

versão

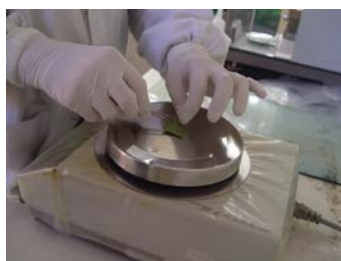
ON LINE

Documentos

ISSN 1806-9193
Dezembro, 2007

218

Bulks de DNA na Caracterização de Germoplasma Vegetal



Embrapa



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1806-9193

Dezembro, 2007

Documentos 218

versão

ON LINE

Bulks de DNA na caracterização de germoplasma vegetal

Editores Técnicos

**Adriana Pires Soares Bresolin
Caroline Marques Castro
Antonio Costa de Oliveira**

**Pelotas, RS
2007**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392, km 78

Caixa Postal 403, CEP 96001-970 - Pelotas, RS

Fone: (53) 3275 8199

Fax: (53) 3275 8219 - 3275 8221

Home page: www.cpact.embrapa.br

E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Walkyria Bueno Scivittaro

Secretária-Executiva: Joseane M. Lopes Garcia

Membros: Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena Verneti Azambuja, Luís Antônio Suita de Castro, Sadi Macedo Sapper, Regina das Graças V. dos Santos

Suplentes: Daniela Lopes Leite e Luís Eduardo Corrêa Antunes

Revisor de texto: Sadi Macedo Sapper

Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Editoração eletrônica e capa: Oscar Castro

Fotos da capa: Larissa Carvalho (estagiária)

1ª edição

1ª impressão 2007: 100 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Bresolin, Adriana Pires Soares.

BULKS DE DNA NA CARACTERIZAÇÃO DE GERMOPLASMA VEGETAL / Adriana Pires Soares Bresolin; Caroline Marques Castro; Antonio Costa de Oliveira. -- Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007.

26 p. -- (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 218).

ISSN 1516-8840

Genética vegetal - DNA - Amostragem - Marcador molecular. I. Castro, Caroline Marques. II. Oliveira, Antonio Costa de. III. Título. IV. Série.

CDD 572.86

Autor

Adriana Pires Soares Bresolin
Eng. Agrôn(a)
Doutoranda em Fitomelhoramento
(spadri@pop.com.br)

Caroline Marques Castro
Eng. Agrôn(a), Dr^a em Genética
Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS
(caroline@cpact.embrapa.br)

Antonio Costa de Oliveira
Eng. Agrôn., Ph.D. em Genética
Associado do do Departamento de Fitotecnia -
FAEM/UFPel, Pelotas, RS
(acostol@terra.com.br)

Apresentação

A genética molecular tem tido um papel importante na conservação da biodiversidade. Os recursos genéticos vegetais são parte importante dessa biodiversidade, pois compreendem plantas cultivadas e espécies silvestres com valor comprovado ou mesmo potencial.

O uso de técnicas moleculares na caracterização de recursos genéticos tem permitido identificar o grau de diversidade genética do germoplasma conservado, possibilitando um manejo adequado desses recursos e informando a respeito da necessidade de novas coletas ou introduções de germoplasma, assim como para redundâncias no material conservado.

Marcadores moleculares associados ao uso de *bulks* de DNA em estudos de diversidade genética permitem avaliar um grande número de populações em um curto espaço de tempo, isso porque reduz drasticamente o número de amostras a serem processadas preservando os alelos mais frequentes de cada população. Por isto, os *bulks* de DNA vêm sendo frequentemente utilizados em análises moleculares que envolvem principalmente espécies alógamas.

Esta revisão bibliográfica aborda o uso de *bulks* de DNA na caracterização de recursos genéticos, suas vantagens e limitações.

