

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Fernanda Witt Cidade

“Estudos genético-moleculares no gênero *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae)”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <u>Fernanda Witt Cidade</u>
<u>Alfonso</u>
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientadora: Anete Pereira de Souza

Co-Orientadora: Tatiana Teixeira de Souza Chies

Campinas – São Paulo – Brasil

Maio de 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO
INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C486e Cidade, Fernanda Witt
Estudos genético-moleculares no gênero *Paspalum* L.
(Poaceae: Panicoideae: Paniceae) / Fernanda Witt Cidade.
– Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Anete Pereira de Souza.
Co-orientador: Tatiana Teixeira de Souza-Chies.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Marcadores microssatélites. 2. Diversidade
genética. 3. *Paspalum*. 4. Plantas forrageiras. 5.
Poliplóide. I. Souza, Anete Pereira de, 1962-. II. Souza-
Chies, Tatiana Teixeira de. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em Inglês: Genetic and molecular studies in the genus *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae).

Palavras-chave em inglês: Microsatellite markers; Genetic diversity; *Paspalum*; Forage plants; Polyploid.

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca Examinadora: Anete Pereira de Souza, Cacilda Borges do Valle, Rodolfo Godoy, Eliana Regina Forni Martins, Sérgio Furtado dos Reis.

Data da defesa: 27/05/2011

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 27 de maio de 2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (Orientadora)


Assinatura

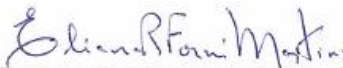
Dra. Cacilda Borges do Valle


Assinatura

Dr. Rodolfo Godoy


Assinatura

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis


Assinatura

Prof. Dr. Flavio Antonio Maës dos Santos

Assinatura

Prof. Dr. José Baldin Pinheiro

Assinatura

Prof. Dr. Roland Vencovsky

Assinatura



Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
20 de abril de 2011.

CIBio: 01/2011

Projeto CIBio: 14/2003

Identificação:

03/2005 – **Doutorado:** Fernanda Witt Cidade, CPG-GBM UNICAMP.

Projeto: Estudos genético-moleculares no gênero *Paspalum* L. (Poaceae:
Panicoideae: Paniceae).

Parecer:

Projeto aprovado pela CIBio/CBMEG em 13/02/2003 sob número 14/2003
(em andamento)

Coordenador: Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato
Presidente da CIBio/CBMEG - UNICAMP

*Aos meus queridos pais, **Francisco e Leontina**, que me deram todas as oportunidades de crescer como ser humano, dedico com amor.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é o registro de mais uma etapa de crescimento profissional e pessoal que tive a felicidade de vivenciar e compartilhar com muitos amigos, colegas e parceiros. A sua concretização tornou-se possível porque pessoas e intuições proporcionaram suporte de naturezas diversas, com demonstração de confiança, carinho e aposta no nosso trabalho. Assim, quero registrar os meus agradecimentos a todos que de alguma forma colaboraram para que este trabalho se realizasse, em especial:

À Universidade Estadual de Campinas, por tudo que aqui me foi oferecido, desde o conhecimento técnico a todos os demais aspectos da minha vida acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e pelos recursos que propiciaram a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) igualmente, pela disponibilização de recursos para viabilizar este trabalho.

À Embrapa Pecuária Sudeste pela parceria.

À Profa. Dra. Anete Pereira de Souza, pela orientação, pelo carinho e por sua contribuição para a minha formação profissional e para a vida, da qual eu me orgulho de ter sido sua orientada.

À minha co-orientadora e incentivadora Profa. Dra. Tatiana Teixeira de Souza-Chies, pelo carinho, pelos ensinamentos, pelas oportunidades e pelo apoio.

Ao Dr. José Francisco Montenegro Valls pelo incentivo, pelo carinho, pelo auxílio, pelas discussões e ensinamentos. Além disso, também agradeço a viagem concedida ao Laboratório do Prof. Dr. Camilo Quarín (IBONE/Argentina), onde tive o prazer de compartilhar conhecimentos com grandes pesquisadores de *Paspalum*.

Ao Prof. Dr. Miguel Dall’Agnol pelo incentivo, pelas agradáveis viagens de coleta, pela disponibilização de material vegetal e pelas críticas ao trabalho.

Ao Dr. Francisco H. Dübbern de Souza, pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, pelo suporte técnico, pelas valiosas sugestões e críticas durante a redação dos artigos, pelas agradáveis conversas e discussões.

Ao Dr. Luiz Alberto Rocha Batista (*in memoriam*) pelo incentivo, pelas calorosas conversas, pelo carinho e amizade, por sua força ao batalhar pela manutenção do Banco de germoplasma de *Paspalum* junto à Embrapa Pecuária Sudeste, além do suporte técnico.

À Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi pela agradável convivência, pela amizade, pelo carinho, pelos ensinamentos, além de ter fornecido suporte durante a realização das análises.

Ao Dr. Marcelo Cavallari pelo auxílio com programa “*Distruct*”.

À colega Fatima Bosetti pelo auxílio com o Programa “Genes”.

Aos pesquisadores do IBONE (Argentina) Prof. Dr. Camilo Quarín, Eric Martínez, Francisco Espinoza, Mario Urbani, à técnica Florencia e aos colegas Diego Hojsgaard, Marita e

Romina por terem me recebido carinhosamente neste centro de pesquisa e por terem me proporcionado um contato mais intenso com o melhoramento e caracterização de *Paspalum*.

Aos membros da pré-banca Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira e Dra. Maria Imaculada Zucchi pelas valiosas sugestões, disponibilidade e ajuda na pré-avaliação da tese.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado a participar da avaliação deste trabalho, pela análise da tese e comentários construtivos.

Ao Prof. Dr. Michel Vincentz, por ter disponibilizado seu laboratório para que parte dos experimentos pudesse ser realizada.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Análise Genética e Molecular, pelo apoio, pela amizade, pela cumplicidade e troca de experiência durante a realização dos experimentos, pelos momentos de descontração e pelo carinho durante agradáveis anos de convivência e aprendizado.

Ao Carlão, Juverande e Pathy pelo apoio técnico prestado.

Às secretárias Sandra Lima e Tânia Zambom do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp pela cordial atenção, profissionalismo e carinho em me atender em todos os momentos que precisei.

Às secretárias Sílvia Helena Zeferino Evangelista e Rejane Maria Aranha da Coordenadoria de Pós-Graduação do Instituto de Biologia da Unicamp e à Maria de Lourdes Fagundes do PPG-Genética e Biologia Molecular da Unicamp pela cordial atenção e pelo auxílio prestado.

Aos amigos Danilo, Melissa, Gustavo, Iminha, Thiago, Julinha, Prianda, Pathy, Mônica e Dr. Juver (Juverlande) pelo auxílio e companheirismo nas horas mais difíceis, muito obrigada pelo ombro amigo e pelo incentivo.

Aos queridos amigos Cris e Thiago pela amizade, carinho e companheirismo. Obrigada por terem escutado tantos comentários sobre *Paspalum* e pelos chazinhos e cafezinhos nos intervalos de trabalho.

Aos meus queridos irmãos, Fabiana e Francisco, cunhados, Juliana e Giovanni, e Bianca pela agradável convivência, pelo apoio e por me receberem carinhosamente durante as minhas estadas em Porto Alegre.

Aos meus amados pais, Francisco e Leontina, por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional e, mesmo à distância, por estarem sempre presentes na minha vida oferecendo-me amor, apoio, carinho e amizade.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
PREFÁCIO	xvi
Capítulo I. INTRODUÇÃO	1
Capítulo II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
II.1. O gênero <i>Paspalum</i> L	7
II. 1.1. Subgêneros e grupos informais de <i>Paspalum</i>	8
II.1.1.1. Grupo Notata	11
II.1.1.2. Grupo Plicatula	15
II. 2. Poliploidia e apomixia em <i>Paspalum</i>	17
II.3. A evolução da genética molecular	22
II.3.1. Utilização dos marcadores moleculares nos estudos em <i>Paspalum</i>	26
Capítulo III. OBJETIVOS	34
Capítulo IV	
“Microsatellite loci for <i>Paspalum atratum</i> (Poaceae) and cross-amplification in other species”, publicado na revista <i>American Journal of Botany</i> em 2010	36
Capítulo V	
“Isolation and characterization of microsatellite loci in <i>Paspalum notatum</i> Flüggé (Poaceae)”, publicado na revista <i>Conservation Genetics</i> em 2009	46
Capítulo VI	
“ <i>Paspalum</i> L. (Poaceae, Panicoideae, Paniceae) species discrimination using molecular genetic evaluation”	56

Capítulo VII

“Efficient and robust identification of different botanical groups in plants species showing wide intra-specific genetic and morphological variability using molecular analysis: *Paspalum notatum* (Poaceae, Panicoideae) varieties” 102

Capítulo VIII. DISCUSSÃO 146

Capítulo IX. CONCLUSÕES..... 152

Capítulo X. PERSPECTIVAS..... 156

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 159

Cidade, Fernanda Witt. Estudos genético-moleculares no gênero *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). 2011. s.n. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Pós-graduação – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas –SP.

RESUMO

No Brasil, a pecuária bovina é baseada principalmente na utilização de pastagens para alimentação animal, sendo a maioria destas cultivadas. O lançamento de novas cultivares de forrageira e os avanços no manejo das pastagens permitiram que o Brasil se tornasse, atualmente, um dos maiores produtores mundiais de bovinos e o maior exportador de carne bovina do mundo. Contudo, poucas opções de forrageiras estão disponíveis para o cultivo de pastagens no Brasil, principalmente para as regiões tropicais, sendo que a maioria dessas é constituída de poucas cultivares de gramíneas africanas do gênero *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*). Há uma necessidade eminente de diversificação das pastagens e, o gênero *Paspalum* se destaca dentre as gramíneas nativas com potencial forrageiro a contribuir para a diversificação de espécies em pastagens tropicais. *Paspalum* inclui aproximadamente 400 espécies distribuídas, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais das Américas. O Brasil é o maior centro de origem e diversidade deste gênero, com ocorrência de espécies de grande potencial forrageiro, havendo vários acessos disponíveis em bancos de germoplasma. Para que os programas de melhoramento possam utilizar de forma adequada os bancos de germoplasma existentes, é necessário um conhecimento da quantidade e da distribuição da diversidade genética dessas coleções. Nesse sentido, no presente trabalho, marcadores microssatélites foram isolados e caracterizados em duas espécies de *Paspalum* (*P. atratum* e *P. notatum*) para o estudo de diversidade genética de acessos de bancos de germoplasma de *Paspalum*. Um total de 21 microssatélites foi desenvolvido para *P. atratum* e

26 para *P. notatum*. A transferibilidade desses marcadores foi avaliada para 35 espécies de *Paspalum*, sendo que doze microssatélites foram utilizados na caracterização de 214 acessos de *Paspalum* de diferentes espécies. Os microssatélites foram úteis na identificação das espécies de *Paspalum*, auxiliando de forma efetiva na organização dos acessos mantidos nos bancos de germoplasma, fornecendo também subsídios para programas de melhoramento genético do gênero. Adicionalmente, 57 acessos de *P. notatum* foram avaliados com o uso de 30 microssatélites, em conjunto com características fenotípicas e citogenéticas. A maioria desses locos apresentou grande potencialidade para uso na discriminação de cultivares e acessos. As avaliações conjuntas indicaram que os microssatélites foram eficientes e robustos na separação dos acessos de *P. notatum* em três variedades botânicas (var. *notatum*, var. *saurae* e var. *latiflorum*), os quais agruparam-se em sete grupos geneticamente distintos. Os microssatélites desenvolvidos, assim como os dados de diversidade genética gerados nesse trabalho, são um passo em direção a um melhor entendimento do gênero e uma ferramenta para que novos trabalhos possam ser realizados.

Palavras-Chave: Marcadores microssatélites; Diversidade genética; *Paspalum*; Espécies forrageiras; Poliplóide.

Cidade, Fernanda Witt. Genetic and molecular studies in the genus *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). 2011. s.n. PhD Thesis. (PhD in Genetics and Molecular Biology) – University of Campinas – UNICAMP – Campinas – SP – Brazil.

ABSTRACT

In Brazil, the production of cattle is based primarily on the use of pastures for animal feed, most of these cultivated. The release of new cultivars of forage and advances in pasture management has enabled Brazil to become currently one of the largest producers of cattle and the largest exporter of beef in the world. However, few options are available for fodder cultivation of pastures in Brazil, mainly in tropical regions, where most of these consists of a few varieties of African grasses of the genus *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*). There is a clear need to diversify pastures and the genus *Paspalum* stands out among the native grasses with forage potential to contribute to the diversification of species in tropical pastures. *Paspalum* includes about 400 species distributed mainly in tropical and subtropical regions of the Americas. Brazil is the largest center of origin and diversity of this genus, with the occurrence of species of high forage yield potential, and several accessions available in germplasm banks. In order to make good use of the existing germplasm collections for breeding purposes it is necessary to know the quantity and distribution of genetic diversity of these collections. In that sense, in the present work, microsatellite markers were isolated and characterized in two species of *Paspalum* (*P. notatum* and *P. atratum*). These markers were used as a tool to study genetic diversity of germplasm banks of *Paspalum*. A total of 21 microsatellites was developed for *P. atratum* and 26 for *P. notatum*. The transferability of these markers was evaluated for 35 species of *Paspalum*, in which twelve microsatellites were used to characterize 214 accessions of different species of *Paspalum*.

The microsatellites were useful in identifying the species of *Paspalum*, effectively assisting in the organization of accessions maintained in germplasm banks, as well as providing subsidies to breeding programs of the genus. Additionally, 57 accessions of *P. notatum* were evaluated using 30 microsatellites, together with phenotypic and cytogenetic characteristic. Most of these loci showed a great potential for cultivar and accessions discrimination. Joint evaluations indicated that the microsatellites were efficient and robust in the separation of the accessions evaluated in to seven genetically distinct groups, which corresponded to the three botanical variedades described for the species (var.*notatum*, var. *sourae*, and var. *latiflorum*). Microsatellites developed, as well as data of genetic diversity generated in this work are a step toward a better understanding of the genus and a tool for further work.

Keywords: Microsatellite markers; genetic diversity; *Paspalum*; Forage species; Polyploid.

PREFÁCIO

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho de tese estão apresentados na forma de quatro artigos científicos. O primeiro artigo, intitulado "Microsatellite loci for *Paspalum atratum* (Poaceae) and cross-amplification in other species", publicado na revista *American Journal of Botany* (e107–e110) em 2010, apresenta o desenvolvimento e a caracterização de 19 marcadores microssatélites para a espécie *P. atratum* e sua transferibilidade para 16 espécies de *Paspalum* de três diferentes grupos botânicos (Grupos Notata, Ovalia e Plicatula).

O segundo artigo, "Isolation and characterization of microsatellite loci in *Paspalum notatum* Flügge (Poaceae)", publicado na revista *Conservation Genetics* (10: 1977–1980) em 2009, apresenta o desenvolvimento de 11 marcadores microssatélites polimórficos para *P. notatum* Flügge e sua transferibilidade para três espécies de *Paspalum* do grupo Notata.

O terceiro artigo, intitulado "*Paspalum* L. (Poaceae, Panicoideae, Paniceae) species discrimination using molecular genetic evaluation" foi submetido à publicação na revista *Annals of Botany*. Ele apresenta a transferibilidade de 19 marcadores microssatélites, desenvolvidos para *P. atratum* e *P. notatum* para outras 34 espécies de *Paspalum* e 37 acessos não classificados (*Paspalum* sp.) e sua utilização na caracterização e discriminação dessas espécies com base da diversidade genética existente entre os acessos.

O quarto artigo, intitulado "Efficient and robust identification of different botanical groups in plants species showing wide intra-specific genetic and morphological variability using molecular analysis: *Paspalum notatum* (Poaceae, Panicoideae) varieties" foi submetido à publicação na revista *American Journal of Botany*. Esse artigo apresenta o estudo da diversidade

genética em acessos de *P. notatum* com a utilização de 15 microssatélites anteriormente desenvolvidos (*P. atratum* e *P. notatum*) e 15 novos marcadores microssatélites para *P. notatum*, bem como a comparação entre esses resultados e dados citogenéticos, morfológicos e geográficos.

Finalmente, apresenta-se uma discussão geral, envolvendo todos os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Capítulo I
INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta o segundo maior rebanho mundial de bovinos, segundo maior produtor de carne bovina e, recentemente, conquistou a posição de maior exportador de carne bovina. A produção e a conquista do mercado internacional se devem, principalmente, à alimentação do rebanho quase que exclusivamente por pastagens, resultando no “boi verde”. Por diversas razões, a carne bovina produzida a pasto é considerada mais saudável. Comparada com a carne oriunda de animais confinados, a carne bovina a pasto possui menor teor de gordura saturada e maior concentração de Omega-3s.

Há poucas décadas atrás, a base da alimentação do gado no Brasil era por meio de pastagens nativas. Contudo, nos últimos 15 anos as pastagens nativas perderam espaço para as pastagens cultivadas de espécies exóticas (Censo Agropecuário IBGE, 2006), onde o capim braquiária predomina como “monocultivo”. Tal fato constitui-se em alto risco para a pecuária, caso não sejam lançadas variedades forrageiras que possibilitem a diversificação genética das pastagens.

Nos últimos 40 anos houve uma perda de aproximadamente 54% das pastagens nativas no Brasil (cerca de 37 milhões de hectares - Censo Agropecuário IBGE, 2006), ou seja, houve uma enorme perda em diversidade vegetal, principalmente de plantas herbáceas, componentes naturais da paisagem nas formações campestres e base alimentar de herbívoros. É evidente que ao se observar os números, percebe-se que o cultivo de pastagens favoreceu a expansão da pecuária no Brasil, por outro lado, perdeu-se em diversidade vegetal. Tendo em vista a atual situação, é

necessário buscar opções forrageiras que se orientem em direção a maior e melhor sustentabilidade da pecuária.

O interesse pelo cultivo de boas espécies forrageiras nativas é crescente, devido, basicamente, à adaptação destas às condições edafoclimáticas da sua região de origem (Nabinger, 1997). Segundo Jacques & Nabinger (2006) o manejo adequado do pastoreio e o uso mínimo de insumos permitiriam a muitas espécies nativas, maior produtividade quando comparadas às espécies exóticas, o que é mais sustentável e economicamente viável (Jacques & Nabinger, 2006). Dentre as espécies forrageiras nativas, o gênero *Paspalum* L. ocupa um lugar de destaque.

A importância das espécies de *Paspalum* como pastagens cultivadas vem sendo evidenciada por vários autores, os quais, na sua maioria, se referem à grande variabilidade inter e intra-específica (Batista & Godoy, 1997; Batista & Godoy, 2000). Este gênero ocupa um lugar de destaque entre as gramíneas nos campos naturais, pois apresenta o maior número de espécies nativas e de interesse agrônômico (Valls, 1987). Além disso, são as principais gramíneas utilizadas como pastagens nativas na América tropical e subtropical.

O Brasil é o principal centro de origem e diversidade das espécies de *Paspalum* (Chase, 1937; Burton, 1945; Burton, 1962; Burton, 1967; Batista & Godoy, 1997; Batista & Godoy, 2000; Rua, 2006; Judziewicz, 1990), as quais ocorrem em praticamente todas as formações herbáceas dos diferentes ecossistemas do país. Nessas comunidades as espécies de *Paspalum* são dominantes e responsáveis pela formação da maior parcela de forragem disponível (Valls, 1987).

O conhecimento da variabilidade disponível no gênero são etapas básicas para a correta caracterização e conservação do germoplasma, e também para o uso adequado das espécies em

programas de melhoramento genético. No entanto, de modo geral, as diferentes espécies do gênero *Paspalum* são pouco conhecidas em relação à estrutura das populações, diversidade genética, extensão da variabilidade, composição dos bancos de germoplasma e mapas genéticos moleculares.

Os programas de melhoramento genético de plantas têm se beneficiado do rápido avanço da biologia molecular, técnicas estas que têm se mostrado muito úteis. Os marcadores moleculares têm facilitado a identificação de origem parental, o rápido reconhecimento de genótipos e a quantificação da variabilidade genética existente entre outros. Neste contexto, este trabalho visou estudar a diversidade genética em diferentes espécies de *Paspalum* através de marcadores moleculares, gerando informações úteis aos programas de melhoramento e ao manejo dos bancos de germoplasma deste gênero, bem como no auxílio da identificação botânica e da conservação das diferentes espécies de *Paspalum*.

Capítulo II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O gênero *Paspalum*

Paspalum é um importante gênero da tribo Paniceae (subfamília Panicoideae) da família Poaceae, sendo que as suas espécies se destacam entre as gramíneas brasileiras por englobar o maior número de espécies nativas e por reunir o maior número de espécies com bom valor forrageiro (Valls, 1987).

Paspalum inclui aproximadamente 330 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais das Américas (Clayton & Renvoize, 1986), particularmente abundantes no sul do Brasil, Paraguai, norte da Argentina e Uruguai (Barreto, 1974), com poucos táxons presentes no Velho Mundo (Clayton & Renvoize, 1986). A maioria das espécies do gênero *Paspalum* é originária do Continente Americano, com poucas exceções, como é o caso de *P. scrobiculatum* L. (Chase, 1929). As espécies deste gênero são dominantes em campos abertos, mas também estão presentes em borda de florestas e em ambientes salinos, ocorrendo desde o nível do mar até 4600 metros de altitude, nos Andes (Zuloaga *et al.*, 2004).

No Brasil, não há estudos com informações detalhadas sobre o número total de espécies, contudo, Valls & Pozzobon (1987) estimaram a ocorrência de cerca de 220 espécies. Segundo Rua (2006), Judziewicz (1990) e Chase (1929), o Brasil abriga o maior número de espécies de *Paspalum*, as quais ocorrem em praticamente todas as comunidades herbáceas dos diferentes ecossistemas do país, sendo dominantes e responsáveis, em muitas comunidades, pela formação da maior parcela de forragem disponível (Valls, 1987).

Paspalum é um dos gêneros da tribo Paniceae que apresenta maior importância

econômica, tanto pelo valor forrageiro e ornamental de muitas de suas espécies como pela importância na alimentação humana ou na medicina popular (Zuloaga & Morrone, 2005).

Inúmeras espécies de *Paspalum*, nativas do Continente Americano, são reconhecidas mundialmente pela produção de forragem de excelente qualidade, como por exemplo, *P. dilatatum* Poir., para a qual sua importância foi evidenciada no começo do século XX (Bulletin of Miscellaneous Information, 1902).

Além da importância forrageira e ecológica de *Paspalum*, suas espécies também são utilizadas como ornamentais em gramados e jardins, parques e quadras de esporte, além da reconhecida importância na recuperação de áreas degradadas e na contenção de erosão.

P. scrobiculatum é cultivada na Ásia como cultura de cereais e é recomendado como um substituto para o arroz para pacientes diabéticos. Esta espécie também foi reconhecida por suas propriedades medicinais e inseticidas (Jarret *et al.*, 1998).

2.1.1. Subgêneros e grupos informais de *Paspalum*

Devido ao grande número de espécies e a vasta amplitude morfológica dentro do gênero, *Paspalum* tem sido dividido em subgêneros, seções ou grupos informais (Chase, 1929; Barreto, 1974; Clayton & Renvoize, 1986; Canto-Dorow, 1993; Canto-Dorow *et al.*, 1996; Morrone & Carbonó, 1995; Morrone *et al.*, 1996; 2000; 2004; Oliveira, 2004; Oliveira & Valls, 2002; Denham *et al.*, 2002; Denham, 2005; Rua & Aliscioni, 2002; Zuloaga *et al.*, 2004; Zuloaga & Morrone, 2005). Chase (1929) baseando-se em similaridades morfológicas subdividiu o gênero em subgêneros *Ceresia* e *Paspalum*, dentro dos quais reconheceu 25 grupos informais. Os grupos descritos por Chase (1929) são utilizados até os dias atuais, os quais têm sido revistos e muitas

vezes recircunscritos.

No geral, tais grupos não apresentam relações evolutivas claras, contudo a monofilia de alguns têm sido discutida (Denham *et al.*, 2002; Rua & Aliscione, 2002; Souza-Chies *et al.*, 2006; Essi & Souza-Chies, 2007), obrigando a revisão do conceito de alguns grupos.

Atualmente são reconhecidos quatro subgêneros para *Paspalum*: *Paspalum* subg. *Anachyris* Chase, *P.* subg. *Ceresia* (Pers.) Rchb., *P.* subg. *Harpostachys* (Trin.) S. Denham e *P.* subg. *Paspalum* (Zuloaga *et al.*, 2004), este último com aproximadamente 265 espécies distribuídas em 25 grupos informais (Chase, 1929, Denham, 2005).

Paspalum subg. *Anachyris* inclui seis espécies de acordo com a revisão taxonômica de Morrone *et al.* (2000), as quais distribuem-se do México ao Brasil, Paraguai, Bolívia, Argentina e Uruguai.

Denham *et al.* (2002) baseando-se na análise cladística de dados morfológicos reconheceram, no subgênero *Ceresia*, duas seções monofiléticas: seção *Pectinata*, a qual inclui sete espécies e seção *Ceresia*, incluindo 18 espécies. Os autores excluíram *Paspalum sanguinolentum* Trin., considerado anteriormente por Chase (1929), do subgênero *Ceresia* e o consideraram monofilético, incluindo um total de 25 espécies. Assim como Denham *et al.* (2002), Rua & Aliscione (2002), a partir da análise cladística de caracteres morfológicos, confirmaram a monofilia da seção *Pectinata* e a inclusão desta dentro do subgênero *Ceresia*. Os resultados obtidos por Denham *et al.* (2002) sustentam a monofilia do subgênero *Ceresia*, o qual forma um clado com o grupo *Racemosa* como seu grupo irmão. As espécies de *Paspalum* subg. *Ceresia* habitam as Américas, desde o México, Mesoamérica e Caribe (Haiti, República Dominicana e Trinidad e Tobago) até a América do Sul (Colômbia, Venezuela, Guiana,

Suriname, Brasil, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina Central e Uruguai). O Brasil abriga o maior número de espécies (22), das quais dez são endêmicas.

Zuloaga & Morrone (2005) haviam considerado apenas três subgêneros para *Paspalum*, contudo, a monofilia do gênero estava sendo questionada com base em evidências moleculares (Duvall *et al.*, 2001; Giussani *et al.*, 2001) e morfológicas (Denham & Zuloaga, 2007). Nessas análises, *Paspalum* se apresentava como parafilético, pois *Thrasya* Kunth aparecia incluída dentro do gênero *Paspalum* e proximamente relacionada ao grupo Decumbentes (Chase, 1929). Devido a essas evidências, seguindo os critérios de Denham e Zuloaga (2007), Denham (2005; 2006) transferiu *Thrasya* para o gênero *Paspalum*, estabelecendo formalmente o subgênero *Harpostachys*, incluindo neste as espécies anteriormente tratadas como grupo informal Decumbentes (*sensu* Chase, 1929).

O subgênero *Harpostachys* de *Paspalum* apresenta aproximadamente 39 espécies nativas dos trópicos e subtropicais da América. Sua distribuição compreende desde o sul dos Estados Unidos, das Antilhas e América Central, até a Argentina e Uruguai. A América Central e norte da América do Sul apresentam a maior concentração de espécies, contudo, também são abundantes no sul e centro do Brasil. São plantas anuais ou perenes, cespitosas, estoloníferas ou rizomatosas (Denham, 2005).

Paspalum subg. *Paspalum* compreende aproximadamente 265 espécies. Segundo Zuloaga & Morrone (2005), o subgênero *Paspalum* não apresenta caracteres sólidos para estabelecer categorias infragênicas, e suas espécies são reunidas em grupos informais. Tais grupos têm sido revisados e re-circunscritos por vários pesquisadores e apesar de não serem considerados naturais, eles são amplamente utilizados por especialistas.

Dentre os grupos informais de *Paspalum* subg. *Paspalum*, os grupos Notata, Plicatula e Dilatata são de grande importância para o Brasil, os quais abrigam um grande número de espécies, das quais algumas apresentam importância como forrageira, como por exemplo, *P. notatum* Flüggé, *P. plicatulum* Michx., *P. atratum* Swallen e *P. dilatatum* Poir..

2.1.1.1. Grupo Notata

Atualmente o grupo Notata inclui 21 espécies anteriormente tratadas por Chase (1929, manuscrito não publicado) como grupo Notata e Linearia, excluindo *Paspalum alnum* Chase do mesmo (Zuloaga *et al.*, 2004). Esses grupos foram estudados por alguns especialistas, muitas vezes englobando revisões taxonômicas das espécies distribuídas regionalmente, como por exemplo, os estudos de Barreto (1974), o qual avaliou o grupo Notata para o Sul do Brasil, Canto-Dorow (1993) e Canto-Dorow *et al.* (1996), esses últimos, seguindo os critérios estabelecidos por Chase (1929) e Barreto (1974), avaliaram as espécies do Rio Grande do Sul (Brasil) de *Paspalum* (grupo Notata).

Oliveira (1996) e Oliveira & Valls (2002) discutiram as afinidades do grupo Notata e Linearia, ao avaliar as espécies brasileiras do grupo Linearia, relacionando morfologicamente as espécies *P. dedecae* Quarín, *P. filifolium* Nees ex Steud. e *P. ionanthum* Chase. Contudo, os autores mantiveram Linearia como um grupo distinto. Recentemente, análises filogenéticas baseadas em dados moleculares sugerem a monofilia dos grupos Notata + Linearia (Souza-Chies *et al.*, 2006; Essi & Souza-Chies, 2007), como considerado por Zuloaga *et al.*, 2004.

As espécies do grupo Notata são distribuídas do sul do México até o Chile, Argentina e Uruguai, em latitude de aproximadamente 40°S, normalmente, habitando campos abertos e

ensolarados, desde o nível do mar até 1500 m de altitude; alguns espécimes de *P. notatum* var. *notatum* são encontrados em até 2400 m de altitude (Zuloaga *et al.*, 2004).

Paspalum notatum é uma das espécies mais bem conhecidas do grupo Notata, principalmente devido a sua importância econômica, reconhecida mundialmente. Essa espécie é tradicionalmente cultivada como gramínea forrageira, a qual produz boa qualidade de forragem e resistência ao pastejo, pisoteio e fogo (Otero, 1961).

Paspalum notatum

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

Paspalum notatum pode ser considerada um complexo agâmico, pois apresenta vários níveis de ploidia e um sistema reprodutivo complexo, com citótipos diplóides ($2n=2x=20$) auto-incompatíveis e de reprodução sexuada, autotetraplóides apomíticos (Burton, 1948), triplóides e pentaplóides ocasionais (Quarin *et al.* 1989; Tischler & Burson, 1995). É uma das espécies mais comuns do gênero no Sul do Brasil, e sua importância como planta forrageira nas regiões subtropicais é amplamente reconhecida. Diversos biótipos são encontrados no Brasil e vários destes são dominantes na composição botânica de amplas áreas de pastagem natural, especialmente no Estado do Rio Grande do Sul (Barreto, 1974). Muitos desses biótipos produzem boa qualidade de forragem e são altamente resistentes ao pastejo e ao pisoteio.

O germoplasma nativo desta espécie apresenta uma grande diversidade (Steiner, 2005; Cidade *et al.*, 2008), do qual alguns acessos apresentam excelente valor forrageiro e

superioridade em relação às cultivares comercializadas (Steiner, 2005).

Devido ao bom valor forrageiro e à rapidez de estabelecimento de uma densa cobertura de solo, inúmeros acessos de *Paspalum notatum* têm sido incorporados a experimentos de cunho agrônômico e há cultivares comerciais da espécie, algumas das quais pertencem à variedade *saurae* (Valls & Pozzobon, 1987). As cultivares Pensacola e Tifton 9, ambas provenientes de Programas de Melhoramento Norte Americano e cultivadas como forrageiras principalmente na região Sul do Brasil são exemplos de cultivares de *Paspalum notatum*.

Paspalum notatum, além do uso como forrageira, é cultivada em gramados e na contenção da erosão, pois uma vez estabelecida, ela é muito persistente, requer baixa fertilidade do solo, controla a proliferação de patógenos, sendo tolerante ao pisoteio (Gates *et al.*, 2004). Historicamente tem sido útil para melhorar os campos cultivados, baseado na rotação de culturas. Nos Estados Unidos, o cultivo de Pensacola durante a rotação de culturas tem reduzido a incidência de doenças no cultivo de leguminosas forrageiras. (Gates *et al.*, 2004).

Devido à ampla variabilidade morfológica intraespecífica de *Paspalum notatum*, inúmeros autores discutiram essa variação. De acordo com Barreto (1957; 1974), *Paspalum notatum* é uma espécie polimórfica, comum a todas as pastagens naturais dos países de clima quente e temperado da América. Assim, em diferentes condições ecológicas ocorrem morfotipos também diversos desta importante espécie. Os caracteres mais significativos que permitem diferenciar estas formas estão relacionados com o aspecto, vigor, dimensões e pilosidade das folhas; altura dos colmos floríferos, número e comprimento dos ramos da inflorescência, bem como as dimensões e coloração das espiguetas (Barreto, 1974).

Parodi (1948) considerou três variedades para a espécie, aceitando a variedade *latiflorum*

descrita por Döll (1877), a variedade *notatum*, e descreveu uma nova variedade, *Paspalum notatum* var. *saurae* Parodi. Posteriormente, Parodi (1969) elevou esta última variedade à espécie, nomeando-a como *Paspalum saurae* Parodi. Araújo (1971) aceitou as variedades propostas por Parodi (1948), porém, mencionou os ecótipos encontrados em diferentes localidades do Estado do Rio Grande do Sul, salientando os de Lagoa Vermelha, Capivari, André da Rocha e Uruguaiana.

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

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

Canto-Dorow (1993) e Canto-Dorow *et al.* (1996) aceitaram apenas duas variedades para a espécie, que se diferenciam, principalmente, quanto ao nível de ploidia, *Paspalum notatum* var. *notatum* ($2n=4x=40$) e *Paspalum notatum* var. *saurae* ($2n=2x=20$). A variabilidade morfológica encontrada na variedade *notatum* foi considerada como diferentes biótipos, inclusive com chave sistemática separando a variedade em quatro biótipos. Canto-Dorow (1993) mencionou em seu trabalho a diferença entre ecótipo e biótipo, e justificou a sua separação em biótipos pela manutenção das características originais da espécie em condições homogêneas de cultivo. Araújo

(1971) já havia chamado atenção para uma “forma” pilosa encontrada em campos arenosos e pobres dos municípios de Júlio de Castilhos e Tupanciretã, no Estado do Rio Grande do Sul. Esta “forma”, transplantada para solos mais argilosos, perdia toda a pilosidade em pouco tempo, porém no trabalho de Canto-Dorow (1993) também foram incluídas “plantas pilosas”, que mantiveram o indumento em cultivo.

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

2.1.1.2. Grupo Plicatula

O grupo Plicatula apresenta um grande número de espécies ou formas e agrega as espécies relacionadas morfologicamente à *P. plicatulum*. As espécies desse grupo encontram-se distribuídas em todo território brasileiro, mas a região Centro-oeste do Brasil, leste da Bolívia e Paraguai constituem o centro de diversidade. (Quarín *et al.*, 1996).

Oliveira (2004) avaliou as espécies brasileiras do grupo Plicatula, a qual enumerou um total de 33 espécies. Contudo, as espécies de *Paspalum* do grupo Plicatula não apresentam uma delimitação clara e formam um intrincado complexo agâmico. O nome *P. plicatulum* vem sendo utilizado na identificação de várias espécies do grupo, inclusive espécies bem estabelecidas, como *P. geminiflorum* e *P. glaucescens*, são encontradas erroneamente identificadas como *P. plicatulum* (Oliveira, 2004).

As espécies pertencentes ao grupo Plicatula apresentam grande importância, principalmente para o Brasil Central, onde é representado por diversas espécies de grande porte,

além daquelas menores e de ocorrência generalizada. Entretanto, algumas de suas espécies também são componentes importantes das pastagens naturais da Região Sul (Valls & Pozzobon, 1987). Tais espécies apresentam excelente adaptação à seca, ao frio, ao alagamento, ao fogo e à desfolha (Batista *et al.*, 1987).

Algumas espécies deste grupo são comercializadas no Brasil para o estabelecimento de pastagens, destacando-se o pasto negro (*P. plicatulum* cv. Hartley), originário do Brasil e reintroduzido no país a partir da Austrália (Batista & Godoy, 1998) e o Capim Pojuca (*P. atratum* cv. Pojuca), originário do Brasil Central e lançado comercialmente pela EMBRAPA (Valentim *et al.*, 2000).

