

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Raquel Morais de Paiva

**DIVERSIDADE GENÉTICA ESTIMADA POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES EM POPULAÇÕES DE *LOLIUM MULTIFLORUM***

Juiz de Fora
2015

RAQUEL MORAIS DE PAIVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA ESTIMADA POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES EM POPULAÇÕES DE *LOLIUM MULTIFLORUM***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Co-orientadora: Ana Luisa Sousa Azevedo

Juiz de Fora

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Paiva, Raquel Morais de.

Diversidade genética estimada por meio de marcadores microssatélites em populações de *Lolium multiflorum* / Raquel Morais de Paiva. -- 2015.

58 f. : il.

Orientador: Lyderson Facio Viccini

Coorientadora: Ana Luisa Sousa Azevedo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2015.

1. Azevém. 2. Marcadores moleculares. 3. Microssatélite.
4. Diversidade genética. I. Viccini, Lyderson Facio, orient.
II. Azevedo, Ana Luisa Sousa, coorient. III. Título.

RAQUEL MORAIS DE PAIVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA ESTIMADA POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES EM POPULAÇÕES DE *LOLIUM MULTIFLORUM***

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Data de Aprovação: 23 de Fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini - Orientador

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Ana Luisa Sousa Azevedo – Co-Orientadora

Instituição: Embrapa Gado de Leite

Dr^a. Andréa Mittelmann

Instituição: Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora

2015

"O essencial é invisível aos olhos."

O Pequeno Príncipe

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFJF, instituição da qual sou aluna desde a graduação, à FAPEMIG pelo financiamento da bolsa de estudos. E às demais fontes financiadoras do projeto, CNPq, Embrapa e CAPES. Em especial à Embrapa, que foi o local onde tudo foi possível.

Agradeço aos meus pais, Rosangela e Jesus, que estiveram sempre ao meu lado me apoiando e incentivando e pelos valores e educação oferecidos.

Ao meu namorado, Victor, pelo amor, companheirismo e por ser compreensivo nos momentos que fomos obrigados a abrir mão do que queríamos pelo futuro um do outro, mesmo que isso nem sempre tenha sido decidido sem alguma discussão.

Em especial, gostaria de agradecer ao meu orientador, o professor doutor Lyderson Facio Viccini, por todo o apoio e por aceitar o desafio que eu propus no início do meu mestrado, me proporcionando trabalhar com algo que nem eu mesma tinha certeza do que seria, mas que hoje posso dizer que valeu a pena!

À doutora Ana Luisa Sousa Azevedo pela orientação na Embrapa Gado de Leite. Aprendi bastante neste um ano e meio trabalhando com um assunto, até então desconhecido por mim.

À doutora Andréa Mittelman pela colaboração na pesquisa e no material, de suma importância para o andamento do trabalho.

Ao professor doutor Marco Antônio Machado, e futuro orientador, por me receber tão bem e disponibilizar seu laboratório e tudo o mais que foi necessário para que esta pesquisa acontecesse.

Ao pessoal do laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, pelo companheirismo, pelas conversas, risadas e festinhas surpresas, nem mais tão surpresas assim. Em especial à Daniele, Sabine, Lorena, Fernando e Karina que desde o começo formamos uma equipe de ajuda mútua. E às meninas Alessa, Isabela Fonseca, Isabella Barreto, Isabela Motta, Juliana, Gisele e Sula e ao Felipe pela ótima vivência e ensinamentos.

RESUMO

O estudo de diversidade genética é importante na caracterização de populações de espécies vegetais como forrageiras. O aumento da produtividade é um objetivo constante do melhoramento das forrageiras e depende diretamente da diversidade genética existente. O Azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma forragem de inverno, muito utilizada para o gado devido à sua alta palatabilidade, digestibilidade e resistência ao pisoteio. A espécie é proveniente da Europa e, largamente utilizada no Sul do Brasil. Como parte do Programa de Melhoramento de Azevém da Embrapa Gado de Leite o presente trabalho teve como objetivo principal estimar a diversidade genética de 32 populações de azevém. O DNA de 628 indivíduos foi extraído, e marcadores microssatélites obtidos por amplificação cruzada foram utilizados. Um dendrograma foi gerado pelo algoritmo UPGMA, usando-se o software NTSYS, através do coeficiente de similaridade de Dice. Dentre os trinta e cinco pares de primers testados, vinte e cinco (71,5%) apresentaram amplificação cruzada em *L. multiflorum*, demonstrando a eficiência de utilização de marcadores desenvolvidos para espécies proximamente relacionadas. Quinze marcadores foram selecionados com base no sucesso da amplificação cruzada e maior número de polimorfismos. Os valores da matriz de coeficientes de similaridade obtidos variaram de 0,43 a 0,93. Observou-se a presença de divergência genética entre as populações, indicando que elas possuem uma ampla base genética. Este resultado está de acordo com a extensa distribuição geográfica e com o sistema alógamo de reprodução da espécie.

Palavras chave: Azevém, marcadores moleculares, microssatélite, diversidade genética.

ABSTRACT

The genetic diversity estimation is important to characterize plant populations including forage species. The increase of productivity is a constant objective in forage breeding programs and is directly dependent of the genetic diversity. The ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) is a winter grass, widely used for cattle due to its high palatability, digestibility and resistance to trampling. The species was introduced from Europe and is widely used in southern Brazil. As part of The Embrapa Dairy Cattle Ryegrass Breeding Program, the present work aimed to estimate the genetic diversity among 32 ryegrass populations. The DNA of 628 individuals was extracted and microsatellite markers obtained by cross amplification were used. A dendrogram was generated by UPGMA algorithm, using NTSYS software and Dice's similarity coefficient. Among the thirty-five pairs of tested primers, twenty five (71.5%) showed cross amplification in *L. multiflorum*, demonstrating the efficiency of using cross amplification of microsatellite markers from related species. Fifteen markers were chosen based on the cross amplification success and the level of polymorphism. The values of similarity coefficient matrix varied from 0.43 to 0.93. Genetic divergence among the populations was observed, indicating that the populations possess a wide genetic base. This result corroborates the wide geographical distribution and the allogamous reproduction system previously reported for the species.

Keywords: Ryegrass, molecular markers, microsatellite, genetic diversity.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1. Esquema de amplificação de uma reação única de PCR. 18
- Figura 2. *Lolium multiflorum* _ Azevém. Copyright © 2005 Brianna M. Richardson. 22
- Tabela 1. Informações sobre as populações de azevém. 27
- Tabela 2. Primers utilizados no teste de amplificação em *Lolium multiflorum*, suas respectivas sequências *forward* e *reverse*, referência de origem de cada marcador microssatélite e taxa para o qual o marcador foi descrito originalmente. 30
- Figura 3. Teste de primers realizado em gel de agarose 2% com marcador de peso molecular de 200-pb. 35
- Tabela 3. Marcadores microssatélites selecionados conforme teste de amplificação e polimorfismo em indivíduos de *Lolium multiflorum*. Temperatura de anelamento dos primers (TA), tamanho original do fragmento amplificado de acordo com a literatura, tamanho do fragmento obtido neste trabalho para cada marcador e taxa para o qual o marcador foi descrito originalmente. 38
- Figura 4. Dendrograma obtido pelo algoritmo UPGMA dos 63 *bulks* de azevém pertencentes ao Programa de Melhoramento de Azevém da Embrapa Gado de Leite. Os números em cada ramificação indicam os valores de *bootstrap*. 39
- Figura 5. Gráfico de porcentagens de variância molecular obtido através do software GenAlex. 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Grau Celsius

DNA – “Deoxyribonucleic acid” – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribunucleotídeos trifosfato

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GE – “General Eletric”

h – Hora

M – Molar

min – Minuto

mM - Milimolar

ng - Nanograma

NTSYS – “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System” - Taxonomia Numérica e Sistema de Análise Multivariada

pb – Pares de bases nucleotídicas

PCR – “Polymerases Chain Reaction” – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Inverso do logaritmo da concentração de H +

s – Segundo

SSR – “Simple Sequence Repeats” – Marcador Microsatélite

TA – Temperatura de anelamento dos primers

Taq – *Thermus aquaticus*

UPGMA – “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”

V – Volt

µl - Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 DIVERSIDADE GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS.....	13
1.2 APLICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA	14
1.3 MELHORAMENTO DE PLANTAS FORRAGEIRAS	18
1.4 CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO <i>LOLIUM</i> E DA ESPÉCIE <i>LOLIUM MULTIFLORUM</i>	20
1.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DE <i>LOLIUM</i> SPP.....	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 MATERIAL VEGETAL	26
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	28
3.3 AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM MARCADORES MICROSSATÉLITE	28
3.4 DETECÇÃO DO TAMANHO DO FRAGMENTO DE DNA	32
3.5 DIVERSIDADE GENÉTICA	32
4 RESULTADOS	34
4.1 AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM MARCADORES MICROSSATÉLITE	34
4.2 DETECÇÃO DOS TAMANHOS DOS FRAGMENTOS DE DNA	36
4.3 DIVERSIDADE GENÉTICA	36
5 DISCUSSÃO	41
5.1 AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM MARCADORES MICROSSATÉLITE E DETECÇÃO DOS TAMANHOS DOS FRAGMENTOS DE DNA	41
5.2 DIVERSIDADE GENÉTICA	42
6 CONCLUSÕES	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO A – RESUMO PUBLICADO.....	57

1 INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos vegetais são fonte importante para a diversidade genética, que garante a variabilidade entre os indivíduos de uma espécie e a sustentabilidade de um ecossistema.

Estudar a diversidade genética de um grupo de seres vivos significa buscar variações biológicas hereditárias acumuladas durante o processo evolutivo. Em uma mesma espécie, procura-se por polimorfismos (SANTOS et al., 2009), que podem ser gerados por mutações na sequência de DNA, seleção, migração, deriva genética e recombinação e resultam em novos alelos ou genes. Os polimorfismos são investigados visando compreender qual o parentesco entre indivíduos, relações filogenéticas, se existe ou não fluxo gênico entre populações etc.

Quanto maior o polimorfismo encontrado na molécula de DNA, maior é a chance de existirem variáveis alélicas que conferem vantagens adaptativas aos desafios ambientais. A diversidade genética é encontrada entre indivíduos de uma espécie, que mesmo morfologicamente similares, diferem geneticamente entre si (CANÇADO, 2009).

Como importante instrumento na detecção de variação genética e seleção de genótipos mais produtivos, o estudo da diversidade genética em plantas cultivadas tem grande contribuição para o crescente aumento da produção em diferentes espécies cultivadas (MACHADO, 2014). Entre elas, as forrageiras desempenham um papel particularmente importante na alimentação de rebanhos que tem como finalidade tanto a produção de leite como de carne.

1.1 DIVERSIDADE GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS

Segundo Borém e Miranda (2009) o melhoramento de plantas pode ser definido como a arte e a ciência que visam à modificação genética das plantas para torná-las mais úteis aos homens, animais e ambiente. O melhoramento de plantas provavelmente surgiu com a agricultura sendo, no início, um processo arbitrário, baseado em características fenotípicas. Após o trabalho de Mendel, o entendimento do processo de hereditariedade contribuiu muito para aprimorar as técnicas de melhoramento vegetal e a seleção de indivíduos, direcionando o perfil fenotípico dos descendentes de acordo com o interesse do melhorista (BORÉM, 2005).

O melhoramento de plantas pode ter objetivos que requerem conhecimentos de diversas áreas, não cabendo ao melhorista conhecer todas. O trabalho em equipes multidisciplinares visa dominar outras ciências fundamentais, como genética molecular, nutrição e ciência do solo (BORÉM e MIRANDA, 2009).

A genética molecular é um ramo das ciências biológicas que estuda a composição e função de genes ao nível molecular. Com aplicabilidade em diversas áreas como ecologia, saúde, zoologia e botânica, os conhecimentos de genética e técnicas da biologia molecular são empregados em estudos que visam à detecção de mutações gênicas, análises de polimorfismos de DNA, identificar padrões de expressão gênica, auxiliar em questões de taxonomia molecular e de microorganismos e também em genética forense. Além dessas, em outras áreas como o melhoramento genético técnicas de biologia molecular são comumente empregadas (BORÉM e MIRANDA, 2013).

Neste contexto, informações precisas sobre a diversidade genética e a frequência gênica populacional gerada através de marcadores moleculares são bastante úteis em todas as fases dos programas de conservação e uso de recursos genéticos (HARTL e CLARK, 1989; OUBORG, PIQUOT e VAN GROENENDAEL 1999), facilitando a seleção de genótipos que sejam úteis em programas de melhoramento genético. A manutenção dos bancos de germoplasma e a conservação de seus acessos são essenciais ao melhoramento genético, pois são fontes de variabilidade. As atividades de conservação e uso de germoplasma

envolvem a coleta, a manutenção, a caracterização e a valoração da diversidade genética existente. A caracterização é um aspecto crucial em todo o processo, pois permite identificar genes envolvidos em características agronômicas de interesse, auxiliando na definição das estratégias de uso e conservação dos recursos (GONÇALVES et al., 2008; CANÇADO, 2009).