João Carlos Costa Gomes

Chefe-Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

Bulks de DNA na caracterização de germoplasma vegetal	9
Introdução	9
Definição de Bulks de DNA	11
Tipos de Bulks DNA	11
Bulks Oriundos de Tecidos de Plântulas	11
Bulks Oriundos de Sementes	11
Uso de Bulks de DNA em análises moleculares	12
Influência do tamanho dos Bulks <i>nas</i> análises	13
Vantagens do uso de Bulks	16
Limitações do uso de Bulks	16
Conclusões	18
Referências	18

Bulks de DNA na caracterização de germoplasma vegetal

*Adriana Pires Soares Bresolin
Caroline Marques Castro
Antonio Costa de Oliveira*

Introdução

Grande riqueza em termos de variabilidade genética de inúmeras culturas encontra-se disponível nos bancos de germoplasma ao redor do mundo. Porém, o uso eficiente destes recursos requer inicialmente uma caracterização precisa da variabilidade existente dentro e entre as populações (SEGOVIA-LERMA et al., 2003). A constatação de que a caracterização do germoplasma conservado em bancos genéticos é limitada não é recente (FRANKEL e BROWN, 1984), e a carência de informações sobre os acessos depositados constitui-se em um dos grandes entraves para o uso desse acervo genético.

A caracterização de germoplasma vegetal refere-se à observação, mensuração e documentação de caracteres da planta que são herdáveis, consistentes e expressas homogeneamente em vários ambientes (FERREIRA et al., 2005). Este processo é realizado por meio da identificação e separação genética dos acessos que compõem a coleção de germoplasma quer morfológicamente, via descrição de caracteres

morfológicos, quer, em nível do genoma, utilizando técnicas moleculares.

A análise molecular permite acessar o polimorfismo genético que muitas vezes difere do polimorfismo derivado da análise fenotípica. A tecnologia molecular tem permitido a identificação de similaridade no DNA de gêneros separados há milhares de anos e cujo fenótipo mascara sua herança genética comum (JAUHAR, 1996; SOBRAL, 1996).

A caracterização molecular de coleções de germoplasma vem sendo realizada com o auxílio vários marcadores baseados na análise direta do DNA (POWELL et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1996; GALGARO et al., 1998; LEÓN et al., 1998; GILBERT et al., 1999; GIMENES et al., 2000; PUECHER et al., 2001; MELLISH et al., 2002; FU et al., 2003; SCHUSTER et al., 2004, HERRMANN et al., 2005). A genética molecular tem tido um papel importante na conservação da diversidade genética, identificando necessidades de coletas ou introduções de germoplasma, assim como redundâncias nos recursos genéticos conservados.

O sistema de reprodução de uma espécie tem papel fundamental na determinação da estrutura genética das populações (RITLAND; JAIN, 1981; MURAWSKI; DAYANANDAN; BAWA, 1994). Segundo Hamrick (1983) e Hamrick e Godt (1989), em espécies de autofecundação a maior variabilidade genética encontra-se entre populações, enquanto que em espécies de fecundação cruzada a variabilidade é maior dentro de populações (LOVELESS e HAMRICK, 1984). O conhecimento do sistema reprodutivo é crítico na definição do tipo e número de amostras necessárias para assegurar uma estimativa precisa da diversidade genética.

No caso de populações geneticamente heterogêneas, como aquelas mantidas por fecundação cruzada, não há uniformidade genética dentro da população (WADT, 1997). Nesse caso, o estudo da variabilidade genética com marcadores de DNA pode

ser feito por meio de amostras de plantas individuais, em número que possibilite a caracterização da variabilidade genética dentro da população (CASTRO et al., 2003), ou por meio de *bulks* de DNA (HERRMANN et al., 2005).

Definição de *Bulks* de DNA

Os *bulks* de DNA são amostras constituídas pela combinação de várias plantas individuais de uma mesma população em uma única amostra (MICHELMORE et al., 1991). A estratégia da composição de *bulks* é originalmente baseada na mistura em iguais quantidades de DNA genômico extraído de plantas individuais (GOLEMBIEWSKI et al., 1997; KONGKIATNGAM et al., 1996; SWEENEY e DANNEBERGER, 1995). Fu et al. (2003), avaliando a estratégia de *bulks* em análise de RAPD evidenciaram que tanto os *bulks* formados antes da extração do DNA, compostos por quantidades iguais de tecido vegetal dos diferentes indivíduos, como aqueles formados após a extração, geraram dados consistentes com a análise.