Paspalum atratum

Paspalum atratum Swallen é uma gramínea forrageira tropical, perene e cespitosa, distribuindo-se geograficamente deste a América Central até a do Sul. No Brasil, ocorre nos Estados do Amapá, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Roraima, São Paulo e Tocantins (Oliveira, 2004). Essa espécie apresenta ampla variação morfológica, sendo morfológicamente relacionada à *P. plicatulum* e *P. lenticulare* Kunth (Oliveira, 2004).

No Brasil, a partir do material coletado em Terenos (MS), o Capim Pojuca foi lançado comercialmente pela EMBRAPA. Esse material apresenta excelente adaptação em áreas alagadiças; pequena exigência em fertilidade do solo, boa produção de forragem, boa aceitação por bovinos e eqüinos, excelente velocidade e vigor de estabelecimento e de rebrota, é pouco atacado por pragas e doenças, tem grande produção de sementes, além de ser tolerante ao fogo.

2.2. Poliploidia e apomixia em *Paspalum*

A poliploidia é um dos mecanismos que está envolvido na evolução de *Paspalum*, podendo explicar a grande diversidade apresentada pelo gênero. A poliploidia já foi evidenciada em aproximadamente 80% das espécies, a metade das quais são tetraplóides e de reprodução apomítica (Quarin, 1992). *Paspalum* apresenta um sistema reprodutivo complexo composto por espécies com raças diplóides de reprodução sexuada e poliplóides sexuais ou apomíticas (Quarín, 1992), ocorrendo desde citótipos triplóides (Quarin & Lombardo, 1986) até hexadecaplóides ($2n=16x=160$) (Burton, 1940).

A poliploidia, ou seja, a existência de mais de dois conjuntos cromossômico no mesmo núcleo, é uma condição herdável. A maioria dos poliplóides apresenta número igual de conjuntos cromossômicos, sendo a condição mais comum a tetraplóide (quatro conjuntos). Os poliplóides são muito comuns entre as plantas, peixes e anfíbios. Sendo este um fenômeno comum a essas espécies, elas encontram-se em boas condições e bem adaptados mesmo apresentando múltiplos complementos cromossômicos.

Assim como nas espécies de *Paspalum*, a poliploidia está presente em aproximadamente 80% das gramíneas (Stebbins, 1985) e em grande parte das Angiospermas, desempenhando um importante papel na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. De acordo com Stebbins (1985), a poliploidia é provavelmente a alteração citogenética mais importante na especiação e evolução vegetal.

Os poliplóides se dividem em categorias dependendo da sua composição cromossômica e da sua origem. Os poliplóides surgem de anormalidades mitóticas ou meióticas, levando à formação de gametas com mais de um conjunto cromossômico. Os gametas diplóides, os quais

surgem em frequências raras, tipicamente fusionam-se com um haplóide e produzem zigotos triplóides, os quais são instáveis e podem ser estéreis ou contribuir para adicionais gametas poliplóides, dependendo da espécie. A fusão de gametas diplóides leva à formação de zigotos tetraplóides, os quais são potencialmente estáveis (Schifino-Wittmann, 2004).

Os poliplóides são classificados em autopoliplóides, originados pela duplicação de um mesmo genoma, e alopoliplóides, originados pela duplicação de genomas diferentes, normalmente após um evento de hibridação. As consequências citogenéticas e genéticas dos diversos tipos de poliploidização são diferentes: num autopoliplóide, por haver cópias iguais de um mesmo genoma, espera-se o pareamento cromossômico em multivalentes e herança polissômica. Num alopoliplóide, a existência de genomas diferentes levaria à formação de apenas bivalentes intragenômicos e herança dissômica (Sybenga, 1992). Devido à ambigüidade entre as classes de poliplóides, uma terceira classe tem sido proposta, os poliplóides segmentares (Stebbins, 1971), ou seja, aqueles originados pela duplicação dos genomas de espécies próximas o suficiente para apresentarem certa homeologia cromossômica. Segundo Stebbins (1971) estas categorias nem sempre são claramente definidas, mas são úteis em estudos evolutivos.

A condição poliplóide dos acessos de *Paspalum* é claramente evidenciada através dos tipos de associações cromossômicas múltiplas observadas na diacinese em inúmeras espécies (Moraes-Fernandes, 1971; Quarin *et al.*, 1996; Burson, 1997; Freitas *et al.*, 1997; Takayama *et al.*, 1998). A maioria das espécies perenes de *Paspalum* é poliplóide apomítico, principalmente tetraplóide. Contudo, grande parte dos autotetraplóides apresenta formas diplóides, reprodução sexuada e são autoincompatíveis, como é o caso de *P. notatum* e *P. plicatulum*.

Os autotetraplóides (4x) ocasionalmente aparecem espontaneamente em populações

naturais diplóides ($2x$) pela não disjunção no tecido somático (duplicação cromossômica meristemática) ou no tecido reprodutivo pela formação de gametas não reduzidos. Nos autotetraplóides, cada cromossomo está presente quatro vezes, conseqüentemente, as associações cromossômicas, tais como tetravalentes, trivalentes, bivalentes e univalentes são esperadas, dependendo da associação randômica dos quatro cromossomos homólogos. Todos os cromossomos e locos gênicos estão em quatro cópias, a formação tetravalente e a herança tetrassômica são características utilizadas como critério para identificar autotetraploidia. O número de possíveis genótipos em um diplóide com dois alelos é três (aa , Aa e AA), por outro lado, o número de genótipos no nível $4x$ é cinco ($AAAA$, $AAAa$, $AAaa$, $Aaaa$, $aaaa$) (Singh, 2003).

Quarin (1992) sugeriu que as espécies autotetraplóides de *Paspalum* devem ter surgido em um processo constituído por dois passos: diplóides sexuais de fecundação cruzada eventualmente desenvolvem sacos embrionários apospóricos, ocasionalmente a oosfera não reduzida, sendo esta fertilizada por núcleos espermáticos reduzidos de um diplóide, formando um triplóide ($2n$, $2x+n=3x$). O triplóide produziria uma progênie que, em combinação com pólen de diplóides, formariam os tetraplóides ($2n$, $3x+n=4x$). Assim, novos genótipos autotetraplóides surgiriam. Esta teoria vem sendo reforçada em *Paspalum notatum* pelas descobertas da ocorrência de triplóides em populações naturais (Quarin *et al.*, 1989; Tischler & Burson, 1995). As formas diplóides de *P. notatum* (*P. notatum* var. *saurae*) são sexuais e meioticamente estáveis com dez bivalentes na meiose (Moraes-Fernandes, 1971; Moraes-Fernandes *et al.*, 1974), enquanto que poliplóides reproduzem-se por apomixia apospórica obrigatória (Forbes & Burton, 1961) ou facultativa (Quarin *et al.*, 1984).

Por outro lado, o grupo Dilatata reúne espécies de origem alopoliplóide, cujos genomas básicos (I e J) encontram-se amplamente distribuídos pelo gênero (Burson & Quarin, 1982; Valls, 2000). *Paspalum dilatatum* destaca-se no grupo como a espécie com maior variabilidade. *Paspalum dilatatum* “Comum” corresponde ao tipo nomenclatural da espécie e, por muitos anos, foi considerado o único biótipo de *P. dilatatum* (Burson *et al.*, 1991), atualmente diversos biótipos são reconhecidos, os quais possuem origem de eventos múltiplos de alopoliploização.

Os alopoliplóides são derivados da hibridação interespecífica de duas ou mais espécies relacionadas e genomicamente distintas através da duplicação cromossômica de híbridos F1 estéreis. Os híbridos F1 interespecíficos ou intergenéricos são normalmente estéreis, pois os genomas são altamente divergentes e não há afinidade cromossômica, ou formam somente um pequeno número de bivalentes em sinapse. Este tipo de sinapse é conhecido como associação heterogenética. Em contraste, as associações homogenéticas são as que ocorrem entre cromossomos de um mesmo genoma. Entretanto, o pareamento cromossômico normal e a fertilidade das sementes são restaurados pela duplicação cromossômica (Singh, 2003).

A alopoliploidização apresenta um papel muito importante na evolução das espécies cultivadas como trigo, algodão, tabaco, brássicas e cana de açúcar. A formação de bivalentes é uma exigência para meiose estável. No caso dos alopoliplóides, o pareamento entre cromossomos homólogos é reforçado por mecanismos genéticos (Comai, 2005). No trigo alohexaplóide, um gene chamado de *pairing homeologous 1 (Ph1)* é necessário para evitar o pareamento de homeólogos e acredita-se que tenha resultado de uma adaptação para a poliploidia (Prieto *et al.*, 2004). O efeito desse gene foi detectado através da remoção do cromossomo ou do braço cromossômico que carrega o loco *Ph1* por manipulação citogenética, ou pelo uso de raios-X ou

mutagênicos químicos para causar mutação ou deletar o loco. Nessas situações, multivalentes assim como bivalentes, foram observados na meiose em hexaplóides e haplóides (Appels, 1998).

Os estudos dos genomas de eucariotos têm fornecido provas do potencial evolutivo dos poliplóides: muitos dados moleculares sugerem que mais de 90% das angiospermas retém evidências de uma ou mais duplicações genômicas ancestrais (Chen & Ni, 2006). Isto indica que a poliploidia pode fornecer, em longo prazo, flexibilidade evolutiva. Além das evidências da poliploidia ancestral, inúmeras espécies vegetais têm sofrido eventos de poliploidização mais recente (Adams & Wendel, 2005).

A partir da caracterização fenotípica de neopoliplóides (poliploidia induzida artificialmente pela duplicação cromossômica) observou-se indícios de que os organismos poliplóides, após o desgaste evolutivo sofrido durante período de instabilidade (*bottleneck*), podem apresentar algumas vantagens em relação aos seus genitores diplóides (Comai, 2005). O mesmo autor concluiu que esses poliplóides tornam-se eficientes competidores e muitas vezes capazes de invadir novos ambientes. Há três vantagens documentadas para os poliplóides: a heterose, a qual é responsável pelo maior vigor dos poliplóides em relação a seus genitores diplóides; a redundância gênica, que protege os poliplóides contra efeitos de mutações deletérias; e a reprodução assexuada, a qual capacita os poliplóides a se reproduzirem na ausência de companheiro sexual (Comai, 2005).

Geralmente, a poliploidia está associada à formação de espécies apomíticas (Comai, 2005), tendo sido observado este fato em muitas espécies poliplóides do gênero *Paspalum*.

A apomixia é um tipo de reprodução assexuada na qual ocorre a formação de semente sem que ocorra a fertilização e formação do embrião por via sexuada. Os indivíduos resultantes

são geneticamente idênticos a planta que os originou. A reprodução assexuada permite a fixação do genótipo e a manutenção dos caracteres desejáveis. Além disso, devido à ausência de recombinação, mantém blocos gênicos, genes ligados e a contínua exploração da heterose (Carvalho *et al.*, 2003).

Burton (1948) comprovou que *P. notatum* se reproduz por meio de apomixia, desde então, muitas espécies poliplóides têm sido caracterizadas como apomíticas obrigatórias, enquanto os diplóides são associados à reprodução sexual. Norrmann (1981) demonstrou apomixia facultativa para plantas tetraplóides de *P. wrightii* Hitchc. & Chase (sob *P. hydrophilum* Henrard). A partir de então, outros apomíticos facultativos foram encontrados em *Paspalum* (Burson, 1989; Caponio & Quarín, 1990).

2.3. A evolução da genética molecular

O estudo da variabilidade genética existente nas populações naturais é essencial para elucidar a biologia, conhecer a diversidade e obter informações sobre a evolução das espécies. A mutação, a recombinação e o fluxo gênico, na qualidade de forças geradoras de variabilidade, são fundamentais para o processo evolutivo, pois a adaptação de cada espécie ao longo das gerações depende da existência de variabilidade sobre a qual a seleção natural possa atuar (Brammer, 2002). O grau de variabilidade genética é uma questão discutida e investigada desde os primórdios do século XX. Na primeira metade desse século, técnicas de genética clássica eram utilizadas. A partir da segunda metade desse mesmo século, novas descobertas e técnicas foram surgindo, permitindo o acesso direto às informações do DNA, RNA e proteínas.

A eletroforese de isoenzimas (1966) foi a primeira técnica “molecular” utilizada em

estudos de variabilidade genética (Solferini & Scheepmaker, 2001).

No final da década de 1960 a descoberta das enzimas de restrição por Linn & Arber (1968) e Meselson & Yuan (1968) revolucionou a emergente Biologia Molecular. Em 1974, Grodzicker *et al.*, a partir da descoberta das enzimas de restrição, utilizaram pela primeira vez a técnica atualmente denominada de RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”) (Arias & Infante Malachias, 2001), que se baseia na ação de enzimas de restrição, as quais reconhecem seqüências específicas no DNA e clivam a molécula nestes sítios. Os efeitos de mutações pontuais, inserções, deleções e rearranjos nos sítios de clivagem criam polimorfismos que podem ser visualizados pela diferença de tamanho dos fragmentos de DNA obtidos após a digestão enzimática, sendo detectadas por meio de *Southern blotting* (Botstein *et al.*, 1980).

Entretanto o advento que revolucionou e acelerou os estudos moleculares, juntamente com a tecnologia do DNA recombinante, foi a criação da técnica da PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”) em 1985, pelo bioquímico Kary B. Mullis, o que lhe rendeu o Prêmio Nobel de Química, em 1993. Desde então, novas técnicas baseadas em PCR vêm surgindo.

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

Marcadores moleculares surgiram devido à necessidade de detecção de polimorfismo diretamente no DNA, e são definidos como características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente.

Os marcadores moleculares de DNA têm sido utilizados para acessar polimorfismo genético, construir mapas genéticos, bem como para revisar a posição sistemática de grupos de espécies vegetais e fazer estudos comparativos, permitindo fazer inferências sobre sua origem e evolução (Williams *et al.*, 1990). Além disso, os marcadores moleculares podem facilitar o desenvolvimento de estratégias para conservação de recursos vegetais e a para a condução de programas de melhoramento (Rajora & Mosseler, 2001).

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

Entre os marcadores mais conhecidos identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*; Jeffreys *et al.*, 1985). A partir do surgimento da metodologia de amplificação de DNA (PCR), diversos marcadores moleculares foram desenvolvidos os quais tem em comum o uso da PCR: AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (Vos *et al.*, 1995), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990), SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*; Zietkiewicz *et al.*, 1994), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Rafalsky, 2002), TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*, Hu & Vick, 2003), entre outros. Os marcadores baseados em PCR abriram novas e inúmeras possibilidades de detecção e avaliação do polimorfismo encontrado na molécula de DNA.

Os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são regiões de DNA que consistem de pequenas seqüências repetidas em *tandem* contendo de 1 a 6 nucleotídeos. Tais seqüências estão distribuídas ao acaso no genoma eucariótico constituindo os locos polimórficos, os quais surgem devido à variação no número de repetições do motivo de DNA em cada loco microssatélites. Dessa forma, cada loco microssatélite pode apresentar diferentes alelos entre os indivíduos da mesma espécie na natureza. As seqüências de DNA que flanqueiam estas regiões são conservadas e estáveis em de uma dada espécie e, muitas vezes, entre espécies diferentes de um mesmo gênero, permitindo a utilização de *primers* flanqueadores dos microssatélites de uma espécie para as ampliações de microssatélites de diferentes espécies. O conteúdo informativo desses locos é alto por se tratarem de locos multialélicos cujas sequencia apresenta elevada taxa evolutiva. Os microssatélites tem atualmente ampla utilização nos programas de melhoramento e avaliação da diversidade genética e estudos da estrutura populacional de diferentes espécies por serem marcadores co-dominantes e multialélicos, fornecendo um elevado nível de informação genética por loco.

Os microssatélites são dispersos no genoma de forma relativamente proporcional. Entretanto, regiões de grande abundância destas seqüências têm sido encontradas e são nomeadas de “SSR hot spots” (Bornet *et al.*, 2002; Zietkiewicz *et al.*, 1994). Em plantas, eles são freqüentes e distribuídos aleatoriamente no genoma, sendo utilizados para estudo de diversidade genética e caracterização de germoplasma.

Os motivos repetidos mais freqüentes encontrados pela primeira vez foram repetições (AC)_n e (AG)_n (Condit & Hubbell, 1991). Uma busca em bancos de dados de seqüências de DNA de eucariotos publicadas revelou que os sítios de microssatélites são distribuídos em uma

frequência de 1 a cada 50 mil pares de bases. Sua presença foi constatada em inúmeras espécies vegetais, incluindo algumas culturas de maior expressão, tais como: trigo (Roder *et al.*, 1998), arroz (Temnykh *et al.*, 2000), milho (Sharopova *et al.*, 2002), melão (Ritschel, 2004), e cana de açúcar (Cordeiro *et al.*, 2001), sendo que os motivos mais frequentes foram (AT)_n, (AAT)_n, (AGC)_n, (AAC)_n, (AAG)_n, (AATT)_n e (AAAT)_n.

2.3.1. Utilização dos marcadores moleculares nos estudos em *Paspalum*

O gênero *Paspalum* apresenta inúmeras características interessantes do ponto de vista genético. Os padrões evolutivos do gênero são complexos, sendo constituído de inúmeras espécies, onde, na maioria, há presença de poliploidia e apomixia. As técnicas de biologia molecular estão proporcionando grandes avanços no conhecimento genômico das espécies do gênero *Paspalum*, auxiliando na elucidação de padrões evolutivos em grupos taxonômicos informais, relações filogenéticas, estudos populacionais, mapeamento de genes de interesse, como aqueles relacionados à apomixia, e caracterização de acessos presentes em bancos de germoplasma para fins de melhoramento genético.

O grupo Dilatata (Chase, 1929) é um complexo alopoliplóide, no qual estão incluídas “espécies”, biótipos e subespécie alotetraplóides com reprodução sexuada (*P. urvillei* Steud., *P. pauciciliatum* (Parodi) Hert. *P. dasypleurum* Kunze ex Desv., biótipos Virosoro e Vacaria de *P. dilatatum* e *P. dilatatum* ssp. *flavescens* Roseng. Arr. ET Izag.), e biótipos apomíticos, penta, hexa e heptaplóides (Barshaw & Forbes, 1958; Burson, 1991a,b; 1995).

Os biótipos sexuais do grupo Dilatata apresentam fórmula genômica IIJJ. Estudos citológicos têm revelado que *P. juergensii* Hackel (grupo Paniculata) é considerado o doador do

genoma JJ presente no grupo Dilatata (Burson *et al.*, 1973) e *P. intermedium* Munro ex Morong et Britton (grupo Quadrifaria) é considerado o possível doador do genoma II. Por outro lado, os biótipos apomíticos apresentam cromossomos de origem desconhecida.

Devido às peculiaridades apresentadas pelo grupo Dilatata, as técnicas moleculares estão sendo úteis para avaliar a variabilidade genética nele presente, bem como as relações filogenéticas e os padrões envolvidos na evolução do grupo.

Marcadores isoenzimáticos foram utilizados com o propósito de verificar a ocorrência de variabilidade genética entre indivíduos irmãos e/ou a ocorrência de pseudogamia em biótipos *P. dilatatum* (comum e Torres). Foi encontrada variabilidade isoenzimáticas nas progênies, aventando a possibilidade da ocorrência de sexualidade nos biótipos analisados (Gauer *et al.*, 2001).

Os marcadores RAPD foram utilizados por Casa *et al.* (2002) com a finalidade de discriminar biótipos sexuais e apomíticos de *P. dilatatum*. Nesse estudo, os autores revelaram que as similaridades genéticas entre os acessos apomíticos de *P. dilatatum* foram superiores em relação ao biótipo sexual, os autores discutem que esse fato se deve, provavelmente, ao modo de reprodução apomítica e/ou a pressão seletiva favorecendo poucos genótipos apomíticos bem adaptados com limitada variação genética. Contudo, Miz & Souza-Chies (2006) estudaram as relações genéticas entre membros do grupo Dilatata de *Paspalum* com o auxílio de marcadores moleculares RAPD, os resultados foram discordantes aos de Casa *et al.* (2002), Miz & Souza-Chies (2006) explicaram que essa discordância entre os resultados se deve ao superior número de acessos analisados em seu trabalho. Ambos os trabalhos não apresentaram resultados definitivos.

Mais recentemente Speranza & Malosetti (2007) desenvolveram 16 marcadores

microsatélites nucleares e um microsatélite plastidial polimórficos para *P. dilatatum* ssp. *flavescens* (tetraplóide sexual). Esses marcadores foram utilizados para a análise de uma coleção de acessos que representava parte da variabilidade dentro de todos os biótipos e espécies do grupo Dilatata. Tiveram por objetivo encontrar evidências de origens múltiplas ou variabilidade dentro delas, bem como interpretar os mecanismos evolutivos que deram origem à atual diversidade dentro do grupo (Speranza, 2009). Foi identificado um número discreto de clones com diferentes distribuições. As relações entre os grupos sugeriram um número muito limitado de eventos sexuais de sucesso que deram origem aos genótipos. As conclusões ressaltam que todos os apomíticos do grupo Dilatata podem estar relacionados uns aos outros, por um ou alguns eventos de hibridação envolvendo sempre uma mãe apomítica (Speranza, 2009). Os resultados também permitiram uma discussão referente às possíveis origens dos genomas envolvidos na evolução do grupo Dilata.

Oito populações de *P. dilatatum* oriundas da Argentina foram avaliadas por Garcia *et al.* (2007) com o uso de marcadores moleculares (RAPD) e análises morfológicas. Neste trabalho foi observada a ocorrência de tetraplóides sexuais e pentaplóides apomíticos em simpatria. Não houve correlação entre os dados moleculares e morfológicos. Todos os genótipos analisados foram discriminados geneticamente, demonstrando que talvez exista fluxo gênico entre as populações, provavelmente, envolvendo os biótipos sexuais. Por outro lado, esses dados não foram bem aproveitados, uma vez que análises mais completas poderiam ter sido feitas com os dados obtidos, o que possibilitaria revelar a estrutura genética populacional e o fluxo gênico entre as populações de *P. dilatatum*.

Paspalum notatum é uma importante gramínea forrageira, conhecida internacionalmente

como “bahiagrass”. Essa espécie apresenta um sistema reprodutivo complexo, envolvendo indivíduos diplóides de reprodução sexuada e autoincompatíveis e autotetraplóides apomíticos facultativos ou obrigatórios. Alguns estudos demonstram que a variedade diplóide (*P. notatum* var. *saurae*) vegeta naturalmente em uma região restrita da Argentina (Burton 1967, Daurelio *et al.* 2004), e os tetraplóides (*P. notatum* var. *notatum*) são amplamente distribuídos. Os marcadores moleculares estão sendo amplamente utilizados no estudo de *P. notatum* dada sua complexidade genômica e reprodutiva.

Marcadores moleculares do tipo RAPD foram utilizados por Daurelio *et al.* (2004) com o objetivo de investigar a variabilidade genética em populações tetraplóides simpátrica e alopátrica a populações de diplóides sexuais de *P. notatum*. Os resultados obtidos pelos autores sugerem que a coexistência de populações diplóides sexuais e tetraplóides apomíticos pode gerar variabilidade em sistemas apomíticos, uma vez que a população tetraplóide simpátrica à diplóide apresentou níveis de variabilidade genética significativamente superior à população tetraplóide alopátrica.

A fim de avaliar a variabilidade genética de 42 acessos de *P. notatum* coletados em diversas regiões geográficas da América do Sul, Espinoza *et al.* (2006) utilizaram marcadores AFLP. Todos os acessos investigados apresentaram elevado grau de semelhança. A dissimilaridade genética máxima entre todos os acessos foi de 0,36. O dendrograma obtido pelos autores apresentou dois grupos principais de acessos. O primeiro grupo corresponde aos acessos apomíticos tetraplóides, incluindo os acessos pentaplóide e hexaplóide. Nesse grupo os autores ainda encontraram dois subgrupos que poderiam ser distinguidos morfologicamente: um envolvendo genótipos com lâminas foliares curtas e estreitas, o qual inclui acessos da Argentina e do Brasil; e outro com acessos que apresentam lâminas foliares mais largas, incluindo acessos do

Brasil e do Paraguai. O segundo grande grupo dentro de *P. notatum* foi constituído, principalmente, de indivíduos de reprodução sexuada.

Ao avaliar 95 acessos de *P. notatum* com o uso marcadores moleculares ISSR, Cidade *et al.* (2008) encontraram maior variação genética entre os acessos avaliados em relação à encontrada por Espinoza *et al.* (2006). O coeficiente de similaridade variou de 0,43 a 0,97, com média de 0,59. Contudo, não foram encontradas correlações morfológicas e/ou geográficas claras entre os grupos formados, provavelmente devido ao pequeno número de marcadores analisados.

O primeiro mapa genético molecular de *Paspalum notatum* var. *saurae* ($2n=2x=20$) foi desenvolvido por Ortiz *et al.* (2001). Os autores utilizaram sondas RFLP de arroz e milho em uma população F1 segregante com 126 indivíduos, obtendo um total de 71 locos RFLP. Com o intuito de saturar o mapa, os autores utilizaram RAPD e AFLP, totalizando 157 marcadores. O mapa consenso apresentou 120 marcadores atribuídos a dez grupos de ligação. De acordo com a distância total do mapa foram cobertos 991 cM e várias regiões sintênicas ao arroz e ao milho foram identificadas. Contudo, não foi possível identificar regiões associadas à aposporia, pois a apomixia não ocorre no nível diplóide.

Posteriormente, através de estudos genéticos e moleculares em progênies derivadas do cruzamento entre plantas tetraplóides sexuais e tetraplóides apomíticas, foi demonstrado que a herança da aposporia em *Paspalum notatum* é controlada por um único loco dominante, o qual está localizado em uma grande região, onde a recombinação genômica é restrita (Martinez *et al.*, 2001, 2003; Stein *et al.*, 2004, 2007). Os resultados sugerem que o loco apospórico deve estar incluído em um bloco genético, onde as regiões cromossômicas adjacentes apresentam baixas taxas de recombinação e pareamento cromossômico preferencial com um dos homólogos (Stein

et al., 2004)

Foi realizada uma análise comparativa utilizando sondas RFLP (cromossomos 2 e 12 do arroz) fortemente ligadas à aposporia em *P. notatum* (Martínez *et al.*, 2001; 2003). Observou-se que o loco (APO) apresenta uma conservação sintênica parcial em *P. simplex* e *P. malacophyllum*, os quais apresentam sintenia apenas no cromossomo 12 (Pupilli *et al.*, 2004). Concluiu-se que os genes candidatos à apomixia provavelmente estão localizados no cromossomo 12 do arroz. Foi proposto que uma translocação poderia ser a causa da ligação das duas sondas em *Paspalum notatum*.

O primeiro mapa genético molecular de *Paspalum notatum* tetraplóide foi publicado por Stein *et al.* (2007), utilizando apenas os marcadores moleculares em dose única obtidos a partir de AFLP e RFLP. Foi utilizada uma população F1 com 113 indivíduos segregantes para o modo de reprodução, os quais foram obtidos pelo cruzamento entre uma planta tetraplóide completamente sexual com um indivíduo tetraplóide apospórico como doador de pólen. Dois mapas de ligação (feminino e masculino) foram construídos. O mapa Q4188 consistiu de 263 marcadores distribuídos em 26 grupos de co-segregação sobre uma distância genética total de 1.590,6 cM, enquanto o mapa Q4117 continha 216 locos dispersos em 39 grupos de co-segregação com 2.265,7 cM, dando uma cobertura estimada do genoma de 88% e 83%, respectivamente. Marcadores ligados ao loco APO foram identificados.

A importância econômica do gênero *Paspalum* como forrageira é amplamente conhecida. Inúmeras espécies e acessos são mantidos em bancos de germoplasma dos mais variados países, com o intuito de desenvolver cultivares comerciais. Esses bancos de germoplasma são constantemente avaliados e os marcadores moleculares têm sido ferramentas essenciais na

caracterização genética dos materiais armazenados.

Sendo assim, 46 acessos de *P. vaginatum* Sw. (“seashore paspalum”) foram inicialmente avaliados com o auxílio de marcadores RAPD (Liu *et al.*, 1994, 1995). Os acessos foram organizados em sete grupos genéticos, sendo que os representantes de cada grupo compartilhavam características morfológicas. Observou-se que geralmente os ecótipos de uma mesma região geográfica compartilhavam o mesmo grupo genético.

Primers flanqueadores de microssatélites provenientes de 50 EST-SSR do trigo, 50 do milho e 30 do sorgo foram avaliados quanto à transferibilidade em *P. vaginatum* para análise da diversidade de 73 acessos. Observou-se que a taxa de transferência destes marcadores para *P. vaginatum* foi de 67,5, 49,0 e 66,8%, respectivamente (Wang *et al.*, 2006).

Estudos filogenéticos baseados em marcadores moleculares do tipo seqüências de DNA foram feitos entre as espécies de *Paspalum* a fim de esclarecer suas relações de parentesco (Souza-Chies *et al.*, 2006; Essi & Souza-Chies, 2007; Giussani *et al.* 2009; Rua *et al.*, 2010), bem como para testar a monofilia dos grupos informais (Chase, 1929). Contudo, os resultados ainda são preliminares, pois englobam um pequeno número de espécies, confinadas a poucos grupos taxonômicos.

Como citados anteriormente, embora alguns trabalhos envolvendo marcadores moleculares e espécies do gênero *Paspalum* tenham sido realizados com o intuito de avaliar diferentes aspectos genéticos, ainda há muito que se estudar, pois há grupos de espécies de grande importância ecológica e possivelmente econômica totalmente desconhecidos do ponto de vista biológico, taxonômico, genético e molecular.

Capítulo III
OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Geral:

Contribuir para um maior conhecimento genético das espécies de *Paspalum* por meio de análises genético-moleculares, de modo que seja possível auxiliar na classificação taxonômica e delimitação de espécies, bem como nos programas de coleta, conservação e melhoramento das espécies de *Paspalum*.

Específicos:

- Desenvolver e caracterizar marcadores moleculares do tipo microssatélite para as espécies *P. notatum* e *P. atratum*.
- Analisar a diversidade genética de acessos pertencentes a diferentes espécies de *Paspalum* depositados em bancos de germoplasma por meio dos marcadores microssatélites.
- Analisar a variabilidade genética existente intra e interespecífica nos acessos de *Paspalum* e compará-la com os dados morfológicos, citogenéticos e geográficos existentes para os acessos de *Paspalum notatum* avaliados.

Capítulo IV

**MICROSATELLITE LOCI FOR PASPALUM ATRATUM (POACEAE)
AND CROSS-AMPLIFICATION IN OTHER SPECIES**

American Journal of Botany 97 (11): e107–e110 (2010)

DOI:10.3732/ajb.1000207

**MICROSATELLITE LOCI FOR *PASPALUM ATRATUM* (POACEAE)
AND CROSS-AMPLIFICATION IN OTHER SPECIES¹**

F. W. Cidade ², T. T. de Souza-Chies ³, F. H. D. Souza ⁴, L. A. R. Batista ⁴, M. Dall’Agnol ⁵, J. F.
M. Valls ⁶, M. I. Zucchi ⁷, and A. P. Souza ^{2,8,9}

¹ Manuscript received 11 June 2010; revision accepted 28 August 2010.

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support (Project No. 05/51010) and a graduate fellowship (2006/61242-8) to F. W. Cidade and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and a research fellowship to A. P. Souza.

² Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, CP 6010, Campinas, SP, Brazil, CEP 13083-970;

³ Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43433 Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 91501-970;

⁴ Embrapa Pecuária Sudeste, CP 339, São Carlos, SP, Brazil, CEP 13560-970;

⁵ Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 91501-970;

⁶ Embrapa - Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), CP 02372 Brasília, DF, Brazil, CEP 70770-900;

⁷ Pólo Regional Centro Sul - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios/APTA, Rodovia SP127, Km 30, Bairro: Vila Fátima, Piracicaba, SP, Brazil, CEP 13400-970;

⁸ Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas/SP, Brazil, CEP 13083-970

⁹ Corresponding author: anete@unicamp.br

ABSTRACT

Premise of the study: *Paspalum atratum* is a perennial, cespitose, tropical grass native to Central and South America. This species belongs to a polyploid complex (Plicatula group) little known at the genetic level. The characterized microsatellite markers provide new informative tools for further studies of the hybridization, mating systems, and structure of the population.

Methods and Results: Using the microsatellite-enriched library method, we isolated and characterized 19 microsatellite markers from *P. atratum*. Eleven of them were polymorphic, showing a variable degree of variation, while eight were monomorphic in the samples analyzed. Additionally, the transferability of these microsatellite markers was tested in other species.

Conclusions: These results suggest that the characterized markers have enough discriminatory potential to be used in genetic characterizations of *Paspalum* taxa, which are based on an understanding of their mating systems and genetic structure, as well as in understanding the evolutionary processes involved in the evolution of groups of *Paspalum*.

Key words: genetic diversity; microsatellites; *Paspalum*; *Paspalum atratum*; Plicatula group; Poaceae.

INTRODUCTION

Paspalum L. (Poaceae) is a genus recognized for its ecological importance, its forage and ornamental features, as well as for the vast genetic and morphological diversity within and among its component species. This genus comprises about 400 species distributed mainly in tropical to warm-temperate areas worldwide (Chase, 1929), of which nearly 80% is polyploidy (Quarín, 1992).

The wide diversity found among *Paspalum* species led to their grouping into unofficial taxonomic groupings. Chase (1929), based on morphological similarities, subdivided *Paspalum* into the two subgenera *Ceresia* and *Paspalum*, and recognized 25 informal groups within these. In a report by Chase (1929), all species morphologically related to *P. plicatulum* Michx. were congregated in the Plicatula group, which thus constituted a heterogeneous group without clear delineation, forming an intricate agamic complex (Oliveira, 2004). Westcentral Brazil, eastern Bolivia, and Paraguay comprise the geographic center of variation of this group (Quarín et al., 1997).

Paspalum atratum Swallen is a perennial, tropical, cespitose grass. It is a polymorphic species that is morphologically similar to *P. plicatulum* and *P. lenticulare* Kunth (Plicatula) (Oliveira, 2004). Gaining a better understanding of mating systems and the genetic structures and relationships within polyploidy complexes depends on the identification of appropriate genetic markers. Microsatellite markers can potentially provide an excellent tool for this purpose. This work reports the characterization of 19 new microsatellite markers in *P. atratum*, of which 11 were polymorphic and eight monomorphic in the samples analyzed.

METHODS AND RESULTS

A microsatellite-enriched genomic library was obtained for *P. atratum* using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles as described by Billotte et al. (1999). The genomic DNA was extracted from dried leaf material using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method as described by Doyle and Doyle (1987) with few modifications. The total DNA was digested with *RsaI* and ligated to the adapters 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' and 5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'. The enrichment was done using a hybridization-based capture with (GT)₈ and (CT)₈ biotin-linked probes and streptavidin magnetic-coated beads (Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles, Promega, Madison, WI). The enriched fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then ligated into a pGEM T-Easy vector (Promega) and transformed into competent XL1-blue *Escherichia coli* cells. The positive colonies, as determined by blue/white β-galactosidase selection, were tested by PCR to confirm the presence of inserts. A total of 192 selected recombinant colonies were bidirectionally sequenced in an automated ABI PRISM 377 sequencer (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA) using T7 and SP6 primers and the BigDye terminator kit (version 3.1). The sequences were assembled and edited with the Seqman program (DNASar, Madison, WI). MICROSAT software (A. M. Risterucci, CIRAD, personal communication) was used to eliminate adaptors and restriction sites of the sequences. Of the selected clones, 107 contained microsatellite sequences; however, 86 presented proper flanking regions for primer design. All types of microsatellites were considered in the development of markers, including interrupted (simple or compound) and the complex. A total of 86 primer pairs flanking the repetitive regions were designed with Primer Select (DNASar).

These primer pairs were evaluated for polymorphisms in 27 *Paspalum* accessions (each accession was represented by a single individual) from the germplasm bank maintained at the EMBRAPA - Cattle-Southeast in São Carlos - SP, Brazil. (Accession vouchers are presented in Appendix 1.)

The fragments were PCR-amplified on a PTC-200 (MJ Research, Waltham, MA) thermocycler in a 20- μ L reaction volume consisting of 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.15 mM of each dNTP, 0.8 mM of each primer, 1 U *Taq* DNA polymerase and 20 ng of genomic DNA. The PCR amplification protocol consisted of an initial denaturation at 94 ° C for one min; 30 amplification cycles of denaturation at 94°C for one min, annealing at specific temperatures per primer pair for one min (Table 1), and elongation at 72°C for one min; and a final extension at 72°C for five min. For some loci, a touchdown protocol was used (Don et al., 1991). The amplification products were separated in 6% denaturing polyacrylamide gels and visualized by silver-staining according to Creste et al. (2001). A 10 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used as a size standard for allele scoring.