A caracterização pode ser realizada por meio de caracteres morfológicos, que embora seja crucial, é influenciada pelas condições ambientais, ou por meio de caracteres moleculares. Marcadores moleculares são muito utilizados para caracterização da variabilidade e divergência genética em nível de DNA e não apresentam interferências do ambiente. Eles podem ser utilizados para estimar a diversidade genética, facilitar a seleção genotípica, identificar germoplasma, construir mapas genéticos e obter informações sobre a estrutura das características quantitativas (e.g. GONG e DENG, 2012; MUZZALUPO, VENDRAMIN e CHIAPPETTA, 2014; TAKAHASHI et al., 2014; GARCÍA-VERDUGO et al., 2015; LI et al., 2015; YU et al., 2015). Assim, ambas as avaliações, morfológica e molecular, complementam-se e podem elucidar melhor a variabilidade existente quando associados (CARELLI, 2003; BORÉM e MIRANDA, 2009).

1.2 APLICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Marcadores moleculares são fragmentos específicos de DNA que, com uso de várias técnicas, podem ser identificados no genoma do organismo sob estudo. As principais vantagens dos marcadores moleculares são o número quase ilimitado, a possibilidade de automação e a elevada quantidade de análises possíveis (KÖLLIKER, ROSELLINI e WANG, 2010).

A capacidade de distinguir entre acessos de populações distintas que podem estar coexistindo fazem dos marcadores moleculares valiosas ferramentas (AVISE, 1994). Atualmente, estão disponíveis diversos marcadores moleculares com características específicas, sendo normalmente desenvolvidos para espécies-

modelo ou de elevada importância econômica (GOULART et al., 2011). A escolha dos marcadores genéticos é decidida por fatores como custo de desenvolvimento, facilidade e transmissibilidade dentro da mesma espécie ou espécies diferentes (KING et al., 2008).

Dentre os diversos marcadores moleculares disponíveis, uns dos mais utilizados são os marcadores microssatélites, já descritos para diferentes famílias, tais como Poaceae (MATAKIS et al., 2011), Rosaceae (GERMAIN-AUBREY et al., 2010), Bignoniaceae (YU et al., 2011), Amaranthaceae (FIGUEIRA et al., 2011) e Polygonaceae (MATESANZ et al., 2011).

Marcadores microssatélites (Simple Sequence Repeats – SSR) envolvem reação em cadeia da polimerase (PCR) de pequenos motivos de sequências repetitivas de dois ou mais nucleotídeos, amplamente encontrados nos genomas eucariotos. Os SSRs são inestimáveis ferramentas para a análise genética de características agrônomicas e análises de diversidade genética devido à facilidade de se encontrar polimorfismos entre indivíduos próximos e sua natureza codominante, aliado à sua especificidade de sequência e alta reprodutibilidade (KÖLLIKER, ROSELLINI e WANG, 2010), além da possibilidade de automação (HERNÁNDEZ et al., 2002). São largamente encontrados em procariotos e eucariotos e podem ser encontrados tanto em regiões codificantes quanto não codificantes (ASP et al., 2007).

A taxa de mutações de microssatélites pode ser superior à de mutações pontuais (HANCOCK, 1999), o que o torna o marcador de escolha para muitas análises genéticas, sendo inclusive amplamente utilizados para estudos filogenéticos em muitas espécies selvagens e de culturas e entre congêneres (SENDA et al., 2003). Devido à sua alta taxa de mutações, essas regiões geram grande interesse na genética de populações. As mutações resultam em marcadores altamente polimórficos, permitindo discriminação genética entre indivíduos proximamente relacionados, mesmo empregando um número relativamente baixo de marcadores (GOULART et al., 2011). Estes polimorfismos genéticos surgem devido a variações no número de unidades repetidas, provavelmente causados por erros durante a replicação do DNA (LEVINSON e GUTMAN, 1987).

A maior desvantagem dos marcadores microssatélites é a necessidade de serem identificados através de informações de sequenciamento do genoma de cada espécie examinada pela primeira vez (SUDHEER et al., 2011). O alto custo e a

laboriosidade na identificação de marcadores microssatélites faziam seu desenvolvimento e aplicação em plantas serem restritos a poucas culturas de importância agrícola e econômica (PEAKALL et al., 1998; KULEUNG et al., 2004). Porém com o advento das novas tecnologias de sequenciamento e o desenvolvimento de metodologias como genotipagem por sequenciamento fizeram estes custos baixarem substancialmente, o que permitiu expandirem-se as pesquisas para as ditas culturas órfãs (VARSHNEY et al., 2012).

Uma alternativa viável para identificar marcadores microssatélite em espécies com pouca informação de genoma é utilizar a amplificação cruzada entre espécies relacionadas. Neste caso, não é necessário que existam informações prévias de sequenciamento do genoma da espécie em estudo. Em adição à redução de custos, esta estratégia reduz o tempo necessário para a identificação dos marcadores microssatélites em várias espécies (ROA et al., 2000; LORIEUX, NDJIONDJOP e CHESQUIÈRE, 2000; BRONDANI et al., 2003; ZHANG et al., 2005). Os melhores resultados são obtidos nas espécies de plantas dentro de um mesmo gênero ou próximos (AZEVEDO et al., 2012) como desenvolvido para gêneros pertencentes às famílias Poaceae (MCGRATH et al., 2006; LAUVERGEAT et al., 2005), Asteraceae (LÚCIO et al., 2011), Lamiaceae (RADOSAVLJEVIĆ et al., 2011) e Agavaceae (FLATZ et al., 2011).

As sequências de DNA que flanqueiam um locus de microssatélite são conservadas dentro de uma espécie e, muitas vezes, entre espécies dentro de um gênero, sendo possível utilizar primers específicos (geralmente de 20 a 25 pb) para essas regiões. Nesse sentido, é necessário, primeiramente, desenvolver primers para a espécie em estudo, que podem ser utilizados na obtenção de marcadores microssatélites em espécies geneticamente relacionadas (VARSHNEY et al., 2002; FALEIRO, 2007). Marcadores baseados em PCR, como os microssatélites, tem transmissibilidade tanto dentro como entre espécies e constituem uma boa escolha para programas de melhoramento que visam, por exemplo, marcar genes de interesse (KING et al., 2008) e estudos de diversidade genética.

Os resultados das amplificações utilizando marcadores microssatélites são verificados em gel de agarose, poliacrilamida ou através da eletroforese capilar. Os dois primeiros métodos são de precisão menor e demandam mais tempo comparativamente à eletroforese capilar (MEKSEM e KAHL, 2005) que é também utilizada para o sequenciamento de DNA (GUPTA et al., 2010). Esse procedimento

apresenta alta precisão, porém possui alto custo, que é relacionado ao equipamento e, principalmente, à necessidade de marcação dos oligonucleotídeos iniciadores com fluoróforos específicos (MISSIAGGIA e GRATTAPAGLIA, 2006). Assim, para analisar o tamanho dos produtos de PCR por eletroforese e sistema de detecção a laser, um dos primers deve carregar uma cauda marcada com um corante fluorescente, que são de alto custo. Todas as sequências iniciadoras *forward* devem ser marcadas (SCHUELKE, 2000).

Uma alternativa para a redução dos custos destes consumíveis foi proposta por Oetting et al. (1995) (Figura 1). A técnica consiste na marcação dos fragmentos de PCR com fluoróforos presentes em um iniciador universal (GOULART et al., 2011). A PCR então ocorre em duas etapas. Na primeira, os fragmentos são amplificados de forma usual, a partir dos iniciadores *forward* e *reverse*. Estes fragmentos contêm a cauda M13 na extremidade *forward*. Na sequência, são incluídos ciclos adicionais de amplificação, com o objetivo de inserir o iniciador M13 marcado com fluorescência nos fragmentos amplificados pelos ciclos anteriores. A principal vantagem da técnica da cauda fluorescente é que apenas o iniciador M13 requer marcação com fluoróforo, e este pode ser utilizado com vários oligonucleotídeos iniciadores distintos (SCHUELKE, 2000).

A incorporação do fluoróforo aumenta o custo da síntese em aproximadamente 500%, em relação ao custo da síntese de um iniciador não marcado. Por outro lado, a inclusão da cauda M13 (Figura 1) no oligonucleotídeo iniciador aumenta seu custo em 100% (SCHUELKE, 2000).

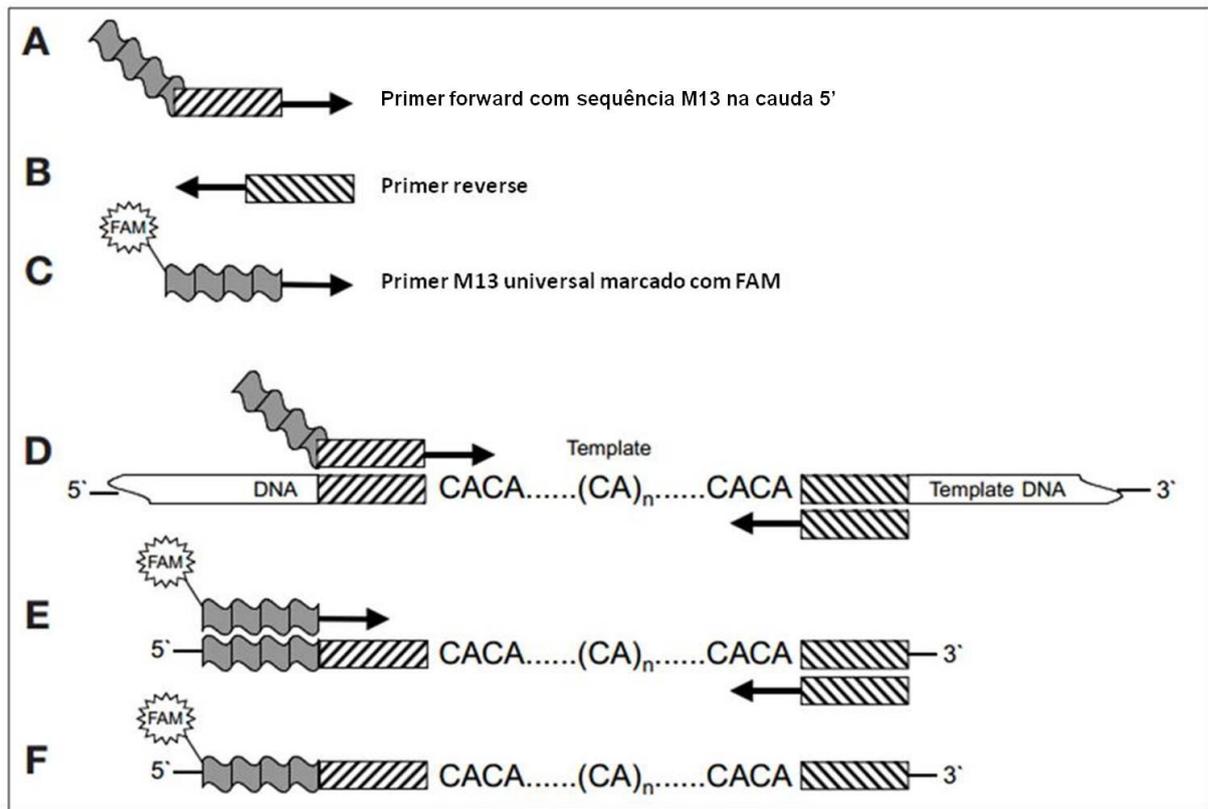


Figura 1. Esquema de amplificação de uma reação única de PCR. As caixas listradas indicam os primers microsatélite específicos (A, B) A caixa cinza ondulada representa a sequência M13 universal e a estrela a sonda fluorescente FAM (C). Nos primeiros ciclos da PCR, o primer *forward* com a cauda M13 é incorporado aos produtos da PCR (D). Estes produtos são, então, o alvo para o primer universal M13 marcado com FAM (E), que será incorporado durante os ciclos seguintes com uma temperatura de anelamento mais baixa, de 53°C. O produto final marcado pode ser analisado em um sistema de detecção a laser (F). Adaptado de SCHUELKE (2000).

1.3 MELHORAMENTO DE PLANTAS FORRAGEIRAS

Plantas forrageiras podem ser definidas como todas aquelas consumidas por herbívoros e, por isso, abrangem variada gama de gêneros e espécies, desde herbáceas até arbustivas (PEREIRA et al., 2001). Poucas ganharam destaque comercial e abrangência, seja por resultarem em maior produtividade animal, ou pela facilidade de cultivo, ou por apresentarem resistência a estresses bióticos e/ou, abióticos. Assim, nas regiões de clima temperado sobressaíram-se, especialmente,

leguminosas, como: alfafa (*Medicago sativa*) e os trevos (*Trifolium spp.*), e as gramíneas dos gêneros *Lolium*, *Bromus*, *Dactylis* e *Phalaris* (VALLE, JANK e RESENDE, 2009).

O melhoramento de forrageiras tem objetivos semelhantes aos das grandes culturas, como o aumento da produtividade e da qualidade, a resistência a pragas e doenças, a produção de sementes de boa qualidade, o uso eficiente de fertilizantes, a adaptação a estresses edáficos e climáticos, e ainda conseguir maior eficiência na sua transformação em produção animal (VALLE et al., 2008; VALLE, JANK e RESENDE, 2009).

No Brasil, várias instituições têm-se dedicado ao melhoramento genético de plantas, como as universidades, as empresas estaduais de pesquisa, a Embrapa e várias empresas privadas (BORÉM e MIRANDA, 2013). Desde a sua criação em 1973, a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), tem como uma de suas prioridades a Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) em Forrageiras. Nesse sentido, foram estruturados programas de seleção de gramíneas e leguminosas para a liberação comercial de novas cultivares. Esses programas seguem um esquema de avaliação sistemático e organizado (UNIPASTO, 2015).