Tipos de *Bulks* de DNA

Bulks oriundos de tecidos de plântulas

Na maioria dos protocolos de extração de DNA vegetal são utilizados tecidos de plântulas ou plantas, pois permitem o isolamento de elevadas concentrações de DNA por amostra (MCDONALD et al., 1994). Em geral, são usados entre 50-100ng de DNA por reação, este intervalo pode variar de acordo com a técnica de marcadores empregada (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Bulks oriundos de sementes

O uso de DNA obtido diretamente de tecidos de sementes foi pesquisado com sucesso em várias espécies (BENITO et al.,

1993; CHUNWONGSE et al., 1993; MCDONALD et al., 1994; SHATTERS Jr. et al., 1995; ZHANG et al., 1996; MARCOS FILHO et al., 1997; SALGADO, 2001). Schuster et al. (2004) detectaram mistura varietal em lotes de sementes de soja por meio de microssatélites, utilizando tanto amostras constituídas por DNA extraído a partir de sementes individuais como por amostras em *bulk*. Ramos et al. (2006) também constataram que a utilização de *bulks* de DNA oriundos de mistura de sementes podem ser perfeitamente utilizados na detecção de marcadores microssatélites, apresentando nitidez e repetibilidade na determinação da pureza varietal de lotes de sementes de linhagens de milho, com sensibilidade para detecção de concentrações de DNA iguais ou superiores a 0,01%.

Uso de Bulks de DNA em análises moleculares

Para conservar e manejar de forma adequada os recursos genéticos é indispensável conhecer a diversidade genética presente nas populações. O desenvolvimento de marcadores baseados no DNA genômico como: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) ou polimorfismo dos fragmentos de restrição, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou DNA polimórfico amplificado ao acaso, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados e SSR (*Simple Sequence Repeats*) seqüências simples repetidas, têm possibilitado o acesso a estimativas de diversidade genética em muitos organismos. Atualmente, grande parte dos trabalhos de caracterização de germoplasma inclui um ou mais tipos de marcadores moleculares baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (GUTHRIDGE et al., 2001; FU et al., 2003; HERRMANN et al., 2005; RAMOS et al., 2006).

Aliados à aplicação prática de alguns marcadores, os *bulks* de DNA têm sido freqüentemente utilizados em estudos de variabilidade genética em várias espécies, incluindo *Brassica*

napus (DULSON et al., 1998), *Agrostis stolonífera* L. (GOLEMBIEWSKI et al., 1997), *Lolium perenne* (ROLDÁN-RUIZ et al., 2001), *Trifolium repens* L. (KÖLLIKER et al., 2001), *Daucus carota* (BRADEEN et al., 2002), *Camellia sinensis* (YUNG-GOO et al., 2002), *Medicago sativa* L. (SEGOVIA-LERMA et al., 2003) e *Trifolium pratense* (HERMANN et al., 2005).

Micheltmore et al. (1991) desenvolveram uma metodologia, denominada *Bulk Segregant Analysis* (BSA) ou análise de segregantes em *bulk*, para identificar, em populações segregantes, marcadores de DNA ligados a genes ou regiões genômicas de interesse. A partir deste trabalho, os *bulks* passaram a ser utilizados com inúmeros propósitos, como por exemplo: em estudos de mapeamento de características quantitativas (CHURCHILL et al., 1993; WANG e PATERSON, 1994); na identificação de marcador ligado à resistência a doenças (POULSEN et al., 1995) e a peso de panícula (MALONE et al., 2007); na análise de relação genética entre cultivares relacionadas (LOARCE et al., 1996); na identificação de cultivares (KOGKIATNGAM et al., 1996; RAMOS et al., 2006); e na caracterização e análise de divergência genética entre populações (SWEENEY; DANNEBERGER, 1994, 1995; MARGALÉ et al., 1995; KÖLLIKER et al., 2001; HERRMANN et al., 2005).

