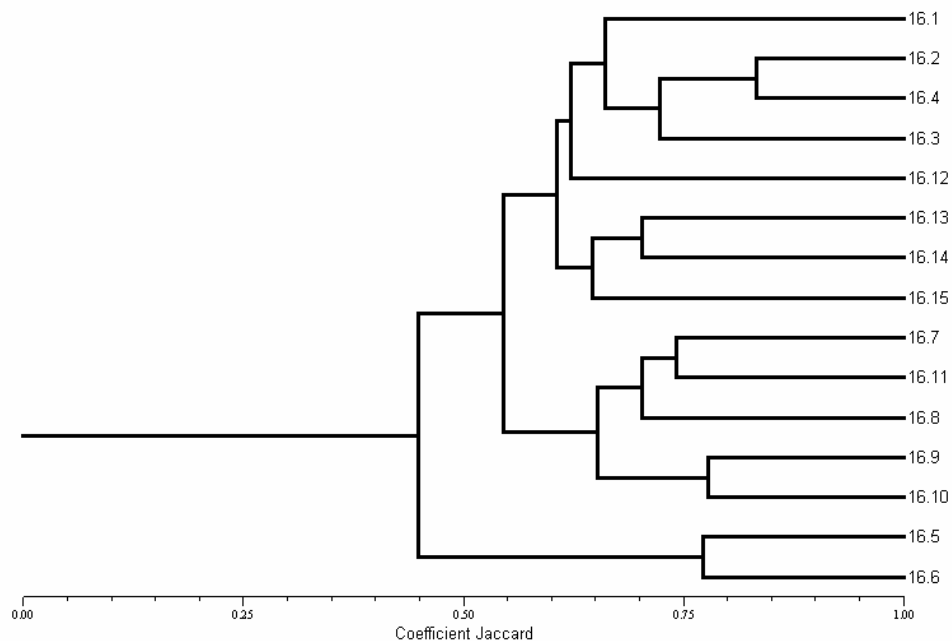
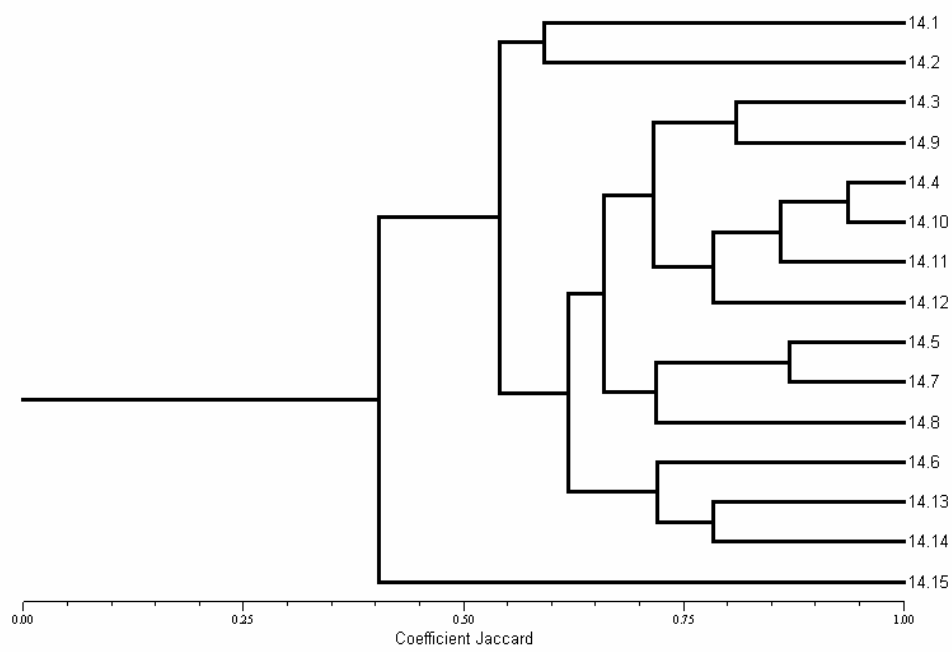


Figura 6 – Dendrogramas acessos 14 e 16 de *A. latifolia*

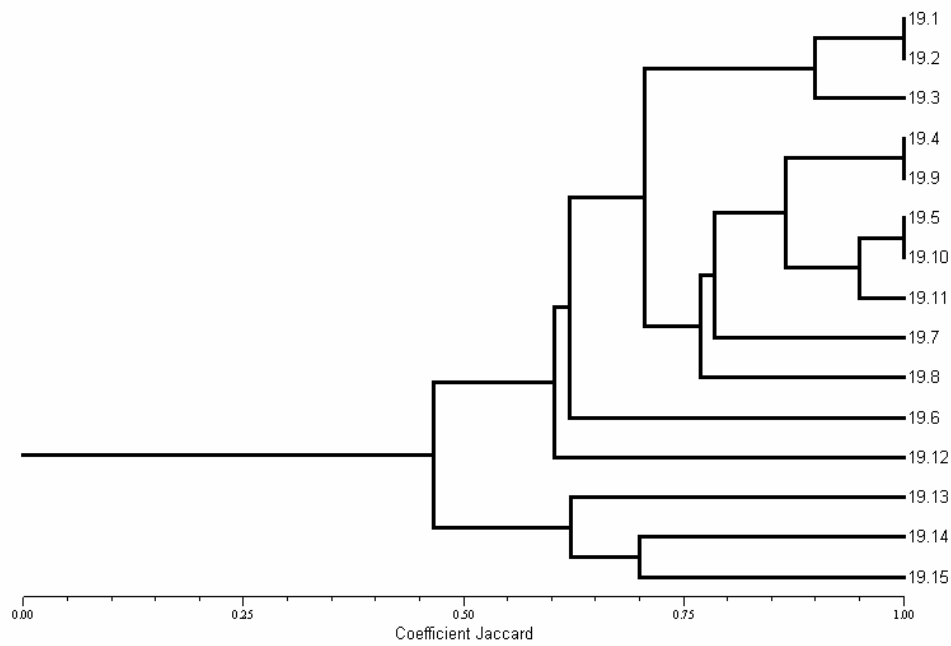
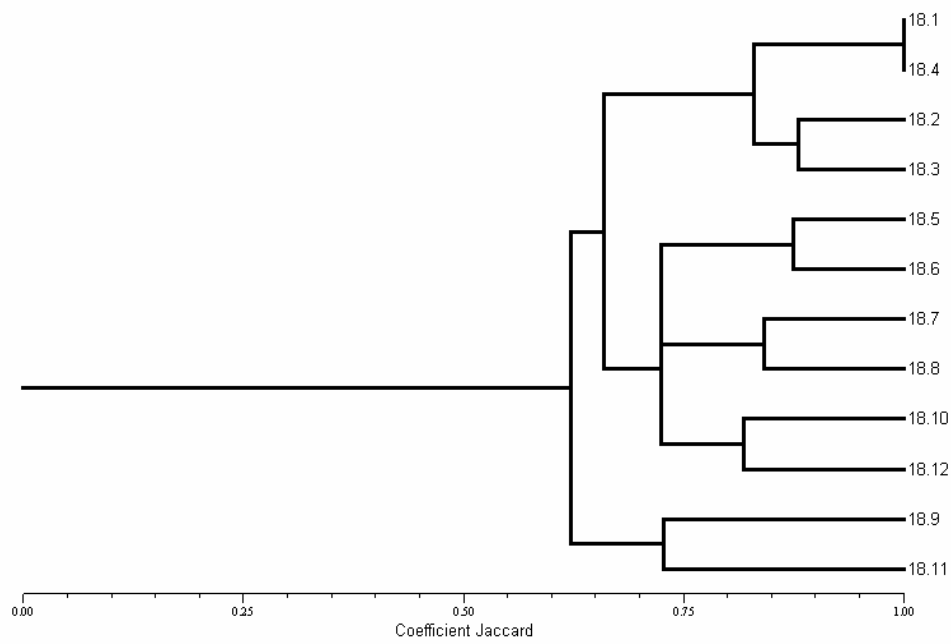


Figura 7 – Dendrogramas acessos 18 e 19 de *A. muricata*

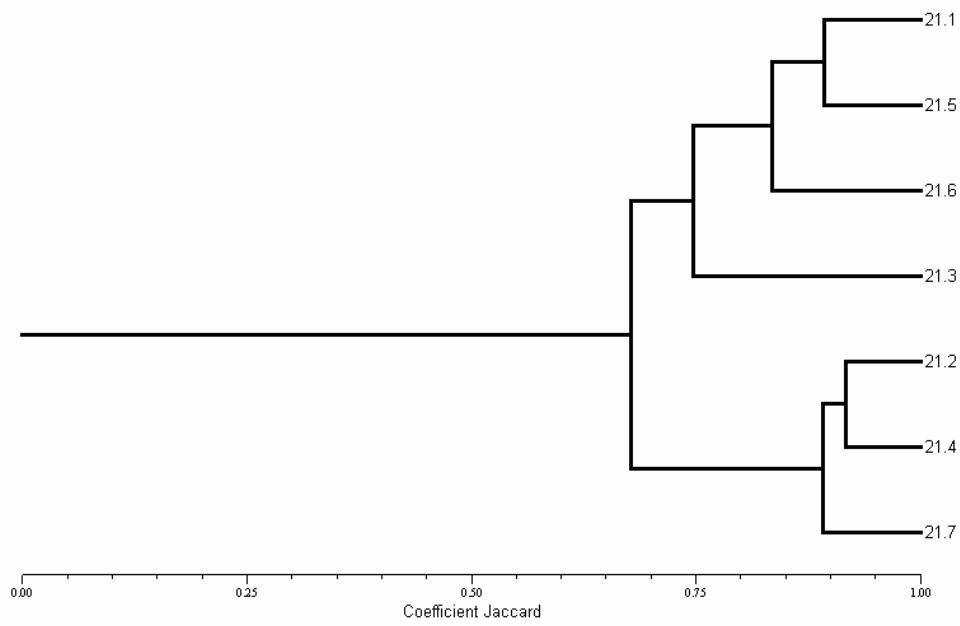
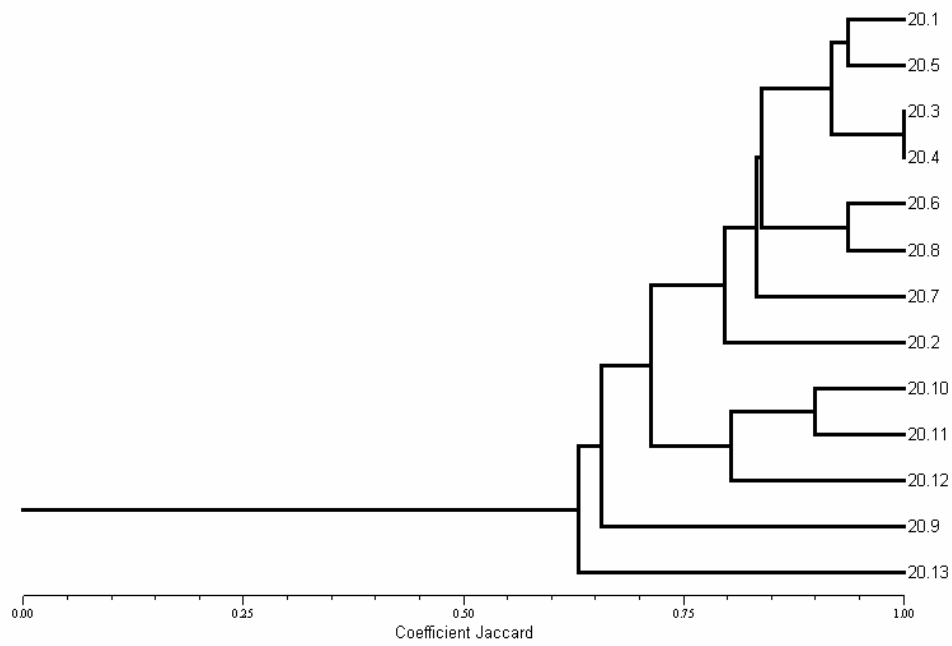


Figura 8 – Dendrogramas acessos 20 e 21 de *A. arillata*

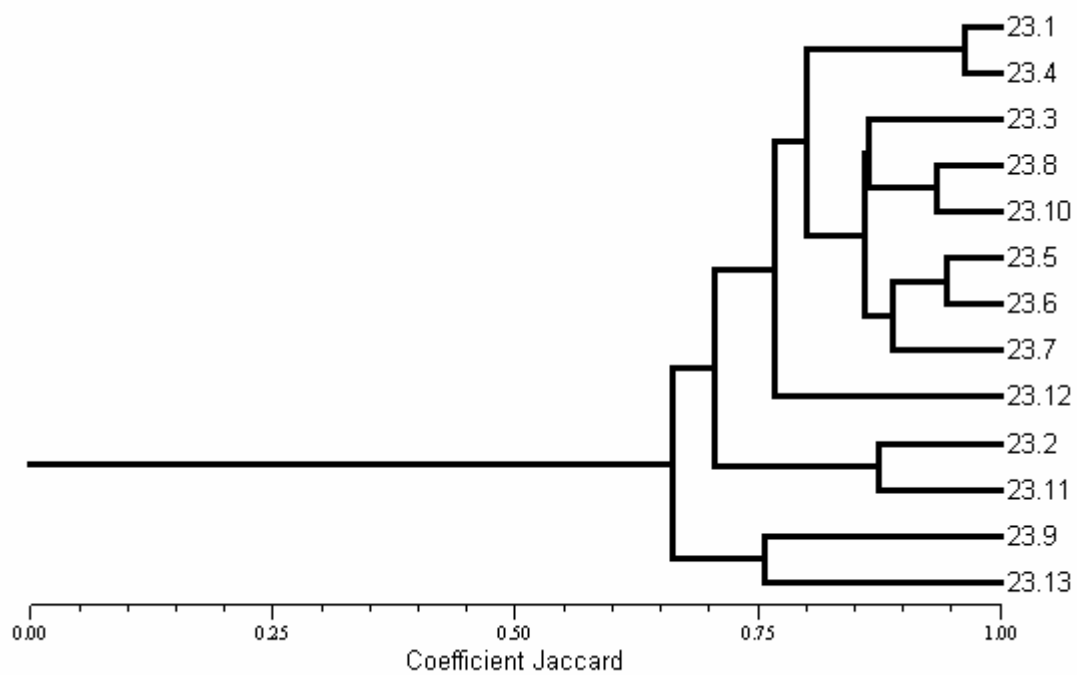
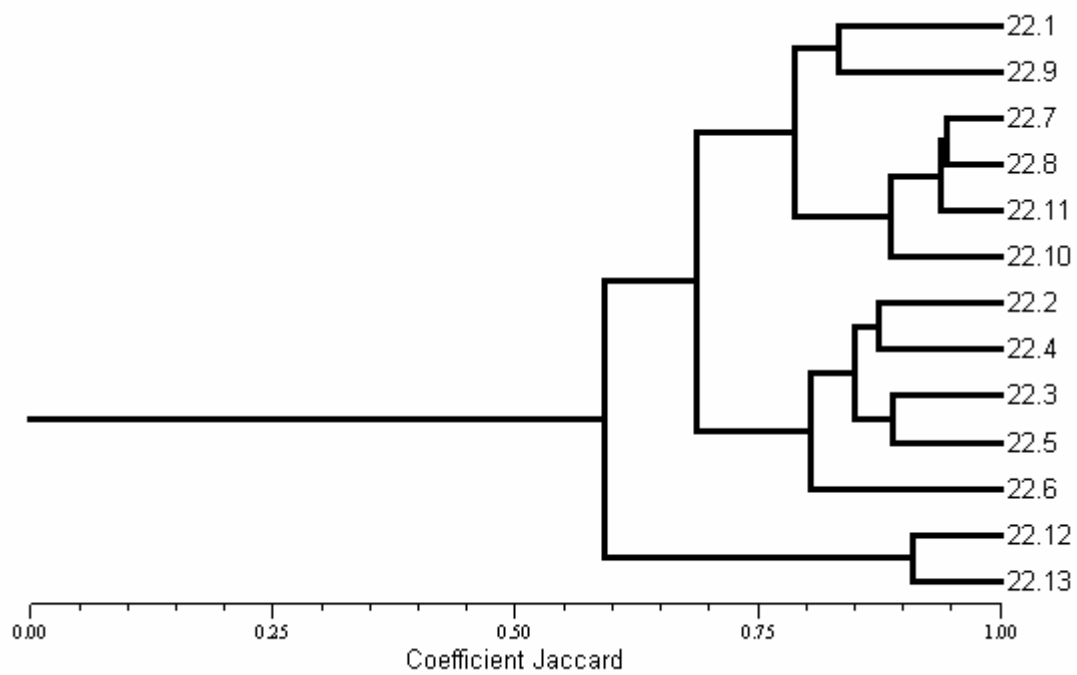