A Embrapa conta com cerca de 170 bancos de germoplasma destinados à conservação de recursos genéticos. Os bancos ativos de germoplasma de forrageiras totalizam 14 bancos e coleções de germoplasma, que envolvem: Alfafa, Amendoim forrageiro, Azevém, *Cenchrus*, *Panicum*, *Brachiaria*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Stylosanthes*, forrageiras nativas do Pantanal, leguminosas forrageiras nativas para a baixada litorânea e os tabuleiros costeiros do Nordeste, forrageiras para os Cerrados, forrageiras para o Meio-Norte e forrageiras para a região Sul (EMBRAPA, 2015).

Na Região Sul do Brasil, a pecuária tem grande destaque econômico (MITTELMANN et al., 2010). Esta atividade, onde se destacam a produção de carne e leite, depende das forrageiras como base da cadeia alimentar de rebanhos. Portanto, o melhoramento genético de plantas forrageiras é essencial para o desenvolvimento da pecuária e deve se preocupar com a eficiência da produção animal assim como com a produtividade das cultivares.

Existem muitas espécies de plantas que podem ser utilizadas como pastagem para o gado. Estas espécies se dividem de acordo com o período de desenvolvimento (inverno ou verão), quanto ao ciclo de vida (anual ou perene) e

quanto à família botânica, sendo as mais utilizadas gramíneas e leguminosas (MITTELMANN, 2006).

O azevém (*Lolium multiflorum*) é uma gramínea forrageira de inverno com ciclo de vida anual e muito utilizada na região Sul do Brasil para a alimentação do gado durante o período mais frio do ano. Existe grande interesse no estudo da espécie e do gênero devido à sua importância na pecuária e na agricultura. Neste sentido, a Embrapa coordena um Programa de Melhoramento do Azevém, criado em 2002, e desenvolvido pela Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora – MG), em parceria com a Embrapa Clima Temperado (Pelotas – RS), outras unidades da Embrapa e Universidades (NEIVA, 2007). O programa lançou sua primeira cultivar comercial (a BRS Ponteio) em 2007 (EMBRAPA, 2007).

1.4 CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *LOLIUM* E DA ESPÉCIE *Lolium multiflorum*

O gênero *Lolium* (Poaceae) é composto por nove espécies diploides ($2n=2x=14$), sendo seis delas alógamas e três autógamas. As seis alógamas incluem duas importantes gramíneas cultivadas, *L. multiflorum* e *L. perenne*, além de *L. rigidum*, *L. subulatum*, *L. canariense* e *L. edwardii*. As três espécies autógamas são *L. temulentum*, *L. remotum* e *L. persicum* (HIRATA et al., 2011). Imagina-se que a origem geográfica do gênero seja na Ásia Sul-Occidental e na bacia do Mediterrâneo (SENDA et al., 2004).

Entre as espécies autógamas, *L. temulentum* é uma erva daninha mímica com ciclo de vida e morfologia similar ao trigo (*Triticum aestivum* L.) e à cevada (*Hordeum vulgare* L.). É amplamente distribuído em todo o mundo, sendo uma gramínea anual de dia longo que é classificada como erva daninha nociva e praga em sistemas de cultivo (SENDA et al., 2003; KUK, BURGOS e TALBERT, 2000). *L. remotum* é uma erva daninha associada ao linho (*Linum usitatissimum* L.). Eles dividem características bastante similares e sua distribuição coincide com a das culturas associadas. A distribuição de *L. persicum* é restrita ao oeste da Ásia e

crece em uma mesma área geográfica com *L. temulentum* e por vezes circundando campos de trigo ou cevada (SENDA et al., 2003).

O azevém perene (*L. perenne*) é obrigatoriamente alógama, pois possui um sistema de autoincompatibilidade gametofítica determinada geneticamente (CORNISH, HAYWARD e LAWRENCE, 1979) sendo, portanto, cada cultivar é uma população heterogênea de genótipos (GOLEMBIEWSKI, DANNEBERGER e SWEENEY, 1997; KING et al., 2008). *L. perenne* é uma das principais espécies de gramíneas utilizadas em relva e pasto nas regiões temperadas do mundo e é taxonomicamente relacionada a várias espécies de plantas importantes da família Poaceae, incluindo arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), milho (*Zea mays* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (SORENG e DAVIS, 1998).

O azevém (*L. multiflorum* Lam.) (Figura 2) é uma das gramíneas forrageiras mais importantes, sendo largamente cultivada na Ásia, América do Norte e do Sul, Europa e Nova Zelândia (HIRATA et al., 2006). No Brasil, a introdução provavelmente se deu pelos imigrantes italianos por volta de 1875, estando hoje largamente disseminado (BARBIERI et al., 2005; FLOSS, 1988). É uma espécie adaptada à região sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), e uma das forrageiras mais utilizadas no sistema de plantio direto como cobertura de inverno, semeada como uma cultura agrícola com finalidade principal de uso forrageiro ou de formação de cobertura viva ou morta em pomares (MAIA, 1995; GALLI et al., 2005).

É uma gramínea anual, rústica, cespitosa, agressiva, de folhas finas e tenras, possui lígula curta e aurículas abraçantes. A inflorescência é uma espiga dística, isto é, com duas fileiras de espiguetas. A espécie é adaptada a temperaturas mais baixas em climas mesotérmicos (não resiste ao calor de verão de climas tropicais) desenvolvendo-se somente durante o inverno e na primavera em climas mesotérmicos (PUPO, 1979; FLOSS, 1988).



Figura 2. *Lolium multiflorum* _ Azevém. Copyright © 2005 Brianna M. Richardson

É uma planta relativamente pouco exigente em tipo de solo, persistindo em uma ampla gama de texturas, desde argilosos a arenosos (CARÁMBULA, 1998), com tolerância a solos ácidos e alcalinos (pH 5,0 a 7,8), mas com melhor crescimento em solos com pH variando de 5,5 a 7,5 (HANNAWAY et al., 1999).

Esta gramínea é extremamente produtiva, utilizada tanto no cultivo exclusivo quanto em consorciação com outras gramíneas ou leguminosas (BREMM, 2007). É resistente ao pastejo e a excessos de umidade, suportando altas lotações. Pode ser manejada para permitir a ressemeadura natural, ou seja, a produção e a queda das sementes na terra, não sendo necessário semear todos os anos (MITTELMANN et al., 2006). Possui elevada produção de forragem de alto valor nutritivo, bom vigor inicial, e grande capacidade de rebrota (CARÁMBULA, 1977; DIAS, GOMES e INFELD, 2001; QUADROS et al., 2003), além de boa produção de sementes (GERDES, 2003).

Apesar de ser uma planta de clima frio, é uma espécie que apresenta crescimento lento em baixas temperaturas, principalmente nos meses de junho e julho, aumentando sua produção de matéria seca em temperaturas mais elevadas

na primavera (FLOSS, 1988). A temperatura ótima para sua produção situa-se entre 20 e 25°C, sendo adaptado a climas frios e úmidos (HANNAWAY et al., 1999) e sensível a estiagens (FLOSS, 1988). Seu pico de crescimento ocorre nos meses de setembro e outubro (BREMM, 2007).

1.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DE *LOLIUM* SPP.

O gênero *Lolium* inclui forragens de grande importância econômica, com provável crescimento de seu valor no futuro, devido ao aumento na demanda por carne e produção de leite e ao desenvolvimento de biocombustíveis (KING et al., 2008). O bioetanol pode ser obtido pela fermentação de carboidratos solúveis em água, que se acumulam em *L. perenne* em níveis equivalentes ou superiores aos da cana de açúcar (FARRAR et al., 2012). O azevém perene (*L. perenne* L.) e também o azevém (*L. multiflorum* Lam.) são plantas daninhas e forrageiras amplamente cultivadas (SENDA et al., 2003). Estas duas espécies são também componentes valiosos de pastagens permanentes e prados e desempenham um papel importante em pastagens cultivadas de regiões temperadas (KÖLLIKER, BOLLER, e WIDMER, 2005). Os membros deste gênero possuem alto rendimento e produzem forragem de alta qualidade e digestibilidade (ARMSTEAD et al., 2006).

Em um sistema de produção que visa atender o desempenho dos animais a baixo custo, a adoção de pastagens cultivadas de estação fria e quente é uma opção que visa manter altas produções de matéria seca e qualidade de forragem, pois a pastagem é a fonte de nutrientes mais barata para os ruminantes (CARVALHO, PRACHE e DAMASCENO, 1999). As forrageiras de estação fria são fundamentais para uma agricultura sustentável e representam a base alimentar de ruminantes nas regiões de clima temperado de todo o mundo (NELSON e MOSER, 1994).

Em ambientes temperados, o melhoramento do azevém tem sido realizado visando à obtenção de cultivares tolerantes ao frio, aumento na produção de forragem e seus componentes nutricionais e aumento na produção de sementes.

Por ser uma planta alógama, fornece vantagens ao melhorista, devido à alta heterozigose dos indivíduos, resultando em ampla variabilidade genética, que pode ser utilizada no melhoramento (NELSON, 1995; NELSON, PHILLIPS e WATSON, 1997). O melhoramento genético do azevém no Brasil visa principalmente o desenvolvimento de cultivares mais produtivas, de ciclo mais precoce e adaptado a diferentes condições edafoclimáticas (FLORES et al., 2008).

No Sul do Brasil, a pastagem nativa contribui com mais de 90% da alimentação de bovinos, ovinos e outros herbívoros domésticos e selvagens. As baixas temperaturas nas estações de outono e inverno ocasionam importante restrição alimentar aos rebanhos, pois o crescimento de muitas espécies forrageiras é praticamente paralisado (BOLDRINI, 1993). Deste modo, a adoção de pastagem cultivada de estação fria, como o azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), é uma opção que visa manter altas produções de matéria seca com alta qualidade para atender a demanda nutricional dos animais a um baixo custo (DE CONTO et al., 2011).

Há em torno de trinta cultivares de azevém registradas junto ao Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014). A Lei de Sementes (Lei n.º 10.711, 5 de agosto de 2003, regulamentada pelo Decreto n.º 5.153, de 23 de julho de 2004) impede a comercialização de materiais não registrados, ou com a identificação “Comum”. A comprovação de origem genética das cultivares começou a ser exigida para os campos de multiplicação de azevém a partir de 2011. Este procedimento terá como vantagem para o produtor uma maior regularidade no fornecimento de sementes, maior estabilidade de preços e a confiabilidade, pois é possível conhecer a origem genética da cultivar (EMBRAPA, 2007). Assim, estudos moleculares dos acessos e das cultivares a serem lançadas são de extrema importância.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estimar a diversidade genética existente entre populações de azevém (*Lolium multiflorum*) pertencentes ao Programa de Melhoramento da Embrapa Gado de Leite e contribuir com informações sobre a base genética destas populações através do uso de marcadores microssatélites.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Testar a transferência de marcadores microssatélites genômicos relatados na literatura para espécies geneticamente próximas ao azevém.
2. Testar a metodologia de *bulks*, muito utilizada em estudos de melhoramento vegetal, para estudos genéticos e moleculares das populações de azevém utilizadas no Programa de Melhoramento da Embrapa Gado de Leite.
3. Contribuir com a caracterização genética e molecular das populações pertencentes ao Programa de Melhoramento do Azevém da Embrapa Gado de Leite.
4. Auxiliar na definição de métodos e estratégias de melhoramento a serem adotados pelo Programa de Melhoramento do Azevém da Embrapa Gado de Leite.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas 31 populações de azevém (*Lolium multiflorum*) e uma população de azevém perene (*Lolium perenne*) pertencentes ao Programa de Melhoramento de Azevém da Embrapa Gado de Leite (Tabela 1). Vinte indivíduos foram coletados em 31 das 32 populações totais. A população de azevém LOL181-A era composta por apenas oito indivíduos. Foram montados *bulks* com dez indivíduos de cada população. Assim, cada uma ficou representada por dois *bulks* (A e B), e a população que continha oito amostras ficou representada por apenas um *bulk* (A). As informações sobre as populações utilizadas neste trabalho estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Informações sobre as populações de azevém. A coluna ID corresponde à identificação utilizada para cada população.