Influência do tamanho dos Bulks nas análises

Em geral o tamanho dos *bulks* tem sido definido de forma empírica, sendo ainda limitadas às informações a respeito do impacto do seu uso em estimativas de variabilidade genética para algumas espécies. Quando o tamanho dos *bulks* não é definido de forma empírica, o tamanho da amostra é baseado em probabilidades estatísticas de acordo com a estrutura da população a fim de que seja representativo da mesma e em função do marcador molecular utilizado levando em conta sua natureza dominante ou co-dominante. Na literatura podemos

encontrar tamanho de *bulks* variando de cinco (GILBERT et al., 1999) até 45 indivíduos (SWEENEY e DANNEBERGER, 1995).

Puecher et al. (2001) verificaram que a utilização de um *bulk* de 10 indivíduos do gênero *Bromus catharticus* aliado à técnica de AFLP possibilitou a distinção entre as duas populações avaliadas. Marcadores AFLP associados ao loco que determina o sexo em aspargo foram adequadamente identificados através de análises utilizando *bulks* de 10 indivíduos (REAMON-BÜTNER et al., 1998).

Fu et al. (2003), em estudo realizado para avaliar a estratégia do uso de *bulks* em análise de marcadores RAPD em acessos de *Linnum usitassimum* L., constataram que *bulks* de 10 indivíduos por população foram eficientes na detecção de variabilidade, enquanto que *bulks* com mais de 10 indivíduos não foram necessariamente mais informativos.

Jorgensen e Shim (2000), explorando a variabilidade genética entre populações de *Daucus carota* L., optaram pela utilização de *bulks* de 13-15 plantas por população e pela técnica de AFLP, obtendo avanços satisfatórios na pesquisa. Da mesma forma, MELLISH et al. (2002), fizeram uso de um *bulk* de 15 indivíduos em análise de AFLP para estudar a diversidade genética entre cultivares de uma espécie forrageira do gênero *Agropyron*, o que propiciou a diferenciação dos 12 cultivares avaliados. De acordo com este autor, as amostras de DNA em *bulk* podem ser usadas para estudos de filogenia de diferentes populações.

Kongkiatngam et al. (1996), testando o efeito de diferentes tamanhos de *bulks* em análises com marcadores RAPD, concluíram que o *bulk* constituído por 20 indivíduos foi representativo da heterogeneidade das cultivares de trevo-vermelho.

A utilização de um *bulk* de 20 plantas revelou variabilidade genética entre 52 cultivares e acessos de *Trifolium repens* e detectaram que aproximadamente 90% dos fragmentos

amplificados nas amostras individuais também estavam presentes nas amostras em *bulks* (Kölliker et al., 2001). Em estudos com *Lolium perenne*, utilizando marcadores AFLP, foi eficiente o uso de *bulks* compostos de 20 plantas individuais na exploração de diversidade genética entre populações (Guthrige et al., 2001).

Para explorar a diversidade genética entre e dentro de populações de trevo-vermelho, não um, mas dois *bulks*, de 20 indivíduos cada, representando uma única população, seria considerado o ideal (Herrmann et al., 2005). A análise de dois *bulks* de 20 indivíduos por população resulta na detecção de até 16% mais marcadores AFLP quando comparada com uma análise baseada em um único *bulk* por população.

Embora a análise de vários *bulks* de uma mesma população tenha sido previamente sugerida (GILBERT et al., 1999), um grande número de estudos tem sido executado com apenas um *bulk* por população, com resultados bastante satisfatórios (KÖLLIKER et al., 2001; SAWKINS et al., 2001; SEGOVIA-LERMA et al., 2003). Segundo Segovia-Lerma et al. (2003), através de marcadores AFLP, um único *bulk* de 30 indivíduos pode ser usado com precisão em estudos de diversidade genética em um grande número de populações de alfafa.

Vantagens do uso de Bulks

A utilização de *bulks* em estudos de diversidade genética permite avaliar um grande número de populações em um curto espaço de tempo, isso porque reduz drasticamente o número de amostras a serem processadas, preservando os alelos mais freqüentes em cada população (MICHELMORE et al., 1991).