Figura 9 – Dendrogramas acessos 22 e 23 de *A. psoraleoides*

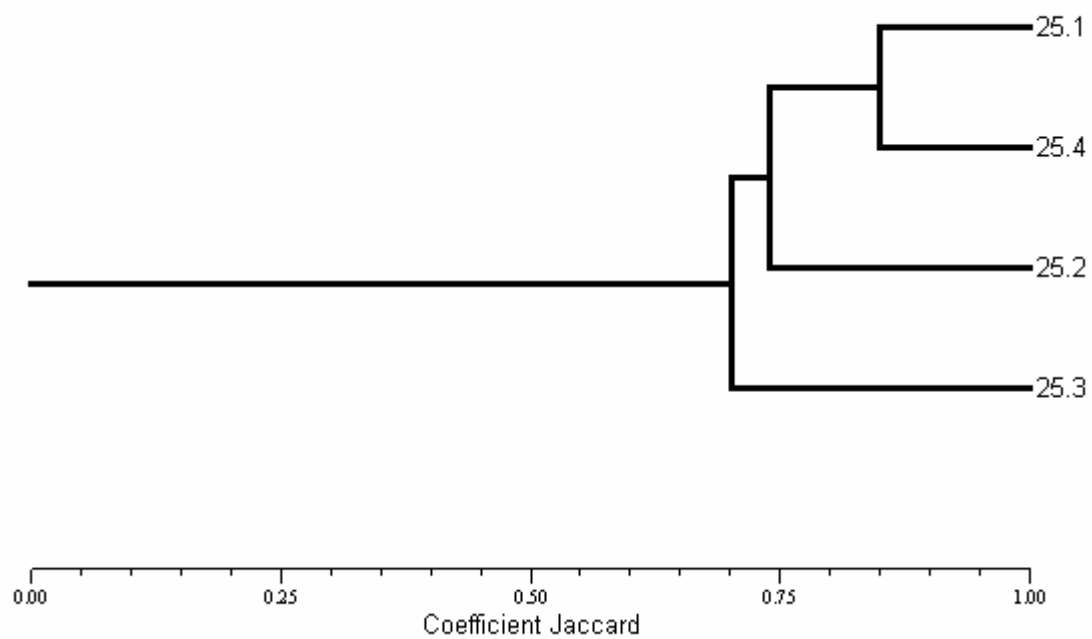
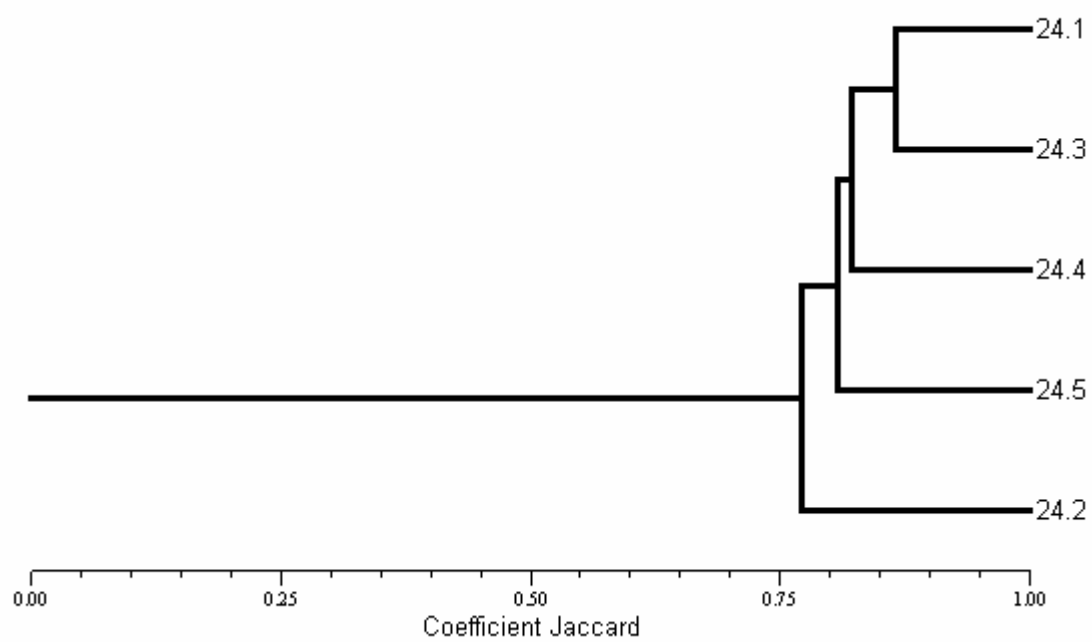


Figura 10 – Dendrogramas acessos 24 e 25 de *A. punctata*

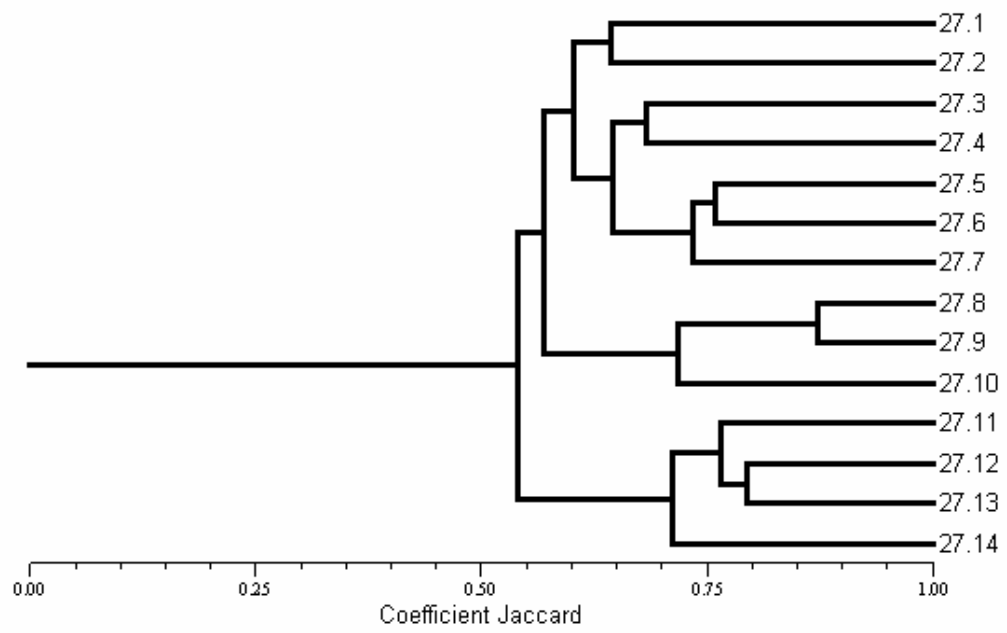
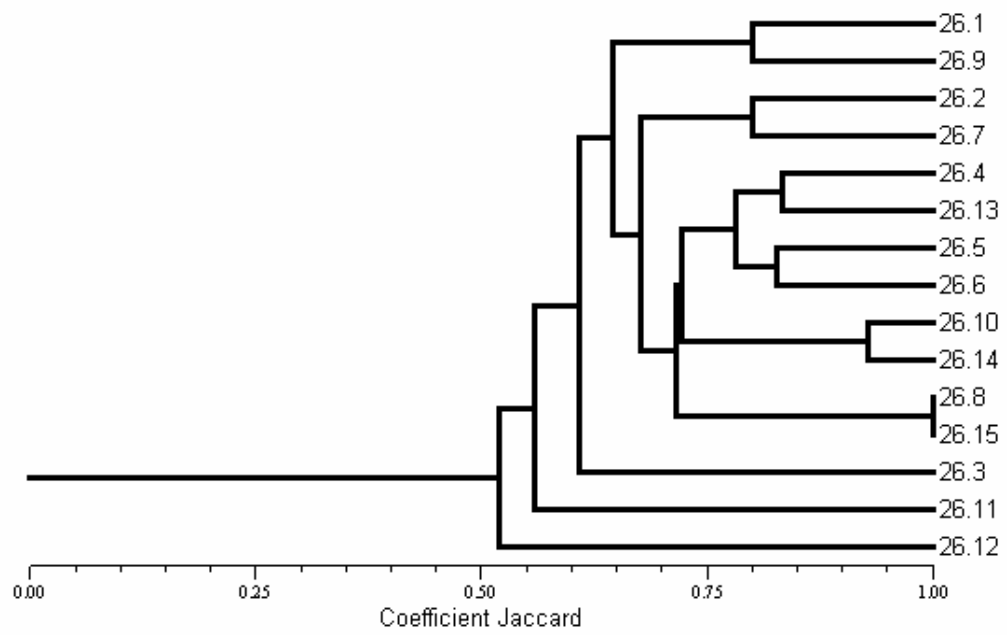


Figura 11 – Dendrogramas acessos 26 e 27 de *A. riograndensis*

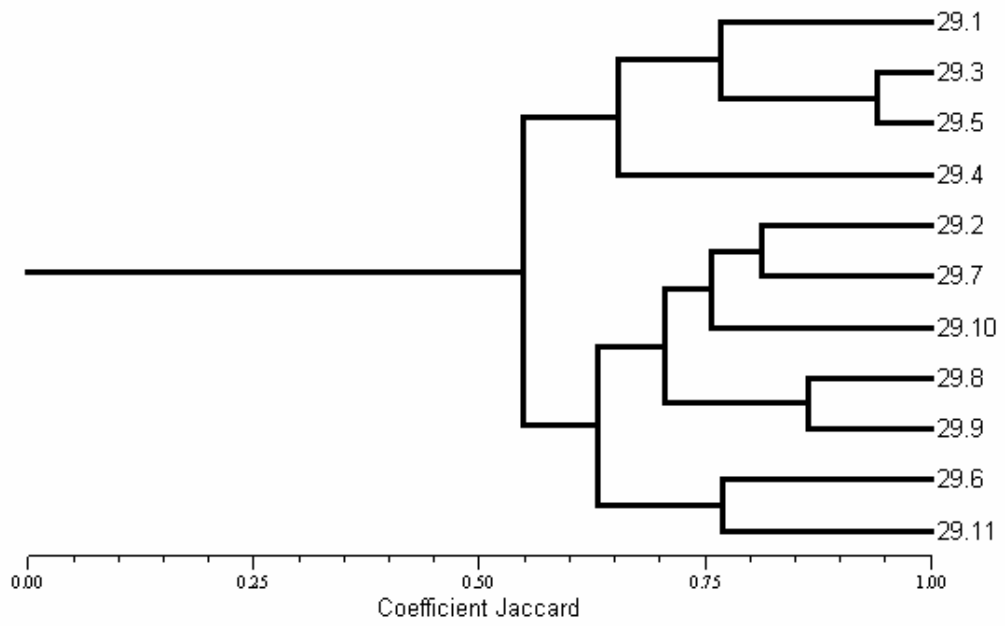
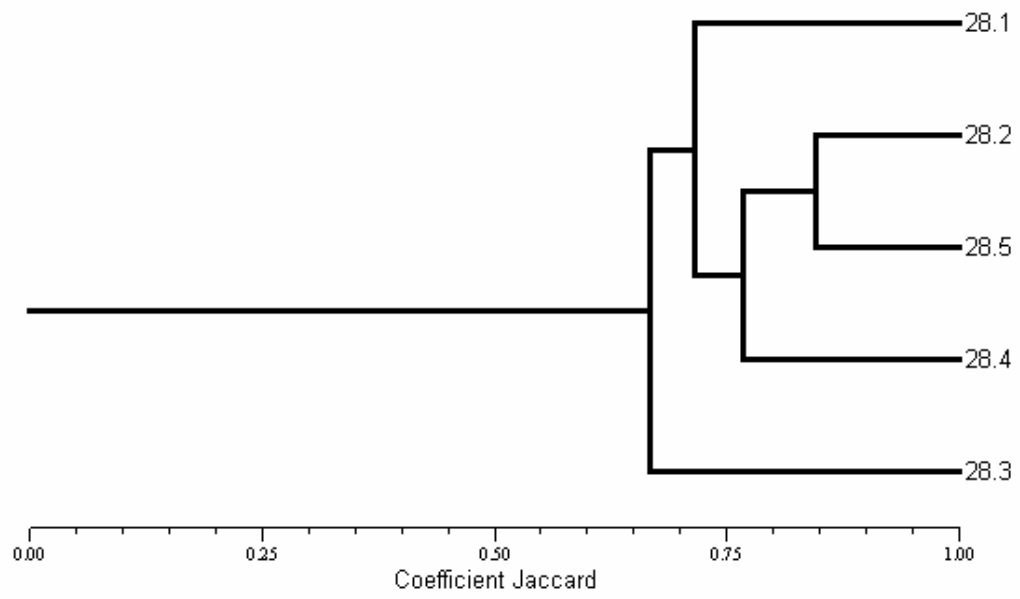


Figura 12 – Dendrogramas acessos 28 e 29 de *A. rocinhensis*

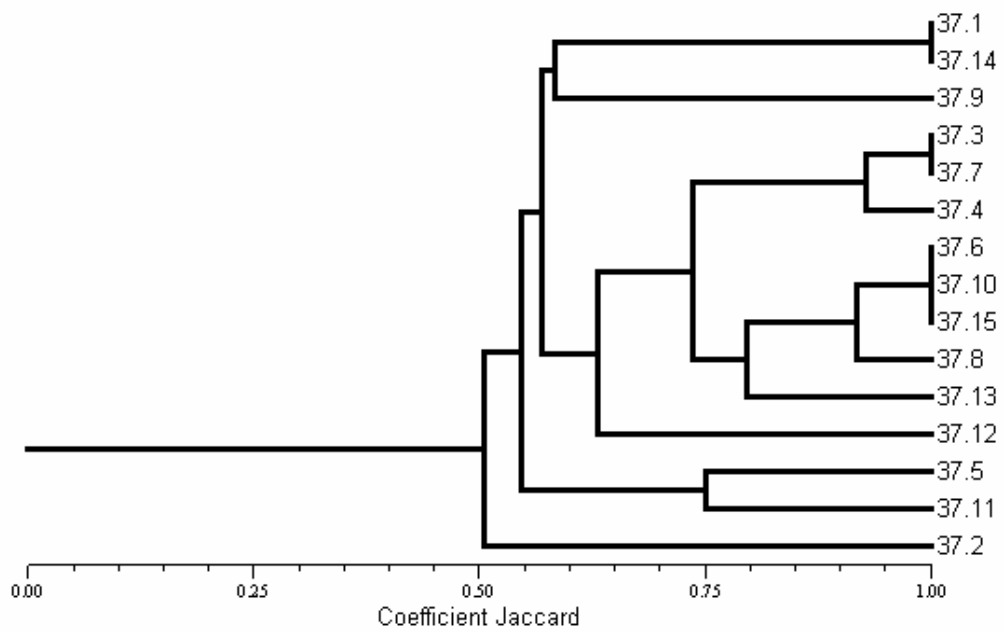
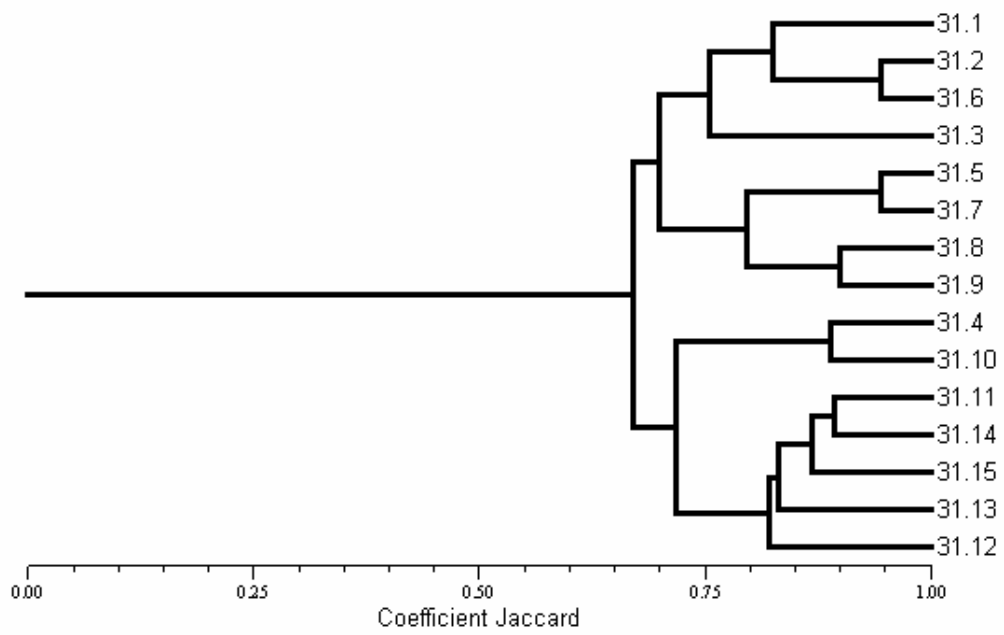