População	ID	Informações
BRS Estações	BRSEST	Cultivar Embrapa
BRS Integração	BRSINT	Cultivar Embrapa
BRS Ponteio	BRSP	Cultivar Embrapa, origem Pelotas, RS
CNPGL/LOL 130	CNPGL/LOL 130	Pop original - deu origem à BRS Integração, origem Farroupilha-RS
CNPGL/LOL 195	CNPGL/LOL 195	Pop original - deu origem à BRS Estações, origem Vacaria-RS
COMUM	COMUM	Cultivar comercial
Empasc 304	304	Cultivar comercial
FABC1	FABC1	Cultivar comercial, origem na região de Castro, Paraná
INIA Bakarat	INIABAK	Cultivar Uruguai
INIA Escorpio	INIA	Cultivar Uruguai
LOL 130	LOL130	Fase intermediária do melhoramento da BRS Integração
LOL 166	LOL166	Castro - PR
LOL 172	LOL172	Vacaria - RS
LOL 173	LOL173	Passo Fundo - RS
LOL 176	LOL176	Passo Fundo - RS
LOL 177	LOL177	Coxilha - RS
LOL 178	LOL178	Nova Alvorada - RS
LOL 181	LOL181	Nova Alvorada - RS
LOL 183	LOL183	David Canabarro - RS
LOL 185	LOL185	Coqueiros do Sul – RS
LOL 187	LOL187	Coqueiros do Sul – RS
LOL 188	LOL188	Coqueiros do Sul - RS
LOL 189	LOL189	Coqueiros do Sul - RS
LOL 190	LOL190	Coqueiros do Sul - RS
LOL 191	LOL191	Chapada - RS
LOL 192	LOL192	Pontão - RS
LOL 194	LOL194	Barão de Cotegipe - RS
LOL 195	LOL195	Fase intermediária do melhoramento da BRS Estações
LOL 198	LOL198	Dom Pedrito - RS
LOL 200	LOL200	Coqueiros do Sul - RS
LOL 213	LOL213	Bento Gonçalves - RS
ORO VERDE	Lperene	<i>Lolium perenne</i> , cultivar tetraplóide importada

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Foram realizadas 314 extrações de DNA total, sendo cada amostra composta por 2 indivíduos de *Lolium* spp., totalizando 628 indivíduos. Após a extração, as amostras de uma mesma população foram agrupadas para formar um total de 63 *bulks* de DNA. Para cada amostra aproximadamente 300mg de folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido ou picotadas em um microtubo contendo tampão de lise, para obtenção de uma amostra homogênea.

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit “Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction” da GE Healthcare.

3.3 AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM MARCADORES MICROSSATÉLITE

Trinta e cinco pares de primers foram testados nas amostras das populações de *Lolium multiflorum* (Tabela 2). Dentre estes marcadores 13 foram inicialmente identificados a partir de *Lolium multiflorum* (MCGRATH et al., 2006; STUDER et al., 2006; HIRATA et al., 2006). Outros 21 pares de primers foram baseados no trabalho realizado por Feltus et al. (2006), sendo destes, 9 identificados em *Pennisetum* e 12 em *Sorghum*. Um par de primers foi identificado no trabalho de Jones et al. (2001), que desenvolveu marcadores SSR para *Lolium perenne* e ainda relatou a amplificação em *L. multiflorum*, porém sem descrever quais marcadores foram utilizados neste último experimento. Todos os pares de primers foram inicialmente testados em quatro amostras de *L. multiflorum*.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada com volume final de 20µl como descrito: 1X GoTaq reaction buffer, 0,3 µM de cada primer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (GE Healthcare), 1 unidade de GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega), e 45 ng de DNA genômico. A reação com primers marcados com a cauda M13

diferia-se apenas pela quantidade de cada primer, sendo utilizados 0,5 µM de cada primer, *reverse* e FAM-M13, e 0,013 µM do primer *forward* com a sequência M-13. Utilizou-se um termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) para a realização da reação em cadeia da polimerase com o seguinte perfil: desnaturação inicial à 94°C (5 min.) seguida de 35 ciclos à 94°C (45 s), temperatura de anelamento específica de cada par de primer (45 s), e 72°C (1 min.); e um ciclo de extensão final de 30 min. à 72°C.

Os pares de primers com melhores padrões de amplificação foram resintetizados e conjugados com corante fluorescente (FAM, HEX, ou TAMRA) no grupamento fosfato do primeiro nucleotídeo do primer *forward* (Tabela 3).

Cinco pares de primers contendo a cauda M13 também foram testados (Tabela 3). Três primers foram utilizados em cada reação: um primer *forward* de sequência específica com a cauda M13 presa à extremidade 5', um primer reverso com sequência específica e um primer universal M13 marcado com fluorescência. A quantidade utilizada de primer *forward* foi aproximadamente 25 vezes menor que a do primer reverso.

Os marcadores selecionados no teste de amplificação foram então submetidos ao teste em eletroforese capilar, realizado com oito amostras de *L. multiflorum*. Neste teste foram avaliados a capacidade de amplificação (temperatura de anelamento dos primers, qualidade da reação de PCR, presença de picos inespecíficos e falhas na amplificação) e o polimorfismo dos marcadores utilizados. Foram desconsiderados aqueles que se apresentavam monomórficos ou com muito pouco polimorfismo. Estes pares de primers foram utilizados para genotipagem de todas as 314 amostras de azevém, totalizando 628 indivíduos. Os componentes da reação em cadeia da polimerase e o perfil cíclico foram os mesmos descritos acima.

Os produtos da amplificação foram precipitados utilizando-se acetato de amônio 2,5M e etanol, ressuspensos em água Milli-Q e mantidos congelados à -20°C até o uso.

Tabela 2. Primers utilizados no teste de amplificação em *Lolium multiflorum*, suas respectivas sequências *forward* e *reverse*, referência de origem de cada marcador microsatélite e taxa para o qual o marcador foi descrito originalmente. A coluna M13 indica quais marcadores foram testados utilizando-se a metodologia da cauda M13.

Nome do Marcador	M13	Sequência forward	Sequência reverse	Referência	Taxa
SSR_Azevem_01		AGGGACTTGAACCCCTCACAA	GCAAACGATTAATCATGGAACC	MCGRATH et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_02		ACGAACGAAACGATTTGAACC	TGAAGCCCCAATTCITGACT	MCGRATH et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_03	X	CGGATTTCTAACCGTAGACCTTC	TCAAAGCCAGGAAGCAATCT	MCGRATH et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_04		TGGAATAACGATGAAAAG	CATCACGAATTAACAAAG	JONES et al., 2001	<i>L. perenne</i>
SSR_Azevem_05		GCATAAGCAAGGCATCAAAG	TTCATTCCAACATCACGTCC	FELTUS et al., 2006	<i>Pennisetum</i>
SSR_Azevem_06		GGCATTCTCTTGTGAAAATC	CCCCAACTATACTGAGTTC	FELTUS et al., 2006	<i>Pennisetum</i>
SSR_Azevem_07		CGTAGCTCATCAAAGAAG	CCCCAACTATACTGAGTTC	FELTUS et al., 2006	<i>Pennisetum</i>
SSR_Azevem_08		ACTTGACTCCAACCTCCAAC	TGGGATACAGATGCTGTAG	FELTUS et al., 2006	<i>Pennisetum</i>
SSR_Azevem_09		GTGGTAGCATAATACAGTGG	CTATGGTTAAATCAATGAGCCG	FELTUS et al., 2006	<i>Pennisetum</i>
SSR_Azevem_10		CAACTGCATGCATTTTGTGC	GCACCCAGCTGAAAGAAAAG	FELTUS et al., 2006	<i>Pennisetum</i>
SSR_Azevem_11		GTTGCCTCATCCACTTCCAT	GCACCCAGCTGAAAGAAAAG	FELTUS et al., 2006	<i>Pennisetum</i>
SSR_Azevem_12		AGATGCTTAAGAGTATGACC	TCAGTTTGTCCATGCATTG	FELTUS et al., 2006	<i>Pennisetum</i>
SSR_Azevem_13		TGTAGCAGATGCCAGACTTC	CCATTGCTCCATAATCCAATC	FELTUS et al., 2006	<i>Pennisetum</i>
SSR_Azevem_14		TTTGCCCGCTCGGGTTAC	CCGTGTGAAGTCTTCAACAAG	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_15		CCTGCTAAAGAACACTATCAG	AGGATAAGTCCCAGCTGC	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_16		GCGCTTCTCAGTTCAAATG	GCAGCTTTAACAGCATCTTC	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_17	X	TTTTCGTGCAGCTGAGGCATG	GCAGCTTTAACAGCATCTTC	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_18		TGGGATCCTCAAAGATAATGAG	CTGGAGGAGGACCCCTATTG	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_19		GGTGTATGTGACCATGTACC	GAATCCTCTCAGGTTCTTC	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_20		TGACCCCTTCTCATGAGAGAG	TCTGACAGCTTCATGTGACC	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_21		TTGAACCATATGCTCGCTTG	ACCAGCTCTCATTGACATTG	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_22		TGCCTGTTTCATGGAAACTC	CTCCATGTGACTAAGTGGAC	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_23		GTTACCTACGGAAACCTTG	GCGGCTTAATTTGACTCAAC	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_24	X	AGGAGAAATTCAGCCGGTTTG	CAAACCTCACCTTCTCTGGC	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_25		CGTCGAAGCAGTTCTGCTTG	ACATACCCATTGACATTGGC	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>

Tabela 2. Primers utilizados no teste de amplificação em *Lolium multiflorum*, suas respectivas sequências *forward* e *reverse*, referência de origem de cada marcador microsatélite e taxa para o qual o marcador foi descrito originalmente. A coluna M13 indica quais marcadores foram testados utilizando-se a metodologia da cauda M13. (Continuação)

Nome do Marcador	M13	Sequência forward	Sequência reverse	Referência	Taxa
SSR_Azevem_26		CCATTGTGACCCCGTAACA	TGCATAGACAGCCTCCTGAAT	STUDER et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_27	X	TATTGAGTTTATTGGAAGGACCACC	TCTATGTCCAAAAGCCTTACCAAGA	STUDER et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_28		AAGAAAATGCAATGCTAAACAGATTAGTT	CGCCTCATGAACACTTTATATTCTAGAA	STUDER et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_29		CGATGATCTCATTGCAACGGTG	AGAACGCTCCCTCATGTCCG	HIRATA et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_30	X	TATGTGGGCTAAGCCCCACG	CTTTGGCGGGAACCTCTACCCG	HIRATA et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_31		TCG AAG TCC ATG AGG AGC TG	TGG CTT CAC CAA TTT ATG GC	HIRATA et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_32		GCACCTATTCATGGCTCCGG	GCTTTGCCGGTTATGGCTCC	HIRATA et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_33		CGCAGCATCGTGGTCACTAGTT	GGCTGTGAGCCTGCCACTAGTAG	HIRATA et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_34		AAATCTCCCCAATCCGGTCG	CCTGATCTGTGGATTCCCCCG	HIRATA et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_35		CAGTTGCAAAGCCGATTTTCG	ACAGTTGGAGTTAACCCCATAGTCA	HIRATA et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>

3.4 DETECÇÃO DO TAMANHO DO FRAGMENTO DE DNA

Os produtos dos testes de amplificação iniciais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% à 400 V por 5h. O gel foi corado em solução de brometo de etídio, e os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados utilizando-se marcador de peso molecular de 200 pb (Promega).

Amplicons fluorescentes foram detectados por eletroforese capilar usando o sequenciador de DNA MegaBACE1000 (GE Healthcare). Utilizou-se o padrão de tamanho de DNA GeneTab 500 (GENE ID). A análise de tamanho foi realizada com o software Fragment Profile (GE Healthcare).

Os dados finais foram exportados para uma planilha do software Excel (Microsoft Corporation). Em cada amostra, apenas os fragmentos mais fortes e mais reprodutíveis (todas as reações foram feitas em duplicata) foram marcadas e incluídas na análise.

3.5 DIVERSIDADE GENÉTICA

O coeficiente de similaridade de Dice foi calculado e utilizado para construir a matriz de similaridade de pares de amostras. Os coeficientes foram utilizados para construir um dendrograma de acordo com o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*). Todas as análises computacionais foram realizadas com o software NTSYSpc (ROHLF, 2000). Os agrupamentos do dendrograma foram determinados por análise de *bootstrap* de 1000 conjuntos de dados permutados que foram gerados por meio do software Past (HAMMER, HARPER e RYAN, 2001).

Análises de variância molecular (AMOVA) foram realizadas através do software GenAlEx 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012). Assim, para avaliar a variação

intra e interpopulacional foram investigadas 31 populações, sendo cada uma composta por dois bulks (A e B). A população LOL181-A, que continha apenas um bulk foi excluída desta análise.

4 RESULTADOS

4.1 AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM MARCADORES MICROSSATÉLITE

Trinta e cinco pares de primers (Tabela 2) foram testados para verificar a presença de amplificação em um conjunto de quatro amostras de azevém provenientes do Programa de Melhoramento da Embrapa Gado de Leite. Vinte e cinco pares de primers apresentaram amplificação em azevém. Aqueles que não amplificaram para as quatro amostras utilizadas foram desconsiderados (Figura 3).

Entre os primers satisfatoriamente amplificados, dez eram provenientes de *L. multiflorum*, sendo três relatados no trabalho de Mcgrath et al. (2006), três no de Studer et al. (2006) e quatro no de Hirata et al. (2006). Os outros 14 foram relatados por Feltus et al. (2006), seis de *Pennisetum* e oito de *Sorghum*. E o único par de primer descrito para em *L. perenne* também obteve sucesso na amplificação em *L. multiflorum* neste trabalho.

Dentre os 25 pares de primers que amplificaram para azevém, os 14 mais polimórficos foram selecionados para amplificar os 63 *bulks* de azevém. Entre eles, dois eram provenientes do trabalho de Mcgrath et al. (2006), um de Jones et al. (2001) e sete de Feltus et al. (2006), dos quais três foram isolados de *Pennisetum* e quatro de *Sorghum*. Outros três primers foram de Studer et al. (2006) e um de Hirata et al. (2006).