Of the 86 evaluated primer pairs, only 11 were polymorphic and amplified in all accessions of *P. atratum*. Of the remainder, eight were monomorphic, 32 did not show satisfactory amplification, and 35 amplified in few or only one accession. These results suggest that perhaps the species identified as *P. atratum* may belong to other species, or some individuals may have originated from a cross between closely related species, since the hybridization between species of the genus *Paspalum* is relatively common. Among the 11 polymorphic microsatellites, the number of bands per locus found in the 27 *Paspalum* accessions ranged from 4 to 15, with an average of 8.27 bands per locus (Table 1). All of the 11 primer pairs produced a dominant locus pattern; however, the possible allopolyploid origin of the species (Quarín et al.,

1997) could have resulted in a codominant pattern of amplification since different genomes may be involved in the evolutionary mechanism associated with this species.

TABLE 1. The characteristics of 19 microsatellite loci from *Paspalum atratum*. The loci names, GenBank accession numbers, forward (F) and reverse (R) primer sequences, repeat motif, annealing temperature for amplification (Ta), product size range in base pairs, number of marks (NM), Polymorphism Information Content (PIC), and discriminating power (D) are shown.

Locus name	Primer Sequence (5'-3')	Repeat Motif	Ta (C°)	Size (bp)	NM	PIC	D	GenBank Accession no.
PA01B7	F: GCCCCCTGCCCTGCTGACA R: CATGCGCCCCACGAAACACGAA	(GC)6(CA)2(GA)8CA(GA)9	60	239–279	10	0.82	0.91	HM208138
PA01C1	F: AGGTTGGTCCAGAGTTGTTTG R: AGTGCTAGTGCAGAGTGCTGTGT	(CA)3CG(CA)2CT (AGGA)3	58	231	4	0.29	0.51	HM208139
PA01F10	F: ATCGTTTCGGCTTTCCTGTCTA R: GGATGGCTACTACGTGATGGTT	(TGCC)2...(GTT)2	50	194–240	5	0.47	0.49	HM208142
PA02A5	F: CGGATCCGATGTCTGAA R: TAGCACGTGTCCTTTTACCA	(GC)3GG(CT)4	56	122–132	6	0.5	0.58	HM208143
PA02B1	F: AGCGCACTCGAAGGCTG R: CGCACACGTCAATCATCATT	(CGGC)3	60	130–170	12	0.75	0.85	HM208144
PA02B6	F: CGCCTAACCGCCACCATA R: AACCTGTTCCCTTCGCCTTCTCC	(CT)22	60	169	13	0.88	1	HM208145
PA02C3	F: GTCAGAAATCAACACAAAACCT R: CGCGAGACGTCAATCATT	(CA)3CTGA(CA)4	60	240–250	5	0.71	0.86	HM208147
PA02F8	F: TATTCTTACGACGAGCCGACTT R: AGCGCAAACACAAAACAAATC	(AC)4TA(AC)3	TD	166–200	4	0.49	0.45	HM208148
PA02G11	F: CGTGACATAAGAAGGGGACAGGAG R: TTGAACTTGGGCGAGCGATTAG	(CT)11	TD	144–176	15	0.89	1	HM208149
PA02H4	F: CCCCTGGTGAAGTGGAGC R: CACGGGGATTATACTGGTTC	(CA)2CT(CA)5T(AC)2	TD	218	7	0.73	0.89	HM208151
PA02H9	F: ATCAGTTGGTCGAGTCTTCATCA R: TGGTGCACCGGTATCTGTTT	(CT)10GT(CT)2	TD	270–330	10	0.82	1	HM208153
PP01A5	F: CTTCTCCGCTTCTCCACAAT R: AAATAAGACCCCTCCCTCCAT	(GT)7	60	257	1	—	—	HM751860
PP01B3	F: TCGGTTGATCAAAGGTAT R: CCACAAGCCAAGGTTAG	(TG)4CA(TG)3	50	217	1	—	—	HM751861
PP01D11	F: CTCCCCCTCCCCTCATTTCCTA R: GCCTTCCTCCGCTTCTTCCACA	(AC)2T(CA)4CTCAAATCACT(CA)(CAC)4	60	245	1	—	—	HM751863
PP01F3	F: ACCACGCCGAACACACCTT R: GGCCAGCCTCCACACCTC	(CT)2(TG)4	60	180	1	—	—	HM751864
PP02D2	F: TGTTGATTGTTGTCTCCAGTC R: TCATTAGTGTTCGCCAGCAGT	(CGG)4GCT(GGC)2	TD	249	1	—	—	HM751868
PP02D6	F: ATCCGGTATAGCCAGTAGCAGT R: CGACGACGGTAAAGCACAC	(TCG)3	TD	223	1	—	—	HM751869
PP02F1	F: TCAGTAAAGACCCAACT R: TGAAATGCTAAGAAATGAAC	(CA)3(CCCACA)2XX(CA)3	TD	252	1	—	—	HM751871
PP02F2	F: AGGGAAGCTCGCACTCAC R: ATCTCTTTAGCAACCACCTTCA	(AG)5G(CT)2ATAAT(GT)5CG (GT)3	54	164	1	—	—	HM751872
Average						8.27	0.67	0.78

*TD = touchdown (60–55°C)

Paspalum atratum and several species of the *Plicatula* group are polyploid, showing $2n = 40$. Due to the high ploidy level, estimates of the allelic frequencies are not possible; therefore, the observed heterozygosity was not estimated. Consequently, the Polymorphism Information Content (PIC) was used to evaluate and characterize the microsatellite loci in *P. atratum* and *P. plicatulum*. To compare the efficiency of the microsatellite markers in varietal identification, we estimated the discriminating power of each locus as previously described (Tessier et al., 1999).

The values obtained for the 11 polymorphic loci range from 0.29 to 0.89 (average of 0.67) for the PIC and from 0.45 to 1.0 (average of 0.78) for the discriminating power. Cidade et al. (2009) obtained similar results for *P. notatum* Flügge when analyzing and characterizing microsatellite markers. All of the characterized variable markers were tested for cross-amplification in 16 other individual species (Table 2) belonging to three groups of *Paspalum*: 12 in Plicatula, three in Notata, and one in the Ovalia group. It was observed that all of the microsatellite markers were amplified in all of the species of the Plicatula group included in this work, and only two were not amplified in the species.

TABLE 2. The cross-amplification of 11 microsatellite loci from *Paspalum atratum* in others species of *Paspalum*. Successful amplification (+) and failed amplification (-) are indicated

Species (sample size)	Groups	PA01B7	PA01C1	PA02F10	PA02A5	PA02B1	PA02B6	PA02C3	PA02F8	PA02G11	PA02H4	PA02H9
<i>P. subciliatum</i> (1)	Notata	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>P. notatum</i> (50)	Notata	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>P. pumilum</i> (1)	Notata	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>P. ovale</i> (1)	Ovalia	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>P. commutatum</i> (1)	Plicatula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. compressifolium</i> (10)	Plicatula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. glaucescens</i> (6)	Plicatula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. guenoarum</i> (6)	Plicatula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. leptum</i> (4)	Plicatula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. limbatum</i> (6)	Plicatula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. oteroi</i> (2)	Plicatula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. plicatulum</i> (28)	Plicatula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. rhodopedum</i> (6)	Plicatula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. rojasii</i> (3)	Plicatula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. simplex</i> (1)	Plicatula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. wrightii</i> (1)	Plicatula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

CONCLUSIONS

These results suggest that the characterized markers have enough discriminatory potential to be used in genetic characterizations of *Paspalum* taxa that are based on an understanding of their mating systems and genetic structure. Furthermore, this will contribute to a better understanding of the genetic relationships between *P. atratum* and related species, as well as in understanding the patterns involved in the evolution of the Plicatula group of *Paspalum*.

LITERATURE CITED

- BILLOTTE, N., P. J. R. LAGODA, A. M. RISTERUCCI, AND F. C. BAURENS. 1999. Microsatellite-enriched libraries: Applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277 – 288.
- CHASE, A. 1929. The North American species of *Paspalum*. *Contributions of the US National Herbarium* 28: 1 – 310.
- CIDADE, F. W., T. T. SOUZA-CHIES, L. A. R. BATISTA, M. DALL'AGNOL, M. I. ZUCCHI, L. JUNGSMANN, AND A. P. SOUZA. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Paspalum notatum* Flüggé (Poaceae). *Conservation Genetics* 10: 1977 – 1980.
- CRESTE, S., A. TULMANN NETO, AND A. FIGUEIRA. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299 – 306.
- DON, R. H., P. T. COX, B. J., WAINWRIGHT, K. BAKER, J. S. MATTICK. 1992. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19: 14.
- DOYLE, J. J., AND J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11 – 15.
- OLIVEIRA, R. C. 2004. O gênero *Paspalum* L., grupo Plicatula (Poaceae: Paniceae), no Brasil. Thesis. Universidade Estadual de Campinas.

QUARÍN, C. L. 1992. The nature of apomixis and its origin in panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8 – 15.

QUARÍN, C. L., J. F. M. VALLS, AND M. H. URBANI. 1997. Cytological and reproductive behavior of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. *Tropical Grasslands* 31: 114 – 116.

TESSIER, C., J. DAVID, P. THIS, J. M. BOURSIQUOT, AND A. CHARRIER. 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 171 – 177.

APPENDIX 1. Identification of the samples, informal group names, accession code, location sites, and country.

Species	Botanical Group	Brazilian accession code (BRA)	Location sites	Country
<i>P. atratum</i> Swallen	Plicatula	BRA-023299	MS, Anastácio	Brazil
<i>P. atratum</i> Swallen	Plicatula	BRA-003913	MS, Miranda	Brazil
<i>P. atratum</i> Swallen	Plicatula	BRA-023329	MS, Anastácio	Brazil
<i>P. atratum</i> Swallen	Plicatula	BRA-009661	MS, Aquidauana	Brazil
<i>P. atratum</i> Swallen	Plicatula	BRA-022934	MS, Paranaíba	Brazil
<i>P. atratum</i> Swallen	Plicatula	BRA-011681	SC, Campo Belo do Sul	Brazil
<i>P. atratum</i> Swallen	Plicatula	BRA-009610	MS, Terenos	Brazil
<i>P. atratum</i> Swallen	Plicatula	BRA-023353	MS, Anastácio	Brazil
<i>P. atratum</i> Swallen	Plicatula	BRA-023612	MS, Dourados	Brazil
<i>P. atratum</i> Swallen	Plicatula	BRA-022993	MS, Paranaíba	Brazil
<i>P. atratum</i> Swallen	Plicatula	BRA-010537	MS, Cáceres	Brazil
<i>P. atratum</i> Swallen	Plicatula	BRA-022861	GO, Cachoeira Alta	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-013111	PR, Balsa Nova	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-013048	PR, Campo Largo	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-020974	RS, São Luiz Gonzaga	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-022403	RS, Arroio dos Ratos	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-003450	SC, Lages	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-008834	RS, Porto Alegre	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-020796	RS, Passo Fundo	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-009130	RS, Porto Lucena	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-020702	RS, Vila Flores	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-011274	RS, Soledade	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-012939	MS, Aral Moreira	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-009032	RS, Itaqui	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-021601	MA, Carolina	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-009181	RS, São Gabriel	Brazil
<i>P. plicatum</i> Michx.	Plicatula	BRA-021598	MA, Riachão	Brazil

Capítulo V

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE LOCI
IN *PASPALUM NOTATUM* FLÜGGÉ (POACEAE)**

**Conservation Genetics 10: 1977–1980 (2009)
DOI 10.1007/s10592-009-9872-6**

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE LOCI IN
PASPALUM NOTATUM FLÜGGÉ (POACEAE)**

F. W. Cidade • T. T. de Souza-Chies • L. A. R. Batista • M. Dall’Agnol • M. I. Zucchi • L.

Jungmann • A. P. Souza

Received: 16 February 2009 / Accepted: 24 February 2009 / Published online: 11 March

2009

F. W. Cidade • L. Jungmann • A. P. Souza

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Departamento de Genética e Evolução.

Universidade Estadual de Campinas, CP 6010, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil, CEP 13083-970.

e-mail: anete@unicamp.br

T. T. de Souza-Chies

Programa de Pós Graduação em Botânica, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43433, Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 91501-970.

L. A. R. Batista

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Pecuária Sudeste, CP 339, São Carlos, SP, Brazil, CEP 13560-970.

M. Dall’agnol Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 91501-970

M. I. Zucchi

Instituto Agronômico de Campinas, Centro de Recursos Genéticos, Laboratório de Biologia Molecular, Av. Barão de Itapura, 1481 CEP 13020902 - Campinas, SP - Brasil - Caixa-Postal: 28.

ABSTRACT

Paspalum notatum is a forage grass recognized as one of the major constituents of the native grasslands in the New World. The knowledge of the genetic diversity and structure of *P. notatum* populations is fundamental for the conservation and germplasm management of this species. Eleven microsatellite markers were isolated from *P. notatum* and characterized in 25 accessions. The average number of alleles per locus was 7.9 and the PIC ranged from 0.36 to 0.89. The data demonstrated that most of the markers are suitable to detect polymorphism and to study the genetic diversity in the *P. notatum* species. Moreover, the transferability of these microsatellites were tested on other three congeneric species.

Keywords: Bahiagrass • Microsatellite • Poaceae • *Paspalum* L. • *Paspalum notatum* Fl.

INTRODUCTION

The genus *Paspalum* L. (Poaceae) comprises 350 to 400 species distributed mainly in tropical to warm-temperate areas worldwide. The main center of *Paspalum* diversity is the New World tropical regions (Chase 1929, Clayton & Renvoize 1986). In Brazil, species of this genus are of great ecological and economical importance, existing in various ecosystems.

Paspalum notatum Flüggé (bahiagrass) is a forage grass recognized as one of the major constituents of the native grasslands in the New World. Natural populations are widely distributed from Mexico to Argentina and throughout the West Indies (Chase 1929). The most common cytotype of this species is tetraploid ($2n=4x=40$), apomictic, pseudogamous and self-compatible (Burton 1948). In South America, a wild self-incompatible sexual diploid ($2n=2x=20$) biotype inhabits a quite limited area (Burton 1946, Daurelio *et al.* 2004). In addition, apomictic triploid and pentaploid genotypes have been occasionally identified in natural populations (Quarin *et al.* 1989).

Conservation strategies and breeding programs have been limited by the scarcity of large and well-characterized germplasm collections. High genetic diversity has been described within the *P. notatum* Brazilian germplasm (Cidade *et al.* 2008). However, an efficient utilization of this genetic resource, better understanding of their breeding systems and genetic structure, and a meaningful interpretation of the variability represented by the natural apomicts are highly dependent on the development of the appropriate markers. Microsatellite markers can potentially provide an excellent tool for the genetic study of this species. In the present work, 11 new polymorphic microsatellite markers were developed for *Paspalum notatum*.

A microsatellite-enriched genomic library was obtained for *Paspalum notatum*, using the methodology of biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles, as described by Billotte *et al.* (1999). Genomic DNA was extracted from dried leaf material using the CTBA method (Doyle & Doyle 1987) with few modifications. The total DNA was digested with *RsaI* and enriched in (CT)₈ and (GT)₈ repeats. Enriched fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then ligated into a pGEM T-Easy vector (Promega) and transformed into competent XL1-blue *Escherichia coli* cells. Positive colonies (blue/white β-galactosidase selection) were tested by polymerase chain reaction (PCR) to confirm the presence of inserts. Selected recombinant colonies, in a total of 96, were bi-directionally sequenced in an automated ABI PRISM 377 sequencer (Perkin Elmer, Applied Biosystems) using T7 and SP6 primers and BigDye terminator (version 3.1). Sequences were assembled and edited with Seqman (DNASar). Repetitive regions were searched with the Simple Sequence Repeat Identification Tool (Temnykh *et al.* 2001). Of the selected clones, 21 contained microsatellite sequences with more than five repeats and proper flanking regions for primer design. A total of 27 primer pairs flanking the repetitive regions were designed with Primer Select (DNASar). The pair of primers were evaluated for polymorphisms in 25 accessions of the *P. notatum* germplasm collection of EMBRAPA-Southeast Pecuary (Brazilian Enterprise of Agropecuary Research) and College of Agronomy-UFRGS (Federal University of Rio Grande do Sul), in Brazil.

Fragments were PCR amplified on a PTC-200 (MJ Research) thermocycler in 25 μL reaction volume, consisting of 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂ 0.15 mM of each dNTP (Invitrogen), 0.8 mM of each primer, 1 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and 20 ng of

genomic DNA. After an initial denaturation at 94°C for 1 min, PCR amplifications were performed in 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72 °C and a final extension at 72° for 5 min. The amplification products were separated in 6% denaturing polyacrylamide gels and visualized by silver-staining according to Creste *et al.* (2001). The allele scoring was done using the 10pb DNA Ladder (Invitrogen) as size standards.

Of the 27 evaluated primer pairs, 11 were polymorphic. In 87 scored alleles, the number of alleles per locus ranged from 3 to 22, with an average of 7.9 alleles per locus (Table 1). These results suggested high suitability for the use of these loci in *P. notatum* population studies. All of the 11 primer pairs produced a dominant locus pattern, once that the most common form of *P. notatum* is the autotetraploid, and the wild diploid inhabits a very limited area in South America (Burton 1946).

In dominant locus patterns, estimates of allelic frequencies are not possible; therefore the observed heterozygosity was not estimated. Consequently, the Polymorphism Information Content (PIC) and expected heterozygosities (PIC calculator) were used to evaluate and characterize the *P. notatum* microsatellite loci. In order to compare the efficiency of the microsatellite markers in varietal identification, we estimated the discriminating power (PD) (Tessier *et al.*, 1999) of each locus. The estimated ranges for the 11 loci were from 0.44 to 0.90 (0.70 on average) for expected heterozygosity and from 0.36 to 0.89 (0.66 on average) for PIC and from 0.55 to 0.97 (0.82 on average) for PD.

Table 1 Characteristics of 11 microsatellite loci from *Paspalum notatum*, with specification of: microsatellite names, GenBank Accession numbers, forward (F) primer sequence; reverse (R) primer sequence, repeat motif, product size range in base pairs (bp), number of alleles (NA), expected heterozygosities (He), Polymorphism Information Content (PIC) and Power Discrimination (PD)

Locus name and GenBank accession no.	Primer nucleotide sequence (5'-3')	Repeat motif	Size range (bp)	NA	He	PIC	PD
PN03-A5 FJ572060	F: GTGGCTGGGATGAAAGAACAAA R: TAGCTCGGCATAGGGGTAG	(CA)3C(CA)5(AC)2(CA)4	249–287	6	0.62	0.59	0.74
PN03-A6 FJ572061	F: TGTTAACGGCAAATCAAAT R: GCCTACCCAAAGCATACC	(GA)3 (GT)8	160–188	11	0.86	0.84	0.96
PN03-E9 FJ572062	F: TGCGCTTTTTCCATCCTAC R: GCACTGCAAACCATCATCTTAT	(AC)7	168–186	7	0.63	0.57	0.81
PN03-F2 FJ572063	F: TGCAACAAAAATAGTCAAAGAT R: AGGAGGCATATTATTAGTTCAA	(AC)7	241–249	5	0.71	0.66	0.81
PN03-G8 FJ572064	F: GCACTCTGAACTCTTGGCTCTT R: CAGGTGCTTGCTTGGTCTAA	(CA)7	254–258	3	0.44	0.36	0.55
PN03-H10 FJ572065	F: GGTGCCCAGTGAACAACA R: GAGAATGGATGGATGAAACGAT	(GA)11	222–272	12	0.87	0.86	0.95
PN02-A12 FJ572066	F: CGTCGTCAAACCCCTTCAT R: TCGGCGCTGTCTTCATCAT	(GA)3AT(GAA)3	185–205	4	0.53	0.48	0.69
PN02-B5B FJ572067	F: GCATGCATAGAGCCAAATAGAT R: TAGGTAGTGGCGGTGAAGATAGTA	(TCA)4	156–188	6	0.64	0.59	0.70
PN02-F6A FJ572068	F: ACATCAGGAGGCATACGAGTG R: CTAGTTGCCCAGGAAAGGTGA	(CT)11	140–218	22	0.90	0.89	0.97
PN02-G10 FJ572069	F: GATACGTCTGATTCTTGTTTCG R: TCCTTCATGTGTTGTGGTCTC	(CA)8	189–219	7	0.81	0.79	0.90
PN02-H7 FJ572070	F: GATATTCCACTCCCTCGCTACT R: CAACCCTACACATATCCCTCAC	(AC)8	194–204	4	0.71	0.65	0.90
Average				7.9	0.70	0.66	0.82

Table 2 Cross-species amplification of eleven *Paspalum notatum* microsatellite loci in *Paspalum subciliatum*, *Paspalum cromyrorhizon* and *Paspalum ionanthum*

Species	PN03- A5	PN03- A6	PN03- E9	PN03- F2	PN03- G8	PN03- H10	PN02- A12	PN02- B5B	PN02- F6A	PN02- G10	PN02- H7
<i>P. subciliatum</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>P. cromyrorhizon</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>P. ionanthum</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

Successful amplification (+) and failed amplification (-) are indicated

In addition to characterizing the 11 loci in *P. notatum*, cross-amplifications were done, using the experimental protocols herein described, in order to test their applicability in three other *Paspalum* sp.: *Paspalum subciliatum* Chase, *Paspalum cromyrorhizon* Trin. Ex Döll, and *Paspalum ionanthum* Chase. Results of the cross-amplification tests are shown in Table 2.

The set of molecular markers described herein are the first microsatellite loci isolated from *P. notatum* species. The data indicated that they are suitable to study the genetic diversity of Brazilian *P. notatum* collections and the genetic structure of natural populations of this important forage grass.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Brazil.

REFERENCES

Billotte N, Lagoda PJR, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.

Burton GW (1946) Bahia grass types. *Agron J*, 38, 273-281.

Burton GW (1948) The method of reproduction in common bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Agron J* 40: 443-452.

Chase A (1929) The North American species of *Paspalum*. *Contr. US Natl. Herb.* 28: 1-310.

Cidade FW, Dall'Agnol M, Bered F, Souza-Chies TT (2008) Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flügge (Paniceae – Panicoideae). *Genet Resour Crop Evol* 55: 235-246. doi: 10.1007/s10722-007-9231-8

Clayton WD, Renvoize S (1986) A. Genera Graminum: grasse of the world. Royal Botanic Gardens, London.

Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Pl Mol Biol Rep* 19: 299-306.

Daurelio LD, Espinoza F, Quarín CL, Pession SC (2004) Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Pl Syst Evol* 244: 189-199.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.

Quarín CL, Norrmann GA, Urbani MH (1989) Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. *Apomixis Newsl* 2: 44-46.

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Catinhour S, McCouch S (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome* 11: 1441-1452.

Tessier C, This DP, Boursiquot JM, Charrier A (1999) Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification *Vitis vinifera* L. *Theor Appl Genet* 98: 171-177.

Capítulo VI

**PASPALUM L. (POACEAE, PANICOIDEAE, PANICEAE) SPECIES
IDENTIFICATION USING MOLECULAR GENETIC EVALUATION**

Annals of Botany (submetido)

ORIGINAL ARTICLE

***PASPALUM* L. (POACEAE, PANICOIDEAE, PANICEAE) SPECIES
IDENTIFICATION USING MOLECULAR GENETIC EVALUATION**

Fernanda Witt Cidade¹, Tatiana T. de Souza-Chies², Francisco H. Dübbern de Souza³, José Francisco Montenegro Valls⁴, Miguel Dall’Agnol⁵ Maria Imaculada Zucchi⁶ and Anete P. Souza^{1,7*}

¹ Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, , Universidade Estadual de Campinas, CP 6010, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil, CEP 13083-875

² Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43433, Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 91501-970.

³ Embrapa Pecuária Sudeste, CP 339, São Carlos, SP, Brazil, CEP 13560-970.

⁴ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final), CP 02372 - Brasília, DF, Brasil, CEP 70770-917.

⁵ Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 91501-970

⁶ Pólo Regional Centro Sul – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios/APTA, Rodovia SP127, Km 30, Bairro: Vila Fátima, Piracicaba, SP, Brazil, CEP13400-970

⁷ Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas/SP, Brazil, CEP 13083-970,

Running title. Species identification of *Paspalum* using genetic molecular approach.

* For correspondence. anete@unicamp.br

ABSTRACT

Background and Aims: *Paspalum* (Poaceae) is an important genus of the tribe Paniceae, which includes several species of economic importance for forage, turf and ornamental purposes. Traditional taxonomical identification of many of its species is difficult, particularly within some of its informal groups; thus, a genetic molecular approach has been used as an additional tool to characterise these species. The cross-species amplification of simple sequence repeat (SSR) markers developed for *P. atratum* and *P. notatum* was evaluated in different *Paspalum* species for the assessment of genetic differences among them to assist in their proper botanical identification.

Methods: The cross amplification of 19 SSR markers was evaluated in 34 species of *Paspalum*. Additionally, a total of two hundred fourteen accessions, which comprised the different species, were evaluated using different methods of grouping.

Key Results: Twelve SSR markers were cross-amplified for most of the 34 *Paspalum* species and other unclassified accessions that were evaluated. The 12 SSR loci revealed 187 bands scored (15.58 per locus). Variable degrees of polymorphism within species were observed. Based upon different methods (PCoA, NJ) accessions were grouped into three main groups of species, of which two corresponded respectively to the Plicatula and the Notata informal *Paspalum* groups.

Conclusions: The molecular genetic approach was able to distinguishing the different taxa studied, except for the species belonging to the Plicatula group, recognised as a very complex one. For this particular case, use of molecular markers specifically developed to the Plicatula species is probably necessary. This molecular genetic approach as an initial assessment of germplasms may represent a valuable tool for species identification and as well as for the characterization, conservation and successful species hybridization.

Key words: cross-species amplification; germplasm evaluation; microsatellite; molecular markers; *Paspalum*; informal groups.

INTRODUCTION

The genus *Paspalum* L. is an important component of the Paniceae tribe (Poaceae). This genus includes between of 330 and 400 species, most of them native to tropical and subtropical regions of the Americas (Clayton & Renvoize, 1986; Chase, 1929; Zuloaga & Morrone, 2005). *Paspalum* species can be found in habitats as diverse as subtropical rainforests, savannas, marshes and dunes, but they are more frequently found in the natural grasslands of eastern Bolivia, Paraguay, central and southern Brazil, northern Argentina and Uruguay (Zuloaga & Morrone, 2005). In fact, the main centre of origin and diversity of the genus is considered to be located in the South American tropics and subtropics (Chase, 1929), primarily central Brazil, where numerous species appears associated with savannas and rocky terrains. The largest number of *Paspalum* species approximately 220 (Valls & Pozzobon, 1987), is found in Brazil (Rua, 2006; Judziewicz, 1990), in nearly all herbaceous plant communities of different ecosystems (Valls, 1987).

Several species of *Paspalum* are of economic importance for forage, turf and ornamental purposes (Burson & Bennett, 1971a) in different parts of the world. Dallisgrass (*P. dilatatum* Poir.) and bahiagrass (*P. notatum* Flügge) are particularly important and widely used as forage, mainly in the southern U.S. (Gates *et al.*, 2004; Evers & Burson, 2004). *Paspalum atratum* Swallen has been the object of growing interest as forage in areas subjected to periodic flooding in Florida (U.S.A.), northeastern Argentina, Brazil, Thailand, Philippines, and Australia (Evers & Burson, 2004). In addition, *P. scrobiculatum* L. ('Kodo millet') is cultivated in India as a cereal crop. *Paspalum vaginatum* Sw. and *P. notatum* are

widely grown as turf grass.

Due to persistent interest for several species of this genus, many accessions have been conserved in germplasm banks and distributed in various countries around the world mainly with the purpose of cultivar development and cytogenetic studies. The use of some accessions of interest, however, is often restricted by the difficulty of correct taxonomical identification. In Brazil, in spite of constant evaluations of germplasm banks and taxonomic reviews (Oliveira, 2004), many species of *Paspalum*, especially those included in the Plicatula Group, remain unidentified. This represents a problem since the correct identification of germplasms and the quantification of its variability are necessary for the development of conservation and breeding programs.

The complexity of the taxonomical characterization of *Paspalum* germplasm results from its complex evolutionary history. Polyploidy is frequent within the genus (Quarín, 1992; Pagliarini *et al.*, 2001) and has played a crucial role in its evolution. Most species have a basic chromosome number of $x = 10$ (Burton, 1940), with ploidy levels ranging from diploid to hexadecaploid (Burton, 1940). Diploid numbers are not rare within the genus (Norrman *et al.*, 1989; Honfi *et al.*, 1990; Norrman *et al.*, 1994a, 1994b; Quarín *et al.*, 1996; Pozzobon & Valls, 2003; Zuloaga & Morrone, 2005; Pozzobon *et al.*, 2008), but most of the investigated species (80%) are polyploids, of which 50% are tetraploid; most of these tetraploids are apomictic (Quarín 1992; Quarín *et al.*, 2001). Many *Paspalum* species consist of sexual-diploid and apomictic-polyploid cytotypes, and several have been shown to have arisen through natural hybridization (Quarín & Norrman, 1990). Furthermore, interspecific hybridization and allopolyploidy are not always morphologically evident in some species complexes as in *Paspalum* (Vaio *et al.*, 2005).

In view of this degree of complexity, the division of the genus into subgenera, sections or informal groups has been proposed (Chase, 1929; Barreto, 1974; Clayton & Renvoize, 1986; Canto-Dorow *et al.*, 1996; Morrone & Carbonó, 1995; Morrone *et al.*, 1996, 2000, 2004; Oliveira & Valls, 2002; Denham *et al.*, 2002; Denham, 2005; Rua & Aliscioni, 2002; Zuloaga *et al.*, 2004, 2005). However, such rankings have been based upon morphological similarities, and the evolutionary relationships are not always clear. The monophyly of some of these groups has been discussed (Denham *et al.*, 2002; Rua & Aliscione, 2002; Souza-Chies *et al.*, 2006; Essi & Souza-Chies, 2007; Giussani *et al.*, 2009; Rua *et al.*, 2010) but a consensus has not been reached.

Molecular markers have been helpful for characterization of accession kept in germplasm banks (Espinosa *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Cidade *et al.*, 2008), for botanical identification of "species" belonging to taxonomical complexes (Kyndt *et al.*, 2005, 2006; Van Droogenbroeck *et al.*, 2006; Koopman *et al.*, 2008; Speranza, 2009) and for detection of individuals of hybrid origin (Kyndt *et al.*, 2006).

Codominancy and high degree of polymorphism makes the analysis of microsatellite markers or simple sequence repeats (SSRs) suitable for these purposes. However, the widespread use of nuclear microsatellites in the characterization of wild germplasm is limited by the fact that the development of SSR primer pairs is relatively expensive and time consuming. Fortunately, primers designed for source species have often been successfully used to amplify nuclear SSRs in closely related taxa when the DNA regions flanking the microsatellite loci are sufficiently conserved (Byrne *et al.*, 1996; Peakall *et al.*, 1998; Steinkellner *et al.*, 1997; Roa *et al.*, 2000; Dirlewanger *et al.*, 2002; Hempel & Peakall, 2003; Poncet *et al.*, 2004 González-Martínez *et al.*, 2004; Speranza *et*

al., 2007; Cidade *et al.*, 2010).

The objectives of our study were (1) to evaluate the cross amplification of SSR markers in all *Paspalum* species present in the germplasm bank of Embrapa Southeast Cattle and Faculty of Agriculture (Rio Grande do Sul Federal University - Brazil) using markers developed for *P. atratum* and *P. notatum*; (2) to evaluate the informative potential of SSRs for genetic discrimination in different species of *Paspalum*; and (3) to use these molecular markers to assess the different *Paspalum* species and assist their botanical identification .

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials and DNA Extraction

A total of 214 accessions of *Paspalum* (177 accessions sampled from 35 species and 37 unclassified accessions) were studied. These accessions have been maintained *in vivo* at the Embrapa Cattle-Southeast, located in São Carlos (SP), and Faculty of Agronomy (Federal University of Rio Grande do Sul), in Porto Alegre (RS), Brazil, where they have been subjected to a number of field and laboratory evaluations.. The Brazilian register codes, species, botanical groups, origin, and chromosome numbers (of those available) are listed in Table 1.

Genomic DNA from each sample was isolated from lyophilised young leaf tissue using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method proposed by Doyle and Doyle (1987), with minor modifications. DNA quality and quantity were checked with

0.8% agarose gels. DNA concentrations were estimated by comparison with known concentrations of lambda DNA.

SSR Analysis

Cross-species amplification was tested for 35 *Paspalum* species with a set of 19 SSR primers developed for *P. atratum* and *P. notatum*. In previous studies (Cidade *et al.*, 2009; 2010), these primers had yielded positive amplifications in few species. Twelve of these SSRs were selected for germplasm evaluation in this work given their readable electrophoretic patterns and absence of nonspecific bands.

The fragments were PCR-amplified in a PTC-200 (MJ Research) thermocycler in a 20 μ L reaction volume consisting of 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.15 mM of each dNTP, 0.8 μ M of each primer, 1 U *Taq* DNA polymerase and 20 ng of genomic DNA. The PCR amplification protocol consisted of an initial denaturation at 94°C for one min; 30 amplification cycles of denaturation at 94°C for one min, annealing at temperatures specific for the primer pairs for one min, and elongation at 72°C for one min; and a final extension at 72°C for five min (Table 2). For some loci, a touchdown protocol was used (Don *et al.*, 1991). Amplification products were verified by electrophoresis on 3% agarose gels containing 0.1 mg ethidium bromide per ml in 1X TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.0). The amplification products were separated by electrophoresis on 6% denaturing polyacrylamide gels in 1X TBE buffer. For polyacrylamide gel electrophoresis, the PCRs were mixed with equal volumes of loading buffer (formamide containing 0.8 mmol/L EDTA plus traces of bromophenol blue and xylene cyanol), denatured at 95°C for 3 min, and snap-cooled on ice. Afterward, the samples were loaded on a preheated model S2001 gel electrophoresis apparatus (Life

Technologies) and run at 75 W for 1 to 3 h depending on the fragment sizes to be separated. For the purpose of visualization, the fragments were visualised by silver-staining according to Creste *et al.* (2001). Only the strongest bands were considered because lighter bands may have been stutter bands that resulted from slippage of the Taq polymerase during PCR (Wu and Tanksley, 1993; Roa *et al.*, 2000). The size of DNA fragments was estimated by comparison with the size standard (10 bp DNA Ladder – Invitrogen).

Table 1. Accessions from the *Paspalum* collection used in this study. The ID, BRA code, Species, Botanical Groups, Origin, Chromosome Numbers, and Reference for the chromosome number determination are shown.