Figura 13 – Dendrogramas acessos 31 e 37 de *A. securigerifolia*

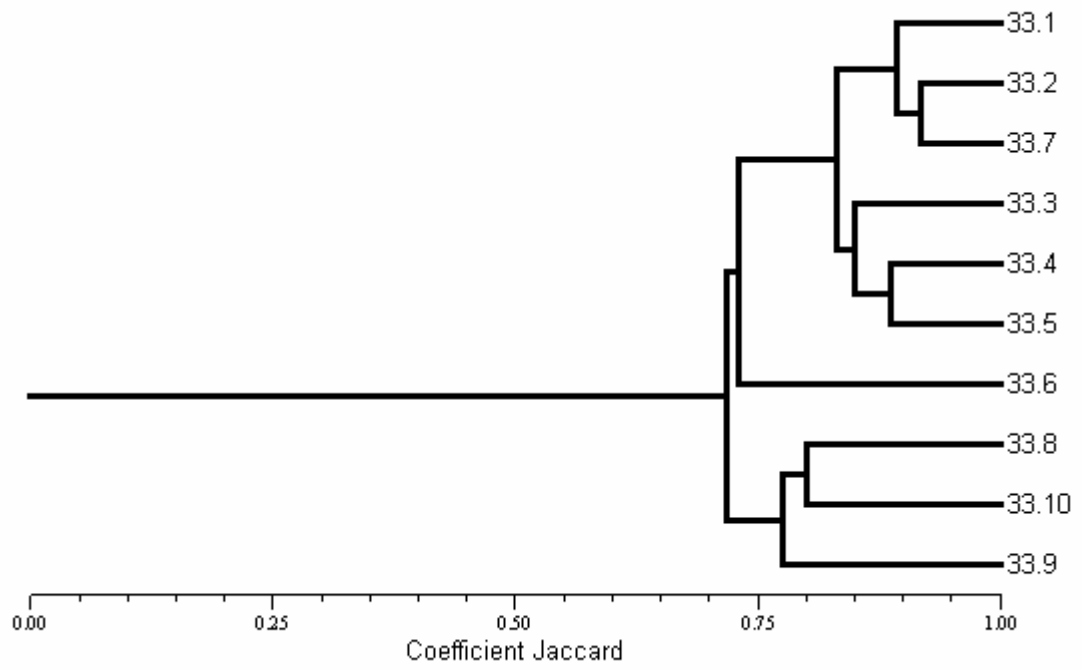


Figura 14 – Dendrograma acesso 33 de *A. sulina*

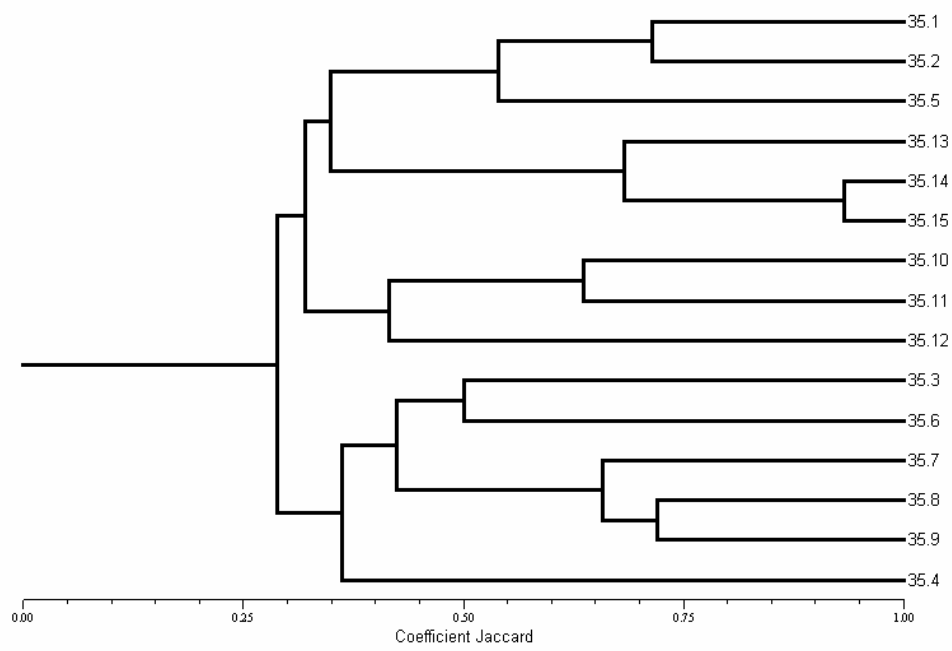
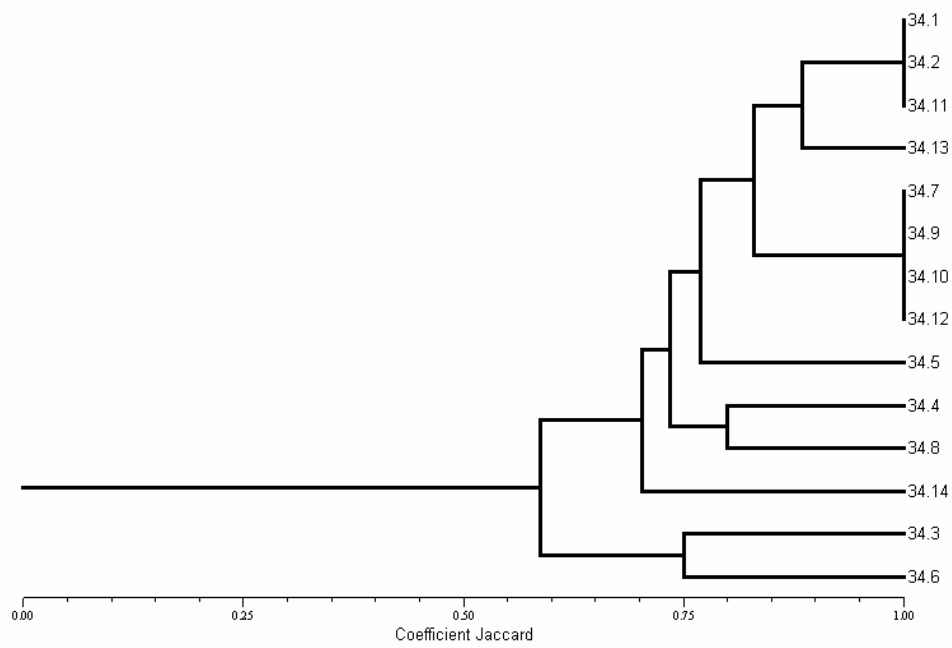


Figura 15 – Dendrogramas acessos 34 e 35 de *A. tristis*

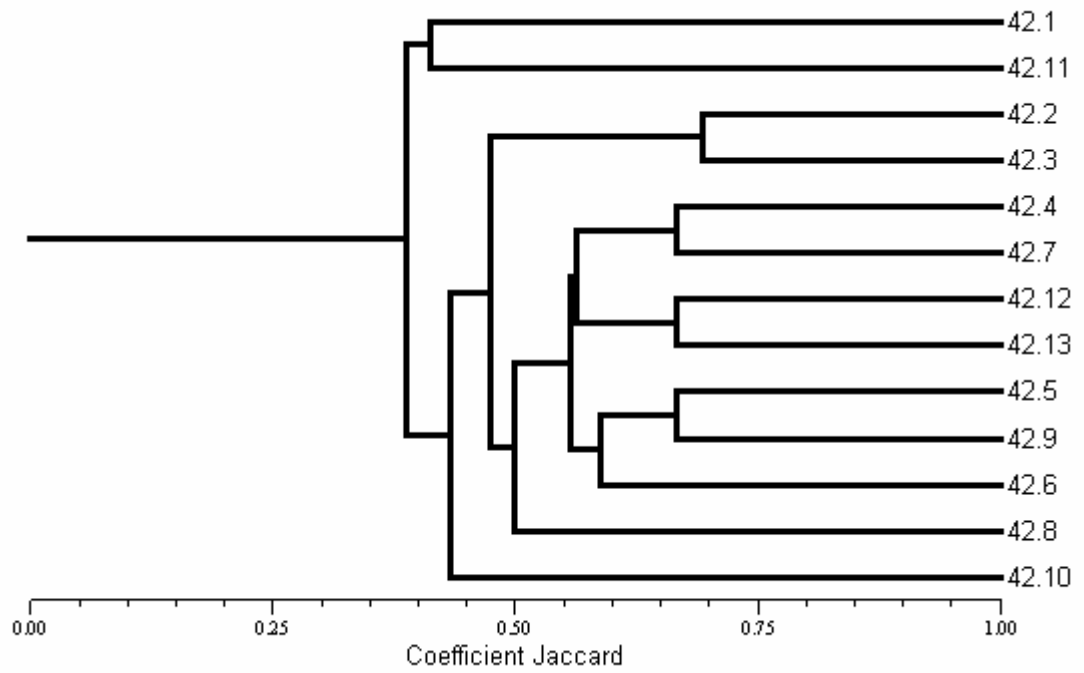


Figura 16- Dendrograma acesso 42 de *A. vallsii*

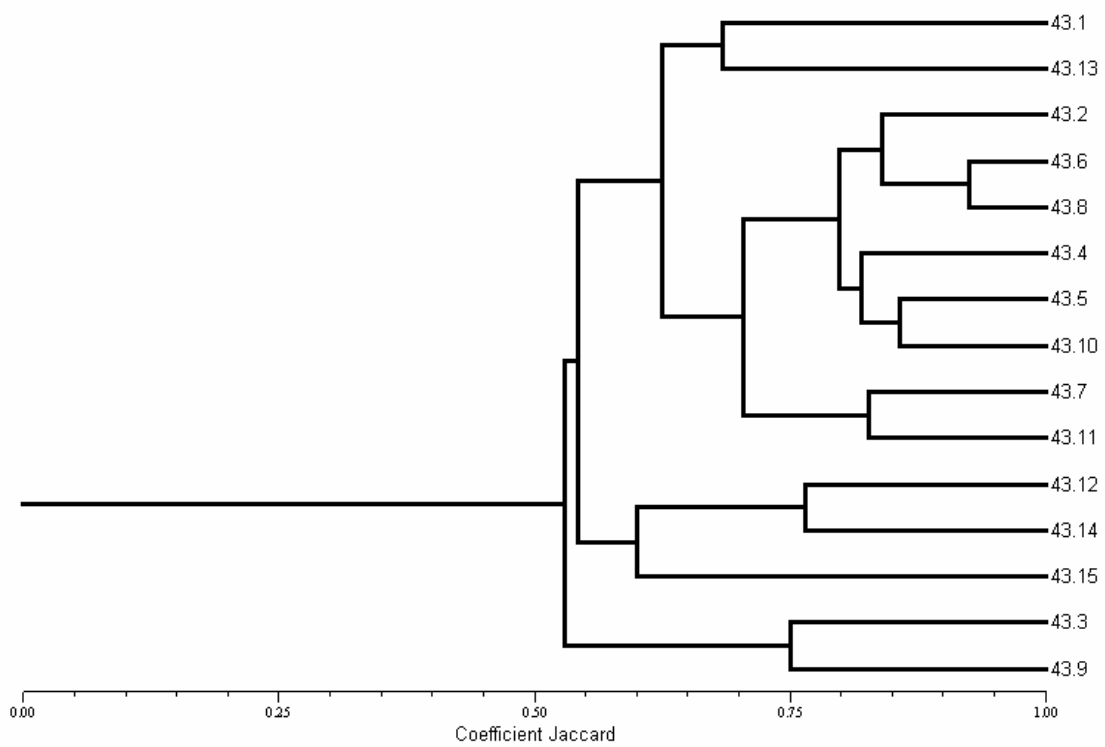


Figura 17- Dendrograma acesso 43 de *A. reitziana*

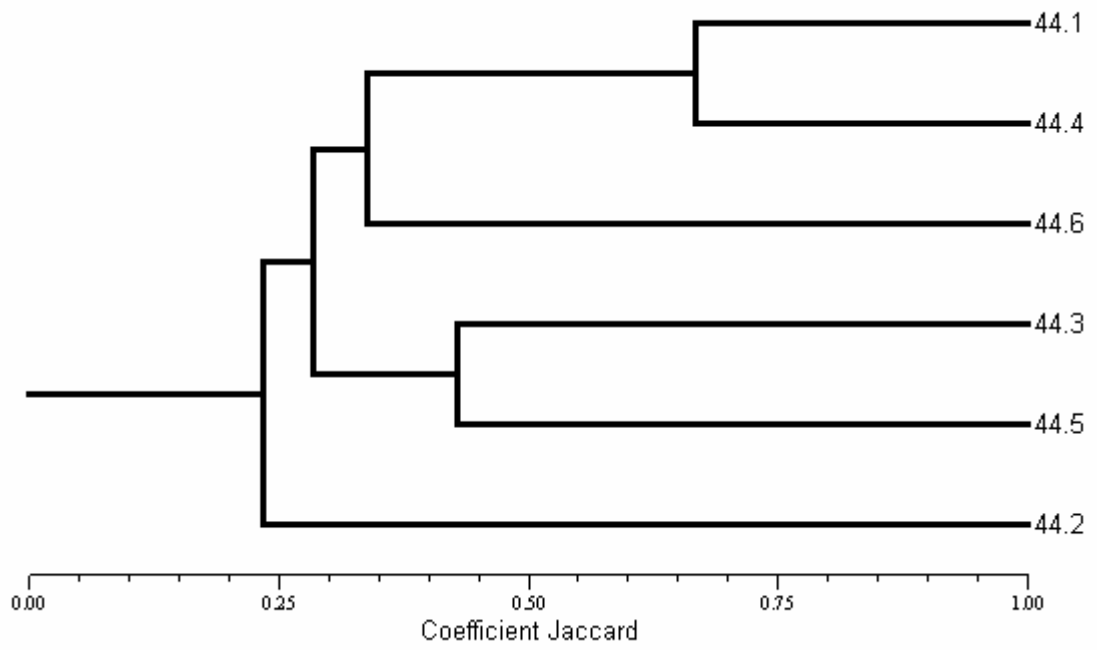


Figura 18 – Dendrograma acesso 44 de *A. paranensis*

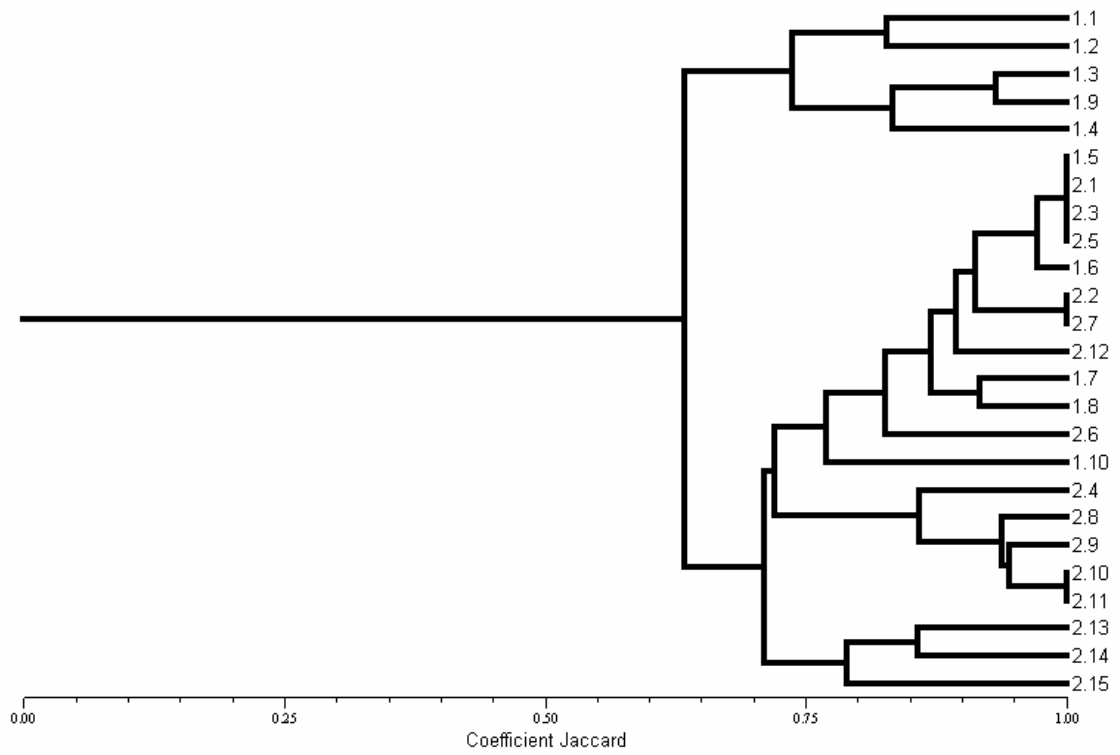


FIGURA 19 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 01 e 02 de *A. araujo*.