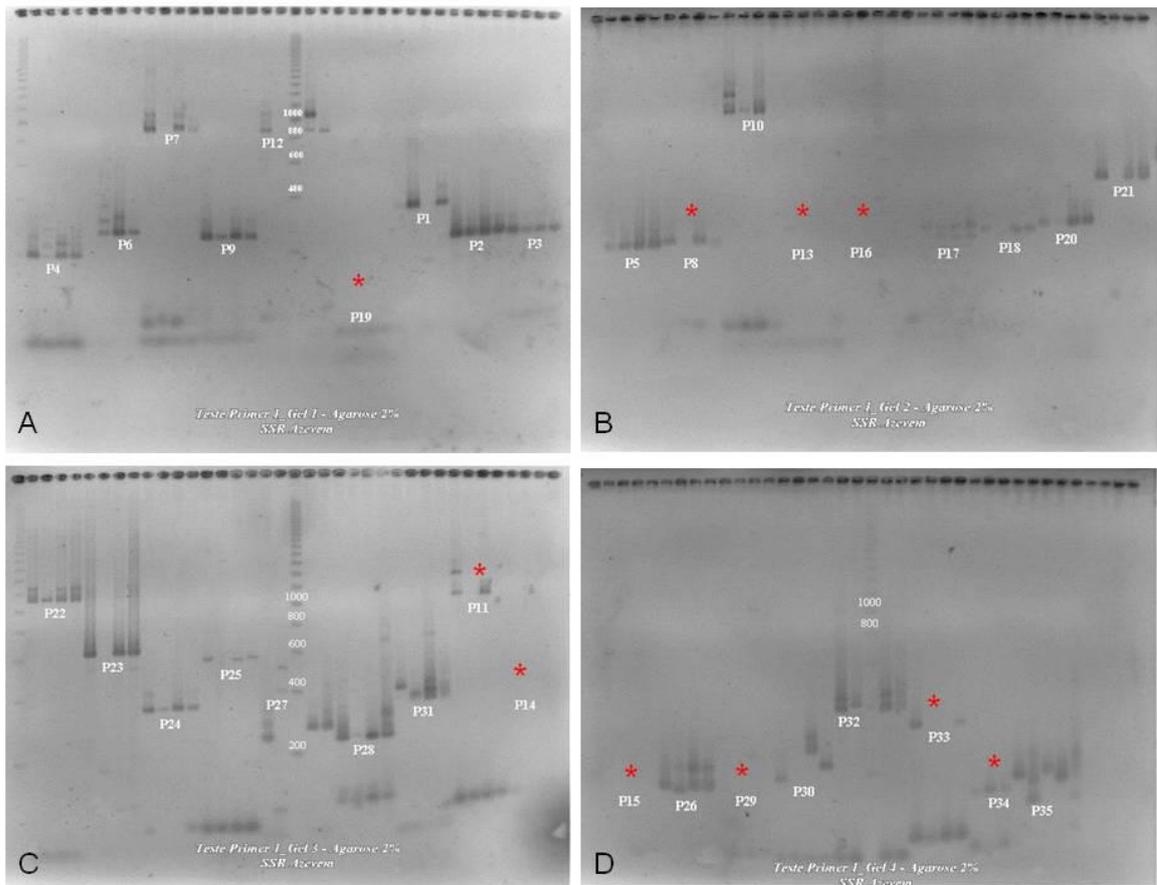


Figura 3. Teste de primers realizado em gel de agarose 2% com marcador de peso molecular de 200-pb. Os asteriscos em vermelho indicam as amostras que não apresentaram amplificação para as quatro amostras. (A) Fragmentos amplificados utilizando-se os primers SSR_Azevem_04, SSR_Azevem_06, SSR_Azevem_07, SSR_Azevem_09, SSR_Azevem_12, SSR_Azevem_19, SSR_Azevem_01, SSR_Azevem_02, SSR_Azevem_03. (B) Fragmentos amplificados utilizando-se os primers SSR_Azevem_05, SSR_Azevem_08, SSR_Azevem_10, SSR_Azevem_13, SSR_Azevem_16, SSR_Azevem_17, SSR_Azevem_18, SSR_Azevem_20 e SSR_Azevem_21. (C) Fragmentos amplificados utilizando-se os primers SSR_Azevem_22, SSR_Azevem_23, SSR_Azevem_24, SSR_Azevem_25, SSR_Azevem_27, SSR_Azevem_28, SSR_Azevem_31, SSR_Azevem_11, SSR_Azevem_14. (D) Fragmentos amplificados utilizando-se os primers SSR_Azevem_15, SSR_Azevem_26, SSR_Azevem_29, SSR_Azevem_30, SSR_Azevem_32, SSR_Azevem_33, SSR_Azevem_34, SSR_Azevem_35.

4.2 DETECÇÃO DOS TAMANHOS DOS FRAGMENTOS DE DNA

Os marcadores selecionados a partir dos testes de amplificação, assim como suas sequências *forward* e *reverse* e aqueles para os quais foi utilizada a metodologia de marcação com cauda M13, estão descritos na Tabela 3.

O tamanho dos fragmentos amplificados para azevém variou de 95 a 470 pares de base. Estes valores, detalhados na tabela 4, corroboraram com o relatado na literatura. Apenas para o marcador SSR_Azevem_09 observou-se uma divergência maior entre os valores de tamanho do fragmento original, descrito na literatura, e o tamanho do fragmento obtido no presente trabalho.

4.3 DIVERSIDADE GENÉTICA

O dendrograma relativo aos 63 *bulks*, obtido utilizando-se o algoritmo UPGMA está representado na Figura 4, assim como os valores de *bootstrap* relativos a cada grupo formado.

Com base nos dados de polimorfismos, os valores do coeficiente de Dice obtidos pela matriz de similaridade variaram de 0,43 a 0,93.

Os acessos identificados como Lperene (Figura 4), pertencentes à espécie *Lolium perenne*, representam uma espécie diferente das populações restantes, compostas por *L. multiflorum*, e estão localizados em um ramo afastado dos demais, com coeficiente de similaridade de aproximadamente 0,56.

Os acessos LOL198-B e LOL185-A pertencem a diferentes populações provenientes do Rio Grande do Sul, e estão localizados em ramos que os distanciam das demais populações. LOL198-B aparece separado das demais populações de *L. multiflorum* com um coeficiente de similaridade de 0,66. Já LOL185-A tem coeficiente de similaridade de 0,68 com as demais amostras de *L. multiflorum*.

Os resultados das análises de variância molecular demonstraram que 23% desta variância ocorre entre as populações e o restante (77%) ocorre dentro das mesmas (Figura 5).

Tabela 3. Marcadores microsatélites selecionados conforme teste de amplificação e polimorfismo em indivíduos de *Lolium multiflorum*. A coluna M13 indica os primers que utilizaram a metodologia da cauda M13. Temperatura de anelamento dos primers (TA), tamanho original do fragmento amplificado de acordo com a literatura, tamanho do fragmento obtido neste trabalho para cada marcador, referência de origem de cada marcador microsatélite e taxa para o qual o marcador foi descrito originalmente.

Nome do marcador	M13	TA	Tamanho original	Tamanho obtido	Referência	Taxa
SSR_Azevem_01		56	314	314-320	MCGRATH et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_03	x	54	195	206-214	MCGRATH et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_04		52	198	151-203	JONES et al., 2001	<i>L. perenne</i>
SSR_Azevem_05		52	211	215-216	FELTUS et al., 2006	<i>Pennisetum</i>
SSR_Azevem_06		52	240	228-250	FELTUS et al., 2006	<i>Pennisetum</i>
SSR_Azevem_09		52	303	189-223	FELTUS et al., 2006	<i>Pennisetum</i>
SSR_Azevem_17	x	54	256	238-271	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_20		56	240	252-259	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_21		52	456	454-470	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_24	x	54	373	305-341	FELTUS et al., 2006	<i>Sorghum</i>
SSR_Azevem_26		52	151	149-167	STUDER et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_27	x	54	251	198-321	STUDER et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_28		60	244	189-216	STUDER et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>
SSR_Azevem_30	x	54	219	173-223	HIRATA et al., 2006	<i>L. multiflorum</i>

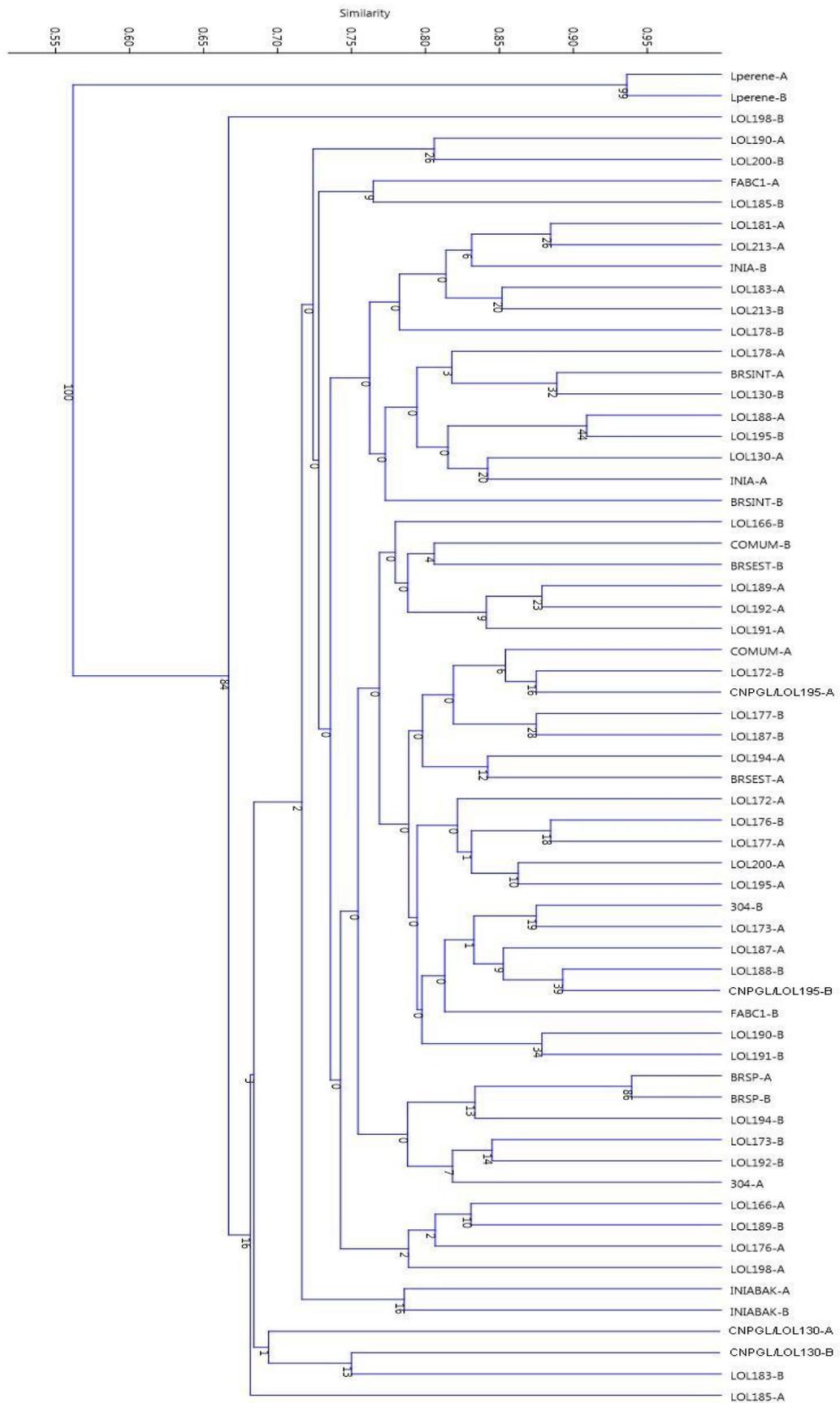


Figura 4. Dendrograma obtido pelo algoritmo UPGMA dos 63 *bulks* de azevém pertencentes ao Programa de Melhoramento de Azevém da Embrapa Gado de Leite. Os números em cada ramificação indicam os valores de *bootstrap*.

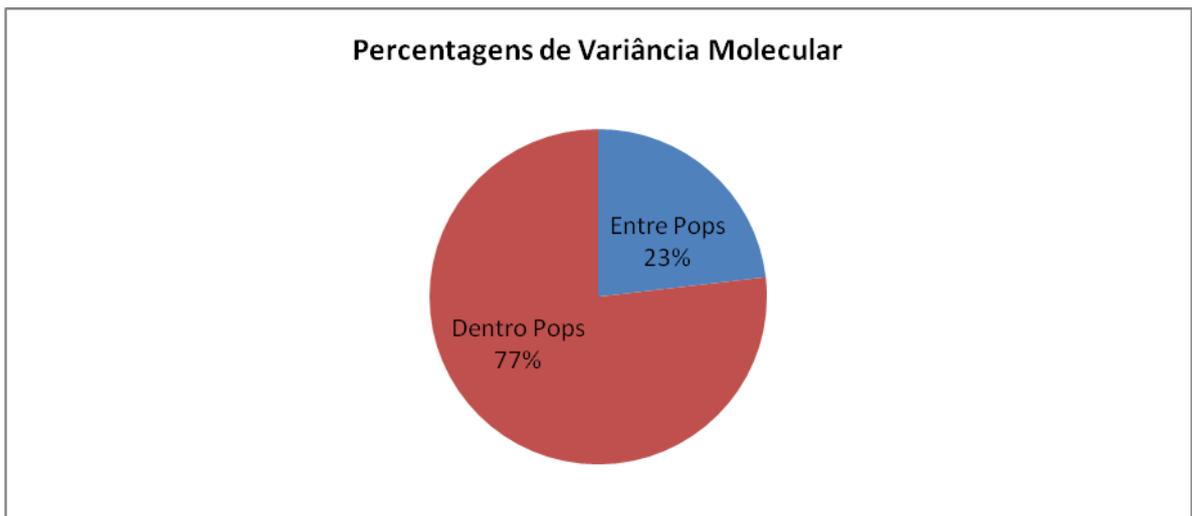


Figura 5. Gráfico de porcentagens de variância molecular obtido através do software GenAlex.