ID	BRA CODE	SPECIES	BOTANICAL GROUPS	ORIGIN	CHROMOSOME NUMBERS	REFERENCE FOR THE CHROMOSOME NUMBER DETERMINATION
3	BRA-007528	<i>P. indecorum</i>	CAESPITOSA	S. Antônio das Missões (RS), Brazil	NA	
6	BRA-006211	<i>P. indecorum</i>	CAESPITOSA	Santana do Livramento (RS), Brazil	NA	
7	BRA-020966	<i>P. indecorum</i>	CAESPITOSA	São Luiz Gonzaga (RS), Brazil	2n=20	Pozzobon <i>et al.</i> , 2008
8	BRA-015067	<i>P. maritimum</i>	CAESPITOSA	Oiapoque (AP), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Adamowski <i>et al.</i> , 2000
9	BRA-015059	<i>P. maritimum</i>	CAESPITOSA	Ferreira Gomes (AP), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Adamowski <i>et al.</i> , 2000
10	BRA-015041	<i>P. maritimum</i>	CAESPITOSA	Macapá (AP), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Adamowski <i>et al.</i> , 2000
12	BRA-022721	<i>P. conjugatum</i>	CONJUGATA	Goiânia (GO), Brazil	2n=40	
14	BRA-021296	<i>P. corcovadense</i>	CORCOVADENSIA	Xangri-lá (RS), Brazil	NA	
15	BRA-021369	<i>P. corcovadense</i>	CORCOVADENSIA	D.Pedro de Alcântara (RS), Brazil	NA	
18	BRA-020745	<i>P. dilatatum</i>	DILATATA	Passo Fundo (RS), Brazil	NA	
22	BRA-023400	<i>P. pauciciliatum</i>	DILATATA	Ponta Porã (MS), Brazil	NA	
23	BRA-009857	<i>P. vaginatum</i>	DISTICHA	Mostardas (RS), Brazil	NA	
24	BRA-009989	<i>P. vaginatum</i>	DISTICHA	Laguna (SC), Brazil	NA	
28	BRA-020648	<i>P. jesuiticum</i>	LIVIDA	Juiz de Fora (MG), Brazil	NA	
31	BRA-021113	<i>P. lividum</i>	LIVIDA	Uruguaiana (RS), Brazil	2n=40	Pozzobon <i>et al.</i> , 2008
32	BRA-006378	<i>P. lividum</i>	LIVIDA	São Gabriel (RS), Brazil	2n=40	Adamowski <i>et al.</i> , 2005
33	BRA-022276	<i>P. malacophyllum</i>	ANACHYRIS	Correa Pinto (SC), Brazil	NA	
34	BRA-023469	<i>P. malacophyllum</i>	ANACHYRIS	Aral Moreira (MS), Brazil	NA	
35	BRA-003077	<i>P. malacophyllum</i>	ANACHYRIS	Itumbiara (GO), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Pagliarini <i>et al.</i> , 2001
36	BRA-023540	<i>P. malacophyllum</i>	ANACHYRIS	Japorã (MS), Brazil	NA	
38	BRA-020915	<i>P. sp</i>	ANACHYRIS	Vitória das Missões (RS), Brazil	NA	
39	BRA-006386	<i>P. lividum</i>	LIVIDA	São Gabriel (RS), Brazil	2n=40	Pozzobon <i>et al.</i> , 2003
40	BRA-006491	<i>P. modestum</i>	MODESTA/PLICATULA	Uruguaiana (RS), Brazil	2n=20	Pozzobon <i>et al.</i> , 2003
42	BRA-020214	<i>P. palustre</i>	MODESTA/PLICATULA	Porto Murtinho (MS), Brazil	2n=40	Pozzobon <i>et al.</i> , 2003
70	BRA-020826	<i>P. juergensii</i>	PANICULATA	Passo Fundo (RS), Brazil	2n=20	Pozzobon <i>et al.</i> , 2008
71	BRA-020681	<i>P. juergensii</i>	PANICULATA	Bento Gonçalves (RS), Brazil	NA	
72	BRA-022675	<i>P. paniculatum</i>	PANICULATA	BRA-012742A	NA	
43	BRA-006289	<i>P. cromyorrhizon</i>	NOTATA	Uruguaiana (RS), Brazil	NA	
44	BRA-006483	<i>P. cromyorrhizon</i>	NOTATA	Uruguaiana (RS), Brazil	NA	
45	BRA-009806	<i>P. ionanthum</i>	NOTATA	S. Vitória do Palmar (RS), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Pagliarini <i>et al.</i> , 2001
46	BRA-006092	<i>P. ionanthum</i>	NOTATA	Piratini (RS), Brazil	NA	
73	BRA-023299	<i>P. atratum</i>	PLICATULA	Anastácio (MS), Brazil	NA	
74	BRA-003913	<i>P. atratum</i>	PLICATULA	Miranda (MS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
75	BRA-023329	<i>P. atratum</i>	PLICATULA	Anastácio (MS), Brazil	NA	

Table 1 continuation

76	BRA-009661	<i>P. atratum</i>	PLICATULA	Aquidauana (MS), Brazil	2n=40	Adamowski <i>et al.</i> , 2005
77	BRA-022934	<i>P. atratum</i>	PLICATULA	Paranaíba (MS), Brazil	NA	
79	BRA-011681	<i>P. atratum</i>	PLICATULA	Campo Belo do Sul (SC), Brazil	NA	
80	BRA-009610	<i>P. atratum</i>	PLICATULA	Terenos (MS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998
81	BRA-023353	<i>P. atratum</i>	PLICATULA	Anastácio (MS), Brazil	NA	
82	BRA-023612	<i>P. atratum</i>	PLICATULA	Dourados (MS), Brazil	NA	
84	BRA-022993	<i>P. atratum</i>	PLICATULA	Paranaíba (MS), Brazil	NA	
85	BRA-010537	<i>P. atratum*</i>	PLICATULA	Cáceres (MT), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
88	BRA-022390	<i>P. compressifolium</i>	PLICATULA	Arroio dos Ratos (RS), Brazil	NA	
89	BRA-011720	<i>P. compressifolium</i>	PLICATULA	Barracão (RS), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
90	BRA-012173	<i>P. compressifolium</i>	PLICATULA	Campos Novos (SC), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
91	BRA-013455	<i>P. compressifolium</i>	PLICATULA	Balsa Nova (PR), Brazil	NA	
92	BRA-013030	<i>P. compressifolium</i>	PLICATULA	Campo Largo (PR), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
93	BRA-011282	<i>P. compressifolium</i>	PLICATULA	Passo Fundo (RS), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Adamowski <i>et al.</i> , 2005
95	BRA-012238	<i>P. compressifolium</i>	PLICATULA	Bom Retiro (SC), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
100	BRA-011355	<i>P. compressifolium</i>	PLICATULA	Lagoa Vermelha (RS), Brazil	NA	
101	BRA-012157	<i>P. glaucescens</i>	PLICATULA	Campos Novos (SC), Brazil	NA	
102	BRA-006424	<i>P. glaucescens</i>	PLICATULA	Alegrete (RS), Brazil	2n=20	Pozzobon & Valls, 2000
106	BRA-011363	<i>P. glaucescens</i>	PLICATULA	Lagoa Vermelha (RS), Brazil	NA	
107	BRA-011398	<i>P. glaucescens</i>	PLICATULA	Lagoa Vermelha (RS), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Pagliarini <i>et al.</i> , 2001
108	BRA-011002	<i>P. glaucescens</i>	PLICATULA	Santo Ângelo (RS), Brazil	2n=60	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
109	BRA-011401	<i>P. glaucescens</i>	PLICATULA	Lagoa Vermelha (RS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
112	BRA-012483	<i>P. guenoarum</i>	PLICATULA	Pereira Barreto (SP), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
113	BRA-006572	<i>P. guenoarum</i>	PLICATULA	São Borja (RS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
114	BRA-022641	<i>P. guenoarum</i>	PLICATULA	BRA-011398	NA	
115	BRA-023621	<i>P. guenoarum</i>	PLICATULA	Dourados (MS), Brazil	NA	
116	BRA-015083	<i>P. guenoarum</i>	PLICATULA	Quaraí (RS), Brazil	NA	
117	BRA-014851	<i>P. guenoarum</i>	PLICATULA	João Pinheiro (MG), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
123	BRA-010332	<i>P. oteroi</i>	PLICATULA	Corumbá (MS), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Pagliarini <i>et al.</i> , 2001
125	BRA-001503	<i>P. oteroi</i>	PLICATULA	Corumbá (MS), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Pagliarini <i>et al.</i> , 2001
133	BRA-013111	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Balsa Nova (PR), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
134	BRA-013048	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Campo Largo (PR), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
137	BRA-020974	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	São Luiz Gonzaga (RS), Brazil	2n=40	Pozzobon <i>et al.</i> , 2008
138	BRA-022403	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Arroio dos Ratos (RS), Brazil	NA	
139	BRA-003450	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Lages (SC), Brazil	NA	
140	BRA-008834	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Porto Alegre (RS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
141	BRA-020796	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Passo Fundo (RS), Brazil	2n=40	Pozzobon <i>et al.</i> , 2008
143	BRA-009130	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Porto Lucena (RS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999

Table 1 continuation

144	BRA-020702	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Vila Flores (RS), Brazil	2n=40	Pozzobon <i>et al.</i> , 2008
145	BRA-011274	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Soledade (RS), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Pagliarini <i>et al.</i> , 2001
146	BRA-012939	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Aral Moreira (MS), Brazil	2n=60	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
147	BRA-009032	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Itaqui (RS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
148	BRA-021601	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Carolina (MA), Brazil	NA	
150	BRA-009181	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	São Gabriel (RS), Brazil	NA	
151	BRA-021598	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Riachão (MA), Brazil	NA	
152	BRA-014389	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Palmas (PR), Brazil	NA	
154	BRA-023302	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Anastácio (MS), Brazil	NA	
155	BRA-012700	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Dourados (MS), Brazil	NA	
156	BRA-014354	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Palmas (PR), Brazil	NA	
157	BRA-022951	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Paranaíba (MS), Brazil	NA	
158	BRA-020761	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Passo Fundo (RS), Brazil	2n=40	Pozzobon <i>et al.</i> , 2008
178	BRA-013391	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Curitiba (PR), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
179	BRA-006700	<i>P. rhodopedum</i>	PLICATULA	Ciríaco (RS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
182	BRA-013129	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Balsa Nova (PR), Brazil	NA	
190	BRA-013307	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Quatro Barras (PR), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
201	BRA-014176	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Guarapuava (PR), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Pagliarini <i>et al.</i> , 2001
216	BRA-022900	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Itarumã (GO), Brazil	NA	
240	BRA-023663	<i>P. plicatulum</i>	PLICATULA	Campo Grande (MS), Brazil	NA	
165	BRA-023582	<i>P. rhodopedum</i>	PLICATULA	Dourados (MS), Brazil	NA	
166	BRA-023477	<i>P. rhodopedum</i>	PLICATULA	Aral Moreira (MS), Brazil	NA	
168	BRA-023370	<i>P. rojasii</i>	PLICATULA	Dourados (MS), Brazil	NA	
169	BRA-023647	<i>P. rojasii</i>	PLICATULA	Campo Grande (MS), Brazil	NA	
170	BRA-022942	<i>P. rojasii</i>	PLICATULA	Paranaíba (MS), Brazil	NA	
173	BRA-023213	<i>P. wrightii</i>	PLICATULA	Corumbá (MS), Brazil	NA	
181	BRA-013404	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Balsa Nova (PR), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Adamowski <i>et al.</i> , 2005
199	BRA-013978	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Ponta Grossa (PR), Brazil	NA	
200	BRA-014168	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Guarapuava (PR), Brazil	NA	
202	BRA-012521	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Três Lagoas (MS), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Adamowski <i>et al.</i> , 2005
204	BRA-013951	<i>P. compressifolium</i>	PLICATULA	Ponta Grossa (PR), Brazil	2n=40	Adamowski <i>et al.</i> , 2005
206	BRA-022705	<i>P. sp</i>	PLICATULA	BRA-011177	NA	
208	BRA-011266	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Passo Fundo (RS), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Adamowski <i>et al.</i> , 2005
210	BRA-012866	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Caarapó (MS), Brazil	NA	
212	BRA-009687	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Bella Vista, Paraguai (PGY)	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
215	BRA-023388	<i>P. rhodopedum</i>	PLICATULA	Dourados (MS), Brazil	NA	
217	BRA-022926	<i>P. limbatum</i>	PLICATULA	Itarumã (GO), Brazil	NA	

Table 1 continuation

223	BRA-015091	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Abelardo Luz (SC), Brazil	NA	
227	BRA-010464	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Aquidauana (MS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
230	BRA-012416	<i>P. commutatum</i>	PLICATULA	Acreuna (GO), Brazil	NA	
232	BRA-012874	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Caarapó (MS), Brazil	NA	
233	BRA-011517	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Bom Jesus (RS), Brazil	2n=40	Adamowski <i>et al.</i> , 2005
234	BRA-012742	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Caarapó (MS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
236	BRA-011479	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Bom Jesus (RS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998
118	BRA-023591	<i>P. lepton</i>	PLICATULA	Dourados (MS), Brazil	NA	
119	BRA-023434	<i>P. lepton</i>	PLICATULA	Aral Moreira (MS), Brazil	NA	
121	BRA-011215	<i>P. lepton</i>	PLICATULA	Santa Maria (RS), Brazil	NA	
237	BRA-023531	<i>P. lepton</i>	PLICATULA	Coronel Sapucaia (RS), Brazil	NA	
238	BRA-022845	<i>P. limbatum</i>	PLICATULA	Acreuna (GO), Brazil	NA	
239	BRA-022969	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Paranaíba (MS), Brazil	NA	
241	BRA-023744	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Alcinópolis (MS), Brazil	NA	
243	BRA-012718	<i>P. limbatum</i>	PLICATULA	Dourados (MS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
244	BRA-014621	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Campos Novos (SC), Brazil	NA	
246	BRA-012645	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Dourados (MS), Brazil	NA	
247	BRA-010243	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Montes Claros (MG), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Adamowski <i>et al.</i> , 2005
248	BRA-014109	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Guarapuava (PR), Brazil	NA	
249	BRA-010511	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Coxim (MS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
250	BRA-012530	<i>P. limbatum</i>	PLICATULA	Ribas do Rio Pardo (MS), Brazil	NA	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Adamowski <i>et al.</i> , 2005
251	BRA-014117	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Guarapuava (PR), Brazil	NA	
252	BRA-010596	<i>P. sp</i>	PLICATULA	N.S. Livramento (MT), Brazil	NA	
254	BRA-009407	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Porto Velho (RO), Brazil	NA	
256	BRA-010952	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Palmeiras Missões (RS), Brazil	NA	
258	BRA-010995	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Ijuí (RS), Brazil	NA	
260	BRA-023680	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Costa Rica (MS), Brazil	NA	
261	BRA-015075	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Quaraí (RS), Brazil	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998; Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
263	BRA-023671	<i>P. limbatum</i>	PLICATULA	Camapuã (MS), Brazil	NA	
266	BRA-014630	<i>P. sp</i>	PLICATULA	Curitibanos (SC), Brazil	NA	
267	BRA-006602	<i>P. rhodopedum</i>	PLICATULA	Santo Ângelo (RS), Brazil	NA	
297	BRA-022101	<i>P. exaltatum</i>	QUADRIFARIA	Caseiros (RS), Brazil	NA	
301	BRA-012793	<i>P. conspersum</i>	VIRGATA	Iguatemi (MS), Brazil	NA	
303	BRA-019186	<i>P. regnellii</i>	VIRGATA	Rio Claro (SP), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
304	BRA-009890	<i>P. regnellii</i>	VIRGATA	Lages (SC), Brazil	NA	
305	BRA-022357	<i>P. regnellii</i>	VIRGATA	Capão Alto (SC), Brazil	NA	
306	BRA-019186	<i>P. regnellii</i>	VIRGATA	Rio Claro (SP), Brazil	NA	
310	BRA-022667	<i>P. sp</i>	VIRGATA	BRA-012424	2n=40	Takayama <i>et al.</i> , 1998

Table 1 continuation

317	BRA-022764	<i>P. sp</i>	NC	Goiânia (GO), Brazil	NA	
318	BRA-022772	<i>P. sp</i>	NC	Goiânia (GO), Brazil	NA	
323	BRA-022748	<i>P. sp</i>	NC	São Carlos (SP), Brazil	NA	
324	BRA-022781	<i>P. sp</i>	NC	Goiânia (GO), Brazil	NA	
325	BRA-022802	<i>P. sp</i>	NC	Goiânia (GO), Brazil	NA	
326	BRA-022799	<i>P. sp</i>	NC	Goiânia (GO), Brazil	NA	
48	BRA-006513	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Uruguaiana (RS), Brazil	2n=40	
49	BRA-021563	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	
50	BRA-010006	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Laguna (SC), Brazil	NA	
52	BRA-023728	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Costa Rica (MS), Brazil	NA	
53	BRA-007986	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Guaíba (RS), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
54	BRA-006467	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Alegrete (RS), Brazil	NA	
55	BRA-006301	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Uruguaiana (RS), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
56	BRA-001112	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Pensacola (FL) USA	NA	
57	BRA-001074	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Paraguai	NA	
58	BRA-024236	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Candói (PR), Brazil	2n=20	
59	BRA-021547	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	
60	BRA-023523	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Coronel Sapucaia (MS), Brazil	NA	
61	BRA-023558	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Japorã (MS), Brazil	NA	
62	BRA-023566	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Japorã (MS), Brazil	2n=40	
63	BRA-006173	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Bagé (RS), Brazil	2n=20	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Pagliarini <i>et al.</i> , 2001
64	BRA-012254	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Macapá (AP), Brazil	NA	
65	BRA-019178	<i>P. notatum</i>	NOTATA	São Carlos (SP), Brazil	NA	
66	BRA-019470	<i>P. notatum</i> SWSB	NOTATA	Corrientes, Argentina	NA	
67	BRA-021270	<i>P. pumilum</i>	NOTATA	Xangri-lá (RS), Brazil	2n=20	
68	BRA-014842	<i>P. subciliatum</i>	NOTATA	Felixlândia (MG), Brazil	2n=40	Pagliarini <i>et al.</i> , 1999
69	BRA-013871	<i>P. ovale</i>	OVALIA	Ponta Grossa (PR), Brazil	NA	
M4	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Barra do Quaraí (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M5	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M6	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M7	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M8	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Japorã (MS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M10	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Candói (PR), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M11	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Candói (PR), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M14	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M17	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M18	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M23	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Encruzilhada do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M24	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Encruzilhada do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008

Table 1 continuation

M25	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Lavras do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M26	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Caçapava do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M27	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Lavras do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M29	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Lavras do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M30	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Bagé (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M31	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	André da Rocha (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M32	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Barretos (SP), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M33	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Vacaria (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M35	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	São Borja (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M36	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Santo Tome, Argentina	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M37	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Santo Tome, Argentina	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M38	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Santo Tome, Argentina	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M39	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Santo Tome, Argentina	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M41	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Santo Tome, Argentina	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M42	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Santo Tome, Argentina	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M44	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Santo Tome, Argentina	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M46	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Santo Tome, Argentina	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M49	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Mostardas (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M50	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Piracicaba (SP), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M51	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Posadas, Argentina	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M54	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Eldorado do Sul (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M55	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Quaraí (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M57	NA	<i>P. notatum</i>	NOTATA	Eldorado do Sul (RS), Brazil	NA	
M66	NA	<i>P. notatum</i>	MD s/n	Colonia, Uruguay	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M67	NA	<i>P. notatum</i>	MD s/n	Colonia, Uruguay	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
M69	NA	<i>P. notatum</i>	MD s/n	São José do Hortêncio-RS	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
BAG	NA	<i>P. notatum</i>	CN s/n	Região das Missões – RS	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008
AR	NA	<i>P. notatum</i>	MD s/n	André da Rocha (RS), Brazil	2n=40	Dahmer <i>et al.</i> , 2008

Data analysis

No assumption about the genetic nature of the alleles was made due to the high ploidy levels of the majority accessions of *Paspalum*. Hence, each allele was scored in a dominant manner and transformed into either a 1 (present) or 0 (absent) matrix. The non-amplified loci were analyzed as missing data. Summary statistics, including total number of bands, number of bands per locus, and polymorphism information content (PIC), were determined based on the total matrix of data obtained from the microsatellite genotyping for each locus. The PIC measure replaces the measure of heterozygosity (He), as He is useful only for co-dominant markers (SSRs were treated as dominant in this study because of the high ploidy level of the samples) (Cordeiro *et al.*, 2003). The PIC was calculated according to the formula

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

where p is the relative frequency of the j th pattern for SSR marker i .

Moreover, to verify the potential information of these SSR loci in future genetic studies of other *Paspalum* species, the number of alleles and the PIC were calculated for each marker within each species.

From the binary matrix, the genetic similarity (GS) indices were calculated for all possible pairwise comparisons using the Dice coefficient (Dice, 1945), $S_D = 2C/(A+B)$, where A is the number of unique bands in the first genotype, B the number of unique bands in the second genotype, and C the number of bands in common. Cluster analysis of the data was carried out with the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath & Sokal, 1973), and the significance of the cophenetic correlation was tested using

the Mantel correspondence test (Mantel, 1967). Additionally, a Principal Coordinate Analysis (PCoA) was conducted. The matrix of Dice similarities for pairwise constructed with the program ‘SimQual’ was transformed into a scalar form with ‘Dcenter’, with which the eigenvectors were computed and plotted with the ‘Eigen’ module. The goodness of fit of the analysis was measured by generating a model distance matrix from the eigenvector matrix (using ‘Simint’) and comparing it to the original Dice coefficient matrix (with ‘Mxcomp and 1000 permutations). All calculations were carried out using the software package NTSys-pc (Rohlf, 2000).

We also generated an unrooted dendrogram using the Weighted Neighbor-joining-method (NJ) based on Dice coefficient dissimilarity ($1-S_D$), which was performed in Software DARwin 5.0.157 (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006). Trees were designed in Figtree v. 1.3.1 software (Rambaut, 2009). The bootstrap method was employed to evaluate the reliability of the tree topology. The calculations were performed with BOOD 3.0 (Coelho, 2001) and DARwin 5.0.157 (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006) software using 1,000 replications. The cophenetic coefficient between the matrix of genetic similarity and the dendrogram was computed using an appropriate routine of the NTSYSpc 2.10 software.

Additionally, to minimise bias in the analysis due to low sample numbers of some species, we used three randomly chosen accessions of each species, when available, to calculate a new matrix of Dice similarity and build a new dendrogram based on the UPGMA method with these species.

The binary matrix derived from the SSR data was examined by analysis of molecular variance (AMOVA) using Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Partitioning of genetic variation within taxa was calculated, and their significance was estimated non-parametrically by 1000 permutations.

RESULTS

SSR markers: cross-species amplification and informative potential

Successful amplification of 12 SSR markers was observed in most species; the only exceptions were locus PN03-A6, which showed weak amplification in *P. pumilum* Ness, *P. subciliatum* Chase, and *P. ovale* Nees ex Steud., and the locus PA01-C8 in *P. ovale*.

A large degree of SSR polymorphism was revealed within the material surveyed. From the 12 SSR markers used, a total of 187 bands (15.58 per locus – Table 2) were amplified, thereby allowing an analysis of the organisation of genetic diversity within *Paspalum*. The loci PA02-B1, PA01-B7, PN03-C7, PN03-A6, and PN02-B5B were the most informative, amplifying more than 20 bands each. The PIC values observed in all the material analyzed for each locus are presented in Table 2.

Table 2. Microsatellite loci used in this work. Repeat motif, annealing temperature for amplification (Ta), product size, number of bands (NB), and general polymorphic information content (PIC), are shown.

Locus name	Repeat motif	Ta (°C)	Product size(pb)	NB	PIC	Reference/ GenBank no.
PA02-A5	(GC)3GG(CT)4	60	122-142	9	0.59	Cidade <i>et al.</i> , 2010
PA02-B1	(CGGC)3	60	130-202	23	0.81	Cidade <i>et al.</i> , 2010
PA01-B7	(GC)6(CA)2(GA)8CA(GA)9	60	185-310	32	0.89	Cidade <i>et al.</i> , 2010
PA01-C1	(CA)3CG(CA)2CT(AGGA)3	58	231	10	0.25	Cidade <i>et al.</i> , 2010
PA02-C3	(CA)3CTGA(CA)4	60	222-400	13	0.78	Cidade <i>et al.</i> , 2010
PA01-C8	(AT)2TTA(AT)2TTCA(GA)2	60	247-279	6	0.76	HM208140
PA01-E10	(GGT)2T(ACT)2	54	186-210	6	0.43	HM208141
PA02-F8	(AC)4TA(AC)3	TD	166-200	6	0.42	Cidade <i>et al.</i> , 2010
PA01- F10	(CT)10	50	188-240	18	0.48	Cidade <i>et al.</i> , 2010
PN03-A6	(GT)8	60	152-192	20	0.76	Cidade <i>et al.</i> , 2011
PN02-B5B	(TCA)4	60	152-234	24	0.79	Cidade <i>et al.</i> 2009
PN03-C7	(CA)6CGACGCATC(AT)3	50	133-177	20	0.83	Cidade <i>et al.</i> , 2011
Average				15.58	0.65	

Table 3 shows the number of bands scored, their size range, and PIC values for SSR loci in each species. The number of alleles within each species coupled with the PIC provides an estimate of the informative potential of the loci for genetic studies of different species of *Paspalum*. The microsatellites tested showed considerable PIC, despite the low sample number for some species. However, the informative potential of these loci is higher in species of the Plicatula group, and most SSRs were developed for *P. atratum*, which belongs to this group.

Clusters analysis

The principal coordinate analyses showed a goodness of fit of 0.86 ($P < 0.001$). The bidimensional scatter-plot PCoA (Principal Coordinate Analyses, Fig. 1.A) indicated the formation of three main groups, corresponding to Plicatula Group (except for some dispersed species), Notata Group (*P. notatum*, *P. pumilum*, *P. subciliatum*, *P. cromyrorhizon* Trin. ex Döll, and *P. ionanthum* Chase, the latter two being grouped more distantly to the other species of this group) and other botanical groups. All botanical groups of *Paspalum* represented in this study are shown in the legend. This trend toward the formation of three main groups may have resulted from the low representative number of some species and groups as well as the markers used, which were conserved in the genetically more distant species of taxa for which primers were originally developed (*P. notatum* and *P. atratum*, from the Notata and the Plicatula groups, respectively).

The three dimensional scatter-plot PCoA (Fig. 1.B) also shows the same trend; however, the species of the Plicatula group were more dispersed and seemed to be splitted into two groups. The three principal vectors PC1 (26.77), PC2 (9.52), and PC3 (3.92) represent 40.21% of the variation.

Table 3. The size range of the bands, the number of bands (NB), and PIC for 12 SSR loci. The SSR loci were tested in 36 *Paspalum* taxa.

Species (SN)/ Botanical group	PN03-A6			PA02-A5			PA01-E10			PA01-B7		
	Size-range (bp)	NB	PIC	Size-range (bp)	NB	PIC	Size-range (bp)	NB	PIC	Size-range (bp)	NB	PIC
<i>P. notatum</i> (61) – Notata	152-192	16	0.86	122-126	2	0.38	200-208	2	0.38	259-300	8	0.68
<i>P. pumilum</i> – Notata	WA	WA	-	122-126	2	-	200-208	2	-	267-269	2	-
<i>P. subciliatum</i> – Notata	WA	WA	-	122-126	2	-	200-208	2	-	269-276	2	-
<i>P. ovale</i> – Ovalia	WA	WA	-	122-126	2	-	200-208	2	-	269	1	-
<i>P. cromyrorhizon</i> – Notata	158-182	4	-	122-126	2	-	200	1	-	259	1	-
<i>P. ionanthum</i> – Notata	162-182	3	-	122-126	2	-	200	1	-	259	1	-
<i>P. atratum</i> (11) – Plicatula	154-182	7	0.73	122-130	4	0.53	198-208	3	0.33	247-279	6	0.64
<i>P. compressifolium</i> (8) – Plicatula	184-192	7	0.74	122-126	3	0.51	180-210	4	0.42	239-275	8	0.78
<i>P. glaucescens</i> (6) – Plicatula	164-182	4	0.64	122-130	3	0.53	198-210	4	0.64	185-271	11	0.85
<i>P. guenoarum</i> (6) – Plicatula	160-182	5	0.72	122-126	2	0.38	198-208	3	0.44	247-273	6	0.74
<i>P. oteroi</i> (2) – Plicatula	160-182	4	0.68	122-126	2	0.38	200-208	2	0.35	189-251	3	0.55
<i>P. plicatulum</i> (27) – Plicatula	160-182	5	0.73	122-132	5	0.71	186-210	6	0.58	239-273	9	0.8
<i>P. rhodopedum</i> (5) – Plicatula	160-182	4	0.69	122-132	4	0.69	200	1	0	247-300	6	0.79
<i>P. rojasii</i> (3) – Plicatula	160-182	4	0.67	128-132	2	0.38	200	1	0	247-267	3	0.55
<i>P. limbatum</i> (6) – Plicatula	160-182	7	0.76	122-128	3	0.48	200	1	0	231-267	6	0.75
<i>P. leptum</i> (4) – Plicatula	160-182	6	0.76	122-126	3	0.51	180-208	3	0.45	239-280	6	0.79
<i>Paspalum</i> sp. – Plicatula (29)	160-182	5	0.71	122-134	6	0.7	200-210	3	0.17	239-310	14	0.83
<i>P. commutatum</i> – Plicatula	158-182	4	-	122-126	2	-	200	1	-	239-247	2	-
<i>P. modestum</i> (2) – Plicatula/Modesta	164-182	3	0.59	122-126	2	0.38	200	1	0	249-269	3	0.53
<i>P. palustre</i> – Plicatula/Modesta	162-182	3	-	122-126	2	-	200	1	-	249-269	3	-
<i>P. wrightii</i> – Plicatula	158-182	4	-	122-126	2	-	200	1	-	230	1	-
<i>P. regnellii</i> (4) – Virgata	164-182	4	0.7	122-128	3	0.59	200	1	0	259-310	3	0.59
<i>P. conspersum</i> – Virgata	162-182	3	-	128-132	2	-	200	1	-	259-310	2	-
<i>P. exaltatum</i> – Quadrifaria	162-182	3	-	122-126	2	-	200	1	-	259-310	2	-
<i>P. indecorum</i> (3) – Caespitosa	164-182	3	0.59	122-142	4	0.63	200	1	0	249-300	4	0.68
<i>P. maritimum</i> (3) – Caespitosa	166-180	3	0.54	122-126	2	0.38	200	1	0	259-301	3	0.53
<i>P. conjugatum</i> – Conjugata	180	1	-	122-126	2	-	200	1	-	239-269	4	-
<i>P. corcovadense</i> (2) – Corcovadensia	168-180	2	0.38	122-126	2	0.38	200	1	0	221-269	4	0.7
<i>P. vaginatum</i> (2) - Disticha	167-180	3	0.59	122-126	2	0.38	200	1	0	249-259	2	0.38
<i>P. lividum</i> (2) – Livida	164-180	3	0.59	122-126	2	0.38	200	1	0	249-269	3	0.56
<i>P. jesuiticum</i> – Livida	162-182	3	-	122-126	2	-	200	1	-	249-257	2	-
<i>P. malacophyllum</i> (4) – Subgenus Anachyris	164-180	3	0.59	122-126	2	0.38	200	1	0	249-259	2	0.35
<i>Paspalum</i> sp Subgenus Anachyris	162-182	3	-	122-126	2	-	200	1	-	249-257	2	-
<i>P. juergensii</i> (2) – Paniculata	164-182	3	0.59	122-126	2	0.38	200	1	0	249-269	3	0.56
<i>P. dilatatum</i> – Dilata	160-180	3	-	122-126	2	-	200	1	-	249-279	3	-
<i>P. pauciciliatum</i> – Dilatata	180	1	-	122-126	2	-	200	1	-	249-279	3	-

NB (number of bands); PIC (polymorphic information content); SN (sample number); WA (Weak amplification); - (not estimated).

Table 3 continuation

Species (SN)/ Botanical group	PA01- F10			PA02-F8			PA01-C8			PA02-C3		
	Size-range (bp)	NB	PIC	Size-range (bp)	NB	PIC	Size-range (bp)	NB	PIC	Size-range (bp)	NB	PIC
<i>P. notatum</i> (61) – Notata	122-126	2	0.13	-	2	0.38	-	5	0.44	240-250	3	0.16
<i>P. pumilum</i> – Notata	200-220	2	-	-	2	-	-	2	-	240-244	2	-
<i>P. subciliatum</i> – Notata	218-220	2	-	-	2	-	-	2	-	240	1	-
<i>P. ovale</i> – Ovalia	220	1	-	-	2	-	WA	-	-	240	1	-
<i>P. cromyhorizon</i> – Notata	220	1	-	-	1	-	-	1	-	242	1	-
<i>P. ionanthum</i> – Notata	220	1	-	-	2	-	-	1	-	222-242	3	-
<i>P. atratum</i> (11) – Plicatula	210-240	4	0.41	-	4	0.49	-	3	0.51	222-370	6	0.73
<i>P. compressifolium</i> (8) – Plicatula	210-220	2	0.32	-	2	0.38	-	4	0.69	238-250	5	0.72
<i>P. glaucescens</i> (6) – Plicatula	194-236	7	0.71	-	2	0.38	-	5	0.72	236-400	6	0.77
<i>P. guenoarum</i> (6) – Plicatula	194-236	4	0.64	-	2	0.37	-	2	0.38	238-250	5	0.73
<i>P. oteroi</i> (2) – Plicatula	194-220	4	0.68	-	2	0.38	-	4	0.67	240-242	2	0.38
<i>P. plicatulum</i> (27) – Plicatula	194-236	4	0.36	-	3	0.46	-	5	0.65	236-400	8	0.74
<i>P. rhodopedum</i> (5) – Plicatula	220	1	0	-	2	0.37	-	5	0.73	238-250	6	0.74
<i>P. rojasii</i> (3) – Plicatula	220	1	0	-	2	0.36	-	2	0.38	238-250	3	0.54
<i>P. limbatum</i> (6) – Plicatula	206-220	2	0.21	-	2	0.38	-	4	0.61	238-242	3	0.49
<i>P. leptum</i> (4) – Plicatula	210-220	2	0.27	-	2	0.37	-	3	0.59	240-250	5	0.72
<i>Paspalum</i> sp. – Plicatula (29)	206-220	2	0.06	-	2	0.37	-	5	0.62	238-370	7	0.69
<i>P. commutatum</i> – Plicatula	220	1	-	-	2	-	-	3	-	238-242	2	-
<i>P. modestum</i> (2) – Plicatula/Modesta	210	1	0	-	2	0.38	-	2	0.38	240-250	3	0.55
<i>P. palustre</i> – Plicatula/Modesta	210	1	-	-	2	-	-	2	-	242	1	-
<i>P. wrightii</i> – Plicatula	220	1	-	-	2	-	-	2	-	238-250	3	-
<i>P. regnellii</i> (4) – Virgata	206-220	2	0.38	-	2	0.38	-	3	0.59	242	1	0
<i>P. conspersum</i> – Virgata	220	1	-	-	2	-	-	3	-	248	1	-
<i>P. exaltatum</i> – Quadrifaria	220	1	-	-	2	-	-	2	-	238-252	2	-
<i>P. indecorum</i> (3) – Caespitosa	188-220	2	0.38	-	3	0.56	-	1	0	236-250	3	0.55
<i>P. maritimum</i> (3) – Caespitosa	204-210	2	0.36	-	3	0.58	-	2	0.35	248	1	0
<i>P. conjugatum</i> – Conjugata	210	1	-	-	1	-	-	1	-	WA	-	-
<i>P. corcovadense</i> (2) – Corcovadensia	210	1	0	-	2	0.38	-	2	0.38	248	1	0
<i>P. vaginatum</i> (2) - Disticha	210-228	2	0.35	-	2	0.38	-	1	0	238-244	2	0.35
<i>P. lividum</i> (2) – Livida	210-222	2	0.38	-	1	0	-	1	0	238-250	3	0.55
<i>P. jesuiticum</i> – Livida	210	1	-	-	2	-	-	1	-	236-238	2	-
<i>P. malacophyllum</i> (4) – Subgenus Anachyris	210	1	0	-	2	0.38	-	2	0.38	240	1	0
<i>Paspalum</i> sp Subgenus Anachyris	210	1	-	-	2	-	-	2	-	240	1	-
<i>P. juergensii</i> (2) – Paniculata	210	1	0	-	2	0.38	-	2	0.38	244	1	0
<i>P. dilatatum</i> – Dilata	198-210	3	-	-	2	-	-	1	-	238-244	2	-
<i>P. pauciciliatum</i> – Dilatata	200-210	2	-	-	2	-	-	1	-	238-244	2	-

NB (number of bands); PIC (polymorphic information content); SN (sample number); WA (Weak amplification); - (not estimated).