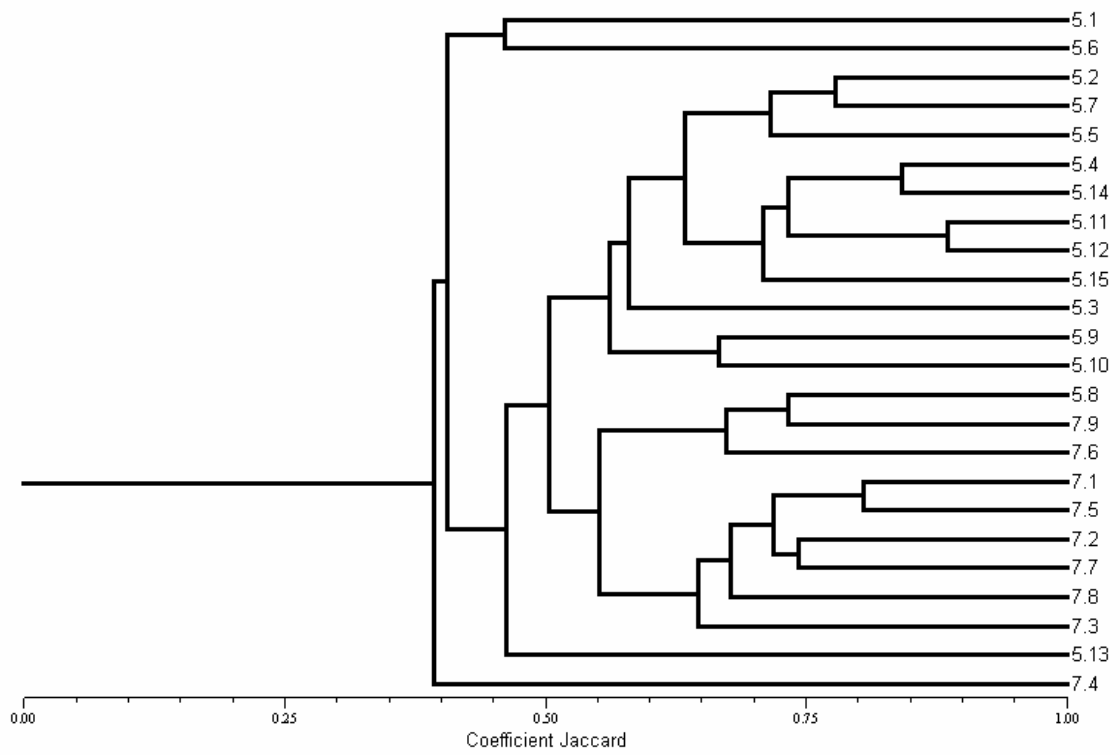


FIGURA 20 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 05 e 07 de *A. bicolor*.

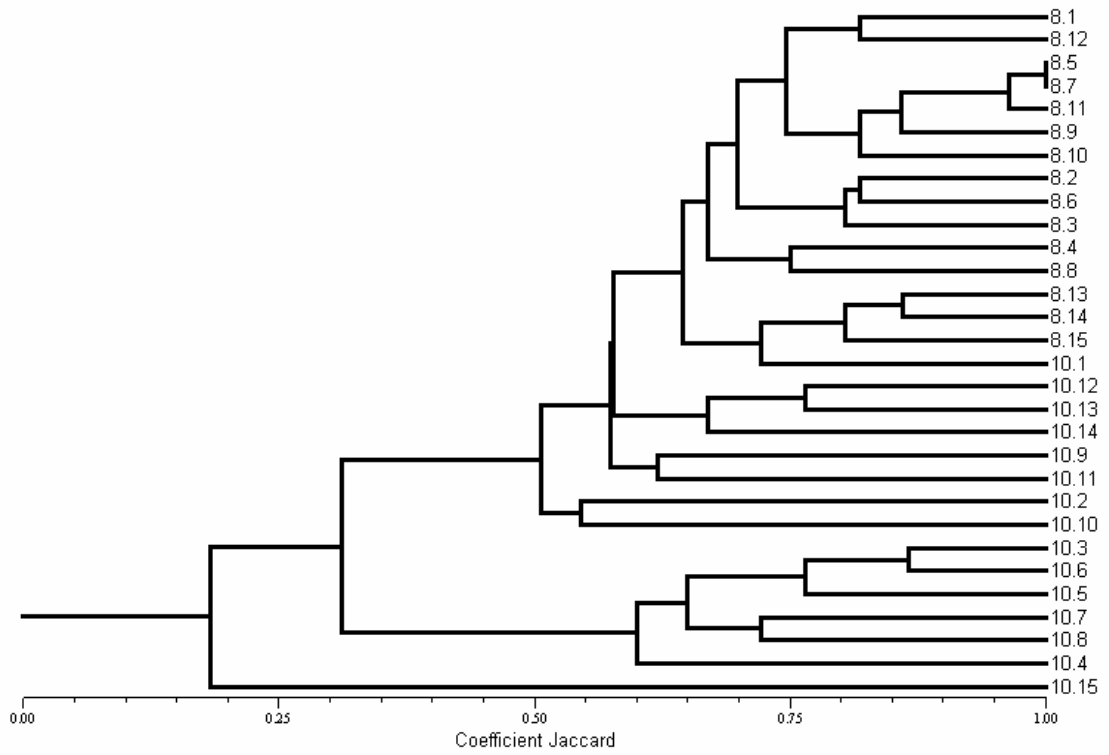


FIGURA 21 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 08 e 10 de *A. ciliata*.

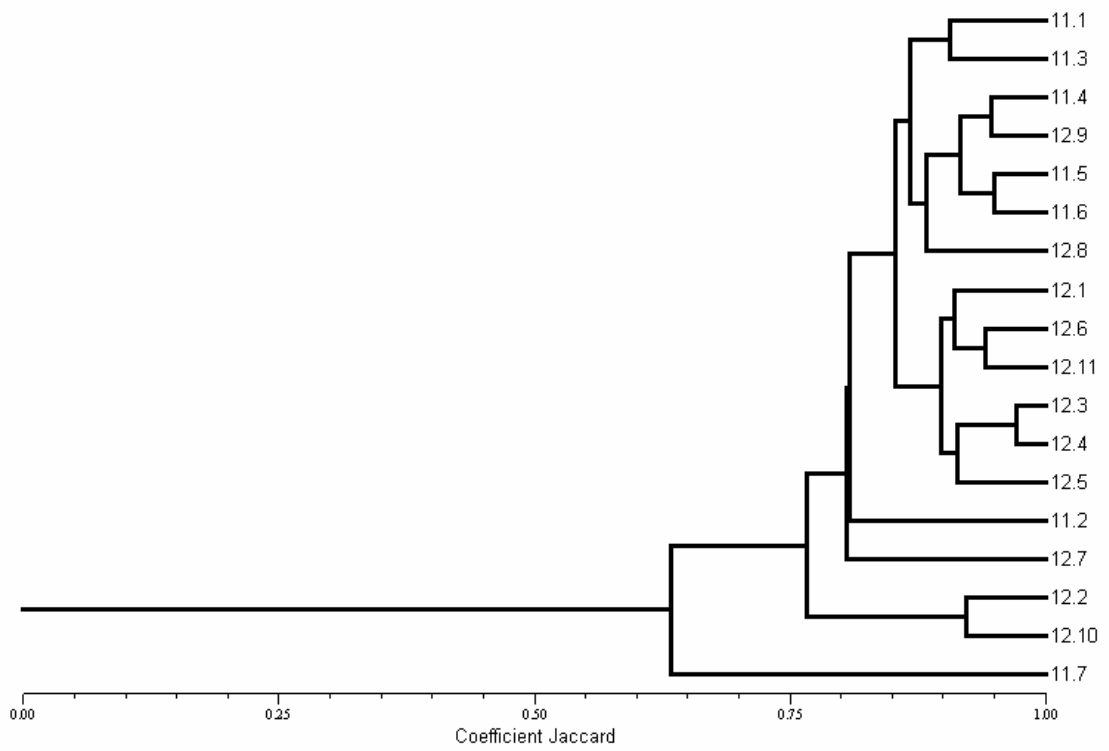


FIGURA 22 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 11 e 12 de *A. incana*.

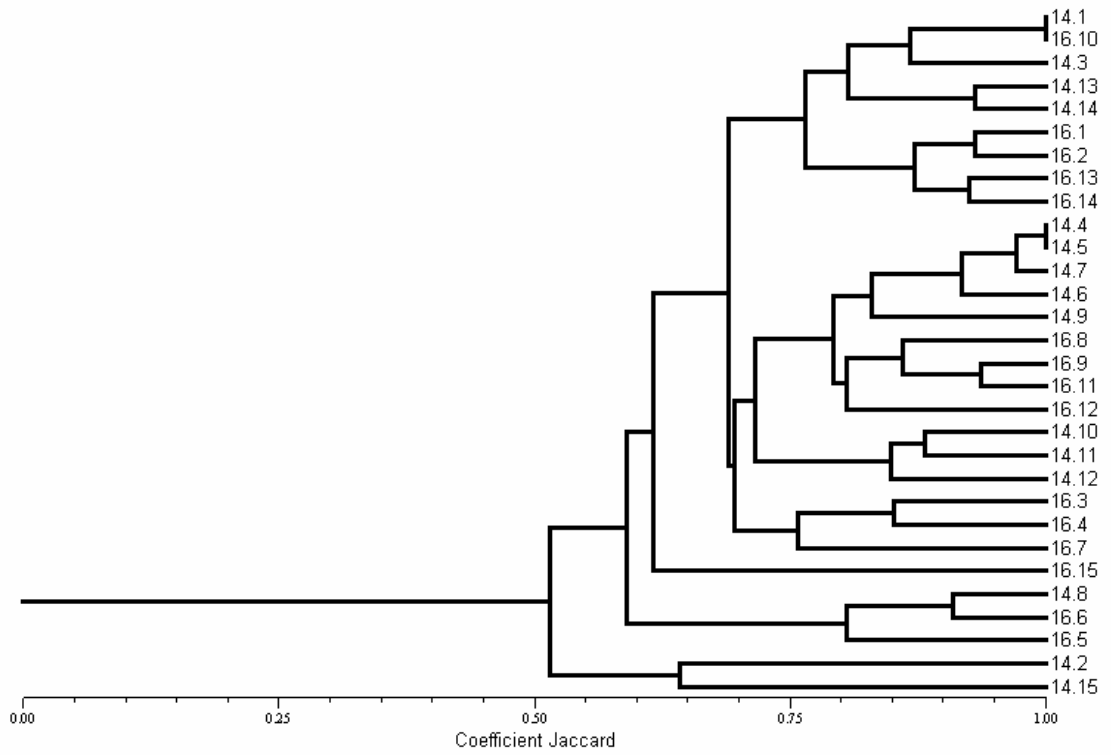


FIGURA 23 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 14 e 16 de *A. latifolia*.

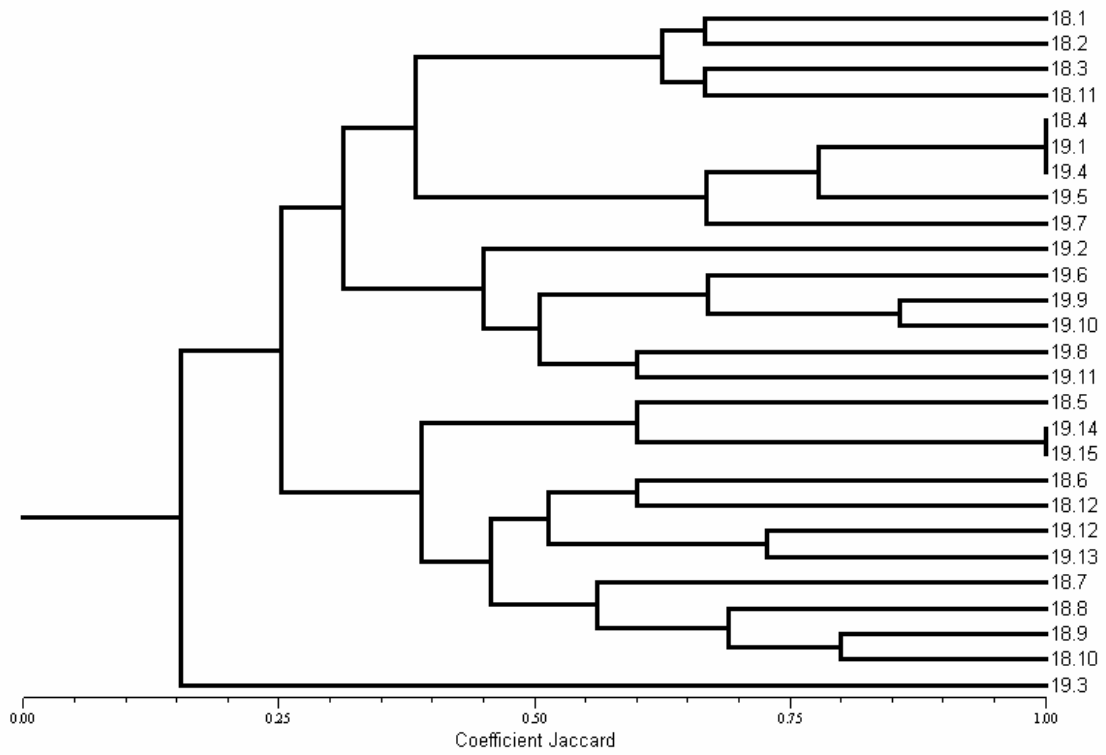


FIGURA 24 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 18 e 19 de *A. muricata*.