A estratégia de *bulks* de DNA tem a grande vantagem da rápida verificação de diferenças entre populações, o que é especialmente importante para um adequado manejo de bancos de germoplasma e para programas de melhoramento genético

(YANAKA et al., 2005). Esta estratégia é particularmente relevante em bancos de germoplasma, onde os *bulks* podem ser utilizados para reorganizar e confrontar os resultados com os previamente obtidos por descritores morfológicos, os quais são muito influenciados pelo ambiente (WADT, 1997).

Segundo Sweeney e Danneberger (1994), a utilização de *bulks* de DNA objetiva diminuir o custo da análise molecular por reduzir consideravelmente o tempo, trabalho e reagentes empregados por reação. Além do que, Fu et al. (2003) evidenciaram que os *bulks* são capazes de gerar padrões genéticos compatíveis com os resultados obtidos por meio de amostras individuais.

Limitações do uso de Bulks

Michelmore et al. (1991) constataram que o tamanho da amostra em *bulk* pode afetar a sensibilidade das técnicas moleculares, impedindo que ocorra a amplificação de marcadores que se encontrem em baixa frequência na amostra. Esses autores verificaram que em amostras que continham menos de 4% dos indivíduos com um determinado marcador, este não foi detectado, enquanto que, para alguns locos, esse limite foi de 10%. Em função dos resultados de Michelmore et al. (1991), vários autores têm considerado o limite de detecção de 4% (WANG e PATERSON, 1994; SWEENEY e DANNEBERGER, 1994, 1995). Contudo, Loarce et al. (1996) verificaram que marcadores com frequência abaixo de 14% não foram detectados nos *bulks*, enquanto que Poulsen et al. (1995) não detectaram fragmentos com frequência inferior a 12,5%. Herrmann et al. (2005) evidenciaram que os marcadores detectados apresentavam uma frequência de 20-30% nos *bulks* de trevo-vermelho. Este limite de detecção de alelos raros corresponde a limites encontrados em outras espécies como tremoço (GILBERT et al., 1999) e trevo-branco (KÖLLIKER et al., 2001).

Outro fator importante a ser considerado para que um marcador seja identificado quando são analisados *bulks* é a intensidade com que o fragmento que identifica o marcador é visualizado no gel quando a análise é feita a partir de plantas individuais (TREUREM, 2001). Esta diferença na intensidade do fragmento provavelmente decorra da competição entre seqüências de DNA pelo iniciador na reação de amplificação (PCR - *Polimerase Chain Reaction*). Segundo Brummer et al. (1995), essas diferenças surgem porque os alelos raros podem não ser amplificados devido à competição dos sítios mais freqüentes que ocorre quando o DNA é misturado. No entanto, a amplificação de *bulks* de DNA pode não gerar os mesmos fragmentos gerados por amostras individuais (SWEENEY e DANNEBERGER, 1994).

Zhu et al. (1998) levantaram alguns questionamentos sobre a efetividade do uso de *bulks* de DNA em relação à baixa sensibilidade na detecção de polimorfismo utilizando marcadores AFLP. Guthridge et al. (2001) evidenciaram que perfis gerados em amostras individuais podiam estar ou não presentes nas amostras em *bulk*, demonstrando a grande relação entre a freqüência de ocorrência e a presença dos fragmentos nas amostras em *bulk*. Apenas fragmentos presentes em mais de 25% das amostras individuais estavam presentes nos *bulks*. Yanaka et al. (2005), por meio de análise realizada com *bulks*, reunindo o DNA de 10 indivíduos de cada acesso, relataram que bandas raras não foram detectadas. Gilbert et al. (1999) salientaram o risco de perda de identificação de alelos quando se avalia *bulks* formados de cinco plantas. Entretanto, vários autores, (Kongkiatngam et al., 1996; Dulson et al., 1998; Mengoni et al., 2000; Kölliker et al., 2001) afirmaram que grandes *bulks* (20 indivíduos) são eficientes, pois não modificam substancialmente os resultados independente da quantidade e estrutura do polimorfismo. Segundo Sweeney e Danneberger (1995) e Margalé et al. (1995), mesmo com a limitação na detecção de alelos raros, o uso de *bulks* tem sido eficiente em estudos de divergência genética.