Table 3 continuation

Species (SN)/ Botanical group	PA02-B1			PN02-B5B ^b			PA01-C1			PN03-C7		
	Size-range (bp)	NB	PIC	Size-range (bp)	NB	PIC	Size-range (bp)	NB	PIC	Size-range (bp)	NB	PIC
<i>P. notatum</i> (61) – Notata	148-176	7	0.58	178-212	7	0.47	-	3	0.09	157-165	5	0.65
<i>P. pumilum</i> – Notata	142-150	2	-	152-204	4	-	-	1	-	145-165	4	-
<i>P. subciliatum</i> – Notata	152-174	5	-	178-212	2	-	-	1	-	145-165	3	-
<i>P. ovale</i> – Ovalia	130-162	2	-	152-204	3	-	-	1	-	149-165	4	-
<i>P. cromyrorhizon</i> – Notata	148-168	2	-	184-208	3	-	-	1	-	165	1	-
<i>P. ionanthum</i> – Notata	148-168	3	-	184-210	3	-	-	1	-	135-165	3	-
<i>P. atratum</i> (11) – Plicatula	136-174	7	0.68	184-226	7	0.75	-	3	0.26	147-165	7	0.75
<i>P. compressifolium</i> (8) – Plicatula	130-168	6	0.7	184-234	8	0.75	-	1	0	143-169	6	0.76
<i>P. glaucescens</i> (6) – Plicatula	130-172	9	0.85	184-234	9	0.79	-	1	0	133-169	11	0.84
<i>P. guenoarum</i> (6) – Plicatula	148-168	6	0.74	184-220	6	0.75	-	4	0.54	147-169	5	0.73
<i>P. oteroi</i> (2) – Plicatula	148-156	4	0.67	184-220	3	0.59	-	2	0.35	147-157	2	0.38
<i>P. plicatulum</i> (27) – Plicatula	130-168	9	0.71	184-234	10	0.72	-	3	0.31	143-169	11	0.74
<i>P. rhodopedum</i> (5) – Plicatula	146-168	5	0.69	184-220	5	0.73	-	1	0	147-169	6	0.78
<i>P. rojasii</i> (3) – Plicatula	138-168	4	0.67	184-220	5	0.72	-	2	0.3	147-169	5	0.76
<i>P. limbatum</i> (6) – Plicatula	146-168	4	0.6	156-226	8	0.82	-	2	0.21	147-165	4	0.68
<i>P. leptum</i> (4) – Plicatula	146-168	4	0.64	184-234	5	0.74	-	1	0	149-165	6	0.78
<i>Paspalum</i> sp. – Plicatula (29)	146-168	8	0.72	158-226	12	0.82	-	6	0.41	147-169	10	0.79
<i>P. commutatum</i> – Plicatula	148-168	2	-	184-226	6	-	-	3	-	147-161	3	-
<i>P. modestum</i> (2) – Plicatula/Modesta	148-168	7	0.8	184-210	4	0.67	-	1	0	149-177	4	0.67
<i>P. palustre</i> – Plicatula/Modesta	148-168	4	-	184-227	3	-	-	1	-	159-165	2	-
<i>P. wrightii</i> – Plicatula	148-168	2	0.38	184-226	6	0.78	-	1	-	143-165	3	-
<i>P. regnellii</i> (4) – Virgata	148-168	2	-	152-220	5	-	-	1	0	145-165	4	0.65
<i>P. conspersum</i> – Virgata	130-148	2	-	152-226	6	-	-	1	-	147-169	4	-
<i>P. exaltatum</i> – Quadrifaria	130-168	4	0.64	184-220	6	0.78	-	2	-	147-165	4	-
<i>P. indecorum</i> (3) – Caespitosa	144-146	2	0.36	184-208	3	0.59	-	2	0.3	145-167	5	0.74
<i>P. maritimum</i> (3) – Caespitosa	174-178	2	-	184-210	3	-	-	2	0.3	145-165	2	0.38
<i>P. conjugatum</i> – Conjugata	156-202	3	0.55	184-210	5	0.76	-	1	-	146	1	-
<i>P. corcovadense</i> (2) – Corcovadensia	130-168	4	0.67	162-196	4	0.68	-	1	0	157-165	2	0.35
<i>P. vaginatum</i> (2) – Disticha	148-168	4	0.7	184-198	4	0.7	-	1	0	153-165	4	0.67
<i>P. lividum</i> (2) – Livida	130-156	4	-	152-196	5	-	-	1	0	149-177	2	0.38
<i>P. jesuiticum</i> – Livida	148-168	3	0.57	184-198	3	0.59	-	1	-	149-177	4	-
<i>P. malacophyllum</i> (4) – Subgenus Anachyris	146-152	3	-	184-188	2	-	-	1	0	151-165	3	0.56
<i>Paspalum</i> sp Subgenus Anachyris	148-168	3	0.55	152-208	4	0.7	-	1	-	156-165	2	-
<i>P. juergensii</i> (2) – Paniculata	148-168	3	-	184-210	4	-	-	1	0	147-165	2	0.38
<i>P. dilatatum</i> – Dilata	148-172	3	-	152-208	5	-	-	1	-	149-177	4	-
<i>P. pauciciliatum</i> – Dilatata	130-168	4	-	152-208	4	-	-	1	-	155-177	4	-

NB (number of bands); PIC (polymorphic information content); SN (sample number); WA (Weak amplification); - (not estimated).

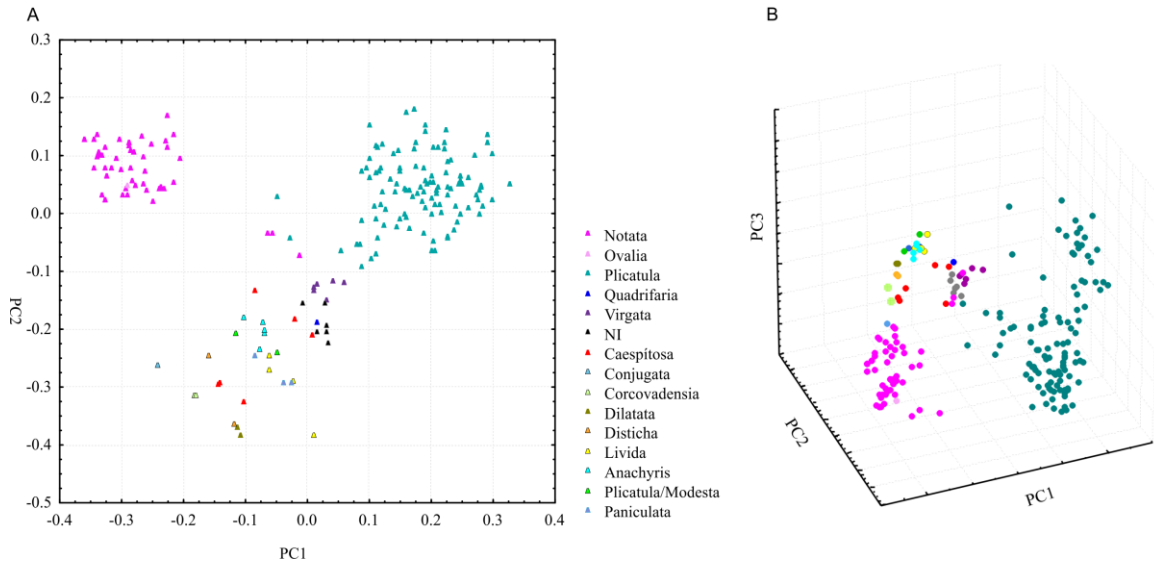


FIG. 1. Principal Coordinate Analysis (goodness of fit 0.86 at $P < 0.001$) of the Dice similarity matrix of 214 accessions of *Paspalum* species based on 187 SSR bands. The three ordination factors together explain 40.21% of the variation in the data matrix. “A” Bi-dimensional and “B” tri-dimensional scatter plot.

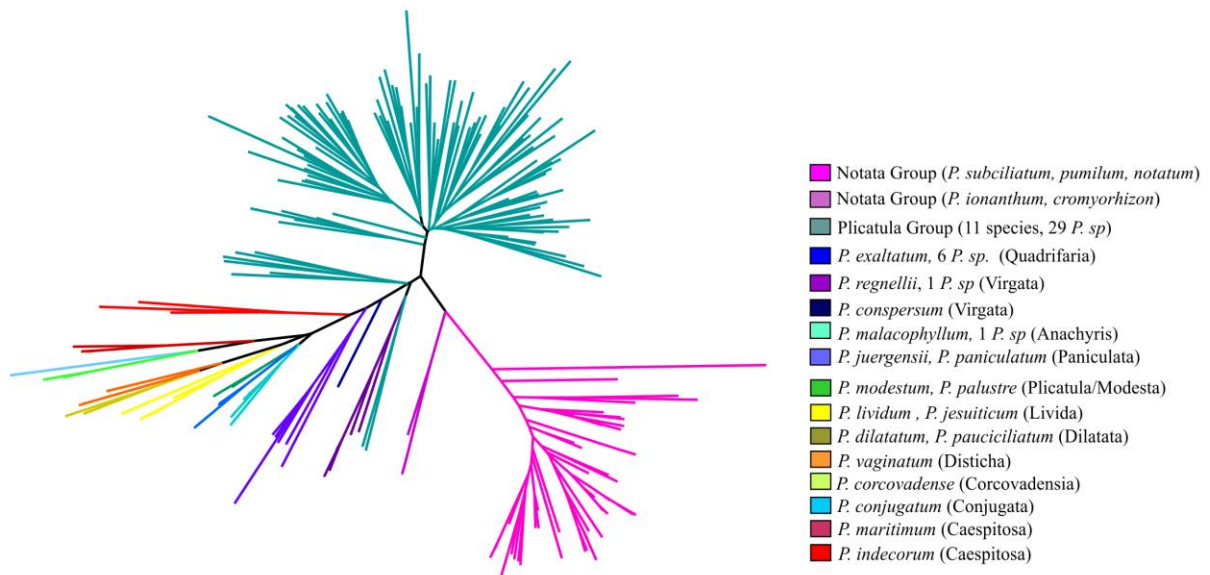


FIG. 2. Unrooted neighbor-joining tree of 214 *Paspalum* accessions.

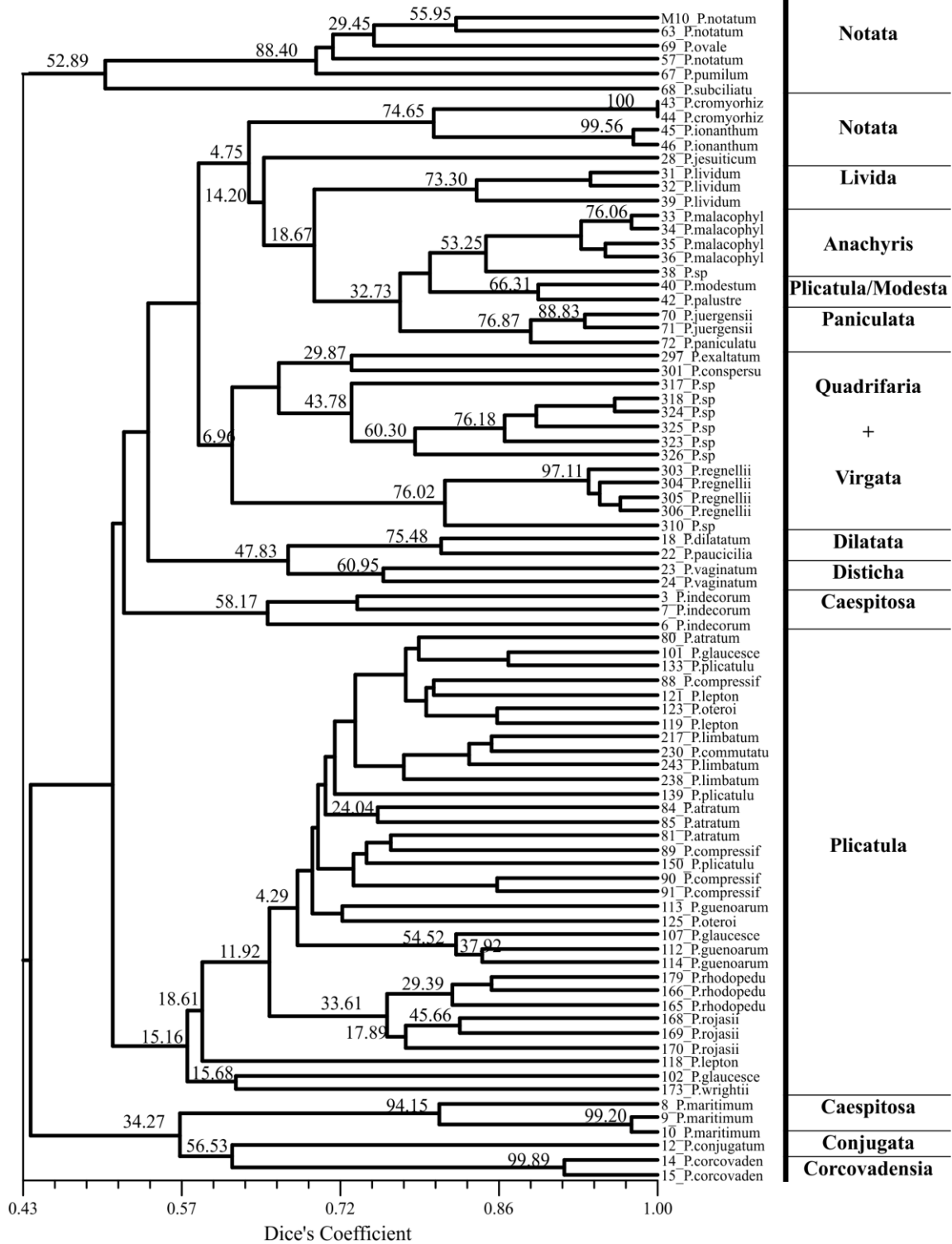


FIG. 4. UPGMA dendrogram based on the Dice similarity coefficient of 83 *Paspalum* accessions

DISCUSSION

SSR markers: cross-species amplification and informative potential

An important observation in our study was that the proportion of the detected polymorphisms decreased with the increasing genetic distance (Table 3). This observation is in agreement with other results obtained in plant (Steinkellner *et al.*, 1997; González-Martínez *et al.*, 2004) and animal research (Primmer *et al.*, 1996).

In the present study, we wished to determine the extent to which microsatellite marker systems can be established for a group of species based on amplification with primer pairs developed for two species of *Paspalum*. *Paspalum notatum* and *P. atratum* marker set revealed polymorphism in most of the other *Paspalum* species analyzed and it is very promising in this respect.

Microsatellite variation was clearly detected in the germplasm studied. The number of alleles varied greatly among the SSR loci evaluated. Considering all loci, a total of 187 microsatellite alleles were amplified. As previously reported by Huang *et al.* (2002), there was some correlation between the number of alleles revealed per locus and the PIC value, which is equivalent to Nei's gene diversity (Nei, 1973). AMOVA (Table 4) analysis showed that the total genetic variation among individuals was 46.83 attributable to among-taxa variation, suggesting that the different species may contain unique alleles or genotypes, and that these data can discriminate between taxa, especially the more distant taxa.

Table 4. Analysis of molecular variance for *Paspalum* accessions based on 187 SSR bands.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	% variation	P values
Among species	35	1296.139	5.66891 Va	46.83	*
Within species	179	1132.833	6.43655 Vb	53.17	*
Total	214	2428.972	12.10545		

*Significant difference at $P < 0.05$.

The reduced number of bands at some loci for the species genetically more distant from the species for which the primers were developed (*Paspalum notatum* and *P. atratum*) may be due to the presence of null alleles, i.e., mutations may have arisen in the region of primer annealing for some alleles. Non-amplifying or null alleles are not very common in the literature concerning plant species, but some examples have been observed (Souza *et al.*, 2005); however, two facts emerge from human studies. First, these alleles are common; and second, where flanking sequences were obtained for non-amplifying alleles, a mutation was found to have occurred in one of the priming sites (Pemberton *et al.*, 1995). Due to the occurrence of null alleles, heterozygotes may be confused with homozygotes. These are usually inferred from significant heterozygote deficits. The occurrence of null alleles that remain undetected in populations can have dramatic effects on the interpretation of genotype frequency distributions and could lead to mistaken interpretations about the level of inbreeding in a population (Pemberton *et al.*, 1995). Therefore, one should take care in using these loci to study populations in species more distant to the Notata and Plicatula group, as they can lead to incorrect estimates. However, in general, all loci were useful in an initial approach to the evaluation of the germplasm of *Paspalum*, especially the species most distant from *P. atratum* and *P. notatum* (target species), which were easily distinguished.

Table 5. Chromosome number, type polyploidy, reproduction mode and genomes found in *Paspalum* species.

SPECIES	CHROMOSOME NUMBER	POLYPLOIDY TYPE	REPRODUCTION MODE	GENOMES
<i>P. indecorum</i>	n=10 (Moraes-Fernandes <i>et al.</i> , 1974) 2n=20 (Quarín, 1977)		Sexual	Partial homology with genomes D e N (Quarín & Burson, 1983)
<i>P. maritimum</i>	2n=40 (Pagliarini <i>et al.</i> , 1999; Adamowski <i>et al.</i> , 2000)	Segmental allotetraploid		
<i>P. conjugatum</i>	n=10; n=20 (Mehra & Chaudhary, 1981) 2n=40 (Honfi <i>et al.</i> , 1990)		Sexual	
<i>P. corcovadense</i>	2n=20 (Pozzobon <i>et al.</i> , 2008) 2n=40 (Pozzobon <i>et al.</i> , 2008)			
<i>P. dilatatum</i>	2n=40 (Burson <i>et al.</i> , 1973) 2n=50 (Burson, 1983) 2n=60 (Burson, 1991a; 1991b) 2n=60 (Burson, 1995) 2n=70 (Soster, 2009)	Allotetraploid Allopentaploid Allohexaploid Allohexaploid	Sexual Apomictic Apomictic Apomictic	IIJJ (Burson <i>et al.</i> , 1973; Burson, 1978) IIJXX (Burson, 1983) IIJXXX (Burson, 1991a; 1991b) IIJXXX2 (Burson, 1995)
<i>P. pauciciliatum</i>	2n=40 (Bashaw & Forbes, 1958)	Allotetraploid	Sexual	
<i>P. vaginatum</i>	2n=20 (Bashaw <i>et al.</i> , 1970) 2n=40 (Hojsgaard <i>et al.</i> , 2009)		Sexual	DD (Burson, 1981a)
<i>P. jesuiticum</i>	2n=30 (Moraes-Fernandes <i>et al.</i> , 1974)			
<i>P. lividum</i>	2n=40 (Gould, 1958, 1968; Burson & Bennett, 1971a)	Autotetraploid or Segmental allotetraploid	Apomictic	
<i>P. malacophyllum</i>	2n=20 (Hojsgaard <i>et al.</i> , 2008, Pozzobon <i>et al.</i> , 2008) 2m=40 (Honfi <i>et al.</i> , 1990; Hojsgaard <i>et al.</i> , 2008)	Autotetraploid	Sexual Apomictic	MMMM (Burson & Hussey, 1998)
<i>P. modestum</i>	2n=20 (Quarín & Hanna, 1980, Honfi <i>et al.</i> , 1990, Pozzobon & Valls, 2003) 2n=40 (Pozzobon & Valls, 2003)		Sexual self-incompatible	PP (Quarín, 1983)
<i>P. palustre</i>	2n=20 (Quarín & Burson, 1991; Martínez & Quarín, 1999) 2n=40 (Pozzobon & Valls, 2003)		Sexual self-incompatible	
<i>P. juergensii</i>	2n=20 (Buson & Bennett, 1971b)		Sexual	JJ (Burson, 1978, 1981a)
<i>P. paniculatum</i>	n=10 (Moraes-Fernandes <i>et al.</i> , 1974) 2n=20 (Quarín, 1977, Pozzobon <i>et al.</i> , 2008)		Sexual	JJ

Table 5 continuation

<i>P. notatum</i>	2n=20 (Burton, 1948) 2n=40 (Burton, 1955)	Autotetraploid	Sexual self-incompatible Apomictic	NN (Burson, 1981b)
<i>P. pumilum</i>	2n=20 (Burson & Bennett, 1971a)		Sexual	NN modified (Quarín & Burson, 1983)
<i>P. subciliatum</i>	2n=40 (Pagliarini <i>et al.</i> , 1999)	Allotetraploid		
<i>P. cromyorrhizon</i>	2n=20 (Quarín <i>et al.</i> , 1982, 1984) 2n=40 (Quarín <i>et al.</i> , 1982, 1984, Honfi <i>et al.</i> , 1990, Burson & Bennett, 1971a)	Autotetraploid or segmental allotetraploid	Sexual self-incompatible Apomictic	NN modified (Quarín <i>et al.</i> , 1984)
<i>P. ionanthum</i>	n=20 (Moraes-Fernandes <i>et al.</i> , 1974 - <i>P. guaraniticum</i>) 2n=40 (Quarín, 1977 - <i>P. guaraniticum</i> , Quarín & Norrmann, 1987) 2n=80 (Burson & Bennett, 1970; Pozzobon <i>et al.</i> , 2008)	Allotetraploid	Sexual self-incompatible	
<i>P. ovale</i>	2n=80 (Hojsgaard <i>et al.</i> , 2008)	Alloctaploid		
<i>P. atratum</i>	2n=20 (Sede <i>et al.</i> , 2010 - Paraguai) 2n=40 (Quarín <i>et al.</i> , 1997, Takayama <i>et al.</i> , 1998)	Autotetraploid or segmental allotetraploid	Sexual Apomictic	
<i>P. compressifolium</i>	2n=20 (Quarín <i>et al.</i> , 1996) 2n=40 (Honfi <i>et al.</i> , 1990, Quarín <i>et al.</i> , 1996, Takayama <i>et al.</i> , 1998) 2n=60 (Pozzobon & Valls., 2000, Rodrigues <i>et al.</i> , 2001)	Autotetraploid Allohexaploid	Sexual Apomictic Apomictic	
<i>P. glaucescens</i>	2n=20 (Moraes-Fernandes <i>et al.</i> , 1974, Takayama <i>et al.</i> , 1998, 2n=40 (Pozzobon & Valls, 2000, Rodrigues <i>et al.</i> , 2001)	auto and allotetraploid segmental	Sexual self-incompatible and compatible apomictic	
<i>P. guenoarum</i>	2n=40 (Moraes-Fernandes <i>et al.</i> , 1974, Pozzobon & Valls, 1987, Honfi <i>et al.</i> , 1990, Takayama <i>et al.</i> , 1998, Pozzobon & Valls, ,2000)	autotetraploid or segmental allotetraploid	apomictic	XXX1X1
<i>P. oteroi</i>	2n=40 (Pozzobon & Valls., 2000)			
<i>P. plicatum</i>	2n=20 (Moraes-Fernandes <i>et al.</i> , 1974, Pozzobon & Valls, 1987) 2n=40 (Honfi <i>et al.</i> , 1990, Takaayama <i>et al.</i> , 1998, Pagliarini <i>et al.</i> , 1999) 2n=60 (Pozzobon & Valls, 2000; Rodrigues <i>et al.</i> , 2001)		sexual self-incompatible apomictic	

Table 5 continuation

<i>P. rhodopedum</i>	2n=40 como <i>P. sp</i> (Plicatula group) - (Pozzobon & Valls, 2000, Takayama <i>et al.</i> , 1998, Pagliarini <i>et al.</i> , 1999)		
<i>P. rojasii</i>	2n=20 (Moraes-Fernandet <i>et al.</i> , 1974) 2n=40 (Moraes-Fernandet <i>et al.</i> , 1974, Rodrigues <i>et al.</i> , 2001)		Sexual
<i>P. wrightii</i>	2n=20 (Honfi <i>et al.</i> , 1990, Pozzobon & Valls, 1987, Takayama <i>et al.</i> , 1998) 2n=30 (Martínez & Quarín, 1999; Pozzobon & Valls, 2003) 2n=40 (Pozzobon & Valls, 2003)		Sexual self-incompatible and compatible
<i>P. limbatum</i>	2n=20 (Bolivia - Norrmann <i>et al.</i> , 1994b) 2n=40 como <i>P. sp.</i> (Plicatula group) (Takayama <i>et al.</i> , 1998, Pozzobon & Valls., 2000) 2n=80 (Norrmann <i>et al.</i> , 1994)		apomictic Sexual self-incompatible
<i>P. commutatum</i>	2n=18 (EUA – Burton, 1942)		sexual
<i>P. lepton</i>	n=10 - Argentina 2n=40 (Moraes-Fernandes <i>et al.</i> , 1974, Pozzobon & Valls, 2000, Rodrigues <i>et al.</i> , 2001)		apomictic
<i>P. exaltatum</i>	2n=20 (Giussani <i>et al.</i> , 2009) 2n=30 and 40 (Giussani <i>et al.</i> , 2009)	Allopolyploid	Sexual apomictic
<i>P. conspersum</i>	2n=40 (Burson and Quarin, 1982)		IIJ2J2
<i>P. regnellii</i>	2n=40 (Honfi <i>et al.</i> , 1990)		sexual autogamous

Clusters

The taxonomy of *Paspalum* has been object of considerable debate. Traditionally, the taxonomical classification of subgenera and informal groups of *Paspalum* species has been fundamented upon morphological similarities, and evolutionary relationships among them remain unclear. For didactic purposes, the species studied in this work were classificated into informal groups or subgenera of *Paspalum* according to Zuloaga & Morrone (2005).

However, the study of *Paspalum* species based exclusively upon morphological similarities is extremely difficult as result of the complex evolutionary history of this genus. The complexity derives from several factors, often concomitant. These include extensive hybridization, both ancient and recent; absence of clear differences between many species (Oliveira, 2004); and polyploidy and apomixis (Quarín, 1992). Based on inbreeding studies a variety of genome types have been suggested for species of *Paspalum*, revealing the complexity of its evolution. The genomic formula (when available), chromosome number, type of polyploidy and reproduction mode found for species of *Paspalum* addressed in this study are presented in Table 5.

In the proceeding discussion following, it is not our intention to elucidate the origins and relationships of the various *Paspalum* species. Our aim is to investigate the usefulness of SSRs as a tool for the identification of genetic diversity and the global similarity among members of the species complex. Hence, a phenetic approach which looks at genetic similarities between individuals will be adopted.

Notata Group

The Notata group as a whole is represented by approximately 21 species (Zuloaga *et al.*, 2004), characterised by membranous ligules, lanceolate to filiform leaves, and inflorescences with usually two conjugated racemes bearing solitary, glabrous or pilose spikelets on short pedicels (Zuloaga *et al.*, 2004). In this study, the species of this group (subgenus *Paspalum*) are represented by only five taxa (*P. pumilum*, *P. notatum*, *P. subciliatum*, *P. cromyrorhizon* and *P. ionanthum*). All species were clearly distinguishable at the molecular level. *P. pumilum*, a sexual autogamous diploid species, showed less genetic divergence from *P. notatum* compared to other species of the group. *P. subciliatum* was intermediate. *P. cromyrorhizon* and *P. ionanthum* were grouped on the other side, somewhat more distant from the other group members (Fig. 1, 2, 3 and 4). Phylogenetic studies based on ITS (internal transcribed sequences) and cpDNA (chloroplast DNA) support the close genetic relationship of *P. pumilum*, *P. notatum*, *P. subciliatum* (Souza-Chies *et al.*, 2006; Essi & Souza-Chies, 2007; Rua *et al.*, 2010), which form a monophyletic group. While the placement of *P. cromyrorhizon* and *P. ionanthum* in the group remains uncertain, inferences provided by cpDNA sequences (Rua *et al.*, 2010) support the close relationship of these species.

Paspalum ovale grouped very close to *P. notatum* and *P. pumilum*. This species was considered by Chase, 1939 (unpublished manuscript) in the Linearia (currently Notata), and it currently belongs to Ovalia (Zuloaga & Morrone, 2005). The species under discussion has 80 chromosomes (octoploid) with evidences of allopolyploidy (Hojsgaard *et al.*, 2009). Some species of the Notata group may have contributed to the genomic composition of *P. ovale*; however, there are not yet sufficient experimental evidences to corroborate this

hypothesis.

Plicatula Group

The Plicatula group includes species characterised by a sharply plano-convex spikelet and a dark brown, shiny upper floret (Chase, 1929; Oliveira, 2004). The species of this group are easily distinguished by morphological features of the spikelet, but the delimitation of its taxa is complicated by the wide variability of vegetative and reproductive traits. In our study, Plicatula group showed high variability within their species, but there wasn't a clear separation between different species (Figs. 1, 2, 3 and 4).

The complexity of Plicatula is described by Oliveira (2004) in her taxonomic review of this group. Many species, including *P. atratum*, *P. plicatulum* Michx., *P. compressifolium* Swallen, and *P. limbatum* Henrard, are morphologically polymorphic. The author suggests that the current circumscription adopted for the separation of some species of Plicatula may include different "species". Moreover, the pattern of speciation of the group is reticulated, and there is no well-defined morphological boundary between taxa. Although the species of this group have not been separated clearly, the Plicatula group in general showed up consistent in our analysis, with few exceptions.

Polyploidy and hybridization are strategies involved in the evolution of the species of the Plicatula group, as in most species of *Paspalum*, and should be taken into account in the definition of species in the group. Oliveira (2004) considered "good" species of Plicatula those with populations with different co-specific cytotypes, with at least a basic polyploid series: $2n = 20$ and 40 .

From a molecular standpoint, few species belonging to the Plicatula group were evaluated. Jarret *et al.* (1998) used RFLP markers (Restriction Fragment Length

Polymorphism) to study the genetic diversity of different species of *Paspalum*, and all four species of Plicatula evaluated in this study grouped together. Based on plastid DNA sequences and morphological traits, Rua *et al.* (2010) suggest a close genetic relationship between *P. compressifolium* and *P. lenticulare* Kunth, placing these species into a sister group of *P. wrightii* Hitchc. & Chase, *P. palustre* Mez and *P. modestum* Mez, the latter being most closely related. Based on morphological data, these latter species were considered by Barreto (1974) as part of the Modesta group. Currently, they are included within Plicatula (Zuloaga & Morrone, 2005). Studies by Rua *et al.* (2010) support a monophyletic group containing *P. wrightii*, *P. modestum*, and *P. palustre* nested within it. In our results, *P. palustre* and *P. modestum* constituted a group while *P. wrightii* is associated with the other species of Plicatula.

Thus, the species of the Plicatula group of *Paspalum* deserve further re-evaluation, perhaps with the aid of morphological and other molecular tools, including chloroplast markers.

Other groups

Due to the small number of species representing some groups of *Paspalum* in this study, few conclusions can be drawn about them. Some molecular phylogenetic studies (*e.g.* Rua *et al.*, 2010) suggest a greater genetic distance of these other groups from the Plicatula and Notata, which explains the lower frequency of polymorphism of microsatellites observed for those species.

Phylogenetic studies based on cpDNA sequences and morphological data support the monophyly of subgenus Anachyris (Rua *et al.*, 2010) and a close genetic relationship

with *P. falcatum* Nees ex Steud. (Falcata), *P. paucifolium* Swallen (Eriantha), *P. humboldtianum* Flügge (Subgenus *Ceresia*), *P. quarinii* Morrone & Zuloaga (Quadrifaria), *P. juergensii* Hack. and *P. paniculatum* L. (Paniculata). In our results, this subgenus is represented by four accessions of *P. malacophyllum* Trin. and accessions of *P. sp* (Anachyris), which formed a group based on the results obtained with cluster analysis (Figs. 2, 3, and 4). Moreover, the genetic similarity between *P. malacophyllum* and the species of Paniculata group (*P. juergensii* and *P. paniculatum*) was highlighted by our study.

The Virgata and Dilatata groups represent species complexes that have been extensively studied and shown to be entirely composed by allopolyploid species based on cytogenetic evidence (Burson *et al.*, 1973; Burson 1978, 1979, 1983, 1991a, b, 1995; Burson and Bennett, 1976; Burson and Quarín, 1982; Caponio and Quarín, 1990; Honfi *et al.*, 1990; Quarín and Caponio, 1995). *P. conspersum* Schrad. ex Schult., *P. dilatatum* and *P. pauciciliatum* (Parodi) Herter present the genomic formulae III₂J₂, IIJX and IIJ, respectively (Table 5). The donor species of the respective genomes are *P. intermedium* Munro ex Morong and *P. juergensii* belonging to Quadrifaria and Paniculata, respectively.

P. conspersum (Virgata) and *P. exaltatum* J.Presl & C.Presl (Quadrifaria) clustered in the UPGMA dendrogram (Fig. 4) and were close to *P. regnellii* Mez ex Ekman (Virgata). The genetic proximity of these species was confirmed by phylogenetic studies (Giussani *et al.*, 2009; Rua *et al.*, 2010). Giussani *et al.* (2009) focused on the study of the Quadrifaria and Virgata groups and the authors noted that the Virgata group is considered monophyletic and that some species, such as *P. exaltatum*, should be included within it. Moreover, *P. regnellii* should be excluded from the Virgata and included in Macrophylla

group.

The two species of the Dilatata group analyzed in this study are well supported in the dendrogram. However, these species were not together to the Quadrifaria and Paniculata groups (donor genomes IIJJ of the Dilatata group).

Paspalum conjugatum Bergius and *P. corcovadense* Raddi were grouped on the basis of the UPGMA dendrogram (Fig. 4). Such species probably represent the phylogenetically more distant species (Rua *et al.*, 2010) compared to other species studied in this work. *P. maritimum* Trin. (Caespitosa) is considered allopolyploid with predominantly bivalent chromosome pairing (Adamowski *et al.*, 2000), and it clustered close to *P. conjugatum* and *P. corcovadense*.

In summary, the molecular genetic approach proved to be useful in this study for the distinction of different taxa, with the exception of those belonging to Plicatula group, a rather complex one. For this particular case, the use of molecular markers specifically developed from its component species is probably necessary. The use of molecular genetic approach, employing microsatellite markers in an initial assessment of the germplasm, should help in species identification and in evaluating the possibilities of successful species hybridization. However, the use of microsatellites in population studies of different *Paspalum* species should be undertaken with caution due to the possible presence of null alleles.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support (Project No. 05/51010) and a graduate fellowship (2006/61242-8) to F.

W. Cidade and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and a research fellowship to A. P. Souza.

LITERATURE CITED

Adamowski EV, Pagliarini MS, Batista LAR. 2000. Chromosome number and microsporogenesis in *Paspalum maritimum* (caespitosa group; gramineae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **43**: 301-305.

Adamowski EV, Pagliarini MS, Bonato ABM, Batista LAR, Valls JFM. 2005. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. *Genetics and Molecular Biology* **28**: 773-780.

Barreto IL. 1974. O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul. *PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.*

Bashaw EC, Forbes Jr I. 1958. Chromosome numbers and microsporogenesis in Dallisgrass *Paspalum dilatatum* Poir. *Agronomy Journal* **50**: 441-445.

Bashaw EC, Hovin AW, Hold EC. 1970. Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: MJT Norman, ed. *Proceedings of the XI International Grassland Congress*. St. Lucia: University of Queensland Press, 245-248.

Burson BL. 1978. Genome relations between *Paspalum conspersum* and two diploid *Paspalum* species. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **20**: 365-372.

Burson BL. 1979. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* × *P. intermedium* and *P. dilatatum* × *P. paniculatum* Hybrids¹. *Crop Science* **19**: 534-538.

Burson BL. 1981a. Cytogenetic relationships between *Paspalum jurgensii* and *P. intermedium*, *P. vaginatum*, and *P. setaceum* var. *ciliatifolium*. *Crop Science* **21**: 515-519.

Burson BL. 1981b. Genome relations among four diploid *Paspalum* species. *Botanical Gazette* **142**: 592 - 596.

Burson BL. 1983. Phylogenetic investigations of *Paspalum dilatatum* and related species. In: JA Smith, VW Hays, eds. *Proceedings of the 14 th International Grassland Congress*. Boulder: Westview Press, 170-173.

Burson BL. 1991a. Homology of chromosomes of the X genomes in common and Uruguayan dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. *Genome* **34**: 950-953.

- Burson BL. 1991b.** Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. *Botanical Gazette* **152**: 219-223.
- Burson BL. 1995.** Genome relationship and reproductive behavior of intraspecific *Paspalum dilatatum* Hybrids: Yellow-Anthered x Uruguaiana. *International Journal of Plant Sciences* **156**: 326 - 331.
- Burson BL, Bennett HW. 1970.** Cytology and reproduction of three *Paspalum* species. *Journal of Heredity* **61**: 129-132.
- Burson BL, Bennett HW. 1971a.** Chromosome numbers, microsporogenesis, and mode of reproduction of seven *Paspalum* species. *Crop Science* **11**: 292-294.
- Burson BL, Bennett HW. 1971b.** Meiotic and reproductive behavior of some introduced *Paspalum* species. *Journal of the Mississippi Academy of Science* **17**: 5-8.
- Burson BL, Lee H, Bennett HW. 1973.** Genome relations between tetraploid *Paspalum dilatatum* and four diploid *Paspalum* species. *Crop Science* **13**: 739-743.
- Burson BL, Bennett HW. 1976.** Cytogenetics of *Paspalum conspersum* and its genomic relationship with yellow-anthered *P. dilatatum* and *P. malacophyllum*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **18**: 701-708.
- Burson BL, Quarín CL. 1982.** Cytology of *Paspalum virgatum* and its relationship with *P. intermedium* and *P. jurgensii*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **24**: 219-226.
- Burson BL, Hussey MA. 1998.** Cytology of *Paspalum malacophyllum* and its relationship to *P. juergensii* and *P. dilatatum*. *International Journal of Plant Sciences* **159**: 153 - 159.
- Burton GW. 1940.** A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. *Journal of Agricultural Research* **60**: 193-197.
- Burton GW. 1942.** A cytological study of some species in the tribe Paniceae. *American Journal of Botany* **29**: 355-360.
- Burton GW. 1948.** The method of reproduction in Common Bahia Grass, *Paspalum notatum*. *Journal of the American Society of Agronomy* **40**: 443-452.
- Burton GW. 1955.** Breeding Pensacola bahiagrass, *Paspalum notatum*: I. Method of reproduction. *Agronomy Journal* **47**: 311-314.
- Byrne M, Marquez-Garcia MI, Uren T, Smith DS, Moran GF. 1996.** Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *Australian Journal of Botany* **44**: 331-341.
- Canto-Dorow TS, Longhi-Wagner HM, Valls, JFM. 1996.** Revisão taxonômica das

espécies de *Paspalum* grupo Notata (Poaceae-Paniceae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia* **47**: 3-44.