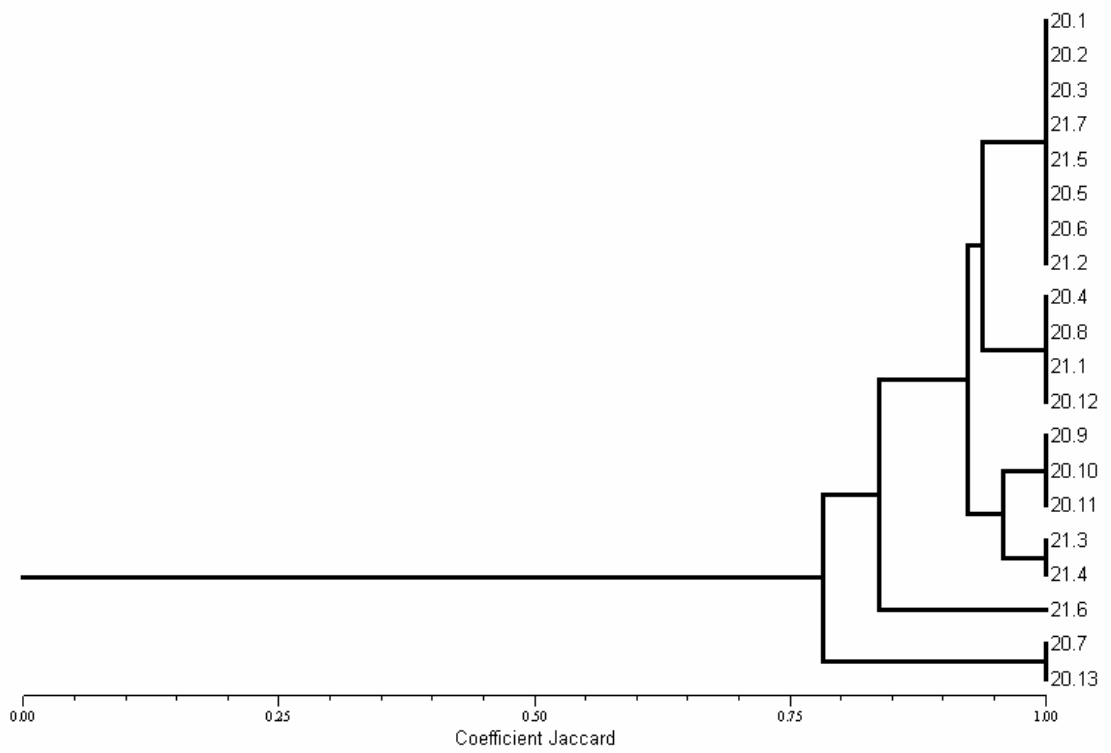


FIGURA 25 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 20 e 21 de *A. arillata*.

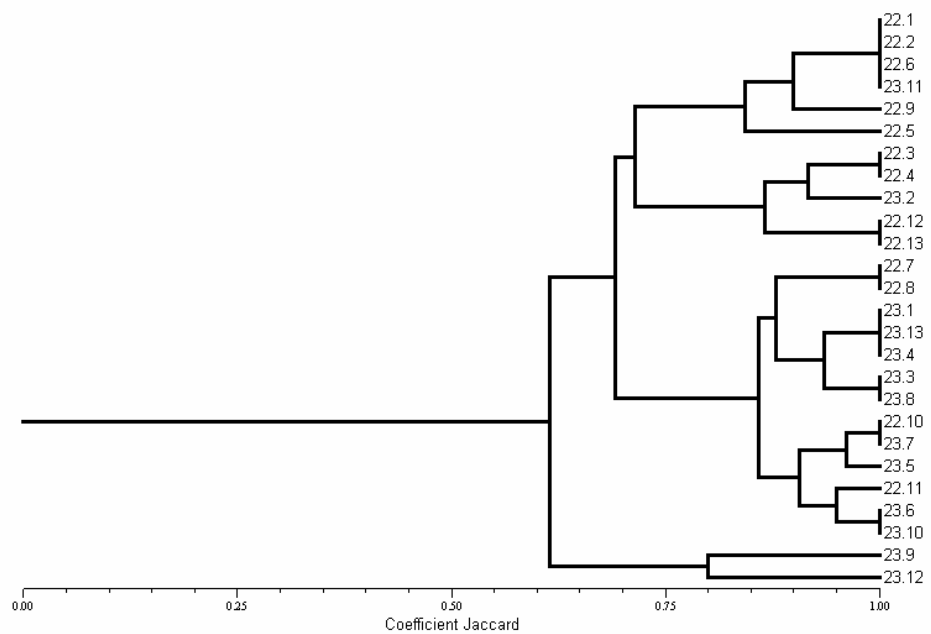


FIGURA 26 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 22 e 23 de *A. psoraleoides*.

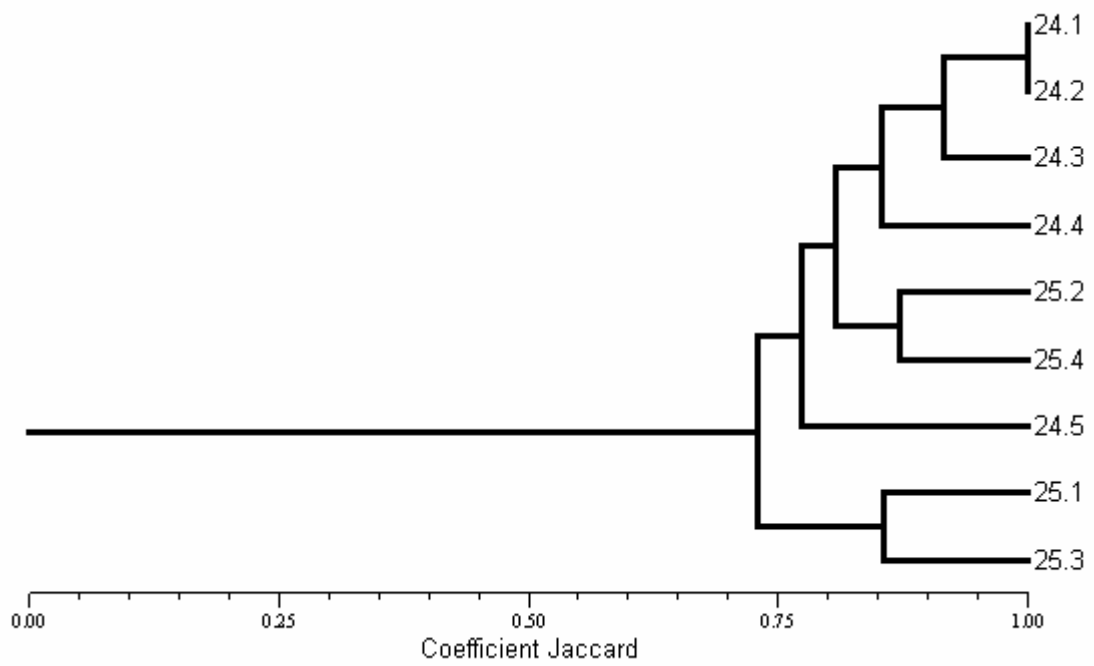


FIGURA 27 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 24 e 25 de *A. punctata*.

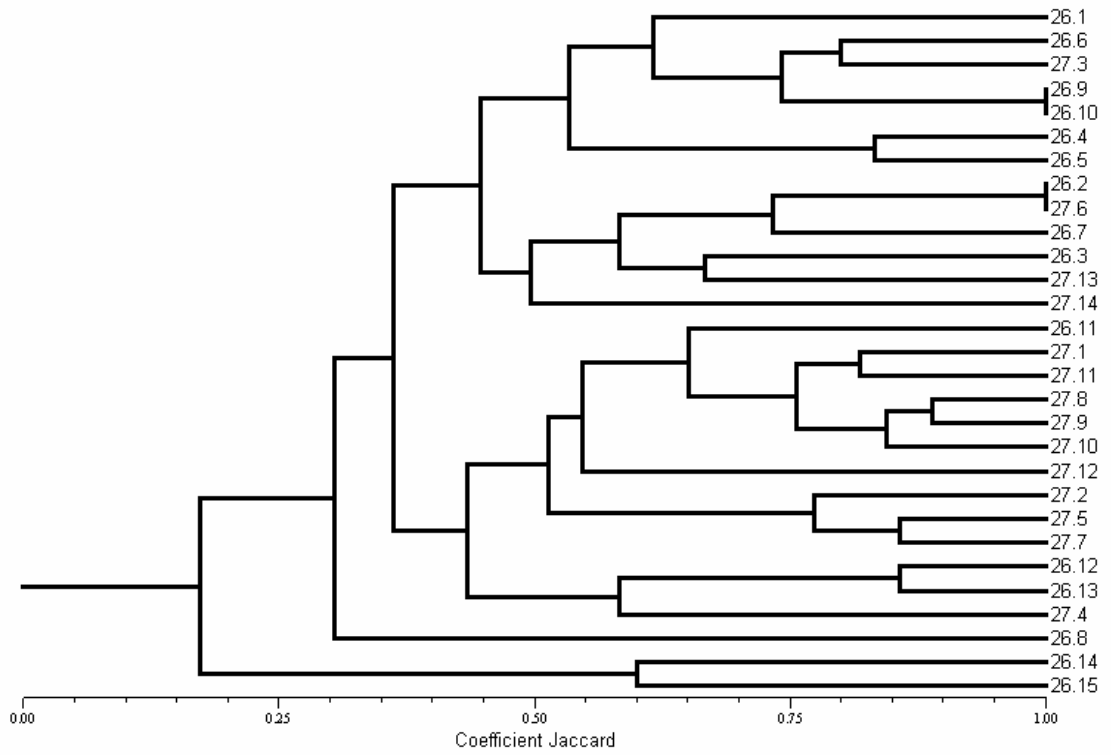


FIGURA 28 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 26 e 26 de *A. riograndensis*.

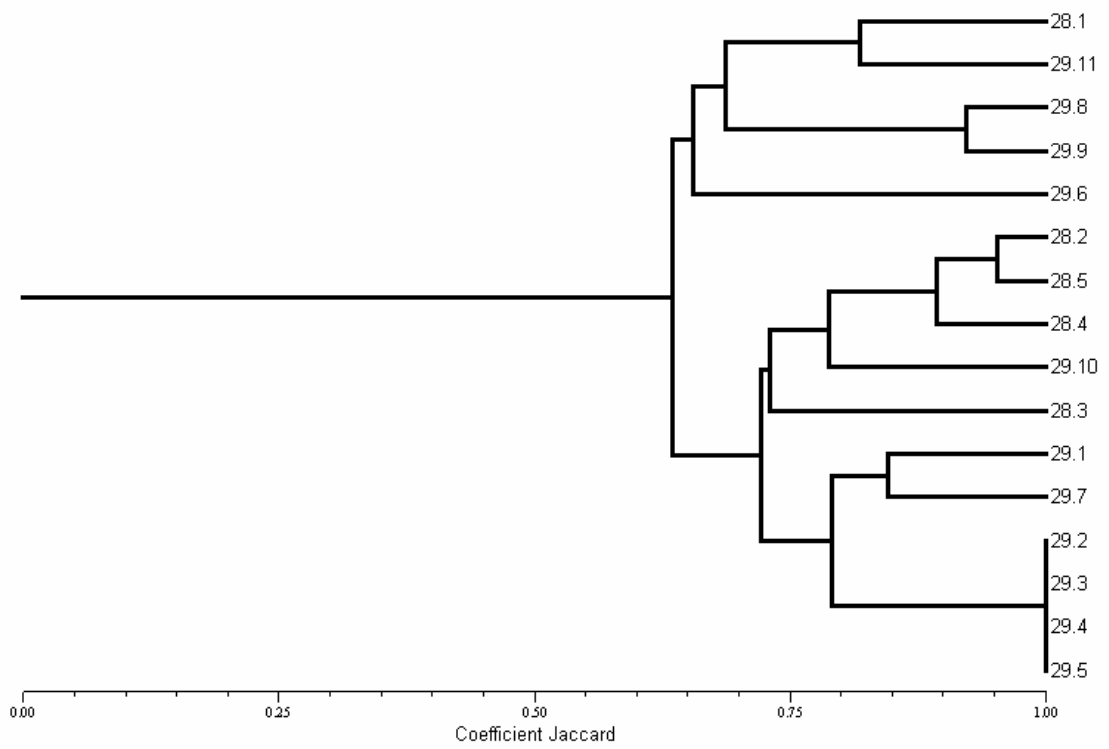


FIGURA 29 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 28 e 29 de *A. rocinhensis*.

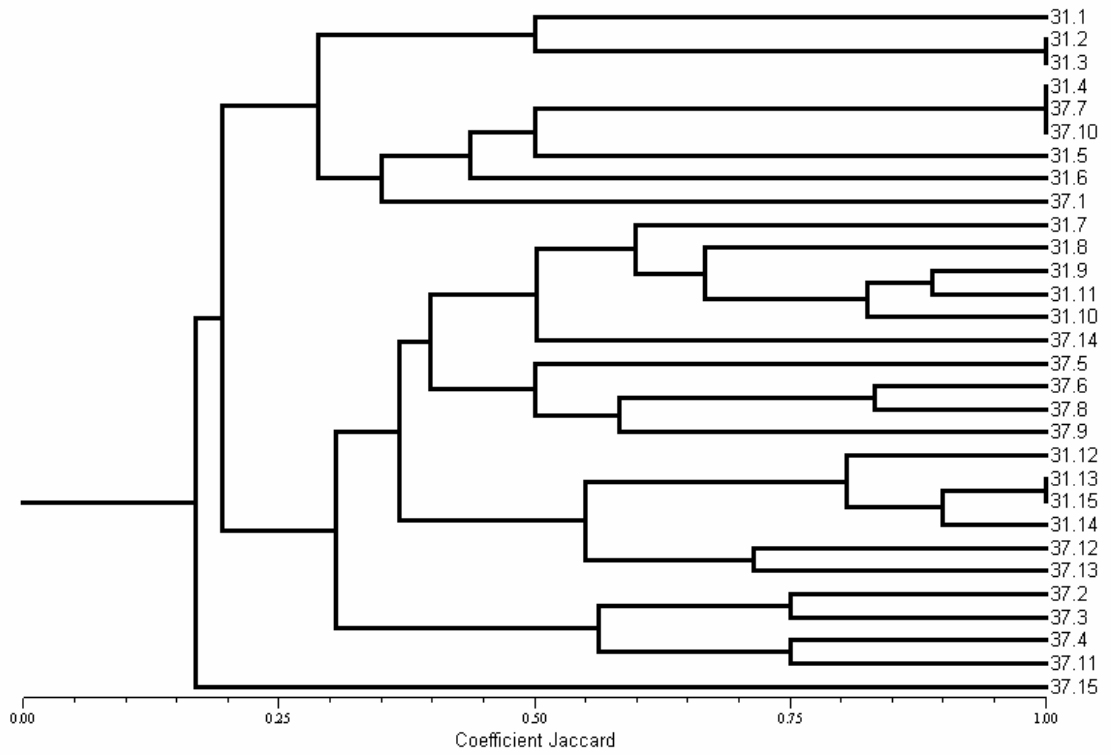


FIGURA 30 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 31 e 37 de *A. securigerifolia*.

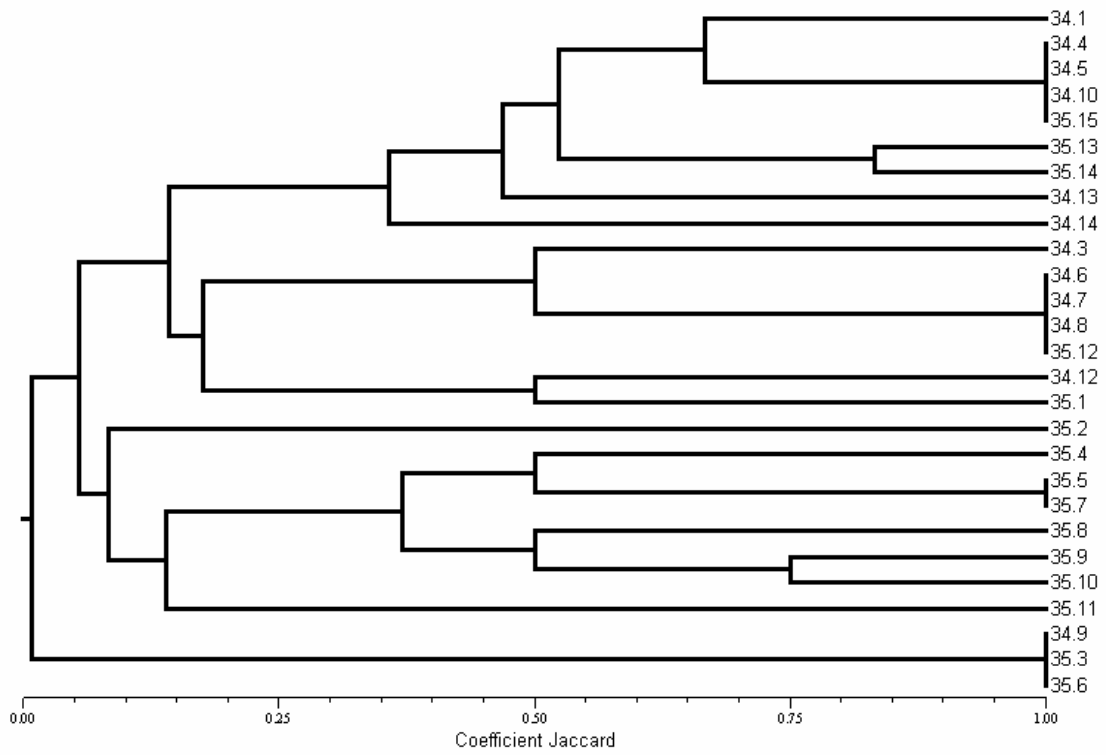


FIGURA 31 – Dendrograma análise comparativa acessos nº 34 e 35 de *A. tristis*.