Conclusões

Esta revisão mostra que os *bulks* de DNA vêm sendo freqüentemente utilizados em análises moleculares que envolvem principalmente espécies alógamas. No entanto, a análise em *bulks* pode subestimar a diversidade genética real existente entre as populações. Desta forma, quando existe o interesse de uma caracterização detalhada de populações específicas de interesse à pesquisa pode ser refinada por meio da análise de genótipos individuais de cada população. Por outro lado, quando o objetivo é caracterizar um grande número de populações, o uso de *bulks* de DNA é extremamente interessante, uma vez que reduz o número de amostras a serem processadas permitindo a caracterização de um grande número de acessos de forma mais rápida e econômica.

Referências

- BENITO, C.; FIGUEIRAS, A.M.; ZARAGOZA, C.; GALLEG0, F.G.; DE LA PEÑA, A. Rapid identification of triticeae genotypes from single seeds using polymerase chain reaction. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 21, p. 181-183, 1993.
- BRADEEN, J.M.; BACH, I.C.; BRIARD, M.; LE CLERC, V.; GRZEBELUS, D.; SENALIK, D.A.; SIMON, P.W. Molecular diversity analysis of cultivated carrot (*Daucus carota* L.) and wild daucus populations reveals a genetically nonstructured composition. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 127, n. 3, p. 383-391.2002.
- BRUMMER, E.C.; BOURTON, J.H.; KOCHERT, G. Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. **Genome**, Ottawa, v. 38, p. 362-367, 1995.
- CASTRO, C.M.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, I.F.; MAIA, M.S.; MATTOS, L.A.; FREITAS, F. Morphological and molecular

characterization of italian ryegrass populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, p. 245-254, 2003.

CHUNWONGSE, J.; MARTIN, G.B.; TANKSLEY, S.D. Pregermination genotypic screening using PCR amplification of halfseeds. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 86, p. 694-698, 1993.

CHURCHILL, G.A.; GIOVANNONNI, J.J.; TANKSLEY, S.D. Pooled-sampling makes high-resolution mapping practical with DNA markers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 90, p. 16-20, 1993.

DULSON, J.; LAIMA, S.K.; RIPLEY, V.L. Efficacy of bulked DNA samples for RAPD fingerprinting of genetically complex *Brassica napus* cultivars. **Euphytica**, Wageningen, v. 102, p. 65-70, 1998.

FERREIRA, M.E.; MORETZSOHN, M.C.; BUSO, G.S.C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. (Ed.). **Recursos**

genéticos vegetais. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 377-420.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220 p.

FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D. Plant genetic resources today: a critical appraisal. In: HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J.T. (Ed.). **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: Allen and Unwin, 1984. p. 249-257.

FU, Y.B.; GUERIN, S.; PETERSON, G.W.; CARLSON, J.E.; RICHARDS, K.W. Assessment of bulking strategies for RAPD analyses of flax germplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Netherlands, v. 50, p. 743-746, 2003.

GALGARO, M.L.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A.; VALLS, J.F.M.; KOCHERT, G. Genetic variation between several species of sections Extranervosae, Caulorrhizae, Heteranthae, and Triseminatae (genus *Arachis*) estimated by DNA polymorphism. **Genome**, Ottawa, v. 41, p. 445-54, 1998.

GILBERT, J.E.; LEWIS, R.V.; WILKINSON, M.J. and CALIGARI, P.D.S. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 98, p. 1125-1131, 1999.

GIMENES, M.A.; LOPES, C.R.; GALGARO, M.L.; VALLS, J.F.M.; KOCHERT, G. Genetic variation and phylogenetic relationships based on RAPD analysis in section Caulorrhizae, genus *Arachis* (Leguminosae). **Euphytica**, Wageningen, v. 116, p. 187-95, 2000.