5 DISCUSSÃO

5.1 AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM MARCADORES MICROSSATÉLITE E DETECÇÃO DOS TAMANHOS DOS FRAGMENTOS DE DNA

O sucesso na amplificação de vinte e cinco pares de primers testados, provenientes de outras espécies relatadas na literatura, além dos relatados para *Lolium multiflorum* (JONES et al., 2001; FELTUS et al., 2006; HIRATA et al., 2006; MCGRATH et al., 2006; STUDER et al., 2006; LIU et al., 2012) mostram que marcadores previamente descritos para espécies proximamente relacionadas é uma boa alternativa para a identificação de marcadores microsatélites em espécies para as quais não existem estudos genômicos aprofundados.

Segundo Wang et al. (2012) a transferência entre espécies e gêneros de SSRs são úteis para a pesquisa em genética e evolução. Essa transferência tem sido relatada em vários grupos (FLATZ et al., 2011; LAUVERGEAT et al., 2005; LÚCIO et al., 2011; MCGRATH et al., 2006) e está relacionada com a distância genética entre a espécie para a qual os SSRs são desenvolvidos e as outras espécies em estudo.

Dentre os 13 marcadores testados no presente trabalho, inicialmente descritos para a espécie *L. multiflorum*, onze (85%) foram amplificados com sucesso nas populações pertencentes ao Programa de Melhoramento do Azevém da Embrapa Gado de Leite. Peakall et al. (1998) sugeriram que a taxa de amplificação cruzada de marcadores microsatélite entre espécies do mesmo gênero pode variar de 50 a 100%. O único marcador testado, inicialmente descrito para outra espécie dentro do gênero *Lolium*, *L. perenne*, foi amplificado com sucesso. Com relação aos marcadores obtidos a partir de outros gêneros, 66% deles foram amplificados com sucesso em *Lolium*. Portanto, é possível notar que a taxa de transferência de

marcadores entre espécies de gêneros diferentes também se manteve dentro da margem proposta por Peakall et al. (1998).

Comparando-se o tamanho dos fragmentos amplificados obtidos com o tamanho dos fragmentos descritos pela literatura, os valores encontrados foram próximos e apenas para um marcador, SSR_Azevem_09, a diferença chegou a mais de 100 pares de base. Esse fato pode ser explicado pela distância genética existente entre os dois gêneros, o gênero *Pennisetum*, para o qual o marcador foi inicialmente descrito e o gênero *Lolium*, estudado no presente trabalho.

5.2 DIVERSIDADE GENÉTICA

Os resultados indicam que os *bulks* de DNA foram eficientemente amplificados e a maioria dos polimorfismos representaram efetivas diferenças genéticas entre as populações. Reyes-Valdés et al. (2013) relatam que *bulks* de DNA são de grande valor para o estudo de grandes números de indivíduos e marcadores. Esta metodologia é útil para estudos em grande escala, a fim de reduzir custos de análises genéticas (SHAM et al., 2002).

A metodologia de *bulk* de DNA permite amostrar um maior número de indivíduos em populações heterogêneas. Este método pode refletir mais acuradamente a composição genética geral da população, quando comparado com a avaliação do genótipo de poucos indivíduos e permite ainda que um maior número de populações seja avaliado (LERMA-SEGOVIA et al., 2003). A metodologia identifica alelos que são altamente frequentes nas populações estudadas, contudo mascara alelos presentes em baixa frequência, que poderiam ser detectados se cada indivíduo fosse amplificado separadamente. Além disso, os *bulks* não permitem que muitas análises *in silico* sejam realizadas, pois os arquivos de entrada não podem ser adequados ao que é exigido pela maioria dos softwares.

Para a análise de polimorfismo dos marcadores, alguns foram eliminados durante os testes devido ao fato de serem monomórficos ou por apresentarem muito pouco polimorfismo, não sendo úteis para análise de diversidade genética. Portanto,

foram selecionados os 14 marcadores mais representativos da população. De acordo com Azevedo et al. (2012) um grande número de alelos e alto polimorfismo são características importantes para estimar corretamente a diversidade genética de uma coleção.

O coeficiente de similaridade de Dice foi escolhido por ser um dos mais usados para análises de diversidade genética (ZHOU et al., 2013). O coeficiente de Dice (1945) é representado pela fórmula abaixo onde *a* representa o número de marcas para os quais ambos os genótipos tiveram código 1 (presença), *b*, o número de códigos 0 para o genótipo *i* e 1 para o genótipo *j*, *c*, o número de códigos 1 para o genótipo *i* e 0 para o genótipo *j* (MEYER, 2002):

$$\frac{2a}{2a+b+c}$$

Para a realização das análises de diversidade, o primeiro passo é calcular as medidas de similaridade (ou dissimilaridade) entre todos os possíveis pares de indivíduos e, assim, formar grupos por processos aglomerativos ou divisivos. Inicialmente, na aplicação desta técnica, são estabelecidos centros de grupos, arbitrariamente, e cada indivíduo é agrupado em relação ao centro mais próximo. Novos centros são calculados e cada indivíduo se move para o grupo cujo centro seja mais próximo de si. O processo continua de forma iterativa até encontrar a estabilidade nos grupos (MEYER, 2002).

Os valores obtidos com os coeficientes de Dice indicam que a extensão da diversidade genética varia, ou seja, existem populações geneticamente muito próximas entre si, outras mais distantes e não há populações idênticas entre si. Era esperado que os *bulks* (A e B) de uma mesma população ficassem agrupados no dendrograma (Figura 4). Contudo o que se observou foi um agrupamento bastante heterogêneo das amostras, não havendo inclusive relações diretas entre as amostras e os locais de coleta, o que pode indicar que as populações estudadas têm uma mesma origem genética, já que a introdução da espécie no Brasil é considerada recente e se desconhece a origem e quantidade exata e a diversidade das variedades introduzidas no país.

Em plantas alógamas, seja em populações naturais ou em coleções de germoplasma, a maior variabilidade tem sido observada dentro das populações/procedências (FERREIRA et al., 2012). O que é corroborado pela

análise de variância realizada neste trabalho (Figura 5), onde a maior porcentagem de variância molecular (77%) foi detectada dentro das populações, enquanto que a variância entre as populações foi de apenas 23%. Isso pode indicar que existe um fluxo gênico entre as populações. Loveless e Hamrick (1984) também observaram que espécies tipicamente alógamas apresentam alta variação genética dentro das populações e pequena variação entre as mesmas.

Altos níveis de diversidade genética são esperados em espécies de ampla distribuição geográfica e alta diversidade populacional (OLIVEIRA et al., 2006) como *L. multiflorum*. Além disso, a existência de diversidade genética em azevém pode ser explicada pelo fato de ser uma planta alógama. A polinização cruzada, realizada pelo vento (FIRESTONE e JASIENIUK, 2013), permite a combinação de diversos genótipos diferentes ao acaso. Dessa forma, grãos de pólen de uma planta podem fecundar uma outra que está localizada muito distante, gerando uma mistura de genótipos, que pode levar à mistura heterogênea que caracteriza populações alógamas.

O dendrograma obtido permitiu o agrupamento dos *bulks* (A e B) de BRSP, que são equivalentes à população BRS Ponteio, uma cultivar da Embrapa, desenvolvida pelo Programa de Melhoramento do Azevém. As amostras aparecem com 93% de similaridade genética, reforçando a diferença destas para as demais amostras. O fato de esta população ter ficado isolada por cerca de 20 anos antes de sofrer os ciclos de melhoramento pode justificar sua grande homogeneidade e ao mesmo tempo sua diferença em relação às demais amostras. As amostras BRSINT-A e BRSINT-B também são cultivares da Embrapa e pertencem à população BRS Integração. Elas apresentam um nível de similaridade de 81% e estão intercaladas com *bulks* da população LOL130, que é a população que deu origem às cultivares BRS Integração e, portanto tem alguma similaridade genética. Outra cultivar da Embrapa é representada pelas amostras BRSEST-A e BRSEST-B, que pertencem à população BRS Estações, e possui um nível de similaridade de 76%.

Além destas cultivares, outras pertencentes a outros programas de melhoramento também foram utilizadas neste estudo. As amostras identificadas como INIABAK-A e INIABAK-B pertencem à cultivar Inia Bakarat, desenvolvida no Uruguai. Esta cultivar não apresentou um nível de similaridade tão alto quanto o da cultivar BRS Ponteio, desenvolvida pela Embrapa. Seu valor de similaridade genética foi de 79%, porém, no dendrograma (Figura 4) os dois bulks pertencentes a

esta população ficaram agrupados e separaram-se das demais populações evidenciando a diferença desta cultivar. Já a cultivar Inia Escorpio, neste trabalho identificada pelos *bulks* INIA-A e INIA-B, também representa uma cultivar do Uruguai, cujo valor de similaridade observado foi 81%. As demais, cultivares comerciais (FABC1, COMUM e 304), não apresentaram padrões de distribuição bem definidos. Os bulks (A e B) destas populações tiveram valores de similaridade de 78%, 85% e 84%, respectivamente.

Materiais superiores e estáveis, desenvolvidos por programas de melhoramento, apresentam um delicado equilíbrio genético, uma vez que novas cultivares a serem lançadas, para obterem o registro de proteção da cultivar devem ser aprovados em experimentos específicos denominados teste DHE (Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade), que consiste em um procedimento técnico de comprovação (DEL NERO, 2004). Por distinguibilidade entende-se que a cultivar tem que se distinguir das demais variedades por uma ou mais características importantes, cuja combinação lhe dê a qualidade de “variedade nova”. A homogeneidade significa que a variedade tem que apresentar baixa variabilidade quando plantada. E a estabilidade determina que as características que descrevem a cultivar devem ser as mesmas ao longo de sua reprodução (TERRAMOTO e TEIXEIRA, 2008; LEITE e MUNHOZ, 2013). Assim, cultivares adaptados ou selecionados para determinada região de produção acabam tendo similaridade genética. Como consequência, a maioria dos cultivares, de uma mesma região, é geneticamente similar, portanto com base genética mais restrita (GIZLICE, CARTER Jr e BURTON, 1993).

A população ORO VERDE, identificada como Lperene no dendrograma da Figura 4, é formada por uma cultivar tetraploide importada, da espécie *Lolium perenne*. Estas amostras foram claramente agrupadas em um ramo isolado das demais amostras de *Lolium multiflorum*. Isto ocorre devido a esta população ser geneticamente distante das outras estudadas, informação corroborada pelo baixo nível de similaridade genética desta com as demais amostras (56%).

As demais populações não representam cultivares e foram coletadas em localizações diversas como fazendas de produtores locais ou em áreas não cultivadas, como próximas a estradas. O grau de similaridade genética entre estas populações variou entre 67% e 91%.

6 CONCLUSÕES

Foi possível observar o sucesso na transferência de marcadores microsatélite entre espécies e gêneros, o que demonstra a eficácia e utilidade desta transferência em trabalhos que estudam espécies para as quais não existem muitos dados genômicos na literatura. A taxa de amplificação cruzada foi alta, mesmo entre gêneros diferentes.

Embora o agrupamento em *bulks* permita tomar uma amostragem maior das populações e reduzir o custo das análises, são raros os softwares que realizem análises neste modelo. Além disso, alelos presentes em baixas frequências nas populações podem ter sido mascarados.

O dendrograma obtido demonstrou que existe variável extensão da diversidade genética das populações estudadas e o agrupamento das amostras foi muito heterogêneo. Além disso, dentro das populações foi observada maior variância molecular do que entre elas.

Concluiu-se que a cultivar BRS Ponteio, já lançada pela Embrapa desde 2007, é geneticamente muito homogênea e diferente das demais.

A população Lperene, composta por indivíduos tetraploides da espécie *Lolium perenne*, atuou como um ótimo grupo externo no dendrograma obtido, devido à maior distância genética existente entre este grupo e os demais.