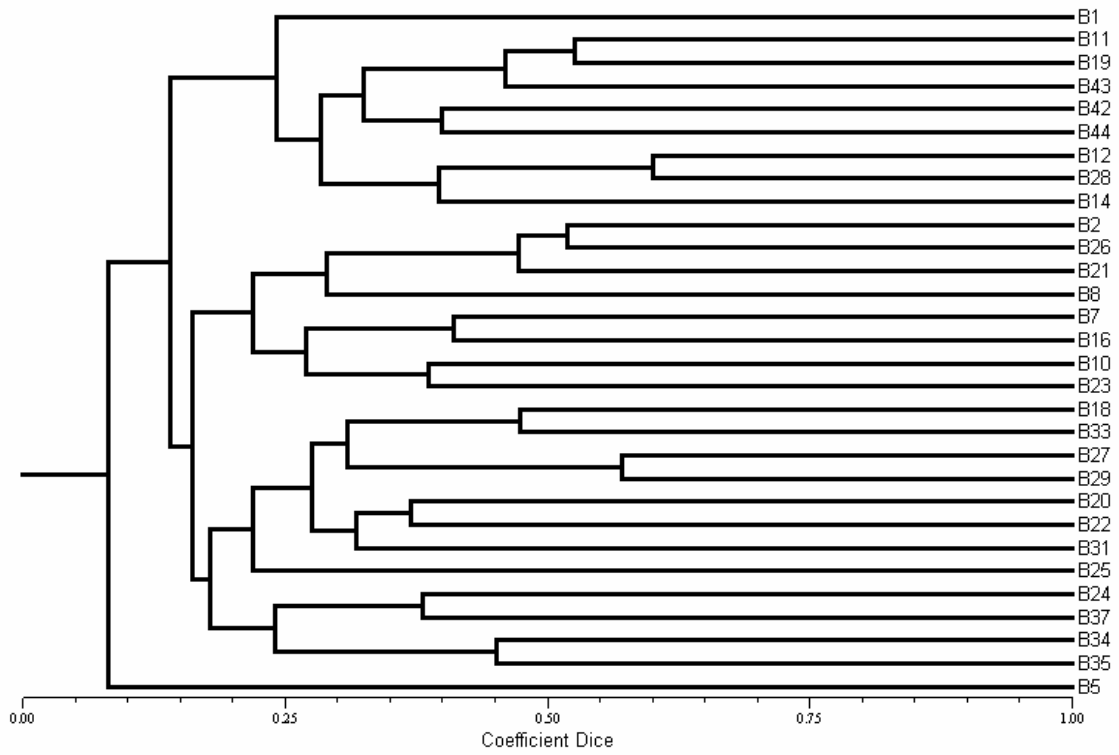


FIGURA 32 – Dendrograma análise comparativa acessos dos bulks dos acessos de todas as espécies.

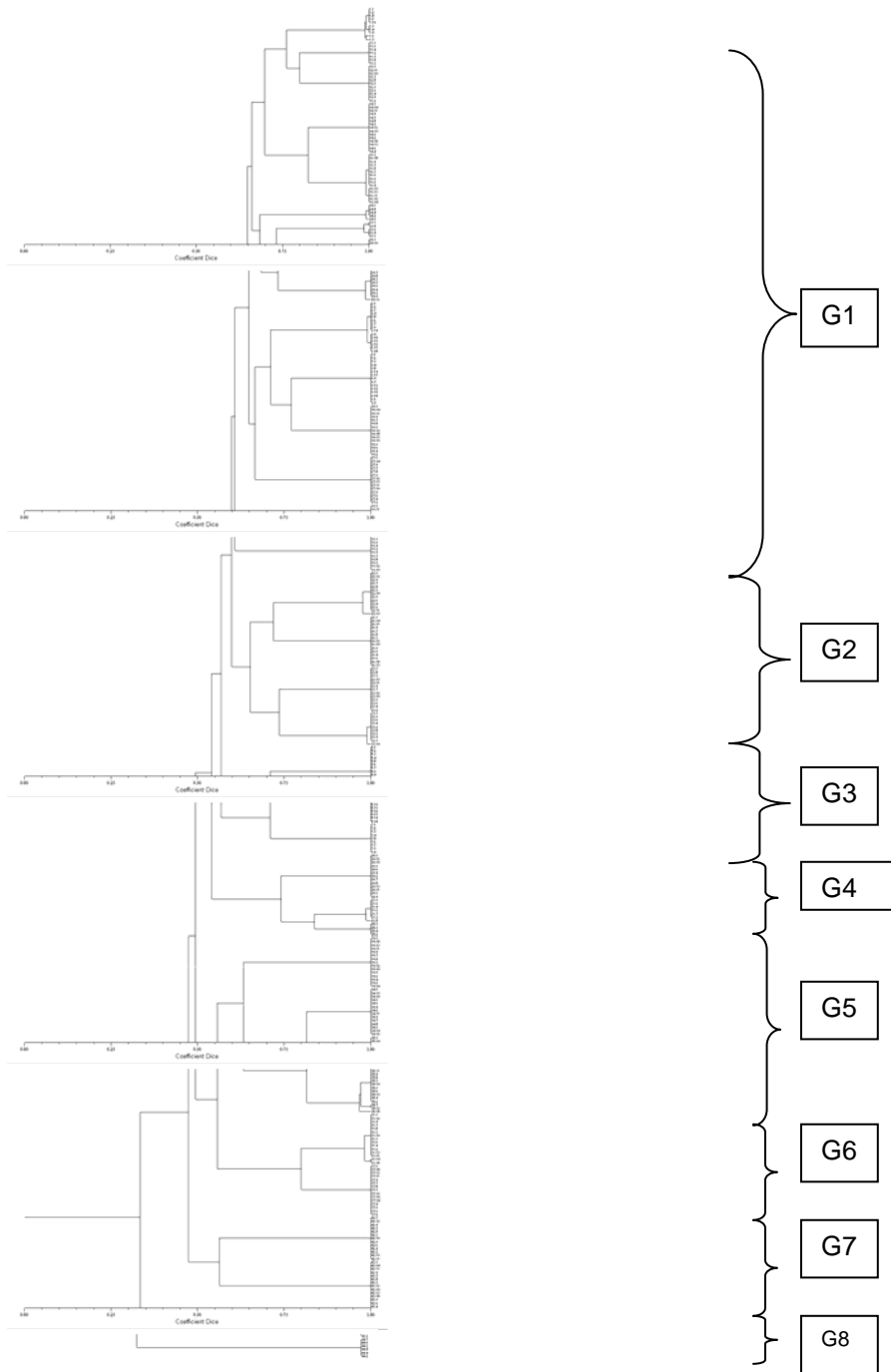


Figura 33 - Dendrograma Geral análise todas as espécies.

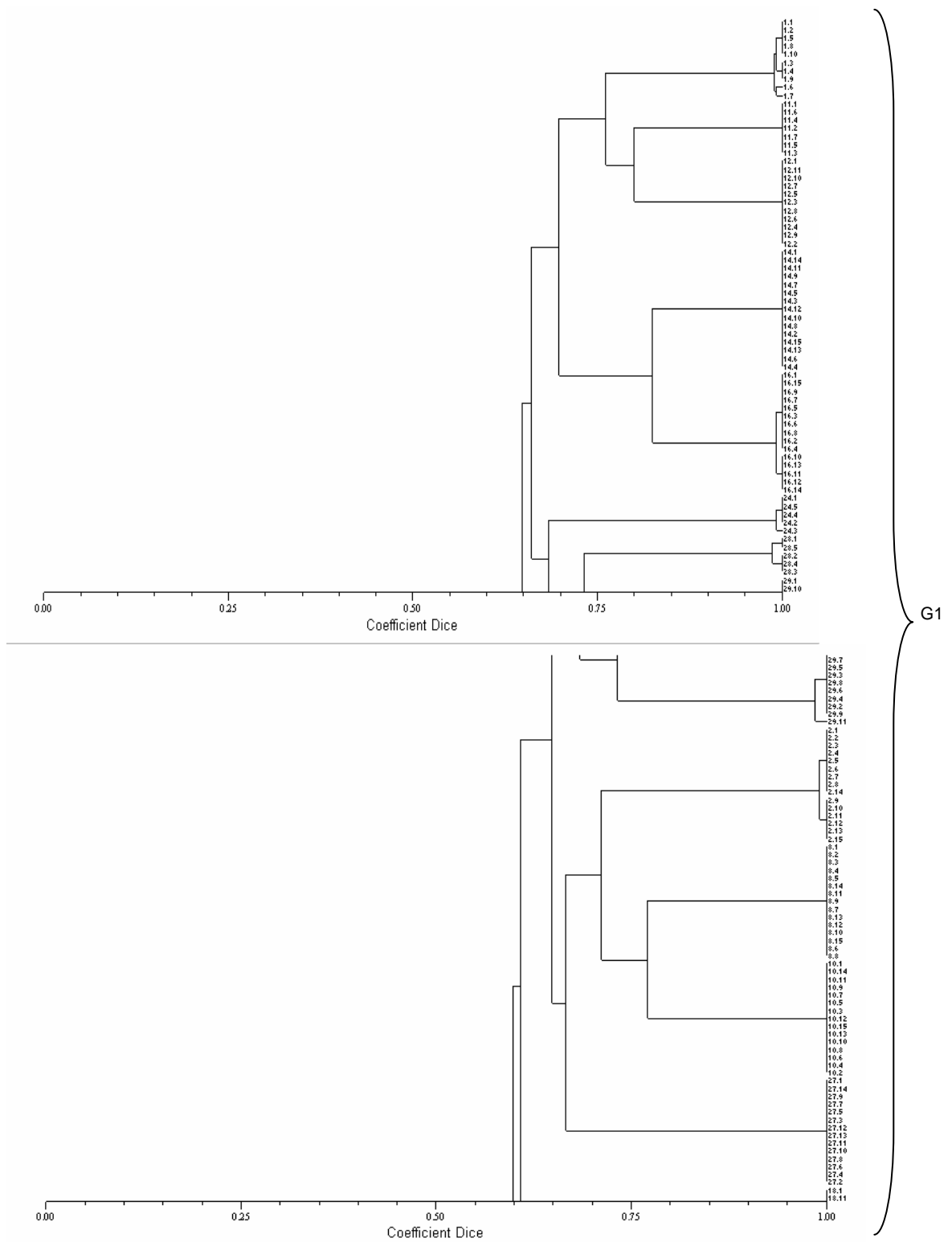


Figura 33 - Detalhe Grupo 1

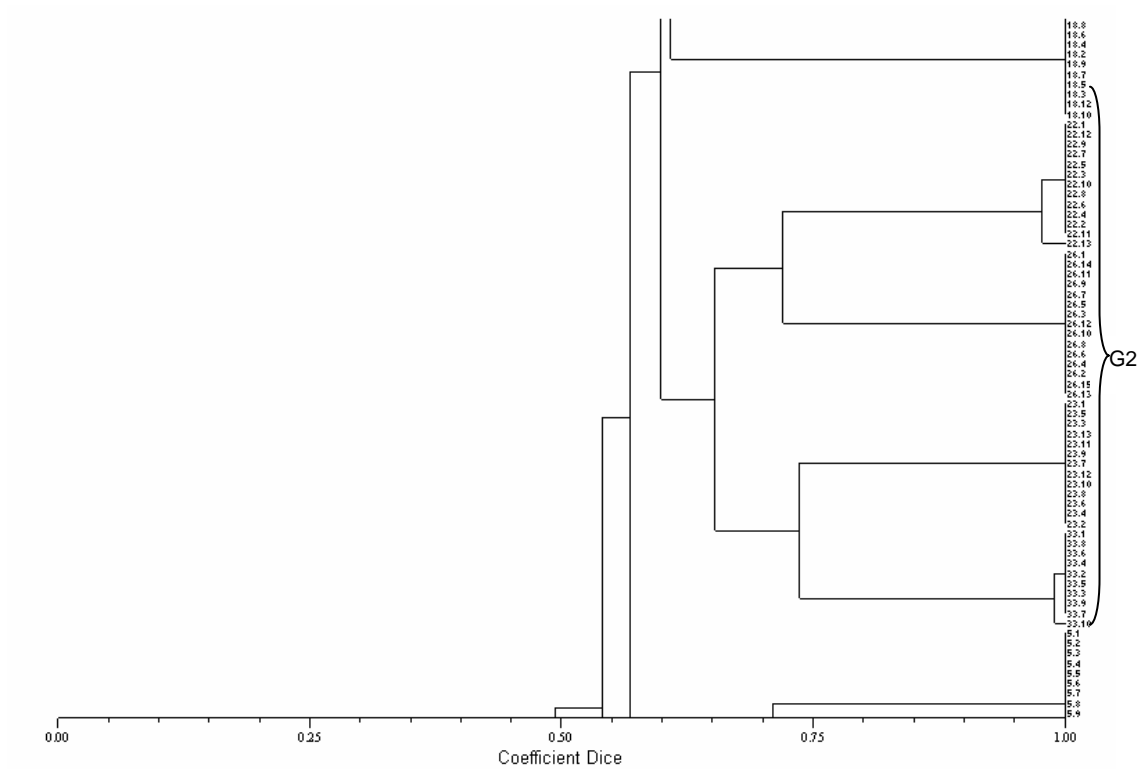


Figura 33 – Detalhe grupo 2.

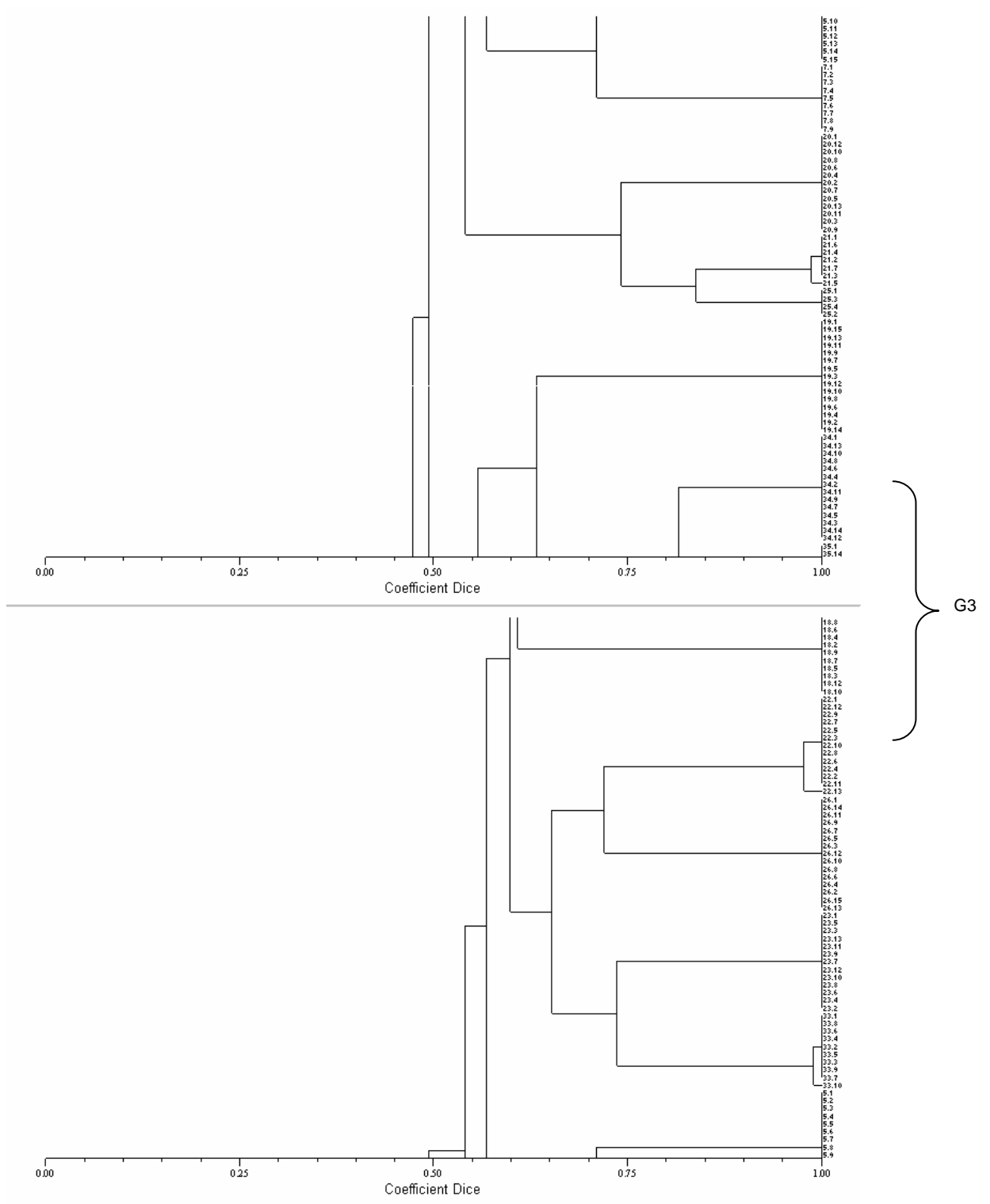


Figura 33 – Detalhe grupo 3.