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

GUTHRIDGE, K.M.; DUPAL, M.P.; KÖLLIKER, E.S.; JONES, K.F.; SMITH; FORSTER, J.W. AFLP analysis of genetic diversity within and between populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 122, p. 191-201, 2001.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant

population. In: SCHONE-WALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.H.; MacBYDE, B.; THOMAS, L. (Ed). **Genetics and conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1983. p. 335-348.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J. Allozyme diversity in plants. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L., WEIR, B.S. (Ed.). **Population genetics, breeding and germplasm resources in crop improvement**. Sunderland: Sinauer Press, 1989. p. 43-63.

HERRMANN, D; BOLLER, B; WIDMER, F; KÖLLIKER, R. Optimization of bulked AFLP analysis and its application for exploring diversity of natural and cultivated populations of red clover. **Genome**, Ottawa, v. 48, n. 3, p. 474-486, 2005.

JAUHAR, P. Genome analysis: a prologue. In: JAUHAR, P. **Methods of genome analysis in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 157.

JORGENSEN, R.B.; SHIM, S.I. Genetic structure in cultivated and wild carrots (*Daucus carota* L.) revealed by AFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 227-233, 2000.

KÖLLIKER, R.; JONES, E.S.; JAHUFER, M.Z.Z.; FORSTER, J.W. Bulk AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 121, p. 305-315, 2001.

KONGKIATNGAM, P; WATERWAY, M.J.; COULMAN B.E.; FORTIN M.G. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. **Euphytica**, Wageningen, v. 89, p. 355-361, 1996.

LEÓN, O.; DIAZ, M.; PETEIRA, B.; CINTRA, D. Applications of molecular markers in the characterization of genetic variability of plant germplasm collections. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, Buenos Aires, v. 13, p. 69-74, 1998.

LOARCE, Y.; GALLEGU, R.; FERRER, E. A comparative analysis of genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 88, p. 107-115, 1996.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in

plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, New York, v. 15, p. 65-95, 1984.

MALONE, G.; MARCHIORO, V.; ZIMMER, P.D.; MALONE, E.; CARVALHO, F.I.F; COSTA DE OLIVEIRA, Antonio. Efeito do método de condução de populações sobre a similaridade genética de uma população segregante de aveia, para peso de panícula. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, p. 75-80, 2007.

MARGALÉ, E.; HERVÉ, Y.; HU, J.; QUIROS, C.F. Determination of genetic variability by RAPD markers in cauliflower, cabbage and kale local cultivars from France. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Netherlands, v. 42, p. 281-289, 1995.

MARCOS FILHO, J.; McDONALD, M.B.; TEKRONY, D.M.; ZHANG, J. RAPD fragment profiles from deterioration soybean seeds. **Seed Technology**, Lincoln, v. 19, n. 1, p. 34-44, 1997.

McDONALD, M.D.; ELLIOT, L.J.; SWEENEY, P.A. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 22, n. 1, p. 171-176, 1994.

MELLISH, A.; COULMAN, B.; FERDINANDEZ, Y. Genetic Relationships among Selected Crested Wheatgrass Cultivars and Species Determined on the Basis of AFLP Markers. **Crop Science**, Madison, v. 42, p.1662–1668, 2002.

MENGONI, A.; GORI, A.; BAZZICALUPO, M. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfafa, *Medicago sativa*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 119, p. 311-317, 2000.

MICHELMORE, R.W.; I. PARAN; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregante analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88, p. 9828-9832, 1991.

MURAWSKI, D.A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K.S.

Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forest. **Biotropica**, Charlottesville, v. 26, n. 1, p. 23-29, 1994.

OLIVEIRA, Antonio Costa de.; RICHTER, T.; BENNETZEN, J.L. Regional And Racial Specificities In Sorghum Germplasm Assessed With Dna Markers. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 579-587, 1996.

POULSEN, D.M.E.; HENRY, R.J.; JOHNSTON, R.P.; IRWIN, J.A.G.; REES, R.G. The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD markers linked to leaf rust resistance in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 91, p. 270-273, 1995.

POWELL, W.; OROZCO CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; PROVAN, J.; WAUGH, R. Polymerase chain reaction-based assays for the characterization of plant genetic resources. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 16, p. 1726-30, 1995.