Os resultados aqui obtidos representam um ponto de partida para que estratégias de melhoramento possam ser adotadas, levando-se em consideração a distância genética entre as amostras.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTEAD, I. P.; HARPER, J. A.; TURNER, L. B.; SKØT, L.; KING, I. P.; HUMPHREYS, M. O.; MORGAN, W. G.; THOMAS, H. M.; RODERICK, H. W. 2006. Introgression of crown rust (*Puccinia coronata*) resistance from meadow fescue (*Festuca pratensis*) into Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*): genetic mapping and identification of associated molecular markers. **Plant Pathology**, **55**: 62–67.
- ASP, T.; FREI, U. K.; DIDION, T.; NIELSEN, K. K.; LÜBBERSTEDT, T. 2007. Frequency, type, and distribution of EST-SSRs from three genotypes of *Lolium perenne*, and their conservation across orthologous sequences of *Festuca arundinacea*, *Brachypodium distachyon*, and *Oryza sativa*. **BMC Plant Biology**, **7**(36).
- AVISE, J. C. 1994. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall.
- AZEVEDO, A. L. S.; COSTA, P. P.; MACHADO, J. C.; MACHADO, M. A.; PEREIRA, A. V.; LÉDO, F. J. S. 2012. Cross species amplification of *Pennisetum glaucum* microsatellite markers in *Pennisetum purpureum* and genetic diversity of napier grass accessions. **Crop Science**, **52**: 1776-1785.
- BARBIERI, R. L.; CASTRO, C. M.; MITTELMANN, A.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de; PEREIRA, A. S.; LEITE, D. L.; CHOER, E.; ANTUNES, I. F.; CASTRO, L. A. S.; RASEIRA, M. C. B.; MARIOT, M. P.; FAGUNDES, P. R. R.; SILVA, S. D. A.; TREPTOW, R. 2005. Banco ativo de germoplasma de azevém. In:____. **Conservação ex situ de recursos genéticos vegetais na Embrapa Clima Temperado**. 1ª ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 27 p.
- BOLDRINI, I. I. 1993. **Dinâmica da vegetação de uma pastagem natural sob diferentes níveis de oferta de forragem e tipos de solos, Depressão Central, RS**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 262 p.
- BORÉM, A. 2005. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2.ed. Viçosa. Editora UFV. 969p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. 2009. **Melhoramento de Plantas**. 5.ed. Viçosa: Editora UFV. 529p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. 2013. **Melhoramento de Plantas**. 6.ed. Viçosa: Editora UFV. 523p.

BRASIL. Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências. Publicada no Diário Oficial da União em 06 de agosto de 2003.

BREMM, C. 2007. **Relação planta-animal em pastagem de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e milheto (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) com ovinos sob níveis de suplemento**. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, 108p.

BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; BORBA, T. C. O.; BRONDANI, R. P. V. 2003. Transferability of microsatellite and sequence tagged site markers in *Oryza* species. **Hereditas**, **138**:187–192.

CANÇADO, L. J. 2009. **Caracterização da diversidade genética molecular em germoplasma de *Brachiaria* spp.** Tese, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, Campinas, 99p.

CARÁMBULA, M. 1977. **Producción y manejo de pasturas sembradas**. Montevideo: Ed. Hemisferio Sur, 476p.

CARÁMBULA, M. 1998. **Producción y manejo de pasturas sembradas**. Montevideo: Ed. Hemisferio Sur, 464 p.

CARELLI, B. P. 2003. **Estimativa de variabilidade genética em acessos crioulos e cultivares comerciais de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) do sul do Brasil e avaliação da presença do gene Mi**. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 116p.

CARVALHO, P. C. F.; PRACHE, S.; DAMASCENO, J. C. 1999. O processo de pastejo: desafios da procura e apreensão da forragem pelo herbívoro. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, 1999, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.253-268.

Copyright © 2005 Brianna M. Richardson. Disponível em: <http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?where=genre=Plantewhere-namesoup=Italian+Ryegrasserel-namesoup=matchphrase> Acesso em: 25/04/2014.

CORNISH, M. A.; HAYWARD, M. D.; LAWRENCE, M. J. 1979. Self-incompatibility in ryegrass I. Genetic control in diploid *Lolium perenne* L. **Heredity**, **43**: 95–106.

DE CONTO, L.; SGANZERLA, D. C.; PEDROSO, C. E. S.; MONKS, P. L. 2011. Relação azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) – ruminante. **Archivos de Zootecnia**, **60** (1): 41-54.

DEL NERO, P. A. 2004. **Propriedade intelectual: A tutela jurídica da biotecnologia**. São Paulo: Editora RT-Revista dos Tribunais, 363p.

DIAS, J. C. A.; GOMES, J. F.; INFELD, J. A. 2001. **Avaliação de genótipos de azevém anual em solos hidromórficos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado.

- DICE, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, **26**: 297-302.
- EMBRAPA – Rede Nacional de Recursos Genéticos Vegetais. PC5 – Bancos Ativos de Germoplasma de Forrageiras. Disponível em: <
<http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-vegetal/projetos-componentes/pc5-bancos-ativos-de-germoplasma-de-forrageiras>> Acesso em: 07/01/2015.
- EMBRAPA. 2007. Azevém BRS Ponteio.
- FALEIRO, G. F. 2007. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1.ed. Planaltina: Embrapa. 102p.
- FARRAR, K.; BRYANT, D. N.; TURNER, L.; GALLAGHER, J. A.; THOMAS, ANN.; FARREL, M.; HUMPHREYS, M. O.; DONNISON, I. S. 2012. Breeding for bio-ethanol production in *Lolium perenne* L.: Association of allelic variation with high water-soluble carbohydrate content. **BioEnergy Research**, **5**: 149-157.
- FELTUS, F. A.; SINGH, H. P.; LOHITHASWA, H. C.; SCHULZE, S. R.; SILVA, T. D.; PATERSON, A. H. 2006. A comparative genomics strategy for targeted discovery of single-nucleotide polymorphisms and conserved-noncoding sequences in orphan crops. **Plant Physiology**, **140**: 1183–1191.
- FERREIRA, C. B. B.; LOPES, M. T. G.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; MOREIRA, D. A.; BARROS, W. S.; MATIELLO, R. R. 2012. Diversidade genética molecular de progênies de dedenheiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **47** (3): 378-384.
- FIGUEIRA, G. M.; BAJAY, M. M.; SILVA, C. M. S.; ZUCCHI, M. I.; MONTEIRO, M.; RODRIGUES, M. V. N. 2011. Development and characterization of microsatellite markers for *Hebanthe eriantha* (Amaranthaceae). **American Journal of Botany**, **98** (10): 282-283.
- FIRESTONE, J. L.; JASIENIUK, M. 2013. Small population size limits reproduction in an invasive grass through both demography and genetics. **Oecologia**, **172**: 109–117.
- FLATZ, R.; YODER, J. B.; LEE-BARNES, E.; SMITH, C. I. 2011. Characterization of microsatellite loci in *Yucca brevifolia* (Agavaceae) and cross-amplification in related species. **American Journal of Botany**, **98** (3): 67-69.
- FLORES, R. A.; DALL'AGNOL, M.; NABINGER, C.; MONTARDO, D. P. 2008. Produção de forragem de populações de azevém anual no estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, **37** (7): 1168-1175.
- FLOSS, E. L. 1988. Manejo forrageiro de aveia (*Avena* sp) e azevém (*Lolium* sp). In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 9, 1988, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, p. 231-268.
- GALLI, A. J. B.; MAROCHI, A. I.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; TRENTIN, R.; TOCHETTO, S. 2005. Ocorrência de *Lolium multiflorum* Lam. resistente a glyphosate no Brasil. In SEMINARIO-TALLER IBEROAMERICANO RESISTENCIA A HERBICIDAS Y CULTIVOS TRANSGÉNICOS (2005, Colonia del Sacramento, UY). Rios, A. coord. La Estanzuela, INIA. 1 disco compacto.

GARCÍA-VERDUGO, C.; SAJEVA, M.; LA MANTIA, T.; HARROUNI, C.; MSANDA, F.; CAUJAPÉ-CASTELLS, J. 2015. Do island plant populations really have lower genetic variation than mainland populations? Effects of selection and distribution range on genetic diversity estimates. **Molecular Ecology**.

GERDES, L. 2003. **Introdução de uma mistura de três espécies forrageiras de inverno e pastagem irrigada de capim-Aruana**. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, 73p.

GERMAIN-AUBREY, C. C.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; GITZENDANNER, M. A. 2010. Microsatellite marker development for the federally listed *Prunus geniculata* (Rosaceae). **American Journal of Botany**, 98 (3): 58-60.

GIZLICE, Z.; CARTER Jr, T. E.; BURTON, J. W. 1993. Genetic diversity in North America soybean: I. Multivariate analysis of founding stock and relation to coefficient of parentage. **Crop Science**, 33: 614 – 20.

GOLEMBIEWSKI, R. C.; DANNEBERGER, T. K.; SWEENEY, P. M. 1997. Potential of RAPD markers for use in the identification of creeping bentgrass cultivars. **Crop Science**, 37: 212–214.

GONÇALVES, L. S. A.; RODRIGUES, R.; SUDRÉ, C. P.; BENTO, C. S.; MOULIN, M. M.; ARAÚJO, M. L.; DAHER, R. F.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G. 2008. Divergência genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparação com descritores multicategóricos. **Horticultura Brasileira**, 26: 364-370.

GONG, L.; DENG, Z. 2012. Selection and application of SSR markers for variety discrimination, genetic similarity and relation analysis in gerbera (*Gerbera hybrida*). **Scientia Horticulturae**, 138: 120-127.

GOULART, I. C. G. R.; MEROTTO JUNIOR, A.; NUNES, A. L.; BERED, F. 2011. Otimização da utilização de marcadores moleculares microssatélites e sua aplicação em estudos com plantas daninhas. **Planta Daninha**, 29: 1175-1181.

GUPTA, V.; DORSEY, G.; HUBBARD, A. E.; ROSENTHAL, P. J.; GREENHOUSE, B. 2010. Gel versus capillary electrophoresis genotyping for categorizing treatment outcomes in two antimalarial trials in Uganda. **Malaria Journal**, 9 (1): 1-8.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, 4 (1).

HANCOCK, J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (eds) **Microsatellites: Evolution and Application**. London: Oxford University Press. p. 1–9.

HANNAWAY, D.; FRANSEN, S.; CROPPER, J.; TEEL, M.; CHANEY, M.; GRIGGS, T.; HALSE, R.; HART, J.; CHEEKE, P.; HANSEN, D.; KLINGER, R.; LANE, W. 1999. Annual Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). Oregon State University, PNW 501. Disponível em: <

<https://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/17440/pnw501.pdf?sequence=4>>.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. 1989. **Principles of population genetics**. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 682p.

HERNÁNDEZ, P.; LAURIE, D. A.; MARTÍN, A.; SNAPE, J. W. 2002. Utility of barley and wheat simple sequence repeat (SSR) markers for genetic analysis of *Hordeum chilense* and tritordeum. **Theoretical and Applied Genetics**, 104: 735–739.

HIRATA, M.; CAI, H.; INOUE, M.; YUYAMA, N.; MIURA, Y.; KOMATSU, T.; TAKAMIZO, T.; FUJIMORI, M. 2006. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR-based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). **Theoretical and Applied Genetics**, 113: 270-279.

HIRATA, M.; KIYOSHI, T.; YUYAMA, N.; CAI, H. 2011. Development of simple sequence repeat markers for inbreeding *Lolium* species. **Grassland Science**, 57: 35–45.

JONES, E. S.; DUPAL, M. P.; KÖLLIKER, R.; DRAYTON, M. C.; FORSTER, J. W. 2001. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Springer-Verlag**, 102: 405-415.

KING, J.; THOROGOOD, D.; EDWARDS, K. J.; ARMSTEAD, I. P.; ROBERTS, L.; SKOT, K.; HANLEY, Z.; KING, I. P. 2008. Development of a genomic microsatellite library in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and its use in trait mapping. **Annals of Botany**, 101: 845-853.

KÖLLIKER, R.; BOLLER, B.; WIDMER, F. 2005. Marker assisted polycross breeding to increase diversity and yield in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Euphytica**, 146: 55–65.

KÖLLIKER, R.; ROSELLINI, D.; WANG, Z. 2010. Development and Application of Biotechnological and Molecular Genetic Tools. In: BOLLER, B.; POSSELT, U.K.; VERONESI, F. **Fodder Crops and Amenity Grasses**. 1.ed. New York: Springer Science. p.89-113.

KUK, Y. I.; BURGOS, N. R.; TALBERT, R. E. 2000. Cross- and multiple resistance of diclofop-resistant *Lolium* spp. **Weed Science**, 48: 412–419.

KULEUNG, C.; BAENZIGER, P. S.; DWEIKAT, I. 2004. Transferability of SSR markers among wheat, rye and triticale. **Theoretical and Applied Genetics**, 108: 1147–1150.

LAUVERGEAT, V.; BARRE, P.; BONNET, M.; GHESQUIÈRE, M. 2005. Sixty simple sequence repeat markers for use in the *Festuca-Lolium* complex of grasses. **Molecular Ecology Notes**, 5: 401-405.

LEITE, D. S.; MUNHOZ, L. L. 2013. Biotecnologia e melhoramento das variedades de vegetais: cultivares e transgênicos. **Veredas do Direito**, 10 (19): 23-44.