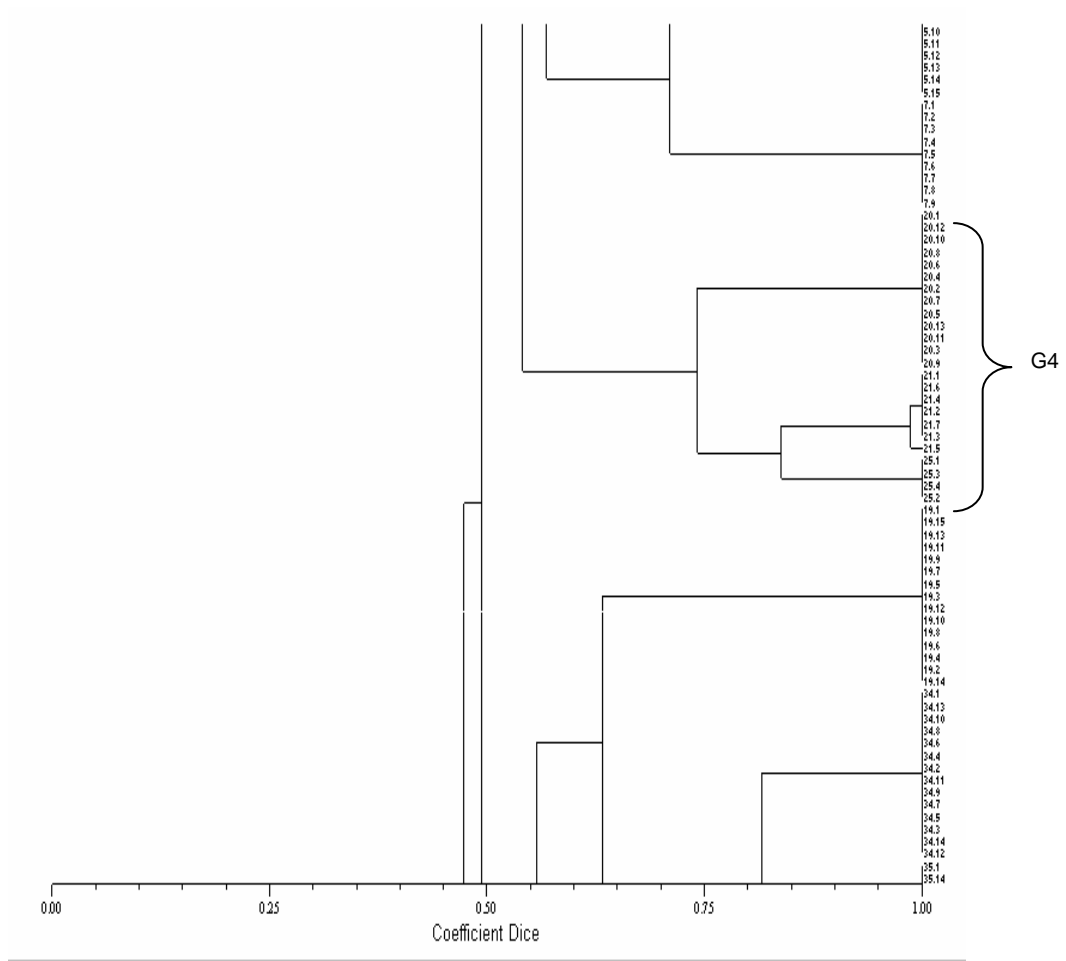


Figura 33 – Detalhe grupo 4.

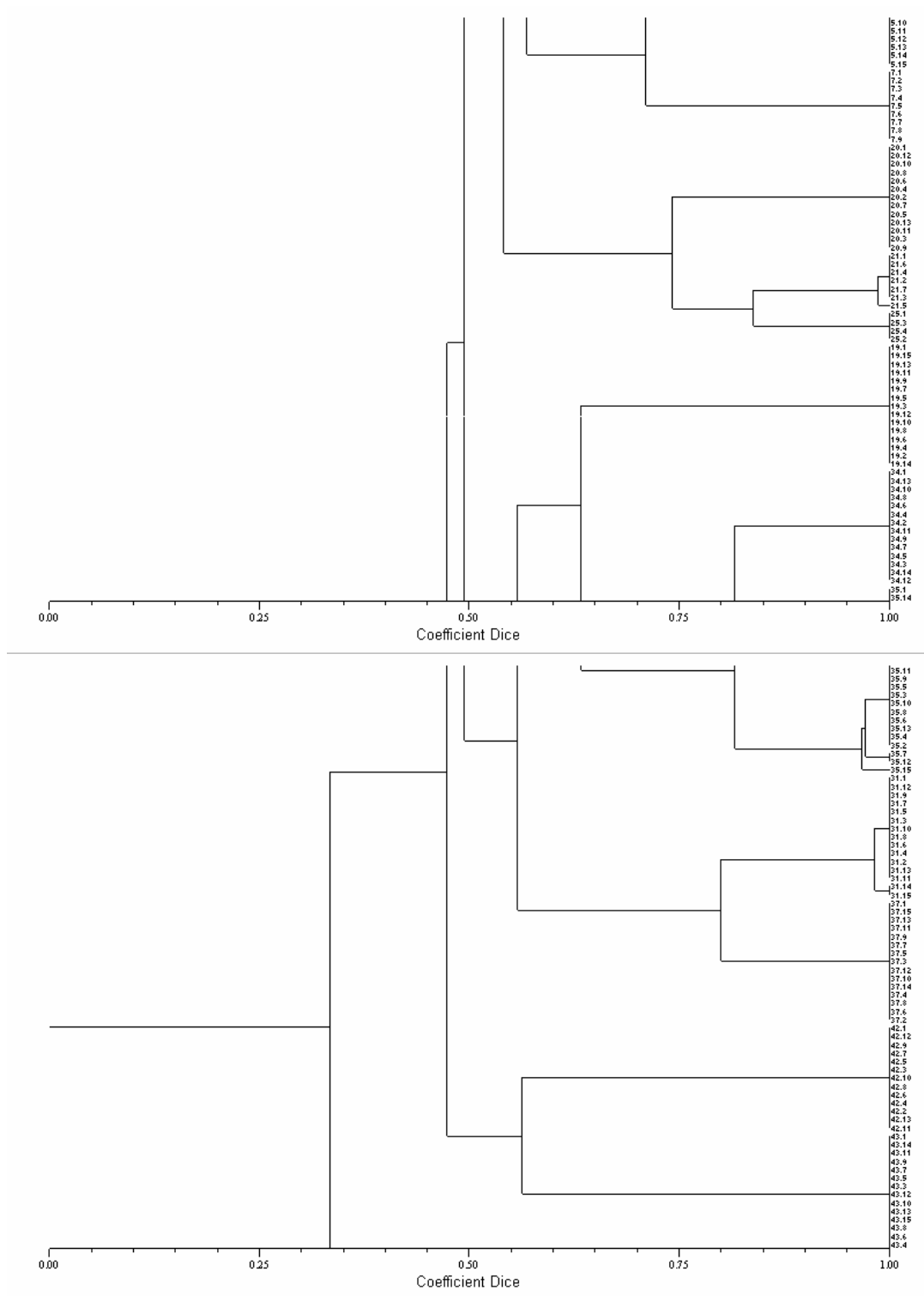


Figura 33 – Detalhe grupo 5

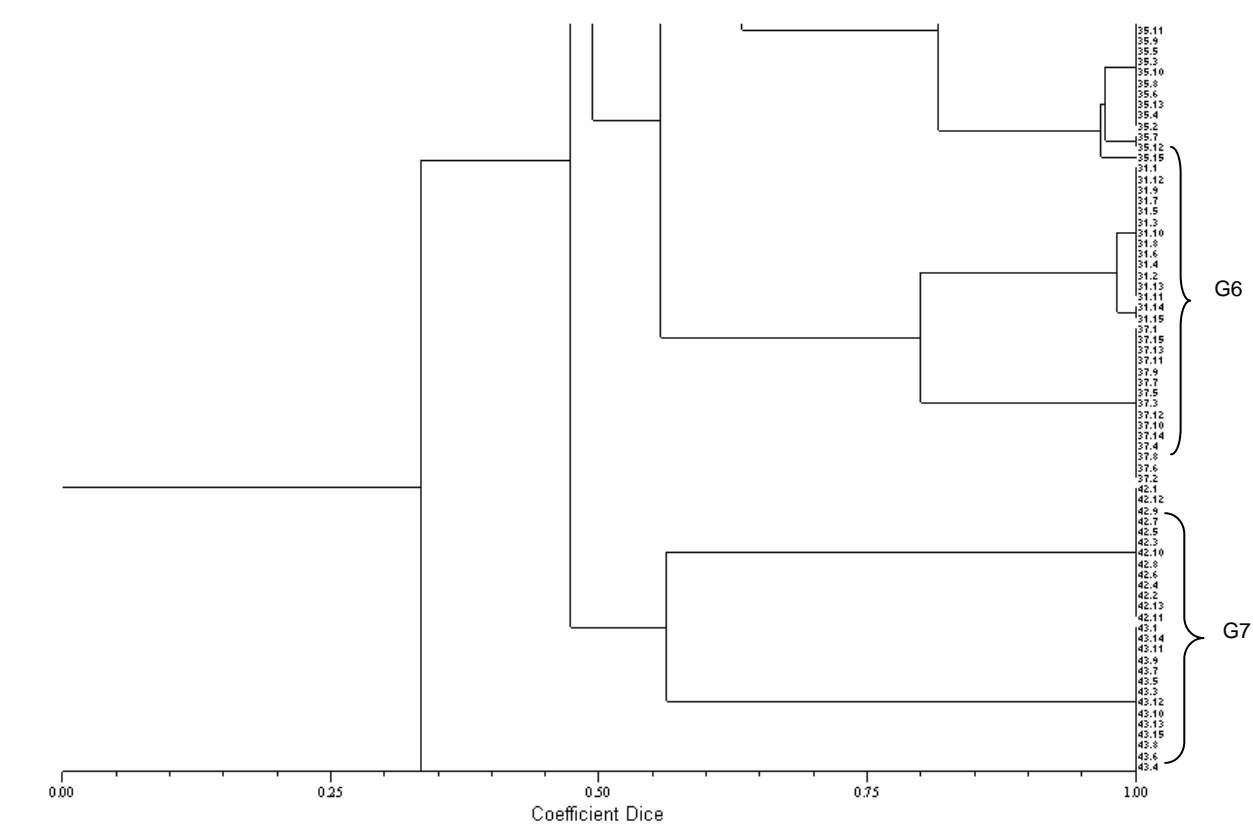


Figura 33 – Detalhe grupos 6 e 7

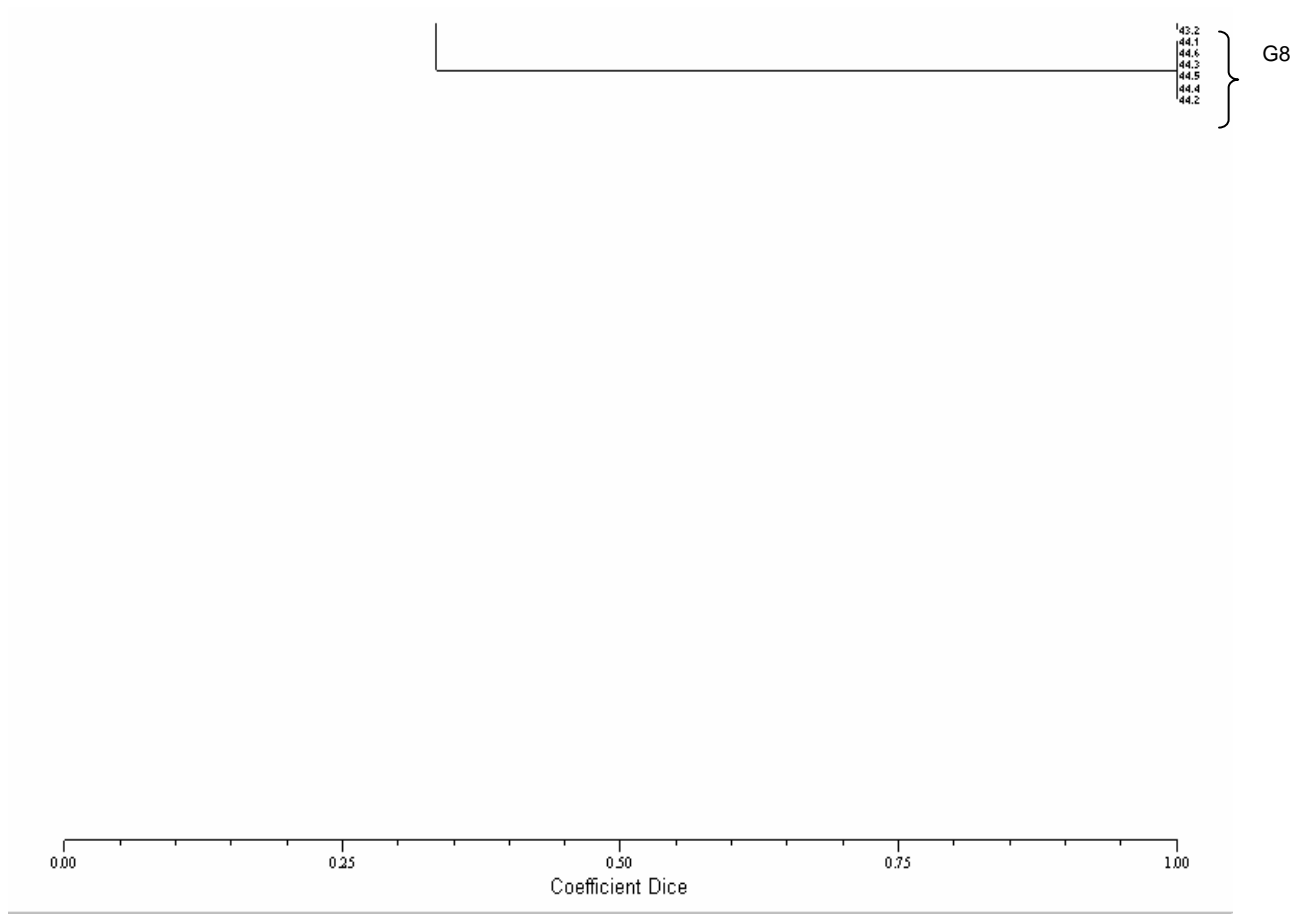


Figura 33 – Detalhe grupo 8

8. Conclusões

Os marcadores RAPD foram eficientes para detectar a variabilidade genética existente entre os diferentes acessos e espécies avaliadas.