Caponio I, Quarín CL. 1990. Intra-and interspecific hybridization between dallisgrass and vaseygrass. *Crop science* **30**: 362-364.

Chase A. 1929. The North American species of *Paspalum*. *Contributions from the United States National Herbarium* **28**: 1-310.

Chase A. 1939. Unpublished manuscript. *Paspalum* of South America. Washington D. C.: Hitchcock and Chase Library, Botany Department, Smithsonian Institution.

Cidade FW, Dall’Agnol M, Bered F, Souza-Chies TT. 2008. Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flügge (Paniceae: Panicoideae). *Genetic Resources and Crop Evolution* **55**: 235-246.

Cidade FW, Souza-Chies TT, Batista LAR, Dall’agnol M, Zucchi MI, Jungmann L, Souza AP. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Paspalum notatum* Flügge (Poaceae). *Conservation Genetics* **10**: 1977-1980.

Cidade FW, Souza-Chies TT, Souza FHD, Batista LAR, Dall’Agnol M, Valls JFM, Zucchi MI, Souza a P. 2010. Microsatellite loci for *Paspalum atratum* (Poaceae) and cross-amplification in other species. *American Journal of Botany* **97**: e107-e110. doi:10.3732/ajb.1000207.

Clayton WD, Renvoize SA. 1986. *Genera graminum: grasses of the world*. London: Her Majesty’s Stationery Office.

Coelho ASG. 2001. BOOD-Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap, Versão 3.0.

Cordeiro GM, Pan Y, Henry RJ. 2003. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Science* **165**: 181-189.

Creste S, Neto AT, Figueira A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**: 299–306.

Dahmer N, Schifino-Wittmann MT, Dall’Agnol M, Castro B. 2008. Cytogenetic data for *Paspalum notatum* Flügge accessions. *Scientia Agricola* **65**: 381–388.

Denham SS, Zuloaga FO, Morrone O. 2002. Systematic Revision and phylogeny of *Paspalum* subgenus *Ceresia* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **89**: 337 - 399.

Denham SS. 2005. Revisión sistemática del subgénero *Harpostachys* de *Paspalum*

- (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **92**: 463 - 532.
- Dice LR. 1945.** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26**: 297-302.
- Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana J, Poizat C, Zanetto A, Arús P, Laigret F. 2002.** Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **105**: 127-138.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 1991.** “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* **19**: 4008.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin* **19**: 11-15.
- Espinoza F, Daurelio LD, Pessino SC, Valle EM, Quarín CL. 2006.** Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant Systematics and Evolution* **258**: 147-159.
- Essi L, Souza-Chies TT. 2007.** Phylogeny of Linearia and Notata groups of *Paspalum* L. (Poaceae, Panicoideae, Paniceae) and related species. *Genetic Resources and Crop Evolution* **54**: 779-791.
- Evers GW, Burson BL. 2004.** Dallisgrass and other *Paspalum* species. In: L Moser, BL Burson, LE Sollenberger, eds. *Warm-Season (C4) Grasses, Agronomy Monographs 45*. Madison, 681-713.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005.** Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics* **1**: 47-50.
- Gates RN, Quarín CL, Pedreira CGS. 2004.** Bahiagrass. In: L Moser, BL Burson, LE Sollenberger, eds. *Warm-Season (C4) Grasses, Agronomy Monographs 45*. Madison, 651-680.
- Giussani LM, Zuloaga F. O., Quarín CL, Cota-Sánchez JH, Ubayasena K, Morrone O. 2009.** Phylogenetic relationships in the genus *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae): an assessment of the Quadrifaria and Virgata informal groups. *Systematic Botany* **34**: 32-43.
- González-Martínez SC, Robledo-Arnuncio JJ, Collada C, Díaz A, Williams CG, Alía R, Cervera MT. 2004.** Cross-amplification and sequence variation of microsatellite loci in Eurasian hard pines. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 103-11.
- Gould FW. 1958.** Chromosome numbers in southwestern grasses. *American Journal of Botany* **45**: 757-767.

Gould FW. 1968. Chromosome numbers of Texas grasses. *Canadian Journal of Botany* **46**: 1315-1325.

Hempel K, Peakall R. 2003. Cross-species amplification from crop soybean *Glycine max* provides informative microsatellite markers for the study of inbreeding wild relatives. *Genome* **46**: 382-93.

Hojsgaard D, Honfi AI, Rua G, Daviña J. 2009. Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from subtropical South America (Poaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* **56**: 533-545.

Hojsgaard D, Schegg E, Valls JFM., Martínez E, Quarín CL. 2008. Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris* (Poaceae). *Flora* **203**: 535-547.

Honfi AI, Quarín CL, Valls JFM. 1990. Karyological studies in South American grasses. *Darwiniana* **30**: 87-94.

Huang Q, Börner A, Röder S, Ganai W. 2002. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* **105**: 699-707.

Jarret RL, Liu ZW, Webster RW. 1998. Genetic diversity among *Paspalum* spp. as determined by RFLPs. *Euphytica* **104**: 119-125.

Judziewicz EJ. 1990. Family 187. Poaceae (Gramineae). *Flora of the Guianas. Series A: Phanerogams.* (A.R.A., Görts-van Rijn, ed.). Königstein: Koltz Scientific Books, 1-727.

Koopman WJM, Wissemann V, De Cock K, Van Huylenbroeck J, De Riek J, Sabatino GJH, Visser D, Vosman B, Ritz CM, Maes B, Werlemark G, Nybom H, Debener T, Linde M, Smulders MJM. 2008. AFLP markers as a tool to reconstruct complex relationships: A case study in *Rosa* (Rosaceae). *American Journal of Botany* **95**: 353-366.

Kyndt T, Romeijn-Peeters El., Van Droogenbroeck B, Romero-Motochi JP, Gheysen G, Goetghebeur P. 2005. Species relationships in the genus *Vasconcellea* (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence. *American Journal of botany* **92**: 1033-1044.

Kyndt T, Droogenbroeck BV. 2006. Cross-species microsatellite amplification in *Vasconcellea* and related genera and their use in germplasm classification. *Genome* **49**: 786-798.

Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research* **27**: 209-220.

- Martínez EJ, Quarín CL. 1999.** Citoembriología y comportamiento reproductivo de un citotipo diploide de *Paspalum hydrophilum* y sus híbridos con *P. palustre* (Poaceae, Paniceae). *Darwiniana* **37**: 223-228.
- Mehra PN, Chaudhary JD. 1981.** Male meiosis in some grasses of the tribe Paniceae from North Eastern India. I. Genus *Paspalum*. *Cytologia* **46**: 265-278.
- Moraes-Fernandes MIB, Barreto IL, Salzano FM, Sacchet AMOF. 1974.** Cytological and evolutionary relationships in Brazilian forms of *Paspalum* (Gramineae). *Caryologia* **27** (4): 455-464.
- Morrone O, Carbonó E. 1995.** Revision del Grupo Racemosa del genero *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **82**: 82-116.
- Morrone O, Vega A, Zuloaga FO. 1996.** Revisión de las especies del género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae), grupo Dissecta (s. str.). *Candollea* **51**: 103-138.
- Morrone O, Denham SS, Aliscioni SS, Zuloaga FO. 2000.** Revisión de las especies de *Paspalum* (Panicoideae: Paniceae), subgénero Anachyris. *Candollea* **55**: 105-135.
- Morrone O, Denham SS, Zuloaga FO. 2004.** Revisión taxonómica del género *Paspalum* grupo Eriantha (Poaceae, Panicoideae, Paniceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **91**: 225-246.
- Nei M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 3321-3.
- Norrmann GA, Quarín CL, Burson BL. 1989.** Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Journal of Heredity* **80**: 24-28.
- Norrmann GA, Bovo OA, Quarín CL. 1994a.** Post-zygotic seed abortion in sexual diploid × apomictic tetraploid intraspecific *Paspalum* crosses. *Australian Journal of Botany* **42**: 449.
- Norrmann GA, Quarín CL, Killeen TJ. 1994b.** Chromosome numbers in Bolivian grasses (Gramineae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **81**: 768.
- Oliveira RC, Valls J. F. M. 2002.** Taxonomia de *Paspalum* L., grupo Linearia (Gramineae-Paniceae) do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **25**: 371-389.
- Oliveira RC. 2004.** O género *Paspalum* L., grupo Plicatula (Poaceae: Paniceae), no Brasil. PhD Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Brazil.
- Pagliarini MS, Takayama SY, Freitas PM, Carraro LR, Adamowski EV, Silva N, Batista LAR. 1999.** Failure of cytokinesis and 2n gamete formation in Brazilian accessions of *Paspalum*. *Euphytica* **108**: 129-135.

- Pagliarini MS, Carraro LR, Freitas PM, Adamowski EV, Batista LAR, Valls JFM. 2001.** Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. *Hereditas* **135**: 27-34.
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A. 1998.** Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution* **15**: 1275-87.
- Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barrett JA. 1995.** Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology* **4**: 249-252.
- Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. 2006.** DARwin software. Available via DIALOG <http://darwin.cirad.fr/darwin/Home.php>.
- Poncet V, Hamon P, Minier J, Carasco C, Hamon S, Noirot M. 2004.** SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). *Genome* **47**: 1071-81.
- Pozzobon MT, Machado ACC, Vaio M, Valls JFM, Peñaloza APS, Santos S, Côrtes AL, Rua GH. 2008.** Cytogenetic analyses in *Paspalum* L. reveal new diploid species and accessions. *Ciência Rural* **38**: 1292-1299.
- Pozzobon MT, Valls JFM. 1987.** Caracterização citogenética em acessos de germoplasma de espécies brasileiras de *Paspalum* (Gramineae). In: *Encontro Internacional sobre melhoramento genético de Paspalum*. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia. 73-78.
- Pozzobon MT, Valls JFM. 2000.** Cytoecography and variation of stomatal size of *Paspalum glaucescens* (Gramineae; Paniceae) in Southern Brazil. *Euphytica* **116**: 251-256.
- Pozzobon MT, Valls JFM. 2003.** Chromosome number in Brazilian germplasm accessions of *Paspalum hydrophilum*, *P. modestum* and *P. palustre* (Gramineae; Paniceae). *Genetics and Molecular Biology* **26**: 365-366.
- Primmer CR, Møller AP, Ellegren H. 1996.** A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* **5**: 365-378.
- Quarín CL. 1977.** Recuentos cromosómicos en gramíneas de Argentina Subtropical. *Hickenia* **1**: 73-78.
- Quarín CL. 1983.** Híbridos interespecíficos de *Paspalum notatum* x *P. modestum*. *Bonplandia* **V**: 235-242.
- Quarín CL. 1992.** The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* **5**: 8-15

Quarín CL, Hanna WW. 1980. Chromosome behavior, embryo sac development, and fertility of *Paspalum modestum*, *P. boscianum*, and *P. conspersum*. *Journal of Heredity* **71**: 419-422.

Quarín CL, Hanna WW, Fernández A. 1982. Genetic studies in diploid and tetraploid *Paspalum* species. *Journal of Heredity* **72**: 254-256.

Quarín CL, Burson BL. 1983. Cytogenetic relations among *Paspalum notatum* var. *saurae*, *P. pumilum*, *P. indecorum*, and *P. vaginatum*. *Botanical Gazette* **144**: 433 - 438.

Quarín CL, Burson BL, Burton GW. 1984. Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. *Botanical Gazette* **145**: 420-426.

Quarín CL, Norrmann GA. 1987. Cytology and reproductive behavior of *Paspalum equitans*, *P. ionanthum*, and their hybrids with diploid and tetraploid cytotypes of *P. cromyorrhizon*. *Botanical Gazette* **148**: 386 - 391.

Quarín CL, Norrmann GA, Urbani MH. 1989. Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. *Apomixis Newsletter* **2**: 44-46.

Quarín CL, Norrmann GA. 1990. Interspecific hybrids between five *Paspalum* species. *Botanical Gazette* **151**: 366 - 369.

Quarín CL, Burson BL. 1991. Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. *Cytologia* **56**: 223-228.

Quarín CL, Caponio I. 1995. Cytogenetics and reproduction of *Paspalum dasypleurum* and its hybrids with *P. urvillei* and *P. dilatatum* ssp. *flavescens*. *International Journal of Plant Sciences* **156**: 232 - 235.

Quarín CL, Pozzobon MT, Valls JFM. 1996. Cytology and reproductive behavior of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: *Paspalum compressifolium*. *Euphytica* **90**: 345-349.

Quarín CL, Valls JFM, Urbani MH. 1997. Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. *Tropical Grasslands* **31**: 114-116.

Quarín CL, Espinoza F, Martínez EJ, Pessino SC, Bovo OA. 2001. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction* **13**: 243-249.

Rambaut A. 2009. FigTree, ver. 1.3.1.

Roa AC, Chavarriaga-Aguirre P, Duque MC, Maya MM, Bonierbale MW, Iglesias C,

- Tohme J. 2000.** Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*)(Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. *American Journal of Botany* **87**: 1647-1655.
- Rodrigues LG, Santos S, Oliveira RC, Peñaloza APS. 2001.** Contagens cromossômicas em espécies brasileiras de *Paspalum* (Gramineae). *Anais do III Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe*. Londrina, 395–397.
- Rohlf FJ. 2000.** NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. *New York: Exeter Software*.
- Rua GH, Aliscioni SS. 2002.** A morphology-based cladistic analysis of *Paspalum* sect. *Pectinata* (Poaceae). *Systematic Botany* **27**: 489 - 501.
- Rua GH, Speranza PR, Vaio M, Arakaki M. 2010.** A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. *Plant Systematics and Evolution* **288**: 227-243.
- Rua GH. 2006.** Estudos filogenéticos em Paniceae: os casos de *Paspalum* e *Digitaria*. J.E.A. Mariath & R.P. Santos eds. *Anais do 57º Congresso Nacional de Botânica. Os Avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética*. Porto Alegre: Sociedade Botânica do Brasil, 170-173.
- Sede S, Escobar A, Morrone O, Zuloaga FO. 2010.** Chromosome Studies in American Paniceae (Poaceae, Panicoideae) 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **97**: 128-138.
- Sneath PHA, Sokal RR. 1973.** *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. San Francisco: Freeman.
- Soster, MTB. 2009.** Caracterização morfológica e citogenética de acessos de *Paspalum* coletados no sul do Brasil. PhD Thesis, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil.
- Sousa SN, Finkeldey R, Gailing O. 2005.** Experimental verification of microsatellite null alleles in Norway Spruce (*Picea abies* [L.] Karst.): implications for population genetic studies. *Plant Molecular Biology* **23**: 113-119.
- Souza-Chies TT, Essi L, Rua GH, Valls JFM, Miz RB. 2006.** A preliminary approach to the phylogeny of the genus *Paspalum* (Poaceae). *Genetica* **126**: 15-32.
- Speranza P, Malosetti M. 2007.** Nuclear and cytoplasmic microsatellite markers for the species of the Dilatata group of *Paspalum* (Poaceae). *Plant Genetic Resources* **5**: 14.
- Speranza PR. 2009.** Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). *Plant Systematics and Evolution* **282**: 43-56.
- Steinkellner H, Lexer C, Turetschek E, Glossl J. 1997.** Conservation of (GA)_n

microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology* **6**: 1189-1194.

Takayama SY, Freitas PM, Pagliarini MS, Batista LAR. 1998. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum* (Plicatula group) from different regions in Brazil. *Euphytica* **99**: 89-94.

Vaio M, Speranza P, Valls JFM, Guerra M, Mazzella C. 2005. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of botany* **96**: 191-200.

Valls JFM. 1987. Recursos genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil. In: *Encontro Internacional sobre melhoramento genético de Paspalum*. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia. 3-13.

Valls JFM, Pozzobon MT. 1987. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. In: *Encontro Internacional sobre melhoramento genético de Paspalum*. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia. 6-21.

Van Droogenbroeck B, Kyndt T, Romeijn-Peeters E, Van Thuyne W, Goetghebeur P, Romero-motochi JP, Gheysen G. 2006. Evidence of natural hybridization and introgression between *Vasconcellea* species (Caricaceae) from southern Ecuador revealed by chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA markers. *Annals of botany* **97**: 793-805.

Wang ML, Chen ZB, Barkley NA, Newman ML, Kim W, Raymer P, Pederson GA. 2006. Characterization of seashore *Paspalum* (*Paspalum vaginatum* Swartz) germplasm by transferred ssrs from wheat, maize and sorghum. *Genetic Resources and Crop Evolution* **53**: 779-791.

Wu KS, Tanksley SD. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular & General Genetics* **241-241**: 225-235.

Zuloaga FO, Pensiero J, Morrone O. 2004. Systematics of *Paspalum* Group Notata (Poaceae- panicoideae- Paniceae). *Systematic Botany Monographs* **71**: 1-75.

Zuloaga FO, Morrone O. 2005. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* **102**: 1-297.

Capítulo VII

**EFFICIENT AND ROBUST IDENTIFICATION OF DIFFERENT BOTANICAL
GROUPS IN PLANTS SPECIES SHOWING WIDE INTRA-SPECIFIC GENETIC
AND MORPHOLOGICAL VARIABILITY USING MOLECULAR ANALYSIS:
PASPALUM NOTATUM (POACEAE, PANICOIDEAE) VARIETIES**

American Journal of Botany (submetido)

EFFICIENT AND ROBUST IDENTIFICATION OF DIFFERENT BOTANICAL GROUPS IN PLANTS SPECIES SHOWING WIDE INTRA-SPECIFIC GENETIC AND MORPHOLOGICAL VARIABILITY USING MOLECULAR ANALYSIS: *PASPALUM NOTATUM* (POACEAE, PANICOIDEAE) VARIETIES[#]

F. W. Cidade², T. T. de Souza-Chies³, F. H. D. de Souza⁴, L. A. R. Batista^{4*}, M. Dall'Agnol⁵, M. I. Zucchi⁶, A. P. Souza^{2,7}

¹ Manuscript received ____;

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support (Project No. 05/51010) and a graduate fellowship (2006/61242-8) for F. W. Cidade as well as to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and a research fellowship for A.P. Souza.

² Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, CP 6010, Campinas, SP, Brazil, CEP 13083-970.

³ Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43433, Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 91501-970.

⁴ Embrapa Pecuária Sudeste, CP 339, São Carlos, SP, Brazil, CEP 13560-970.

⁵ Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 91501-970

⁶ Pólo Regional Centro Sul – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios/APTA, Rodovia SP127, Km 30, Bairro: Vila Fátima, Piracicaba, SP, Brazil, CEP13400-970

⁷ Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas/SP, Brazil, CEP 13083-970,

* *in Memoriam*

Corresponding author: Anete Pereira de Souza

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, CP 6010, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil, CEP 13083-970

E-mail address: anete@unicamp.br

Running title: *Paspalum notatum* diversity.

ABSTRACT

Premise of the study: Identifying and quantifying the genetic similarity of varieties or morphological types of the some apomictic plants presents a complex problem. In *Paspalum notatum*, the main difficulty arises from the morphological variability between some accessions. We developed a combined molecular and morphological approach to unravel complex variation at low taxonomic levels.

Methods: Fifty-seven accessions were evaluated using nine morphological traits, 30 microsatellite loci, geographic data and ploidy levels. The following tests were performed: correlation between genetic, morphological and geographical distances; phenetic analysis; Bayesian inference analysis; analysis of molecular variation (AMOVA) to verify the structure of the gene groups.

Key Results: Thirty simple sequence repeat (SSR) loci revealed the existence of 49 different genotypes, and 208 bands were scored (6.93 per locus). The genetic variation observed among these genotypes was grouped into seven gene pools and corroborated by different methods of analysis. The correlation between morphological and molecular data was significant ($p < 0.001$). Moreover, there was no significant correlation between geographic and genetic distance.

Conclusion: The evidence obtained in this work is consistent with the three botanical varieties of *Paspalum notatum* (*P. notatum* var. *notatum*, *P. notatum* var. *saurae* and *P. notatum* var. *latiflorum*) proposed by Parodi (1948), which are represented by different gene pools. However, there was wide genetic variation within each variety that deserves more detailed study. We suggest using the methodology that has been presented in the study of other plant species, especially those with wide morphological variation and whose identification is difficult.

Key Words: Apomixis; Genetic diversity; Grass Microsatellites; Poaceae; *Paspalum*.

INTRODUCTION

Within the family Poaceae, *Paspalum* L. belongs to the subfamily Panicoideae and the tribe Paniceae. It is considered one of the most important genera in the tribe, given its large number of species and the economic importance of many of them, especially for forage, turf and ornamental purposes (Burson and Bennett, 1971). *Paspalum* is an American genus that comprises over 330 tropical and subtropical species (Clayton and Renvoize, 1986). This genus presents ample genetic and morphological variability, both intra- and inter-specific, as result of a number of mechanisms involved in its evolution, such as hybridization, polyploidization and apomictic reproduction, which maintains heterozygosity and well-adapted maternal phenotypes through successive generations.

Nearly 80% of *Paspalum* species are polyploids, and half of these are tetraploid apomictic (Quarin, 1992). Apomixis, that is, the asexual formation of seeds, is usually related to polyploidy and hybridization. It is found in species of many angiosperm families, particularly Poaceae, Rosaceae and Asteraceae (Kellogg, 1990). In the family Poaceae, about 5% of the genera present apomixis, especially those belonging to the tribe Paniceae. For a long time, apomixis was considered an ‘evolutionary dead end’ because no variability can be found among the offspring of an obligate apomictic plant. Through this reproductive system, however, these species maintain a wide genetic diversity in their genomes (Berthaud, 2001). In fact, it has been suggested that the variability of agamic complexes often exceeds that of sexual species [Harlan and DeWet, 1962 (*apud* Hignight, 1991)]. Apomictic species may retain residual sexuality, through which variability could be introduced into natural populations by means of hybridization,

genetic recombination and mutation. The better genotypes that eventually result from selection are then fixed by asexual reproduction. Many taxonomical and species characterization problems arise as a consequence of the large morphological variation present in these agamic complexes.

Paspalum notatum Flüggé is a good example of this kind of problem because it forms an agamic complex and presents wide morphological variation (Parodi, 1948; Barreto, 1974; Canto-Dorow, 1993; Cidade *et al.*, 2008). It is a perennial rhizomatous turf and forage grass and is also recognized as one of the major constituents of the native grasslands of the New World. This grass is economically important and widely used for forage production, mainly in the southern U. S. A. (Gates *et al.*, 2004); it is found from Central Eastern Mexico to Argentina as well as throughout the West Indies (Chase, 1929).

Various morphological and cytological forms are recognized within *P. notatum* (Barreto, 1974; Canto-Dorow, 1993). This species includes several genotypes, differing both in ploidy level and reproductive system. The diploid cytotype ($2n = 2x = 20$) is sexual and self-incompatible (Burton, 1946; 1948), whereas the tetraploid ($2n = 4x = 40$) is a self-compatible pseudogamous aposporous apomict (Forbes and Burton, 1961). Apomixis in tetraploid *P. notatum* can be either obligate or facultative (Quarín, 1992). The tetraploid cytotypes are usually considered to be the typical form of *P. notatum* in botanical terms; as such they form the variety *notatum*. The diploid cytotypes, on the other hand, are classified as the variety *saurae*, given their distinct morphological characteristics (Parodi, 1948). In addition to these two widely recognized varieties, Doell (1887) proposed the variety *latiflorum*, which was accepted by some taxonomists (Parodi, 1948; Rosengurtt *et al.*, 1970; Lombardo, 1984) until the mid-1980s. Nowadays, *P. notatum* var. *latiflorum* is not currently recognized as such.

Identifying and quantifying the genetic similarity of varieties or morphological types of *P. notatum* presents a complex problem. The main difficulty arises from the morphological variability between accessions. *P. notatum* var. *saurae* is a more easily identified and commercially cultivated variety of *P. notatum*; however, within *P. notatum* var. *notatum* a wide variety of shapes and morphological types are recognized (Barreto, 1974; Canto-Dorow, 1993). Some of these types feature excellent characteristics for potential forage and ornamental uses; however, due to their morphological range they are difficult to identify. Therefore, methods for the fast and accurate identification of *P. notatum* varieties or morphological types would be of substantial benefit to taxonomic classification and breeding programs.

Molecular markers have been of great value in plant studies and have been used for multiple purposes, such as estimating genetic diversity, determining relationships among accessions, elucidating evolutionary relationships and aiding the taxonomic classification of many plants (Daurelio *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2006; Cidade *et al.*, 2008; Speranza, 2009; Jungmann *et al.*, 2010). Among the more informative molecular markers for discrimination of closely related genotypes, is the class of markers based on microsatellite sequences (Esselman, *et al.*, 1999; Assefa *et al.*, 2003; Arnaud-Haond *et al.*, 2005). Microsatellites are sequences of 1 to 6 nucleotides repeated in tandem that are widely distributed in the genome (Morgante and Olivieri, 1993). They represent unstable regions of the genome that mutate at much higher rates than those observed in single-copy sequences. Their high polymorphism, multi-allelism, inheritance as codominant Mendelian traits (in diploids) and easy detection by PCR have enabled their use as genetic markers in eukaryotes (Powell *et al.*, 1996). Microsatellite markers are ideal for plant

genetic linkage mapping, assessment of genetic diversity, varietal identification (Morgante and Olivieri, 1993) and measurement of clonal diversity (Rahman and Rajora, 2001).

In addition, the use of molecular markers, such as microsatellite markers, that regularly identify many genetic polymorphisms at low taxonomic levels makes it possible to address the relationship between morphological variation and genotypic variation.

In this work, we used morphological and molecular (microsatellites) characters to evaluate the genetic patterns and relationships among different morphological types found in *Paspalum notatum*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

A total of 57 accessions of *P. notatum* from the germplasm collections of Embrapa and Universidade Federal do Rio Grande do Sul were evaluated in this study. Their identifiers, collectors, BRA code, sites of origin, and geographic coordinates are listed in Table 1. Of these, 46 accessions had morphological descriptors. Data regarding the number of chromosomes were acquired from Pagliarini *et al.* (1999; 2001), Adanowski *et al.* (2005) and Dahmer *et al.* (2008).

Phenotypic evaluation

Data regarding nine morphological traits obtained from Cidade (2006), Steiner (2005) and unpublished data from Batista (2008) were used for morphological analysis. These traits include the following vegetative traits: leaf sheath length (LSL), leaf sheath width (LSW), leaf blade length (LBL), leaf blade width (LBW), and leaf blade hairiness (LBH); additionally, four

reproductive traits were used: inflorescence stem length (ISL), average length of inflorescence branches (ALIB), spikelet length (SL), and spikelet width (SW). The plant material was botanically identified according to Parodi (1948), Barreto (1974) and Canto-Dorow (1993), and the results were compared with those obtained in this work.

The data matrix with 46 accessions and nine morphological traits consisted of a mixed matrix composed of one qualitative and eight quantitative traits. The data were standardized by dividing each real value by the standard deviation of the trait. Principal component analysis was performed and descriptive statistics were calculated with the GENES (Cruz, 2001) software. To calculate pairwise matrices of Euclidean distance, the software NTSYS 2.1 (Rohlf, 2000) was used. From the results obtained by principal coordinate analysis and principal component analysis, a graph was constructed using the software STATISTICA 7.

For estimating the correlation between morphological distances and molecular similarities, a Jaccard's similarity matrix was constructed using molecular genotyping of the morphologically evaluated accessions. Correlations were calculated using the Mantel test (Mantel, 1967) in NTSYSpc 2.1.

Extraction of DNA and Development of new SSR markers for *P. notatum*

Genomic DNA was isolated from lyophilized young leaf tissue using the CTAB method (Doyle and Doyle, 1987) with minor modifications. DNA concentrations were estimated in comparison with known concentrations of λ DNA on 0.8% agarose gels.

A microsatellite-enriched genomic library was obtained for *P. notatum* using the method described by Billotte *et al.* (1999). The steps to obtain the clones, the sequencing, the sequence

analysis, and the criteria for selecting microsatellites were conducted according to Cidade *et al.* (2009).

SSR marker genotyping

A total of 15 microsatellite markers developed by Cidade *et al.* (2009; 2010) and 15 new SSRs developed in this work were used for genotyping (Table 2). The fragments were PCR amplified in a PTC-200 (MJ Research) thermocycler in a 20- μ L reaction volume consisting of 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.15 mM of each dNTP, 0.8 μ M of each primer, 1 U *Taq* DNA polymerase and 20 ng of genomic DNA. The PCR amplification protocol consisted of an initial denaturation at 94°C for one min; 30 amplification cycles of denaturation at 94°C for one min, annealing at a specific temperature for each primer pair for one min (Table 2), and elongation at 72°C for one min; as well as a final extension at 72°C for five min. For some loci, a touchdown protocol was used (Don *et al.*, 1991). Amplification products were verified by electrophoresis on 3% agarose gels containing 0.1 mg/mL ethidium bromide in 1X TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.0). The amplification products were separated by electrophoresis on 6% denaturing polyacrylamide gels in 1X TBE buffer. For polyacrylamide gel electrophoresis, the PCR products were mixed with equal volumes of loading buffer (formamide containing 0.8 mmol/L EDTA plus traces of bromophenol blue and xylene cyanol), denatured at 95°C for 3 min, and quickly cooled on ice. Afterwards, the samples were loaded on a preheated S2001 model gel apparatus (Life Technologies) and run at 75 W for 1 to 3 h, depending on the fragment sizes to be separated. The fragments were visualized by silver staining according to procedures proposed by Creste *et al.* (2001). A 10-bp DNA Ladder (Invitrogen) was used as a size standard for allele scoring.

TABLE 1. Accessions of *Paspalum notatum* evaluated genetically and phenotypically in this study. Shown are the identifiers, collectors, BRA code, sites of origin, number of chromosomes, ploidy level and geographic coordinates of field collection site.

CODE	ID	COLLECTOR	BRA CODE	SITE OF ORIGEN	CN	PL	LAT	LONG	MDA
1	49	V 14329	BRA - 021563	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.13	-50.57	Yes
2	59	V 14327	BRA - 021547	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.12	-50.55	Yes
3	M7	V14327	NA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.17	-50.55	Yes
4	M6	V14329	NA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.13	-50.57	Yes
5	M17	V14870	NA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.20	-50.50	Yes
6	M18	V14871	NA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.20	-50.50	Yes
7	M5	V14326	NA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.20	-50.50	Yes
8	M14	V14866	NA	Capivari do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.20	-50.50	Yes
9	M49	MD s/n	NA	Mostardas (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.80	-50.70	Yes
10	M25	MD s/n	NA	Lavras do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.90	-54.00	Yes
11	M26	MD s/n	NA	Caçapava do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.50	-53.50	Yes
12	M27	MD s/n	NA	Lavras do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.90	-54.00	Yes
13	M28	MD s/n	NA	Caçapava do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.50	-53.50	Yes
14	M23	MD s/n	NA	Encruzilhada do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.60	-52.60	Yes
15	M24	MD s/n	NA	Encruzilhada do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.60	-52.60	Yes
16	M33	MD s/n	NA	Vacaria (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-28.50	-51.00	Yes
17	M30	MD s/n	NA	Bagé (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-31.30	-54.10	Yes
18	M8	V14614	NA	Japorã (MS), Brazil	2n=40	2n=4X	-23.75	-54.10	Yes
19	62	V 14614	BRA - 023566	Japorã (MS), Brazil	2n=40	2n=4X	-23.75	-54.00	Yes
20	65	Lr 1	BRA - 019178	São Carlos (SP), Brazil	NA	NA	-22.02	-47.88	No
21	64	V 11664	BRA - 012254	Macapá (AP), Brazil	NA	NA	0.02	-51.05	No
22	M50	CN s/n	NA	Piracicaba (SP), Brazil	2n=40	2n=4X	-22.70	-47.90	Yes
23	M32	MD s/n	NA	Barretos (SP), Brazil	2n=40	2n=4X	-20.50	-48.60	Yes
24	M10	V14287	NA	Candói (PR), Brazil	2n=40	2n=4X	-25.50	-52.00	Yes
25	M11	V14282	NA	Candói (PR), Brazil	2n=40	2n=4X	-25.50	-52.00	Yes
26	M35	MD s/n	NA	São Borja (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-28.70	-55.90	Yes
27	M31	MD s/n	NA	André da Rocha (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-28.60	-51.50	Yes
28	M29	MD s/n	NA	Lavras do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.90	-54.00	Yes
29	M4	V14310	NA	Barra do Quaraí (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.10	-57.40	Yes
30	61	V 14613	BRA - 023558	Japorã (MS), Brazil	NA	NA	-23.48	-54.00	No
31	60	V 14600	BRA - 023523	Coronel Sapucaia (MS), Brazil	NA	NA	-23.35	-55.52	No
32	57	Ip 6925	BRA - 001074	Paraguay	NA	NA	-25.25	-57.67	Yes
33	56	Ip 6915	BRA - 001112	Pensacola (FL) USA	NA	NA	30.50	-82.17	Yes
34	53	EEA 673	BRA - 007986	Eldorado do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.10	-51.58	Yes
35	48	V 9782	BRA - 006513	Uruguaiana (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-29.55	-56.78	Yes
36	52	V 14658	BRA - 023728	Costa Rica (MS), Brazil	NA	NA	-18.56	-53.13	No
37	M2	V14244"B"	NA	Uruguaiana (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-29.70	-57.00	Yes
38	M51	CN s/n	NA	Posadas, Argentina	2n=40	2n=4X	-27.38	-55.88	Yes
39	M54	CN s/n	NA	Eldorado do Sul (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.10	-51.60	Yes
40	M38	CN s/n	NA	Santo Tome, Argentina	2n=40	2n=4X	-28.60	-56.05	Yes
41	M46	CN s/n	NA	Santo Tome, Argentina	2n=40	2n=4X	-28.60	-56.05	Yes
42	M37	CN s/n	NA	Santo Tome, Argentina	2n=40	2n=4X	-28.60	-56.05	Yes
43	M39	CN s/n	NA	Santo Tome, Argentina	2n=40	2n=4X	-28.60	-56.05	Yes
44	M42	CN s/n	NA	Santo Tome, Argentina	2n=40	2n=4X	-28.60	-56.05	Yes
45	M44	CN s/n	NA	Santo Tome, Argentina	2n=40	2n=4X	-28.60	-56.05	Yes
46	M36	CN s/n	NA	Santo Tome, Argentina	2n=40	2n=4X	-28.60	-56.05	Yes
47	M41	CN s/n	NA	Santo Tome, Argentina	2n=40	2n=4X	-28.60	-56.05	Yes
48	M56	V14931	NA	Alegrete (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-29.80	-55.80	Yes
49	M66	MD s/n	NA	Colonia, Uruguay	2n=40	2n=4X	-34.14	-57.46	Yes
50	M67	MD s/n	NA	Colonia, Uruguay	2n=40	2n=4X	-34.14	-57.46	Yes
51	M55	V14921	NA	Quaraí (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-30.40	-56.40	Yes
52	55	V 9684	BRA - 006301	Uruguaiana (RS), Brazil	2n=40	2n=4X	-29.71	-57.07	Yes
53	54	V 9747	BRA - 006467	Alegrete (RS), Brazil	NA	NA	-29.08	-55.58	Yes
54	Pensacola	St s/n	NA	Viamão (RS), Brazil	2n=20	2n=2X	-30.00	-50.80	Yes
55	66	Q 3667	BRA - 019470	Corrientes, Argentina	NA	NA	-27.58	-58.75	No
56	58	V 14829	BRA - 024236	Candói (PR), Brazil	2n=20	2n=2X	-25.45	-51.87	No
57	63	V 9607	BRA - 006173	Bagé (RS), Brazil	2n=20	2n=2X	-31.30	-54.08	Yes

*NC=Chromosome number; PL=ploidy level; MDA=morphological data available;
LAT=latitude (decimal degrees); LONG=longitude (decimal degrees).

Statistical analysis

DNA marker profile

The silver-stained SSR bands in each gel were scored as present (1) or absent (0) due to the high ploidy level presented by the majority of *P. notatum* accessions. Summary statistics, including the total number of bands, number of bands per locus, number of polymorphic sites, and polymorphism information content (PIC), were determined based on the total matrix of data obtained from the microsatellite genotyping.

Population structure, genetic diversity and phenetic analysis assessment with microsatellite data

The program STRUCTURE version 2.3.2 (Falush *et al.*, 2003; Falush *et al.*, 2007; Pritchard *et al.* 2000) was used to detect population structure and to assign individuals to subpopulations. This program employs model-based clustering in which a Bayesian approach identifies clusters based on a fit to the Hardy–Weinberg equilibrium and linkage equilibrium. In our study, membership in each genotype was tested for the range of genetic clusters from $K = 2$ to $K = 12$ with the admixture model and without prior information on their origin. Each run consisted of a burn-in period of 300,000 steps followed by 300,000 Monte Carlo Markov Chain replicates, assuming that allele frequencies were correlated across clusters. The final subgroups were determined based on the ad hoc measure ΔK (Evanno *et al.*, 2005). Based on this information, $k = 7$ was chosen as the optimal grouping. Out of the twelve runs for $k = 7$, the one with the highest likelihood value was selected to assign the posterior membership coefficients (Q) to each accession.