- LERMA-SEGOVIA, A.; CANTRELL, R. G.; CONWAY, J. M.; RAY, I. M. 2003. AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasms using bulk DNA templates. **Genome**, **46**: 51-58.
- LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology Reports**, **4**: 203–221.
- LI, M.; CHEN, S.; SHI, S.; ZHANG, Z.; LIAO, W.; WU, W.; ZHOU, R.; FAN, Q. 2015. High genetic diversity and weak population structure of *Rhododendron jinggangshanicum*, a threatened endemic species in Mount Jinggangshan of China. **Biochemical Systematics and Ecology**, **58**: 178-186.
- LIU, F.; YAO, J.; WANG, X.; REPNIKOVA, A.; GALANIN, D. A.; DUAN, D. 2012. Genetic diversity and structure within and between wild and cultivated *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta) revealed by SSR markers. **Aquaculture**, **358-359** :139-145.
- LORIEUX, M.; NDJIONDJOP, M. N.; GHESQUIÈRE, A. A. 2000. First interspecific *Oryza sativa* × *Oryza glaberrima* microsatellitebased genetic linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, **100**: 593–601.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, **15**: 65-95.
- LÚCIO, C. C. F.; RUAS, E. A.; RODRIGUES, L. A.; RUAS, P. M.; VIDOTTO, T.; SOUZA, L. B.; MATZENBACHER, N. I.; RUAS, C. F. 2011. Characterization of 12 microsatellite loci for *Hypochoeris chillensis* (Asteraceae) and cross-amplification in related species. **American Journal of Botany**, **98** (9): 262-264.
- MACHADO, A. T. 2014. Construção histórica do melhoramento genético de plantas: do convencional ao participativo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, **9**(1): 35-50.
- MAIA, M. S. 1995. **Secagem de sementes de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) com ar em ambiente controlado**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil, 108p.
- MAPA. Disponível em:
<http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php>
Acesso em: 03/06/2014.
- MATAKIS, S.; OVERATH, R. D.; KUTIL, B.; PEPPER, A. E.; MANHART, J. R. 2011. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Bothriochloa ischaemum* (Poaceae). **American Journal of Botany**, **98** (7): 192-194.
- MATESANZ, S.; SULTAN, S. E.; JONES, K. L.; HAGEN, C.; LANCE, S. L. 2011. Development and characterization of microsatellite markers for *Polygonum cespitosum* (Polygonaceae). **American Journal of Botany**, **98** (7): 180-182.
- MCGRATH, S.; HODKINSON, T. R.; SALAMIN, N.; BARTH, S. 2006. Development and testing of novel chloroplast microsatellite markers for *Lolium perenne* and other

grasses (Poaceae) from de novosequencing and in silico sequences. **Molecular Ecology Notes**, **6**: 449– 452.

MEKSEM, K.; KAHL, G. 2005. **The Handbook of plant genome mapping: Genetic and Physical Mapping**. Weinheim: Wiley-VCH, 403 p.

MEYER, A. S. 2002. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, 106p.

MISSIAGGIA, A.; GRATTAPAGLIA, D. 2006. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multipletailed primers. **Genetics and Molecular Research**, **5** (1): 72-78.

MITTELMANN, A. 2006. Principais espécies forrageiras. In: PEGORARO, L. M. C. (Ed.). **Noções sobre produção de leite**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 153 p.

MITTELMANN, A.; COSCIONI, A. C.; PILLON, C. N.; BITENCOURT, D.; ALVES, G. C.; GOMES, J. F.; PEGORARO, L. M. C.; PETRINI, L. A.; MARQUES, L. T.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; MARTINS, P. R. G.; BARBOSA, R. S.; FISCHER, V.; JUNIOR, W. S. 2006. **Noções Sobre Produção de Leite**. 1.ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 172p.

MITTELMANN, A.; MONTARDO, D. P.; CASTRO, C. M.; NUNES, C. D. M.; BUCHWEITZ, E. D.; CORRÊA, B. O. 2010. Caracterização agrônômica de populações locais de azevém na Região Sul do Brasil. **Ciência Rural**, **40** (12): 2527-2533.

MUZZALUPO, I.; VENDRAMIN, G. G.; CHIAPPETTA, A. 2014. Genetic biodiversity of Italian olives (*Olea europaea*) germplasm analyzed by SSR markers. **The Scientific World Journal**, **2014**: 12p.

NEIVA, R. 2007. Primeira cultivar de azevém da Embrapa é lançada. Disponível em: < <http://www.renorbio.org.br/portal/noticias/primeira-cultivar-de-azevem-da-embrapa-e-lancada.htm> > Acesso em: 03/11/2014.

NELSON, C. J.; MOSER, L. E. 1994. Plant factors affecting forage quality. In: FAHEY JR., G. C. (Ed.). **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy / Crop Science Society of America / Soil Science Society of America. p.115-154.

NELSON, L. R. 1995. Pest management in ryegrass. In: SYMPOSIUM ON ANNUAL RYEGRASS, 1995, Tyler. **Proceedings...** Tyler: Texas A&M University Agriculture research and Extension Center – Overton Texas Agricultural Experiment Station and Texas Agricultural Extension Service, p.100-105.

NELSON, L. R.; PHILLIPS, T. D.; WATSON, C. E. 1997. Plant breeding for improved production in annual ryegrass. In: ROUQUETTE, F. M.; NELSON, L. R. (Eds.) **Ecology, production, and management of *Lolium* for forage in the USA**. Madison: Crop Science Society of America. 138p.

- OETTING, W. S.; LEE, H. K.; FLANDERS, D. J.; WIESNER, G. L.; SELLERS, T. A.; KING, R. A. 1995. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. **Genomics**, **30** (3): 450-458.
- OLIVEIRA, C. A. M.; SILVA, E. F.; MOLICA, S. G.; FERREIRA, R. L. C.; LIRA, D. A. S.; BARROS JÚNIOR, J. A. B. 2006. Diversidade e estrutura genética em populações de *Caesalpinia echinata* (Lam.) na Estação Ecológica do Tapacurá, PE. **Scientia Forestalis**, **70**: 77-83.
- OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, **87**: 551-568.
- PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (microsatellites) within the genus and other legume genera—implications for the transferability of microsatellites in plants. **Molecular Biology and Evolution**, **15**: 1275–1287.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, **28** (19): 2537-2539.
- PEREIRA, A. V.; VALLE, C. B.; FERREIRA, R. P.; MILES, J. W. 2001. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso. p.1183.
- PUPO, N. I. H. 1979. **Manual de pastagens e forrageiras: formação, conservação, utilização**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 343p.
- QUADROS, B. P.; SILVA, A. C. F.; ROCHA, M. G.; QUADROS, F. L. F.; GUTERRES, F. P.; ESTIVALET, R. C. 2003. Produção de forragem de cultivares de azevém (*Lolium multiflorum*) sob duas densidades de semeadura. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2003. **Anais...** Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia.
- RADOSAVLJEVIĆ, I.; JAKSE, J.; JAVORNIK, B.; SATOVIC, Z.; LIBER Z. 2011. New microsatellite markers for *Salvia officinalis* (Lamiaceae) and cross-amplification in closely related species. **American Journal of Botany**, **98** (11): 316-318.
- REYES-VALDÉS, M. H.; SANTACRUZ-VARELA, A.; MARTÍNEZ, O.; SIMPSON, J.; HAYANO-KANASHIRO, C.; CORTÉS-ROMERO, C. 2013. Analysis and optimization of bulk DNA sampling with binary scoring for germplasm characterization. **PLoS ONE**, **8**(11): e79936.
- ROA, A. C.; CHAVARRIAGA-AGUIRE, P.; DUQUE, M. C.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; IGLESIAS, C.; TOHME, J. 2000. Crossspecies amplification of cassava (*Mannihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, **87**: 1647–1655.

ROHLF, F. J. 2000. NTSYS-pc: Numerical taxonomy system. Ver. 2.1. Exeter Software, Setauket, NY. p. 29–34.

SANTOS, F. R.; LACERDA, D. R.; REDONDO, R. A. F.; NASCIMENTO, A. M. A.; CHARTONE, E.; BORBA, E.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. 2009. Diversidade Genética. In: Drumond, G. M.; Martins, C. S.; Greco, M. B., Vieira, F. (Org.). **Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no estado de Minas Gerais subsídio para o programa Biota Minas**. 1ed. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, p. 389-410.

SCHUELKE, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, **18**: 233-234.

SENDA, T.; KUBO, N.; HIRAI, M.; TOMINAGA, T. 2003. Development of microsatellite markers and their effectiveness in *Lolium temulentum*. **Weed Research**, **44**: 136–141.

SENDA, T.; SAITO, M.; OHSAKO, T.; TOMINAGA, T. 2004. Analysis of *Lolium temulentum* geographical differentiation by microsatellite and AFLP markers. **Weed Research**, **45**:18–26.

SHAM, P.; BADER, J. S.; CRAIG, I.; O'DONOVAN, M.; OWEN, M. 2002. DNA Pooling: a tool for large-scale association studies. **Nature Reviews Genetics**, **3**: 862–87.

SORENG, R. J.; DAVIS, J. I. 1998. Phylogenetic and character evolution in the grass family Poaceae: simultaneous analysis of morphology and chloroplast DNA restriction site character sets. **Botanical Review**, **64**: 1-85.

STUDER, B.; WIDMER, F.; ENKERLI, J.; KÖLLIKER, R. 2006. Development of novel microsatellite markers for the grassland species *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. **Molecular Ecology Notes**, **6**: 1108-1110.

SUDHEER, P. D. V. N.; MASTAN, S. G.; RAHMAN, H.; PRAKASH, C. H. R.; SINGH, S.; REDDY, M. P. 2011. Cross species amplification ability of novel microsatellites isolated from *Jatropha curcas* and genetic relationship with sister taxa. **Molecular Biology Reports**, **38**:1383–1388.

TAKAHASHI, W.; MIURA, Y.; SASAKI, T.; TAKAMIZO, T. 2014. Identification of a novel major locus for Gray leaf spot resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). **BMC Plant Biology**, **14**: 303.

TERRAMOTO, J. R. S.; TEIXEIRA, J. V. 2008. **Propriedade intelectual e proteção aos cultivares**. Campinas: APTA/Departamento de Gestão Estratégica, 27p.

UNIPASTO – Associação para Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras. EMBRAPA. Disponível em:< <http://www.unipasto.com.br/embrapa.html>> Acesso em: 06/01/2015.

VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. 2009. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, **56** (4): 460–472.

- VALLE, C.; SIMIONI, C.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L.; CHIARI, L. 2008. Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. DO; JANK, L. (Eds.). . **Melhoramento de Forrageiras Tropicais**. 1^a. ed. Campo Grande: Embrapa. p. 13–53.
- VARSHNEY, R. K.; RIBAUT, J. M.; BUCKLER, E. S.; TUBEROSA, R.; RAFALSKI, J. A.; LANGRIDGE, P. 2012. Can genomics boost productivity of orphan crops? **Nature Biotechnology**, 30 (12): 1172-1176.
- VARSHNEY, R. K.; THOMAS, T.; STEIN, N.; LANGRIDGE, P.; GRANER, A. 2002. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. **Cellular and Molecular Biology Letters**, 7: 537-546.
- WANG, H.; WALLA, J. A.; ZHONG, S.; HUANG, D.; DAI, W. 2012. Development and cross-species/genera transferability of microsatellite markers discovered using 454 genome sequencing in chokecherry (*Prunus virginiana* L.). **Plant Cell Reports**, 31: 2047–2055.
- YU, C.; LUO, L.; PAN, H.; GUO, X.; WAN, H.; ZHANG, Q. 2015. Filling gaps with construction of genetic linkage map in tetraploid roses. **Frontiers in Plant Science**, 5: 792.
- YU, H. Y.; JING-GAO; LUO, Y. B.; BAI, W. N. 2011. Development of polymorphic microsatellite markers for *Incarvillea sinensis* (Bignoniaceae). **American Journal of Botany**, 98 (8): 224-225.
- ZHANG, L. Y.; BERNARD, M.; LEROY, P.; FEUILLET, C.; SOURDILLE, P. 2005. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. **Theoretical and Applied Genetics**, 111: 677–687.
- ZHOU, H.; LIAO, J.; XIA, Y.; TENG, Y. 2013. Determination of genetic relationship between evergreen azálea cultivars in China using AFLP markers. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, 14 (4): 299-308.

ANEXO A – Resumo Publicado



Assessment of genetic diversity in *Lolium multiflorum* detected by microsatellite markers

Paiva, RM¹; Azevedo, ALS²; Oliveira, FR²; Mittelman, A²; Viccini, LF¹

¹ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Keywords: Ryegrass, *Lolium*, molecular markers, SSR, genetic diversity

Annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) is a cool-season annual grass native to southern Europe. It is an important short-duration grass with high palatability and digestibility. The capacity to tolerate trampling make this species highly valued for forage/livestock systems. In addition, the species has a good capacity to resprout. Embrapa currently conducts a breeding program for Annual ryegrass and the genetic diversity knowledge is useful to characterize individuals/accessions/cultivars allowing the identification of possible duplications in the germplasm collection and also to select parental genotypes in breeding programs. Molecular markers are largely used to access the genetic variability in the DNA level. Microsatellites (SSRs) are PCR based markers, consisting in tandemly repeated nucleotide sequences that require specific primers to anneal at the conserved flanking regions. Therefore, SSRs can be used to obtain markers in genetic related species. The objective of this work was to estimate the genetic variability among populations of ryegrass belonging to Embrapa Dairy Cattle breeding program. The DNA was extracted from 628 individuals, belonging to 32 ryegrass populations and the microsatellite markers were obtained by cross-amplification of close related species. A dendrogram was generated by UPGMA algorithm, using the NTSYS software, by Dice similarity coefficient. Twenty five primer pairs (71.5%) showed cross-species amplification in *L. multiflorum* and 15 were chosen based on the polymorphisms detected. Once no genomic information is available for *L. multiflorum*, the use of markers previously described for closely related species was an efficient alternative for microsatellite markers identification.

The similarity coefficient values ranged from 0.51 to 0.94. High genetic divergence among the populations was observed, indicating a high degree of diversity. The result is expected since *L. multiflorum* is an alogamous species and has a wide geographical distribution. The data will be useful helping breeders to select parents for crosses and as well as to evaluate the genetic diversity between populations during breeding programs.