Os *primers* e fragmentos utilizados conseguiram diferenciar todos os acessos e espécies analisados.

A variabilidade genética encontrada dentro de cada acesso e espécie concorda, em geral, com a partição esperada para os modos de reprodução indicados para as espécies.

A análise individual demonstrou ser mais indicada para a estimativa de variabilidade genética do que a análise realizada em *bulk*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; DUSI, A.; JUNIOR, F.M.Z. et al. **Eletoforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa.SIF: UFV,1998. 574p.
- AGUINAGA, A. A.; FRANKE, L. B.; MONTARDO, D.; CAMACHO, J.C. Respostas de sementes de *Adesmia latifolia* a diferentes profundidades de semeadura. In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL-ZONA CAMPOS, 19, 2002, Mercedes, Corrientes, Argentina. **Anais...**Mercedes: INTA, 2002.p.130.
- ARAÚJO, A. A. de. Leguminosas forrageiras Rio Grande do Sul. Babosas, Pega-pegas, urinária e outras. **Boletim da Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio**, Porto Alegre, v. 60, n. 2, p. 8-26, 1940.
- BARTISH, I. V.; JEPSSON, N.; NYBOM, H. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v.8, p. 791-802, 1999.
- BELLAVER, J. F.; FÃO, V. M.; VOSS, M. Análise de crescimento em estágio inicial de desenvolvimento de espécies do gênero *Adesmia* DC. In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL – ZONA CAMPOS, 17, 1998, Lages. **Anais...** Lages: Epagri, 1998.p.100.
- BEN, J. R.; LODI, B.; SCHEFFER-BASSO, S. M. Resposta de leguminosas nativas (*Adesmia*) ao aumento na disponibilidade de fósforo no solo. In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL – ZONA CAMPOS, 17, 1998, Lages. **Anais...** Lages: Epagri, 1998. p.89.
- BOLDRINI, I.I. Campos do Rio Grande do Sul: Caracterização fisionômica e problemática ocupacional. Flora ilustrada do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Biociências da UFRGS**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, n. 56, 39p.1997.
- BOLDRINI, I.I. Campos Sulinos: Caracterização e Biodiversidade. In: BIODIVERSIDADE, Conservação e Uso sustentável da Flora do Brasil. Recife: Editora da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2002. p.95.
- BÓREM, A. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 547p.
- BURKART, A. Sinopsis del género sudamericano de leguminosas *Adesmia* DC. **Darwiniana**, Buenos Aires, v. 14, n.2-3, p. 463-573, 1967.

- BUSO, G.S.C.; RANGEL, P.H.; FERREIRA, M.E. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza plumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p 107-117,1998.
- CAMACHO, J. C.; FRANKE, AGUINAGA, A. A.; FERREIRA, O. G. L. Insetos polinizadores nativos em *Adesmia latifolia* na depressão central –RS. In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL-ZONA CAMPOS, 19, 2002, Mercedes, Corrientes, Argentina. **Anais...Mercedes: INTA, 2002. p.114.**
- CHTOUROU-GHORBEL, N.; LAUGA, B.; BRAHIM, N.B. *et al.* Genetic variation analysis in the genus *Lathyrus* using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Wageningen. v.49, p. 363-370, 2002.
- COELHO, L. G. M.; BATTISTIN, A., Meiotic behavior of *Adesmia* DC. (*leguminosae- Faboideae*) species native to Rio Grande do Sul, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 3, p. 403-406, 1998.
- COLL, J.; ZARZA, A. Leguminosas nativas promissoras: trebol polimorfo y babosita. **Boletín de divulgación del INIA**, Montevideo, n.22, 1992,19p.
- CROCHEMORE, M. L.; HUYGHE, C.; ÉCALLE, C. *et al.* Structuration of alfalfa genetic diversity using agronomic and morphological characteristics. Relationship with RAPD markers. **Agronomie**, Paris, v. 18, p. 79-94, 1998.
- DALL' AGNOL, M.; GOMES,K. E. Qualidade de Forragem de Leguminosas do Gênero *Adesmia*. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 31, 1994, Maringá. **Anais... Maringá: [s.n.], 1994, p.653.**
- DALL' AGNOL, M.; NABINGER, C.; MONTARDO, D. *et al.* Estado atual e futuro da produção e utilização de leguminosas forrageiras na zona campos: RS. In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL-ZONA CAMPOS, 19, 2002, Mercedes, Corrientes, Argentina. **Anais... Mercedes:INTA, 2002. p.83.**
- del RIO, A. H.;BAMBERG, J. B. RAPD markers efficiently distinguish populations of wild potato (*Solanum*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Wageningen, v. 47, p. 115-121, 2000.
- DULSON, J.; LAIMA, S.K.; RIPLEY, V. L. Efficacy of bulked samples for RAPD fingerprinting of genetically complex *Brassica napus* cultivars. **Euphytica**, Wageningen, v. 102, p. 65-70, 1998.
- DUTRA, G. M.; SERPA, M. R.; D'ARCO, E. *et al.* Efeito da Adubação fosfatada no desenvolvimento inicial de *Adesmia latifolia*. In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL – ZONA CAMPOS, 17, 1998, Lages. **Anais... Lages: Epagri, 1998 a, p.91.**

- DUTRA, G. M.; MAIA, M. S., OLIVEIRA, J. C. P. Efeito de época e densidade de semeadura na produção de matéria seca de *Adesmia latifolia* no ano de estabelecimento. In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL – ZONA CAMPOS, 17, 1998, Lages. **Anais...**Lages: Epagri, 1998 b, p.123.
- DUTRA, G. M.; MAIA, M. S.; OLIVEIRA, J. C. P. Efeito da introdução de *Adesmia latifolia* sobre a produção de matéria seca do campo nativo. In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL – ZONA CAMPOS, 17, 1998, Lages. **Anais...**Lages: Epagri, 1998c, p. 170-172.
- DUTRA, G. M.; OLIVEIRA, J. C. P.; MAIA, M. S. Efeito da época de semeadura e período de corte sobre a qualidade da forragem de *Adesmia latifolia*. In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL – ZONA CAMPOS, 17, 1998, Lages. **Anais...**Lages: Epagri, 1998d, p. 173-175.
- FANG, G.; HAMMAR, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from Plant Genomic DNA. **BioTechniques**, Westborough, v.13, n.1, 1992.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1998.220 p.
- FRANKE, L. B.; SUÑE, A. D.; SAMPAIO, T. G. Efeitos do condicionamento osmótico no armazenamento de sementes de *Adesmia latifolia* (Spreng.) DC. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 11, n. 2, p. 68, 2001.
- GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St. – Hill., *Aquifoliaceae*) using RAPD markers. **Heredity**, Essex, v. 84, p. 647 –656, 2000.
- GERACI, A.; DIVARET, F. M.; CHEVRE, A.M. GENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN SICILIAN WILD POPULATIONS OF BRASSICA ANALYSED WITH RAPD MARKERS. PLANT BREEDING, BERLIN, V.120, P. 193-196, 2001.**
- GILLIES, A. C.M.; ABBOTT, R.J. Evaluation of random amplified polymorphic DNA for species identification and phylogenetic analysis in *Stylosanthes* (*Fabaceae*) **Plant Systematic Evolution**, Vienna, v. 211, p. 201-216,1998.
- GUIDET, F. A powerful new technique to quickly prepare hundreds of plant extracts for PCR and RAPD analyses. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v 22, p. 1772-1773, 1994.

- GUSTINE, D. L.; VOIGT, P. W.; BRUMMER, C. E. et al. Genetic variation of RAPD markers for North American White Clover collections and cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 343-347, 2002.
- GUSTINE, D. L.; SANDERSON, M. A. Quantifying spatial and temporal genotypic changes in White Clover populations by RAPD Technology. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 143-148, 2001.
- HALEY, S. D.; MIKLAS, P. N.; AFANADOR, L.; KELLY, J. D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. **Hortscience**, Alexandria, v.119, n 1, p. 122-125, 1994.
- HALLDÉN, C.; HANSEN, M.; NILSSON, N. O. et al. Competition as a source of errors in RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.93, p.1185-1192, 1996.
- IZAGUIRRE, P.; MÉROLA, S.; BEYHAUT, R. Seed ontogeny in *Adesmia securigerifolia* (Fabaceae – Adesmieae). **Nordic Journal of Botany**, Copenhagen, v.14, p. 547-556, 1994.
- JOHNSON, R. C.; JOHNSTON, W. J.; GOLOB, C.T. et al. Characterization of the USDA *Poa pratensis* using RAPD markers and agronomic descriptors. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Wageningen, v.49, p. 349-361, 2002.
- KONGKIATNGAM, P.; WATERWAY, M. J.; FORTIN, M. G.; COULMAN, B. E. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v.84, p. 237- 246, 1995.
- LANHAM, P. G.; FENNELL, S.; MOSS, J. P.; POWELL, W. Detection of polymorphic loci in *Arachis* germplasm using random amplified polymorphic DNAs. **Genome**, Ottawa, v.35, p.885 – 889, 1992.
- LIU, C.J. Geographical distribution of genetic variation in *Stylosanthes scabra* revealed by RAPD analysis. **Euphytica**, Wageningen, v.98, p.21-27, 1997.
- MENEZES, E. G. **Comportamento do florescimento, produção de sementes e de forragem de *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. em duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul.** 2001. 119f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- MENGONI, A.; GORI, A.; BAZZICALUPO, M. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. **Plant Breeding**, Berlin, v.119, p. 311-317, 2000.

- MICHELMORE, R. W. ; PARAN, I. ; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of National Academy Science**, Washington, v.88, p. 9828-9832, 1991.
- MILAN, P. A.; RITTER, W.; DALL' AGNOL, M. Seleção de leguminosas forrageiras tolerantes a alumínio e eficientes na utilização de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.1, p. 119-124. 1991.
- MIOTTO, S. T.S. **O gênero Adesmia DC. (Leguminosae- Faboideae) no Brasil**. Campinas, Instituto de Biologia, 1991. 307f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.
- MIOTTO, S. T. S.; LEITÃO FILHO, H. F. Leguminosae- Faboideae, Gênero Adesmia DC. Flora ilustrada do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Biociências** da UFRGS, Porto Alegre, n. 52, p. 1-157, 1993.
- MIOTTO, S.T.S.; WAECHTER, J. L. Considerações fitogeográficas sobre o gênero *Adesmia* (Leguminosae-Faboideae) no Brasil. **Boletim de la Sociedad Argentina de Botânica**, Argentina, v. 32, n.1-2, p. 59-66,1996.
- MIOTTO, S.T. S. Quatro espécies novas de Adesmia Dc. (Leguminosae-Faboideae) do sul do Brasil. **Bradea**, Rio de Janeiro, v.6, n. 29, p. 248-258, 1993.
- MIOTTO, S. T. S.; FORNI-MARTINS, E. R. Número cromossômico em espécies brasileiras de *Adesmia* DC. (Leguminosae- Faboideae). **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v.8, n.1, p. 3– 9, 1994.
- MOÇO, M. C. .; MARIATH, J. E. A. A radial symmetry at early stage floral organogenesis in *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. (Leguminosae-Papilionoideae). **Acta Microscópica**, Maracaibo, v. 8, suplemento C, p.789, 1999.
- MONTARDO, D. P.; CRUZ, F. P.; CAETANO, J. H.; BOLDRINI, I. I.; DALL'AGNOL, M. Efeito de dois tratamentos na superação da dormência de sementes de cinco espécies de Adesmia D.C. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.5, n.1, p.01-07, 2000.
- PÉRES, T.; ALBORNOZ, J.; DOMINGUEZ, A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p. 1347-1357, 1998.
- PINTO, R. J. B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá : EDUEM, 1995.
- RIBEIRO F^o, H. M. N.; MELLO, E. L.; HONCZARYK, R. C. A.; ROSA, J.L.; RIBEIRO, S. R.; WINCK, C. A. Degradabilidade ruminal de matéria seca

(MS) e da proteína bruta (PB) de quatro leguminosas perenes de inverno. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 33, 1996, Fortaleza. **Anais ...** Fortaleza: [s.n.], 1996, p.367-369.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version. 2.1. New York: Exeter Software, 2001.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; JACQUES, A. V. A.; RIBOLDI, J.; CASTRO, S. Qualidade da forragem de espécies de *Adesmia* DC. e *Lótus* L.: - Proteína Bruta de Digestibilidade *in vitro* de matéria orgânica In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL – ZONA CAMPOS, 17, Lages. **Anais...** Lages: Epagri,1998, p.116.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; VENDRUSCULO, M. C. Germinação de sementes das leguminosas forrageiras nativas *Adesmia araujoii* Burk. e *Desmodium incanum* DC. **Revista Agrociência**, Pelotas, v. 3, n. 2, 1997.

SCHEFFER-BASSO, S. M. **Caracterização morfofisiológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de *Adesmia* DC. E *Lotus* L.**1999. 276f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; DALL' AGNOL, M.; CAETANO, J.H.S.; JACQUES, A. V. A. Crescimento de plântulas de *Adesmia* spp. submetidas a doses de alumínio em solução nutritiva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 217- 222, 2000.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; JACQUES, A. V. A.; DALL'AGNOL, M. Alocação da biomassa e correlações morfofisiológicas em leguminosas forrageiras com hábitos de crescimento contrastantes. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.59, n. 4, p. 629-634, 2002.

STEINER, J. J.; POKLEMBIA, C. J., et al. A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. **Nucleic Acids Research**, Oxford, p. 2569-2570, 1995.

STOSKOPF, N. C.; DWIGHT, T. T.; CHRISTIE, B. R. **Plant Breeding: Theory and Practice**. Oxford :Westview, 1993.

SWEENEY, P. M.; DANNEBERGER, K. T. Random amplified polymorphic DNA in perennial ryegrass: A comparison of bulk samples vs. Individuals. **Hortscience**, Alexandria, v. 29, n.6, p.624-626, 1994.

TEDESCO, S. B.; STEFANELLO, M. O.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. et al. Superação de dormência em sementes de espécies de *Adesmia* DC. (*Leguminosae*). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 2, p. 89-92. 2001.

- TEDESCO, S. B.; DALL`AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T., Observações sobre o modo de reprodução em *Adesmia latifolia* Spreng. Vog. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n.1, p. 141-142, 1998.
- TEDESCO, S. B. **Morfologia, microsporogênese e modo de reprodução das espécies brasileiras do gênero *Adesmia* DC. (*Leguminosae*)**. 2000. 163f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- TEDESCO, S. B.; DALL`AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; VALLS, J. F. M. Mode of reproductions of Brazilian species of *Adesmia* (*leguminosae*). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 2, p. 475-478, 2000.
- TEDESCO, S. B.; DALL`AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Meiotic behavior and pollen fertility in the seventeen Brazilian species of *Adesmia* DC. (*Leguminosae*). **Caryologia**, Firenze, v.55, n. 4, p. 341-347, 2002.
- THOMPSON, J. A.; RANDALL, N. L. Core set of primers to evaluate genetic diversity in Soybean. **Crop Science**, Madison, v. 38, p 1356-1362, 1998.
- THOMPSON, J. A.; RANDALL, N. L; VODKIN, L. Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 1348-1355, 1998.
- VALLS, J. F. M., **Notas sobre a taxonomia, disponibilidade de germoplasma e problemas para a utilização forrageira de *Adesmia* spp. no sul do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa: Cenargen, 1984 (Datilografado).
- VALLS, J. F. M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. In: ENCONTROS SOBRE RECURSOS GENÉTICOS [1998], Jaboticabal, SP. **Resumos**. [s.l.: s.n.],1988. p. 106-127.
- VIDOR, M. A ; PÉREZ, C. Ensaio in vitro de tolerância ao alumínio e baixo teor de fósforo de *Adesmia tristis* e *Lótus uliginosus*. In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL – ZONA CAMPOS, 17., 1998, Lages. **Anais...** Lages: Epagri, 1998. p.96.
- WANG, H.; MEIQING, Q.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v21, p. 4153-4154, 1993.
- WELSH, J. ; MCCLELLAND, M.. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v18, p. 7213 – 7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v18, p. 6531-6535, 1990.