PUECHER, D.I.; ROBREDO, C.G.; RIOS, R.D.; RIMIERI, P. Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl. populations and cultivars with RAPD and AFLP markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 121, p. 229-236, 2001.

RAMOS, N.P.; BRUNELLI, K.R.; CAMARGO, L.E.A.; FILHO, J.M. Sensibilidade dos microssatélites para determinar a pureza varietal em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 99-105, 2006.

REAMON-BÜTNER, S.M.; SCHONDELMAIER, J.; JUNG, C. AFLP markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L. **Molecular Breeding**, Netherlands, v. 4, p. 91-98, 1998.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, London, v. 47, p. 35-52, 1981.

ROLDÁN-RUIZ, I.; EEUWIJK van, F.A.; GILLILAND, T.J.; DUBREUIL, P.; DILLMANN, C.; LALLEMAND, J.; LOOSE De, M.; BARIL, C.P. Comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, p. 1138-1150, 2001.

SALGADO, K.C.C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2001. 67f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SAWKINS, M.C.; MAASS, B.L.; PENGELLY, B.C.; NEWBURY, H.J.; FORD-LLOYD, B.V.; MAXTED, N.; SMITH, R. Geographical patterns of genetic variation in two species of *Stylosanthes* Sw. using amplified fragment length polymorphism. **Molecular Ecology**, West Lafayette, v. 10, p. 1947-1958, 2001.

SCHUSTER, I.; QUEIROZ, V.T.; TEIXEIRA, A.I.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M. A. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com auxílio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 3, p. 247-253, 2004.

SEGOVIA-LERMA, A.; CANTRELL, R.G.; CONWAY, J.M.; AND RAY, I.M. AFLP-based assessment of genetic diversity among ninealfalfa germplasms using bulk DNA templates. **Genome**, Ottawa, v. 46, p. 51-58, 2003.

SHATTERS JR, R.G.; SCHWEDER, M.E.; WEST, S.H.; ABDELGHANY, A.; SMITH, R.L. Environmentally induced polymorphisms detected by RAPD analysis of soybean seed DNA. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, p. 109-116, 1995.

SOBRAL, B.W.S. Characterization of Biodiversity and Technological Opportunities: High Throughput Screening

Technologies. **Proceedings of the PADCT/SBIO-funded Biodiversity Workshop**, Campinas, Brazil, May, 1996.

SOUZA, L.M.F.I.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St. Hil. (Bombaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 113-121, 2003.

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

SWEENEY, P.M.; DANNEBERGER, K.T. RAPD characterization of *Poa annua* L. populations in golf course greens and fairways. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1676-1680, 1995.

TREUREM, R. Van. Efficiency of reduced primer selectivity and bulked DNA analysis for the rapid detection of AFLP polymorphisms in a range of crop species. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, p. 27-37. 2001.

WADT, L.H.O. **Avaliação de divergência genética em coqueiro (*Cocos nucifera* L.) usando marcadores RAPD em amostras de plantas individuais e compostas**. 1997. 109p. Tese (Magister Scientiae) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 1997.

WANG, G.L.; PATERSON, A.H. Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, p. 355-361, 1994.

YANAKA, F.Y.; DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DIAS, P.M.B.; GOMES, K.E. Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (Poaceae) com Base em Isoenzimas e Marcadores RAPD.

Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 1897-1904, 2005.

YUNG-GOO, P.; KAUNDUN, S.S.; ZHYVOLOUP, A. Use of the bulked genomic DNA-based RAPD methodology to assess the genetic diversity among abandoned Korean tea plantations. **Genetic Resources and Crop evolution**, Netherlands, v. 49, p. 159-165, 2002.

ZHANG, J.; McDONALD, M.B.; SWEENEY, M.P. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) from dry seeds of differing soybean and mayze genotypes. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 24, n. 2, p. 513-522, 1996.

ZHU, J., GALE, M.D., QUARRIE, S., JACKSON, M.T., AND BRYAN, G.J. AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p. 602-611, 1998.