An analysis of molecular variance (AMOVA) was performed using Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) to evaluate differentiation between the eight clusters. Furthermore, the genetic distances among these eight groups were calculated as the Slatkin distance and pairwise ϕ_{ST} .

The summary statistics, including the total number of bands, number of bands per locus, number of polymorphic sites, genetic diversity, PIC, and ϕ_{ST} were determined for the seven groups by analysis with STRUCTURE.

Binary matrices were prepared for analysis using Numerical Taxonomy System (NTSYSpc) version 2.1 (Rohlf, 2000). The Jaccard similarity coefficient (Jaccard, 1908) was used to estimate similarity among accessions. Similarity matrices were subjected to cluster analysis using the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) and principal coordinate analysis (PCO) clustering approaches. The bootstrap method was employed to evaluate the reliability of the tree topology. The calculations were performed with the BOOD software, version 3.0 (Coelho, 2001). The cophenetic coefficient between the matrix of genetic similarity and the dendrogram was computed using an appropriate routine of the NTSYSpc 2.1 software. The significance of the cophenetic correlation was tested using the Mantel correspondence test (Mantel, 1967). All graphics were colored according to the STRUCTURE groups memberships using DARwin 5.0.157 (Perrier and Jacquemoud-Collet, 2006).

Geographic distribution

Geographic coordinates were used to construct a matrix of linear distances (in kilometers) between pairs of genotypes using The Geographic Distance Matrix Generator software (Ersts, 2009 [Internet]). Correlation between this matrix and the genetic similarity matrix (obtained with microsatellites) was tested with the software NTSYSpc 2.1, using the Mantel test. The geographic distribution of the accessions was visualized with the DIVA-GIS program version 5.2.0.2 (Hijmans *et al.*, 2001).

TABLE 2. Characteristics of 30 microsatellite loci from *Paspalum atratum* and *P. notatum*. The loci names, repeat motif, annealing temperature for amplification (Ta), product size range in base pairs, number of markers (NM), Polymorphism Information Content (PIC), forward (F) and reverse (R) primer sequences and GenBank Accession numbers, are shown.

Locus name	Repeat motif	Ta (°C)	Product size(pb)	NM	PIC	F (5'-3')	R (5'-3')	GenBank Accession no.
PA01-B7 ^a	(GC)6(CA)2(GA)8CA (GA)9	60	249-300	7	0.68	GCCCCCTGCCCTGCTGACA	CATGCGCCCCACGAAACACGAA	Cidade <i>et al.</i> 2010
PA01-F10 ^a	(TGCC)2...(GTT)2	50	234-220	2	0.14	ATCGTTTCGGCTTTCCTGTCTA	GGATGGCTACTACGTGATGGTT	Cidade <i>et al.</i> 2010
PA02-C3 ^a	(CA)3CTGA(CA)4	60	240-266	3	0.09	GTCAGAAATCAACACAAAACCT	CGCGAGACGTCATCATT	Cidade <i>et al.</i> 2010
PA02-B1 ^a	(CGGC)3	60	158-170	5	0.53	AGCGCACTCGAAGGTCTG	CGCACACGTCATCATT	Cidade <i>et al.</i> 2010
PN02-A12 ^b	(GA)3AT(GAA)3	60	185-205	3	0.45	CGTCGTCAAAACCCCTTCAT	TCGGCGTGTCTTCATCAT	Cidade <i>et al.</i> 2009
PN02-B3	(GT)12	50	139-157	11	0.84	CAAACAATGGGACAACACTT	TTTTTCTGCTCTGGCTCAT	HQ585421
PN02-B5B ^b	(TCA)4	60	180-204	4	0.58	GCATGCATAGAGCCAAATAGAT	TAGGTAGTGGCGGTGAAGATAGTA	Cidade <i>et al.</i> 2009
PN02-C6	(TG)8	51,4	139-145	4	0.29	TTCAGCAATCAAGAGTTAGA	AGAGACGATCAGGGTGTG	HQ585422
PN02-F6A ^b	(CT)11	60	154-218	22	0.89	ACATCAGGAGGCATACGAGTG	CTAGTTGCCAGGAAAGGTGA	Cidade <i>et al.</i> 2009
PN02-G10 ^b	(CA)8	60	189-219	7	0.83	GATACGTCTGATTCTTGTTTCG	TCCTTCATGTGTTGTGGTCTC	Cidade <i>et al.</i> 2009
PN02-G3	(GT)9	60	294-302	5	0.60	GTCGCCGGTTCGAGTCG	CACATAGCCGGCCTCCTCTC	HQ585423
PN02-G7	(AC)7	TOUCHDOWNN	118	7	0.74	TGCAGCATGTAATAACC	TACACAGGAAGGAAGAAA	HQ585424
PN02-H7 ^b	(AC)8	60	194-204	4	0.63	GATATTCCACTCCCTCGTACT	CAACCCTACACATATCCCTCAC	Cidade <i>et al.</i> 2009
PN03-A5 ^b	(TG)8	60	249-287	4	0.54	GTGGCTGGGATGAAAGAACAAA	TAGCTCGGCATAGGGGTAG	Cidade <i>et al.</i> 2009
PN03-A6 ^b	(GT)8	60	160-188	11	0.86	TGTTAACGGCAAATCAAAT	GCCTACCCAAAGCATAACC	Cidade <i>et al.</i> 2009
PN03-C7	(GT)6.	50	159-165	3	0.58	TCATGCCACGAGAAAGAAACCA	CAGGGACGACAGGGACAAGACT	HQ585425
PN03-D10	(GT)11	50	280-300	7	0.66	GTTATTCCTTCACTCACTACC	AGCTTCTGCCTTCTTTTT	HQ585426
PN03-D12	(AG)10	50	220-240	7	0.69	TGGGGAAGCAGGAAGTCACA	CAGCTCACCGATGGGAATG	HQ585427
PN03-E7	(GT)9	TOUCHDOWNN	298	7	0.74	CATGCTTTTCTGCTTCC	GCTAATACTGCTTGCTCTTC	HQ585428
PN03-E9 ^b	(AC)7	60	168-186	6	0.59	TGCGCTTTTTCCATCCTAC	GCACTGCAAACCATCATCTTAT	Cidade <i>et al.</i> 2009
PN03-F1	(CA)7	50	184-192	5	0.71	CAGTGACCAAGCTTACAACCTA	GTGGCATGCCTTTCTACAA	HQ585429
PN03-F10	(TG)7	60	165-177	7	0.78	TGCCTACCGTTTCTCTTCTCT	GGGATGGGTCTTGACTCTTGAT	HQ585433
PN03-F2 ^b	(AC)7	60	241-249	5	0.64	TGCAACAAAAATAGTCAAAGAT	AGGAGGCATATTATTAGTTCAA	Cidade <i>et al.</i> 2009
PN03-F3	(GT)8	60	165-203	8	0.75	ACCCCGCTCTCTTTCTCA	CCCAACCCACCATTATCCTCTG	HQ585430
PN03-F7	(CA)10	50	200-212	6	0.76	TGCTGGCAGTCTTTCTCT	GGCCATACCACTTTTTG	HQ585431
PN03-F9	(CA)8	60	179-275	15	0.88	AAAAGGGCAGGAGTTAGGAC	AGTTGGCTCAGTTACGATTTTA	HQ585432
PN03-G5	(CA)7	60	126-138	6	0.74	AAGTCACCGTTTCAATCCAG	GCAGTGCGCAAGTTTTCT	HQ585434
PN03-G8 ^b	(CA)7	60	254-258	3	0.38	GCACTCTGAACCTTTGGCTCTT	CAGGTGCTTGCTTGGTCTAA	Cidade <i>et al.</i> 2009
PN03-H10 ^b	(CT)11	60	222-272	13	0.86	GGTGCCAGTGAACAACA	GAGAATGGATGGATGAAACGAT	Cidade <i>et al.</i> 2009
PN03-H3	(GA)22	51,4	198-250	11	0.84	CATGTAAACGTAGCAGAGGT	GCTAATTTTACAGGGTGGTC	HQ585435
Média				6.93	0.64			

a) Cidade *et al.* 2010;

b) Cidade *et al.* 2009.

RESULTS

Phenotypic analysis

The principal components graph (Fig. 1) indicates three main groups, which correspond to the three botanical varieties accepted by Parodi (1948). The features that contributed most to the morphological divergence of the groups were the ALIB and LBL in principal component 1 (PC1) and SL and SW in principal component 2 (PC2), which together account for more than 55% of the variation. The group in dark green in the upper graph was botanically identified as var. *latiflorum* due to the size of the spikelets and the length of the inflorescence branches; however, the LBL and LBW were smaller than those presented by the other accessions belonging to var. *latiflorum*, likely accounting for this separation. Intraspecific botanical identification is presented in the Appendix. Tables with descriptive analyses and principal components are presented in Appendices S1 and S2, respectively.

Microsatellite analysis

The 30 microsatellite primer pairs used to analyze the genetic variation in the 57 *P. notatum* accessions yielded a total of 208 fragments with an average of 6.93 fragments per locus. The combined electrophoretic profile of all loci revealed 49 distinct genotypes, suggesting that there were duplicates or clones in the material analyzed. The number of bands per locus ranged from two for the locus PA01-F10 to 22 for the locus PN02-F6A (Table 2). A high PIC level was detected for some loci. However, other loci (e.g., PAF10 and PA02C3) presented low PIC levels; both of these loci were developed in *P. atratum* and transferred to *P. notatum*. The PIC ranged from 0.09 to 0.89, and the average value was 0.64 (Table 2).

A few of the tetraploid accessions yielded four fragments that simultaneously scored at a single locus, which was the maximum number. The diploid accession presented a maximum of two fragments per locus; these results are consistent with the ploidy level of the material analyzed.

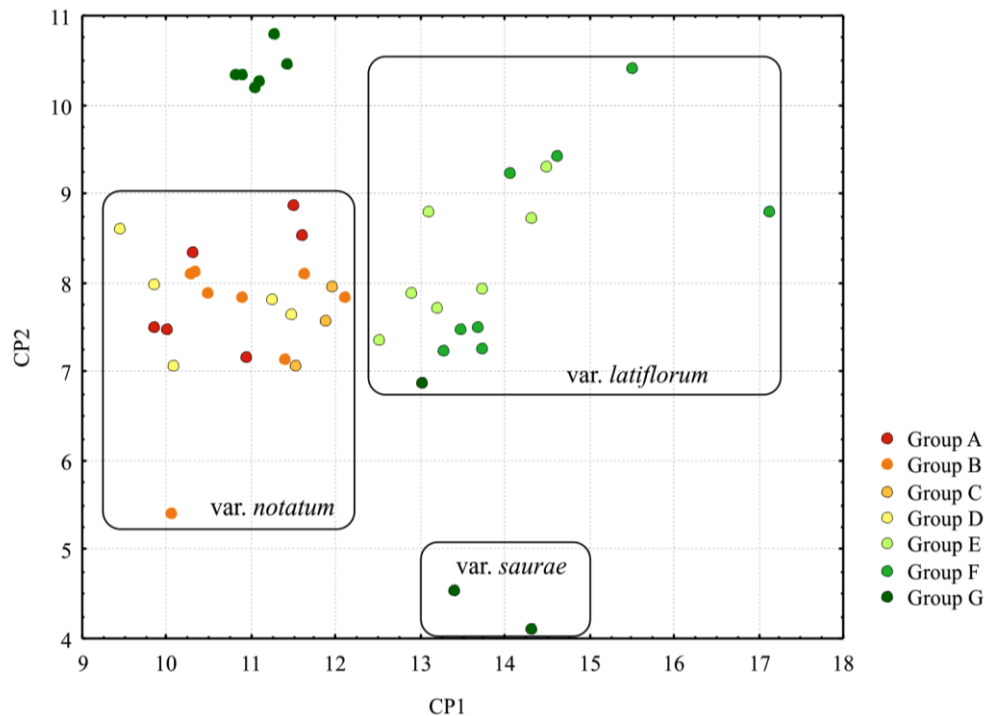


FIG. 1. Graphic of principal components based on nine morphological traits of 46 *Paspalum notatum* accessions. Branch colors correspond to the colors of the STRUCTURE clusters.

Population structure

A Bayesian analysis of population structure, using the model-based approach of Pritchard *et al.* (2000), provides support for the existence of genetic structure in our samples. The LnP (D) revealed by STRUCTURE increased gradually with K from 2 to 12 and showed no clear optimum (data not shown). However, the measure AK (Evanno *et al.*, 2005) was used to estimate the optimum number of clusters. The maximum AK value was observed for K=7 (Appendix 4).

Based on a membership probability threshold of 0.50, nine accessions were assigned to group A, eight to B, six to C, five to D, ten to E, eight to F and ten to G (Fig. 2). The M54 accession from the region of Guaíba – RS (Brazil) presented a mixture of groups D (0.49) and E (0.487); however, this accession has morphological traits more similar to those of G.

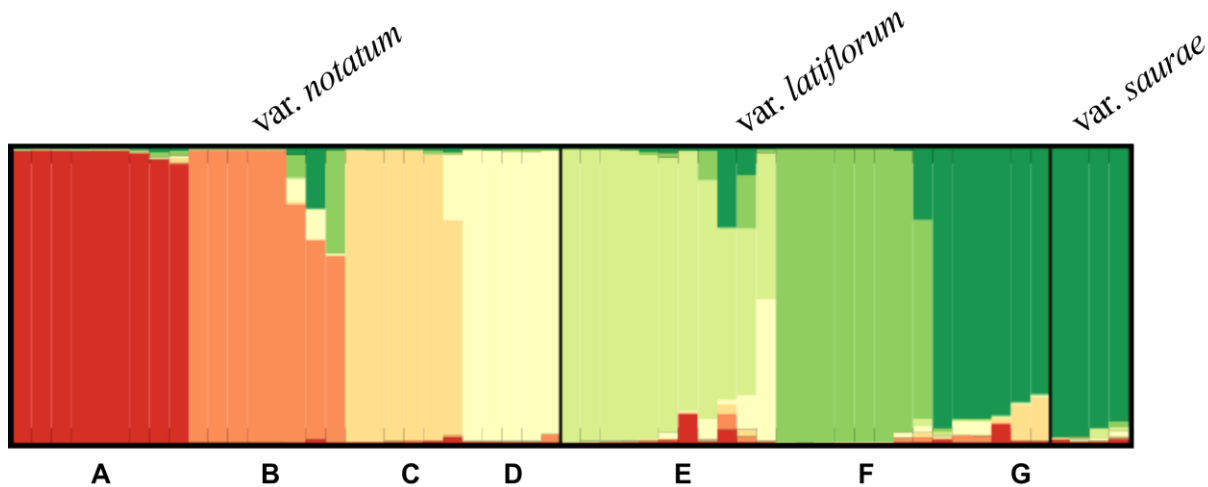


FIG. 2. Barplot obtained from the model-based ancestry analysis of 57 *Paspalum notatum* accessions, implemented in the software STRUCTURE.

The number of accessions belonging to each botanical variety and to each of the seven STRUCTURE clusters with more than 50% membership probability is shown in Table 3. Accessions of groups A, B, C and D belong to the variety *notatum*, while accessions of group E and some of groups F and G belong to the variety *latiflorum*. It should be noted, however, that for several accessions of group G no sufficient morphological descriptors, especially spikelet and inflorescence branch sizes, were available. The accessions of the variety *sauræ* share the same genetic group (G).

TABLE 3. Results from STRUCTURE for K=7 (mean probabilities for each population). Numbers in bold refer to the number of individuals assigned to one of the 7 clusters with probability >0.50. The last column refers to remaining individuals which may have been assigned to others clusters.

Botanical Variety	A	B	C	D	E	F	G	p<0.5
<i>P. notatum</i> var. <i>notatum</i>	9 /0.32	8 /0.25	6 /0.20	5 /0.20	0.00	0.02	0.01	0
<i>P. notatum</i> var. <i>latiflorum</i>	0.01	0.01	0.02	0.06	3 /0.15	8 /0.43	6 /0.33	1
<i>P. notatum</i> var. <i>saurae</i>	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	4 /0.96	0
Without Variety Identification	0.02	0.00	0.00	0.02	7 /0.93	0.02	0.01	0

Similarity and distance-based methods (PCA, NJ, UPGMA) revealed relationships fairly consistent with the STRUCTURE-based membership assignment for most of the accessions, as indicated by the colors in the biaxial plot obtained with PCA (Fig. 3) and the trees (Figs. 4 and 5). The coefficients of similarity for all *P. notatum* accessions ranged from 0.17 to 1.0, with an average value of 0.42. The groups supported by high bootstrap values in the UPGMA dendrogram coincide with the clusters formed from the Bayesian analysis performed by STRUCTURE. The cophenetic correlation coefficient was 0.92, suggesting that the level of distortion between the matrix and the phenograms was low.

The AMOVA showed highly significant ($P < 0.001$) differentiation among groups A, B, C, D, E, F and G, indicating that approximately 47% of the variation can be explained by subdivision of the accessions into these seven clusters (Table 4).

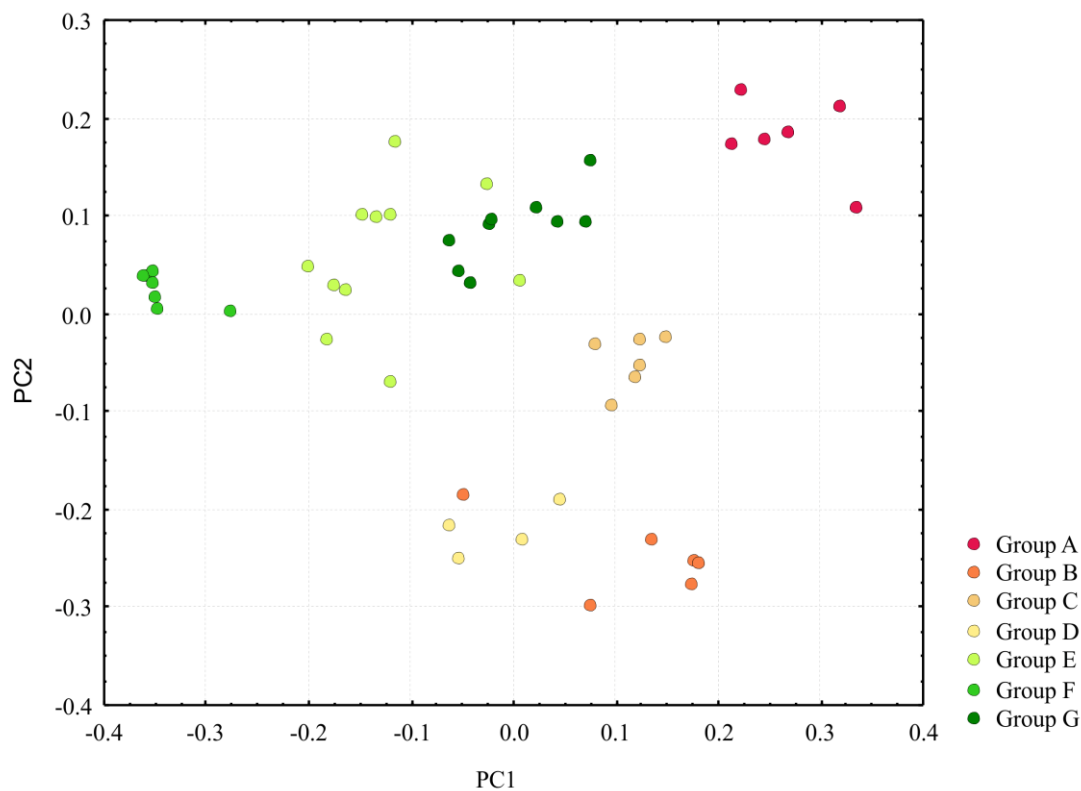


FIG. 3. The principal coordinates based on Jaccard's Similarity resulted from 57 accessions of *Paspalum notatum*. Branch colors correspond to the colors of the STRUCLURE clusters.

TABLE 4. Analysis of Molecular Variance for the clusters of *Paspalum notatum* accessions detected by structure analysis based on 30 SSR markers.

Source of variation	d.f.	Sum squares	Variance of variation	Percentage
Among clusters	6	768.869	13.94435 Va	47.05
Within clusters	50	784.657	15.69314 Vb	52.95
Total	56	1.553.526	29.637.480	

TABLE 5. Exclusive bands revealed by SSR markers in *Paspalum notatum* varieties.

SSRs loci	Exclusive bands of <i>P. notatum</i> varieties		
	<i>var. notatum</i>	<i>var. latiflorum</i>	<i>var. sauræ</i>
PN03-A6		bands 1 , 10	
PN03-D12	band 6	bands 1,4, 5 (240, 228 , 226 bp)	
PN03-E7	band 7	band 1	
PN03-E9		band 3	
PN03-F2		band 5	
PN03-F3	bands 7, 8 (169, 165 pb)	band 6 (197 pb)	
PN03-F9	bands 1, 2, 3, 9 (275, 250, 248 , 192 bp)	band 5 (220 bp)	
PN03-F10		band 1	
PN03-G3	band 1	band 5	
PN03-G7	band 7	band 1	
PN03-G8		band 1	
PN03-H3	bands 10, 11 (206 , 198 bp)	bands 1 , 9 (250, 210 bp)	
PN03-H10		bands 1, 2 , 3, 5, 10, 11	band 13
PN02-B3		bands 7, 11 (145 , 135 bp)	
PN02-C6		band 2	band 1
PN03-D10		bands 1, 2 (300 , 296 bp)	
PN02-F6	bands 19, 20, 21, 22	bands 4, 5, 6, 7, 8, 9, 18	
PN02-G10		bands 1, 7	
PN02-H7	band 1		
PA02-B1	bands 1, 5 (170 , 158 bp)		
PA01-B7		bands 1, 3 , 6 (300, 288 , 259 bp)	
PA02- C3		band 2 (242 bp)	band 1 (266 bp)

In the NJ and UPGMA trees (Fig. 4 and 5), greater genetic divergence was observed among accessions of the variety *sauræ* as compared to other varieties, and *sauræ* behaved as outgroups in the dendrogram. This variety distinguished itself from the others mainly by its ploidy level (diploid) and its reproductive system (sexual self-incompatible), while *P. notatum* *var. notatum* and *P. notatum* *var. latiflorum* are tetraploid apomicts, either obligate or facultative.

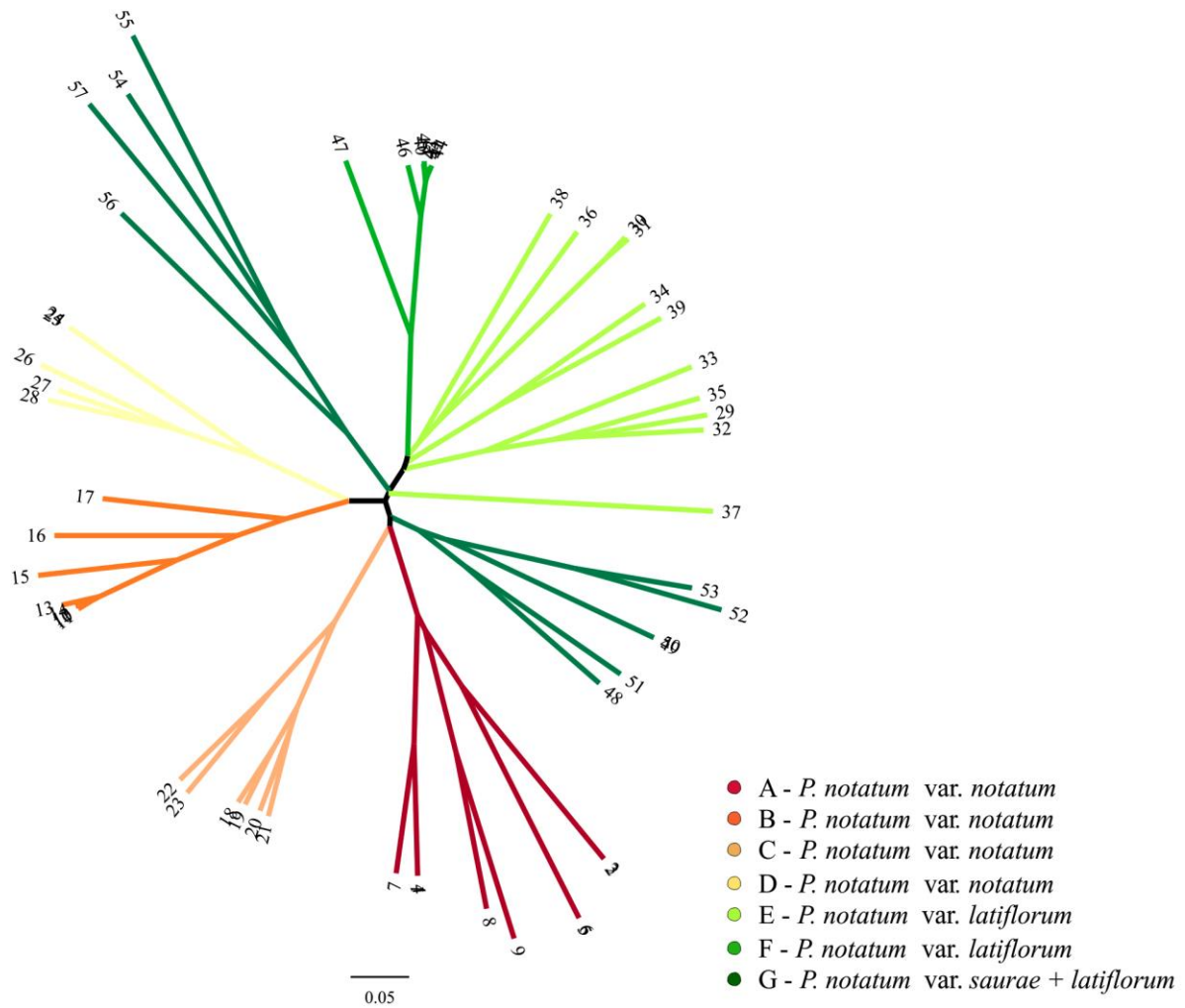


FIG. 4. Unrooted neighbor-joining tree of 57 *Paspalum notatum* accessions. Branch colors correspond to the colors of the STRUSTRUCTURE clusters.

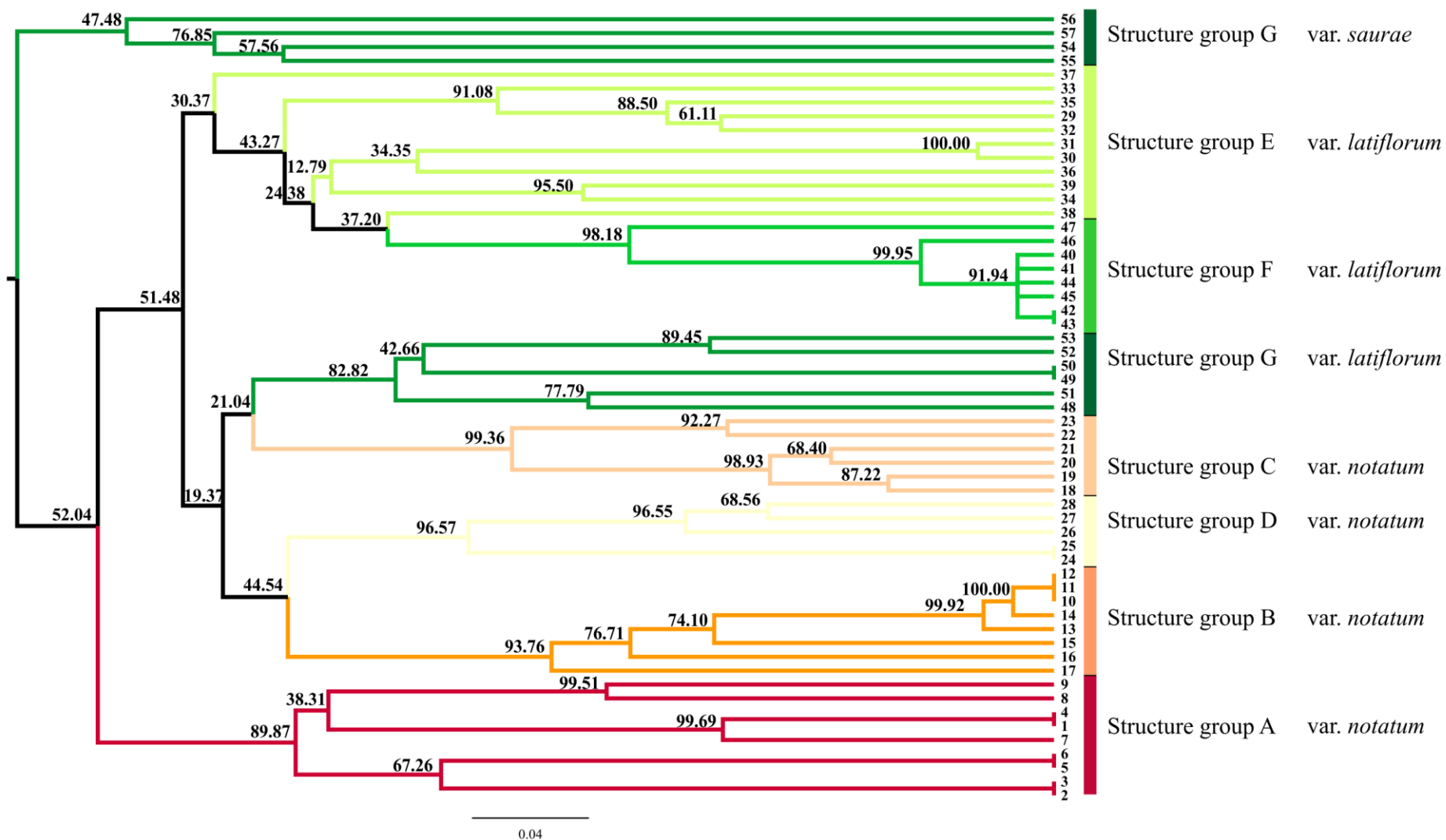


FIG. 5. UPGMA dendrogram based on the Jaccard similarity coefficient of 57 *Paspalum notatum* accessions. Branch colors correspond to the colors of the STRUCTURE.

Table 5 presents the exclusive bands between the different varieties; however, these bands are not present in all accessions of the varieties, but distributed differently between the corresponding gene groups. A more detailed study of the morphological and molecular characterization of these groups should be performed to determine if these characteristics are related to specific cultivars or biotypes. Three highly informative loci (PN03F3, PN02F6A and PN03H10) are shown in figure 6.

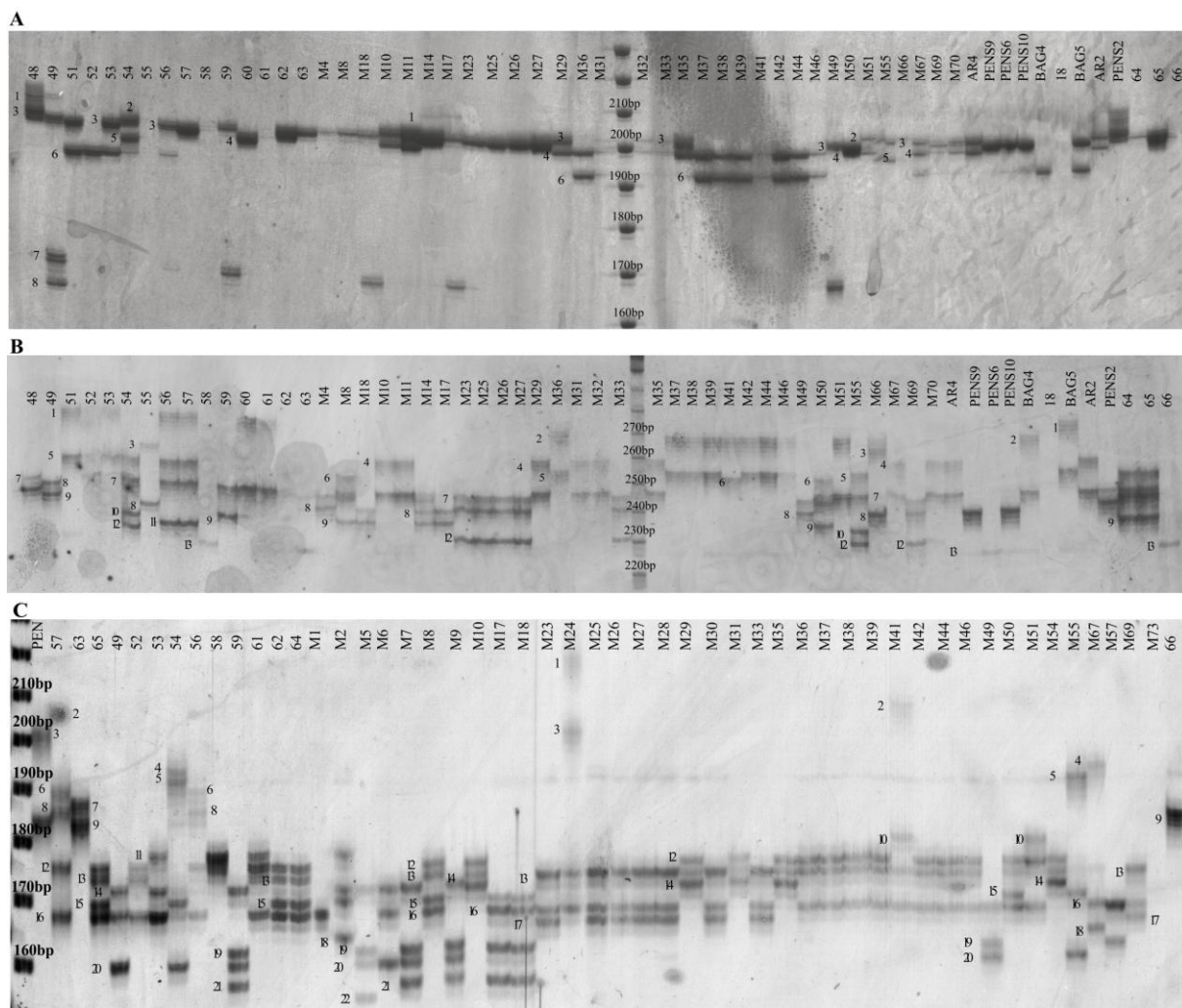


FIG. 6. SSR markers profile obtained from *Paspalum notatum* accessions. A) PN03-F3 locus; B) PN03-H10 locus; C) PN02-F6 locus.

Genetic diversity and genetic relationships among clusters

The genetic diversity for each cluster was assessed (Table 6). Clusters E and G had the highest genetic diversity, with 146 and 144 total bands and 4.87 and 4.80 fragments per locus, respectively. The genetic diversity of A was the next highest ($H_e = 0.55$), with a total of 102 bands and 3.40 bands per locus. The overall ϕ_{ST} among the eight clusters was 0.47 (95% confidence interval and $p < 0.001$), with the ϕ_{ST} value for each cluster ranging from 0.46 to 0.52. Pairwise comparisons on the basis of the ϕ_{ST} values can be interpreted as standardized population distances between two clusters. The pairwise ϕ_{ST} values in this work ranged from 0.181 between clusters E and G to 0.803 between clusters B and F (Table 7). The genetic distance data agreed with the ϕ_{ST} estimates. The smallest genetic distance was between clusters E and G (0.222), whereas clusters F and B had the greatest genetic distance (4.075).

TABLE 6. Summary statistics for the whole group of *Paspalum notatum* accessions and for the clusters detected by structure analysis based on 30 SSR markers.

Statistic	Overall	A	B	C	D	E	F	G
Sample size	57	9	8	6	5	10	8	11
Total number of alleles	208	102	91	94	83	146	84	144
Number of alleles per locus	6.93	3.40	3.03	3.13	2.77	4.87	2.80	4.80
Number of polymorphic sites	200	80	52	50	43	136	30	124
Genetic diversity (H_e)	0.68	0.55	0.54	0.53	0.52	0.65	0.51	0.65
PIC	0.64	0.50	0.48	0.48	0.44	0.60	0.45	0.60
Fst	0.47	0.46	0.50	0.49	0.49	0.43	0.52	0.43

* A, C, D and E belong to the variety *notatum*; B, F and G, in general, belong to *latiflororum*; F also includes var. *saurae*.

TABLE 7. Genetic distance between *Paspalum notatum* clusters from the structure analysis.

	A	B	C	D	E	F	G
A	0	0.537	0.48	0.507	0.278	0.698	0.389
B	1.161	0	0.617	0.598	0.397	0.803	0.445
C	0.924	1.608	0	0.607	0.313	0.77	0.389
D	1.028	1.489	1.541	0	0.312	0.747	0.376
E	0.384	0.657	0.456	0.452	0	0.473	0.181
F	2.312	4.075	3.354	2.956	0.897	0	0.421
G	0.636	0.802	0.636	0.603	0.2216	0.725	0

The top diagonal is pairwise Φ_{ST} and the bottom diagonal is Slatkin distance.

* A, B, C and D belong to the variety *notatum*; E, F and G, in general, belong to *latiflororum*; F also includes var. *saurae*.

Correlation analysis

Correspondence between the morphological traits and the SSR markers was evaluated by means of a Mantel correlation test. The Mantel correlation (r) value was 0.42 ($p < 0.001$), indicating that the morphological and molecular markers were weakly correlated.

The correlation between the geographic distance and the genetic similarity matrix was estimated for all accessions. The Mantel test resulted in $r = 0.0017$, thus revealing no significant association between the genetic and geographic variation. The results are presented in Fig. 7.

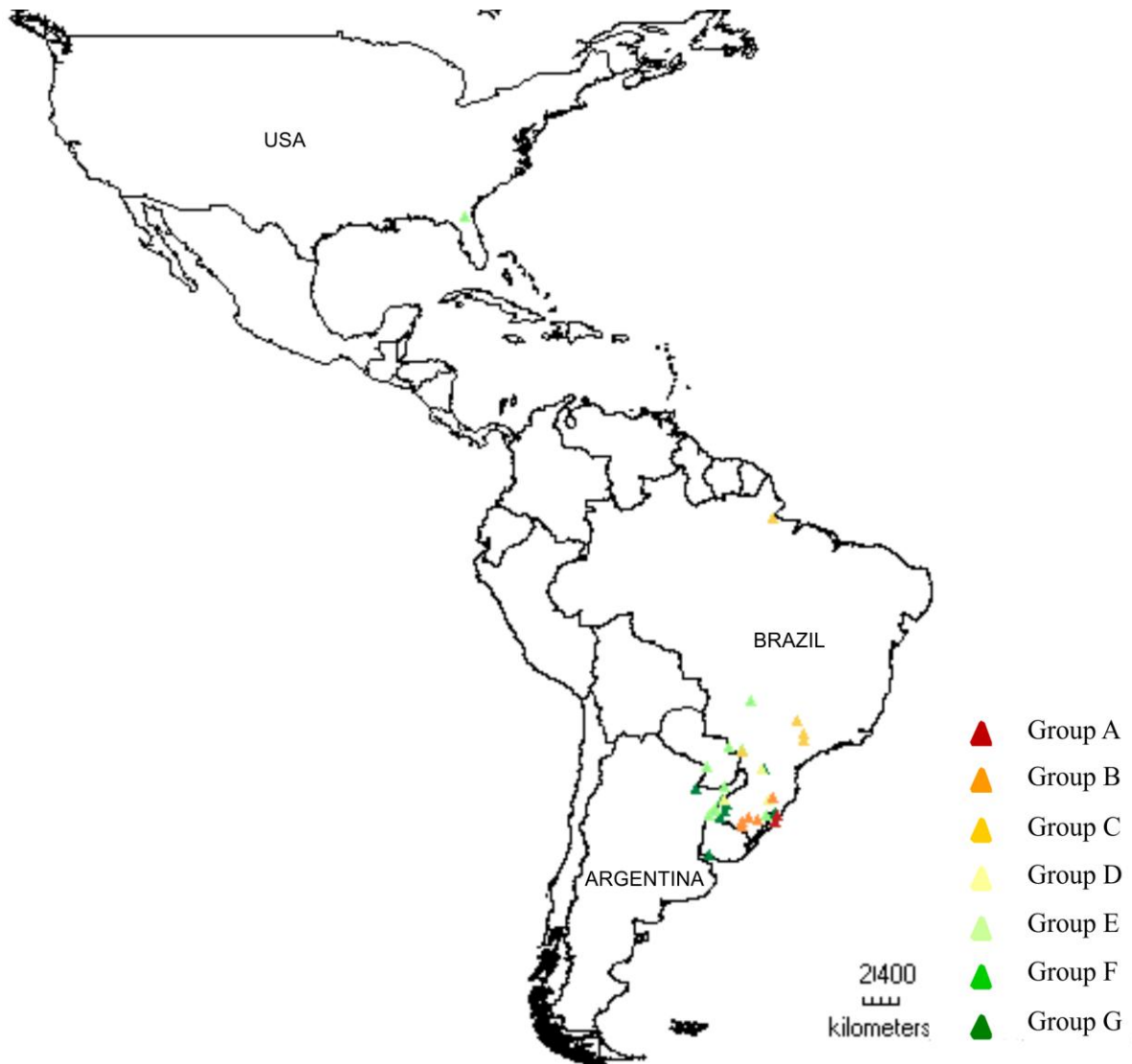


FIG. 7. Geographic distribution of 57 *Paspalum notatum* accessions analyzed genotypically and phenotypically. Point colors correspond to the colors of the STRUCTURE clusters.

DISCUSSION

SSR markers

In this work, a set of SSR molecular marker (30 SSR loci) was first used to characterize *Paspalum notatum* accessions. Most of these markers were developed specifically for this species. Some of these markers had low PIC and only a few marks, while other loci presented high PIC values and many marks. Testolin *et al.* (2000) reported that markers with high polymorphism are promising for use in DNA fingerprinting to identify varieties or cultivars of plants. We recommend that a subset of these loci be used in future fingerprinting studies, with a preference for loci that are easy to score and have high heterozygosity as indicated by high PIC values.

In our study, we observed the presence of exclusive bands between different varieties of *P. notatum*. These bands were not present in all representatives of the same variety, but shared between accessions of the same gene pool. A more detailed morphological and molecular characterization of these groups should be performed; these gene groups may be related to specific cultivars or biotypes, which we could not detect in our work. These SSR markers can substantially benefit taxonomic classification and breeding programs.

Diversity and population structure

We evaluated the genetic variation among 57 accession of *P. notatum*, an important forage grass, using SSR markers. Our genetic analysis confirmed the presence of many different genotypes dispersed throughout southern South America. The genetic variation observed among

these accessions was grouped into seven gene pools and corroborated by different methods of analysis, as shown above. The methodology for the analysis of molecular data used in this work has been successfully used for understanding the organization of the genetic diversity of economically important crops (Liu *et al.*, 2003; Barkley *et al.*, 2006; Kwak and Gepts, 2009; Jungmann *et al.*, 2010).

The genetic structure of the groups was confirmed by AMOVA, and 47% of the variation was explained by the division into seven groups; similar results were obtained by Jungmann *et al.* (2010), who have found that 44% of the variation in apomictic *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. accessions could be explained by germplasm subdivision into five clusters.

Populations of predominantly apomictic grasses are predicted to have low levels of within-population genetic variation due to founder effects and a lack of recombination in offspring, whereas high levels of differentiation among populations are expected due to the limited gene flow via pollen and the divergence of populations over time due to selection, drift, and the accumulation of new mutations (Carino and Daehler, 1999). Our work focused on evaluating the relationships between accessions, which may represent distinct populations. Consequently, we expected a high differentiation between individuals due to reproductive and geographic isolation. High differentiation between individuals was not observed for all accessions, such as the accessions represented by gene pools "B" and "D", which are widely distributed and genetically closer. Furthermore, some accessions derived mainly from Rio Grande do Sul (Brazil) and Argentina showed a wide genetic variation. The species studied is widely distributed in the Americas, and Argentina is considered its center of origin (Burton, 1967). Pouling *et al.* (2005) reports in his work on the invasive capacity of *Pennisetum setaceum* (an

apomictic grass) that this grass can colonize large areas with just a single clone. The most widely distributed accessions of *Paspalum notatum* probably originated from a few apomictic individuals better adapted to different environmental conditions.

Moreover, *Paspalum notatum* comprises sexual diploid and tetraploid facultative apomictic individuals, and diversity may be especially high in apomictic species complexes derived from multiple, independent hybridization events. Daurelio *et al.* (2004) observed that gene flow does occur between tetraploid and diploid cytotypes when in sympatry, and, thus, the diploid commercial cultivars can introduce variability in an apomictic complex. Furthermore, the facultative apomictic tetraploid species can retain residual sexuality, so their occasional, hybridization and genetic recombination introduce variability into natural populations. The better-adapted genotypes are then fixed by apomixis, which maintains the maternal genotype and heterozygosity through successive generations (Kellogg, 1990).

Previous studies have used molecular markers to assess diversity in accessions of *P. notatum*; for example, the work of Espinoza *et al.* (2006), which analyzed accessions using a large number of AFLP molecular markers, found high levels of similarity (0.64 to 0.99). These results contrast with those obtained in this study; additionally, our results agree with those of Cidade *et al.* (2008), who found high diversity in accessions from the State of Rio Grande do Sul (Brazil) using ISSR molecular markers based on a microsatellite region, suggesting that there is a great diversity of genotypes in Brazil. In the latter study, the Jaccard's similarity coefficient ranged from 0.43 to 0.97, with a mean of 0.59. We found somewhat higher values than those obtained by Cidade *et al.* (2008), in which the mean Jaccard's similarity coefficient was 0.42 and there were an average of 6.93 bands per locus.

Morphological X Molecular results

In Brazil, Barreto (1974) and Canto-Dorow (1993) have already documented the wide morphological variability of *P. notatum*; the morphological and genetic evidence reported here confirmed this fact. However, the informal intra-specific categories proposed by these authors could not be confirmed by our data, due to the fact that the morphological features used for these distinctions are continuous and often overlapping or else are incapable of reflecting the total observed variation. Our genetic analyses only weakly correlated with phenotypic data, possibly as a consequence of the small number of morphological characters we were able to use in this work, combined with the phenotypic plasticity of the morphological characteristics, which were mainly vegetative. However, our genetic results show that there is a tendency towards clustering of the *P. notatum* accessions following the botanical variety classifications: var. *notatum*, var. *latiflorum* and var. *saurae*.

Using spikelet size as a diagnostic character, Doell (1877) described the variety *latiflorum*, which features spikelets that are orbicular-elliptical in shape and larger than those of the variety *notatum*. *P. notatum* var. *latiflorum* Doell was accepted and cited by some authors (Parodi, 1948; Rosengurtt *et al.*, 1970; Lombardo, 1984), but it is not been currently regarded as valid. Parodi (1948) studied the variety *latiflorum* and created a new one, namely, *P. notatum* var. *saurae*, which is accepted and used to this day. To differentiate these varieties, Parodi used spikelet size and the length and number of inflorescence branches, which are diagnostic characters that exhibit little or no phenotypic plasticity. The morphological and molecular evidence obtained in this study supports the division of the species into three varieties because there is a strong tendency for the accessions of the same variety to remain grouped in same gene

groups. Seven distinct gene pools were determined by means of an analysis performed by the Bayesian STRUCTURE software; four of these gene pools represent the botanical variety *notatum* and three represent the variety *latiflorum*. The diploid accessions (*P. notatum* var. *saurae*) were grouped into a single gene pool, suggesting that they share a common origin. These accessions may have derived from the cultivar Pensacola, which originated in Argentina (Burton, 1967). Daurelio *et al.* (2004) have observed that gene flow does occur between tetraploid and diploid cytotypes of *Paspalum notatum* when in sympatry. However, a group of tetraploid accessions from western Rio Grande do Sul (Brazil) and Uruguay, botanically identified as *P. notatum* var. *latiflorum*, share the same gene pool with *P. notatum* var. *saurae*.

According to Quarín (1992), autotetraploid species of *Paspalum* may have appeared in a two-step process. Cross-breeding sexual diploids sometimes develop aposporous embryo sacs. Then, occasionally, an unreduced oosphere is fertilized by the reduced spermatic nuclei of a diploid, forming a triploid ($2n, 2x+n=3x$). The triploids then produce offspring that, when fecundated by pollen from diploids, result in tetraploid ($2n, 3x+n=4x$) genotypes.

Sexual diploid strains grow only in a limited area in Argentina, which is considered the center of origin of *P. notatum* (Daurelio *et al.*, 2004; Espinoza *et al.*, 2006). Some tetraploids that share the diploid gene pool may have maintained the genetic patterns of the Argentine diploid populations or may have arisen by independent self-polyploidization events of diploids.

Correlation between the geographic distance and the genetic similarity

Our data suggest that there is no agreement between genetic dissimilarity and geographic distance among the *Paspalum notatum* accessions. This fact was also observed by Espinoza *et al.*

(2006), who suggested that the small genetic variation found among tetraploid *P. notatum* accessions from ecologically different areas and of distant origins results from the buffering imposed by apomixis and polyploidy upon the genetic status of the species, promoting the fixation of genetic fitness over a wide range of environments. Moreover, the incongruence between the genetic and geographic data may also be consequent of anthropogenic dispersal because *P. notatum* is a turf and forage grass that is widely sown commercially, and it can also be accidentally dispersed by cattle or other grazing animals. Even though no correlation between genetic and geographical data was found in our analysis, however was a tendency in some accessions from the same region to share the same gene pool (Fig. 7).

Conclusion

The methodological approach used allowed us to understand the genetic organization of different genotypes of *P. notatum*, and the comparison with morphological characters provided evidence to support the existence of three botanical varieties [*P. notatum* var. *notatum*, *P. notatum* var. *saurae* and *P. notatum* var. *latiflorum* (Parodi, 1948)], which are represented by different gene groups, with few exceptions. However, there was a wide genetic variation within each variety that deserves a more detailed study.

LITERATURE CITED

- ADAMOWSKI, E. V., M. S. PAGLIARINI, A. B. M. BONATO, L. A. R. BATISTA, AND J. F. M. VALLS. 2005. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. *Genetics and Molecular Biology* 28(4): 773-780.
- ARNAUD-HAOND, S., F. ALBERTO, S. TEIXEIRA, G. PROCACCINI, E. A. SERRÃO, AND C. M. DUARTE. 2005. Assessing genetic diversity in clonal organisms: low diversity or low resolution? Combining Power and cost efficiency in selecting markers. *Journal of Heredity* 96(4): 434-440.
- ASSEFA, K., A. MERKER, AND H. TEFERA. 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Hereditas* 139:174-183.
- BARKLEY, N. A., M. L. ROOSE, R. R. KRUEGER, AND C. T. FEDERICI. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1519-1531.
- BARRETO, I. L. 1974. O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul. Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- BERTHAUD, J. 2001. Apomixis and the management of genetic diversity. In Y. Savidan, J. G. Carman, and T. Dresselhaus [eds.]. The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering, 8-23. CIMMYT, El Batan, Texcoco, Mexico.
- BILLOTTE, N., P. J. R. LAGODA, A. M. RISTERUCCI, AND F. C. BAURENS. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.

- BURSON, B. L. AND H. W. 1971. Chromosome numbers, microsporogenesis, and mode of reproduction of seven *Paspalum* species. *Crop Science* 11:292-294.
- BURTON, G. W. 1946. Bahiagrass types. *Journal American Society of Agronomy* 38: 273–281.
- BURTON, G. W. 1948. The method of reproduction of common Bahia grass, *Paspalum notatum*. *Journal American Society of Agronomy* 40: 443-452.
- BURTON, G. W. 1967. A search for the origin of Pensacola bahiagrass. *Economic Botany* 21: 379-382.
- CANTO-DOROW, T. S. 1993. Revisão taxonômica das espécies sul-riograndenses de *Paspalum* L. (grupo Notata) Poaceae - Paniceae, com ênfase na análise da variação intra-específica de *Paspalum notatum* Flüggé. Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- CARINO, D. A. AND C. C. DAEHLER. 1999. Genetic variation in an apomictic grass, *Heteropogon contortus*, in the Hawaiian Islands. *Molecular Ecology* 8: 2127-2132.
- CHASE, A. 1929. The North American species of *Paspalum*. *Contributions from the U.S. National Herbarium* 28: 1-310.
- CIDADE, F. W. 2006. Análise da variabilidade genética de *Paspalum notatum* Flüggé (Poaceae, Panicoideae) com o uso de marcadores moleculares, morfológicos e citometria de fluxo. Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- CIDADE, F.W., M. DALL'AGNOL, F. BERED, AND T. T. SOUZA-CHIES. 2008. Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flüggé (Paniceae – Panicoideae). *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 235-246.
- CIDADE, F. W., T. T. SOUZA-CHIES, L. A. R. BATISTA, M. DALL'AGNOL, M. I. ZUCCHI, L. JUNGSMANN, AND A. P. SOUZA. 2009. Isolation and characterization of

- microsatellite loci in *Paspalum notatum* Flügge (Poaceae). *Conservation Genetics* 10: 1977-1980.
- CIDADE, F. W., T. T. SOUZA-CHIES, F. H. D. SOUZA, L. A. R. BATISTA, M. DALL'AGNOL, J. F. M. VALLS, M. I. ZUCCHI, AND A. P. SOUZA. 2010. Microsatellite loci for *Paspalum atratum* (Poaceae) and cross-amplification in other species. *American Journal of Botany* 2010 97 (11): e107-e110.
- CLAYTON, W. D., AND S. A. RENVOIZE. 1986. *Genera Graminum: Grasses of the World*. Kew Bulletin Additional Series XIII, Royal Botanical Gardens Kew, Her Majesty's Stationery Office, London, England
- CRESTE, S., A. TULMANN NETO, AND A. FIGUEIRA. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biological Reporter* 19: 299-306.
- COELHO, A. S. G. 2001. BOOD - Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap, v. 3.0. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO.
- CRUZ, C. D. 2001. Programa Genes – versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Computer program and documentation distributed by the author, website: <http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm> [accessed 01 May 2010].
- DAHMER, N., M. T. SCHIFINO-WITTMANN, M. DALL'AGNOL, AND B. CASTRO. 2008. Cytogenetic data for *Paspalum notatum* Flügge accessions. *Scientia Agricola* 65 (4): 381-388.

- DAURELIO D. L., F. ESPINOZA, C. L. QUARIN, AND S. C. PESSINO. 2004. Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant Systematic and Evolution* 244: 189–199.
- DOELL, J. C. 1877. Gramineae II. In C. F. P. Martius [ed.] *Flora brasiliensis*, vol. 2: pt. 2, 276–296. Monachii, F. Fleischer.
- DON R. H., P. T. COX, B. J. WAINWRIGHT, K. BAKER, AND J. S. MATTICK. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19: 14.
- DOYLE, J. J., AND J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- ERSTS, P. J. 2009. Geographic Distance Matrix Generator [computer program]. Version 1.2.3. Computer program and documentation distributed by the author, website: http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg [accessed 01 May 2010].
- ESPINOZA, F., L. D. DAURELIO, S. C. PESSINO, E. M. VALLE, AND C. L. QUARÍN. 2006. Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant Systematic and Evolution* 258: 147–159.
- ESSELMAN, E. J., L. JIANQIANG, D. J. CRAWFORD, J. L. WINDUS, AND A. D. WOLFE. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis posterii* ssp. *insperata*: comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* 8: 443–451.
- EVANNO, G., S. REGNAUT, AND J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8): 2611–2620.

-
- EXCOFFIER, L., G. LAVAL, AND S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics* 1: 47–50.
- FALUSH, D., M. STEPHENS, AND J. K. PRITCHARD. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164(4): 1567–1587.
- FALUSH, D., M. STEPHENS, AND J. K. PRITCHARD. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7(4): 574–578.
- FORBES, I., AND G. W. BURTON. 1961. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecific hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. *Crop Science* 1: 402–406.
- GATES, R. N., C. L. QUARÍN, AND C. G. S. PEDREIRA. 2004. Bahiagrass. In . E. Moser, B. L. Burson, and L. E. Sollenberger [eds.], Warm-Season (C4) Grasses, 651-680. Agronomy Monographs 45, Madison, Wisconsin, USA.
- HIGNIGHT, K. W., E. C. BASHAW, AND M. A. HUSSEY. 1991. Cytological and morphological diversity of native apomictic buffelgrass, *Pennisetum ciliare* (L.) Link. *Botanical Gazette* 15(2): 214-218.
- HIJMANS, R. J., L. GUARINO, M. CRUZ, AND E. ROJAS. 2001. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. *Plant Genetic Resource Newsletter* 127: 15–19.
- KWAK, M., AND P. GEPTS. 2009. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 118: 979-992.

-
- KELLOGG, E. A. 1990. Variation and species limits in agamospermous grasses. *Systematic Botany* 15: 112–123.
- LIU, K., M. GOODMAN, S. MUSE, J. S. SMITH, E. BUCKLER, AND J. DOEBLEY. 2003. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from dna microsatellites. *Genetics* 165: 2117-2128.
- LOMBARDO, A. 1984. *Flora montevicensis*. Monocotiledoneas. Montivideo: Intendencia Municipal de Montevideo.
- JACCARD, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 44: 223–270.
- JUNGMANN, L., B. B. Z. VIGNA, K. R. BOLDRINI, A. C. B. SOUSA, C. B. DO VALLE, R. M. S. RESENDE, M. S. PAGLIARINI, M. I. ZUCCHI, AND A. P. DE SOUZA. 2010. Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass *Brachiaria humidicola* based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and geographical origin. *Genome* 53: 698–709.
- MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27(2 Part 1): 209–220.
- MORGANTE, M., AND A. M. OLIVIERI. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3:175–182.
- PAGLIARINI, M. S., S. Y. TAKAYAMA, P. M. FREITAS, L. R. CARRARO, E. V. ADAMOWSKI, AND L. A. R. BATISTA. 1999. Failure of cytokinesis and 2n gamete formation in Brazilian accessions of *Paspalum*. *Euphytica* 108: 129-135.

- PAGLIARINI, M. S., L. R. CARRARO, P. M. FREITAS, E. V. ADAMOWSKI, L. A. R. BATISTA, AND J. F. M. VALLS. 2001. Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. *Hereditas* 135: 27-34.
- PARODI, L. R. 1948. Gramíneas Argentinas nuevas o críticas. I. La variación en *Paspalum notatum* Flüggé. *Revista Argentina de Agronomía* 15: 53-57.
- PERRIER, X., AND J. P. JACQUEMOUD-COLLET. 2006. DARwin: Dissimilarity analysis and representation for Windows [computer program]. Version 5.0.157. Computer program and documentation distributed by the author, website: <http://darwin.cirad.fr/darwin/Home.php> [accessed 01 May 2010].
- POULING, J., S. G. WELLER, AND A. K. SAKAI. (2005) Genetic diversity does not affect the invasiveness of fountain grass (*Pennisetum setaceum*) in Arizona, California and Hawaii. *Diversity and Distributions* 11: 241-247.
- POWELL, W., MACHRAY, G. C., AND J. PROVAN. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1: 215-222.
- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS, AND P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945-959.
- QUARÍN, C. L. 1992. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8-15.
- RAHMAN, M. H., AND O. P. RAJORA. 2001. Microsatellite DNA soma-clonal variation in propagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant and Cell Reports* 20:531-536.
- ROHLF, F. J. 2000. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.1.

ROSENGURTT, B., B. R. ARRILLAGA, AND P. IZAGUIRRE. 1970. Gramíneas uruguayas.

Departamento de Publicaciones de la Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.

SNEATH, P. H. A. R. R. SOKAL. 1973. *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. San Francisco: Freeman.

SPERANZA, P. R. 2009. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). *Plant Systematic and Evolution* 282: 43-56.

STEINER, M. G. 2005. Caracterização Agronômica, Molecular e Morfológica de acessos de *Paspalum notatum* Flüggé e *Paspalum guenoarum* Arech. Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

TESTOLIN, R., T. MARRAZZO, G. CIPRIANI, R. Q. IGNAZION VERDE, M. T. DETTORI, M. PANCALDI, AND S. SANSAVINI. 2000. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* 43: 512-520.

ONLINE SUPPLEMENTS

Appendix S1. Descriptive statistics of 9 morphological traits of 46 *Paspalum notatum* accessions.

	N obs	Average	Minimum	Maximum	Variance	Sd
Length of leaf sheath (cm)	46	4.117	2.8	6.7	0.707	0.841
Width of leaf sheath (cm)	46	0.720	0.5	1.3	0.017	0.1293
Height of floriferous stem (cm)	46	29.859	17	59.5	76.981	8.7739
Average length of inflorescence branches (cm)	44	8.142	4.3	13.5	3.910	1.9773
Leaf blade length (cm)	46	18.733	6.8	38.8	52.668	7.2572
Leaf blade width (cm)	46	0.737	0.4	1	0.021	0.1451
Hairiness of the leaf blade	46	1.283	1	3	0.252	0.5017
Length of spikelet (mm)	46	3.163	2	4	0.157	0.3963
Width of spikelet (mm)	46	2.072	1.5	3	0.081	0.2841

Appendix S2. The principal components of 9 morphological traits of 46 *Paspalum notatum* accessions.

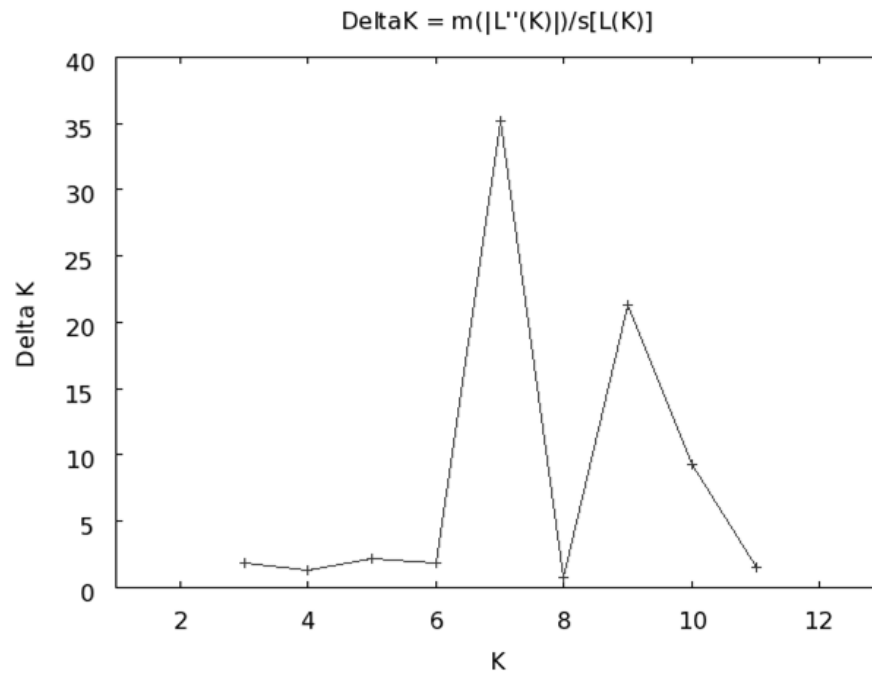
Traits	Eigenvectors								
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
Leaf sheath length (LLS) (cm)	0.382	0.364	0.213	0.094	0.120	0.358	0.646	0.158	0.289
Leaf sheath width (WLS) (cm)	0.230	0.083	0.579	0.372	0.586	0.018	-0.205	-0.196	-0.207
Inflorescence stem length (ISL) (cm)	0.392	0.098	0.422	0.206	0.060	0.646	-0.388	0.062	-0.204
Average length of inflorescence branches (ALIB) (cm)	0.465	0.041	0.339	0.052	0.130	-0.337	-0.080	-0.586	0.429
Leaf blade length (LBL),(cm)	0.480	0.188	0.109	0.065	0.041	-0.552	-0.033	0.528	-0.363
Leaf blade width (LBW) (cm)	0.223	0.403	0.069	0.676	0.482	-0.108	0.244	0.070	0.134
Leaf blade hairiness (HLB)	0.230	0.266	0.508	0.263	0.621	-0.012	0.247	0.286	0.145
Length spikelet (LS) (mm)	0.216	0.555	0.088	0.371	0.020	0.114	0.389	-0.272	-0.512
Width spikelet (WS) (mm)	0.228	0.523	0.210	0.374	0.039	0.110	-0.334	0.387	0.465
Eigenvalue	2.967	2.002	1.458	0.777	0.582	0.406	0.354	0.269	0.184
Total variance explained (%)	32.96	22.24	16.20	8.64	6.47	4.51	3.94	2.99	2.05
Cumulative total variance explained (%)	32.96	55.21	71.41	80.05	86.52	91.03	94.96	97.95	100.00

Appendix S3. Botanical identification of *Paspalum notatum* accessions according to different authors and corresponding Structure.

ID	Parodi (1948)	Barreto (1974)	Canto-Dorow (1993)	Structure group
	Variety	Form	Biotype	
M6	<i>typicum</i>	common	D major	
49	<i>typicum</i>	common	D major	
M5	<i>typicum</i>	common	D major	
M49	<i>typicum</i>	common	D major	A
M14	<i>typicum</i>	common	D major	
M17	<i>typicum</i>	common	D major	
M18	<i>typicum</i>	common	D major	
M7	<i>typicum</i>	common	D major	
59	<i>typicum</i>	common	D major	
M35	<i>typicum</i>	common	C	
M31	<i>typicum</i>	common	B	
M29	<i>typicum</i>	common	B	D
M10	<i>typicum</i>	common	B	
M11	<i>typicum</i>	common	B	
M27	<i>typicum</i>	common	B	
M26	<i>typicum</i>	common	B	
M25	<i>typicum</i>	common	B	
M23	<i>typicum</i>	common	B	B
M28	<i>typicum</i>	common	B	
M24	<i>typicum</i>	common	B	
M33	<i>typicum</i>	common	B	
M30	<i>typicum</i>	common	B	
M66	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana hairy	D major	
M67	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana hairy	D major	
55	<i>latiflorum</i>	-	-	G
54	<i>latiflorum</i>	-	-	
M56	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana hairy	D major	
M55	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana hairy	D major	
64	-	-	-	
65	-	-	-	
M8	<i>typicum</i>	Giant	A	C
62	<i>typicum</i>	Giant	A	
M50	<i>typicum</i>	Giant	A	
M32	<i>typicum</i>	Giant	A	
M39	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana	A	
M37	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana	A	
M46	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana	A	
M44	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana	A	F
M42	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana	A	
M38	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana	A	
M36	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana	A	
M41	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana	A	
M51	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana	A	
61	-	-	-	
60	-	-	-	
52	-	-	-	
M54	<i>latiflorum</i>	Giant	A	E
53	-	Giant	A	
M4	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana	A	
57	<i>latiflorum</i>	Giant	A	
48	-	Uruguaiana	A	
56	<i>latiflorum</i>	Giant	A	
M2	<i>latiflorum</i>	Uruguaiana	A	
66	-	-	-	
Pens	. <i>saurae</i>	<i>P. saurae</i>	<i>saurae</i>	G
63	<i>saurae</i>	<i>P. saurae</i>	<i>saurae</i>	
58	. <i>saurae</i>	<i>P. saurae</i>	<i>saurae</i>	

* *typicum* = var. *notatum*

Appendix S4. Magnitude of ΔK from structure analysis of K (mean \pm s.d. over 10 replicates), calculated following the ΔK method proposed by Evanno *et al.* (2005), for *Paspalum notatum* microsatellite data. The modal values of these distributions indicate the true K or the uppermost level of structure is seven 'genetic clusters'.



Capítulo VIII

DISCUSSÃO

VIII. DISCUSSÃO

Ao longo das últimas décadas o gênero *Paspalum* vem despertando o interesse de muitos pesquisadores, não só pela importância econômica de muitas de suas espécies, mas também devido à apomixia, aloploidia, autoploidia e hibridação interespecífica, mecanismos que estão envolvidos na evolução deste gênero.

Paspalum tem distribuição tropical e subtropical, com grande concentração de espécies nas Américas (Chase, 1929; Clayton & Renvoize, 1986). E, apesar do Brasil ser considerado o centro de diversidade do gênero (Rua, 2006; Judziewicz; 1990; Chase, 1929), com a ocorrência de cerca de 220 espécies (Valls & Pozzobon, 1987), poucas espécies são bem estudadas.

Os primeiros estudos brasileiros em *Paspalum* datam da década de 1950 e foram iniciados e estimulados pelo grande conhecedor dos campos nativos do estado do Rio Grande do Sul, o cientista e educador Prof. Dr. Ismar Leal Barreto (Barreto, 1952; 1954; 1956; 1957; 1965; 1966; 1974). A partir de seus estudos, extensas coletas foram feitas e inúmeros trabalhos foram realizados em *Paspalum*, tanto em aspectos agrônômicos, botânico, como citogenéticos.

Até meados da década de 1980, os trabalhos em *Paspalum* eram quase que exclusivamente realizados no Sul do Brasil, englobando, principalmente, espécies forrageiras subtropicais. Contudo, a partir dessa década, a necessidade de um uso racional e intensivo de gramíneas em pastagens levou à formação de várias coleções de gramíneas forrageiras nativas da América do Sul, a partir de inúmeras viagens de coleta através do Brasil, Paraguai, Argentina, Bolívia e Uruguai. Como resultado, uma importante coleção para gramíneas nativas foi estabelecida na Embrapa/Cenargen (Embrapa Recursos

Genéticos e Biotecnologia), Brasília, DF. Uma pequena parte desta coleção foi duplicada no IBONE, Instituto de Botânica de Corrientes, Argentina, para estudos citogenéticos e caracterização do método de reprodução (Quarín *et al.*, 1996).

Nessas coleções, *Paspalum* é um dos gêneros mais importantes. Segundo Valls (1992) cerca de 1500 acessos de diferentes espécies de *Paspalum* estavam disponíveis no Cenargen. Com o aumento da necessidade operacional de distribuir o germoplasma entre vários centros de pesquisa no país, a Embrapa/Cenargen, alocou parte de sua coleção na Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos, SP. Acessos, principalmente, dos grupos Plicatula e Virgata de *Paspalum* estão sendo rotineiramente avaliados nesse centro quanto a aspectos morfológicos, agronômicos e zootécnicos (Batista *et al.*, 1994; 1995).

A partir dessas coletas, um grande número de trabalhos foi realizado, proporcionando um conhecimento mais aprofundado dos diferentes táxons de *Paspalum*. Incluindo estudos taxonômicos (Canto-Dorow, 1993; 1996; Oliveira, 1996; 2004; Oliveira & Valls, 2002), citogenéticos (Honfi *et al.*, 1990; Freitas *et al.*, 1997; Takayama *et al.*, 1998; Pagliarini *et al.*, 1999; 2001; Adamowski *et al.*, 2000; 2005; Pozzobon & Valls, 1987; 2003; Pozzobon *et al.*, 2008; Quarín *et al.*, 1996; 1997), genético-moleculares (Casa *et al.*, 2002; Ferreira & Souza-Chies, 2005; Miz & Souza-Chies, 2006; Souza-Chies *et al.*, 2006; Essis & Souza-Chies, 2006), agronômicos (Batista *et al.*, 1987; 1994; 1995; 2005; Batista & Godoy, 1998; 2000; Valentim *et al.*, 2000), entre outros. Além disso, novas coletas têm sido feitas e vários acessos de *Paspalum* estão disponíveis na Faculdade de Agronomia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Tais coleções são compostas, principalmente, por espécies Sul Brasileiras com potencial forrageiro para regiões subtropicais do Brasil, e estudos agronômicos, genéticos e citogenéticos foram e estão

sendo realizados (Steiner, 2005; Cidade, 2006; Dahmer, 2007; Reis, 2008; Pereira, 2009; Lopes, 2009, entre outros).

Atualmente, na Embrapa Pecuária Sudeste, 312 acessos, provenientes de coletas realizadas por todo o país, são conservados *in vivo* e, apesar das avaliações constantes desta coleção, e revisões taxonômicas (Oliveira, 2004), muitas espécies de *Paspalum*, especialmente aquelas incluídas no Grupo Plicatula, ainda encontram-se não identificadas e tratadas como, por exemplo, *Paspalum sp.* (Grupo Plicatula). O uso e melhoramento de alguns acessos de interesse, no entanto, são freqüentemente limitados pela dificuldade de correta identificação taxonômica, falta de caracterização do sistema reprodutivo e desconhecimento sobre a amplitude da variabilidade genética existente.

Devido à reconhecida utilidade de marcadores moleculares em programas de melhoramento e na caracterização de espécies vegetais, estes têm sido amplamente utilizados com objetivos diversos, entre os quais caracterizar genótipos de *Paspalum* mantidos em bancos de germoplasma (Liu *et al.*, 1994; 1995; Jarret *et al.*, 1998; Espinosa *et al.*, 2006), bem como, mapear genes, principalmente, relacionados à apomixia (Martínez *et al.*, 2001; 2003; Pupilli *et al.*, 2004 Stein *et al.*, 2007), entre outros. Contudo, no Brasil, os estudos genético-moleculares em *Paspalum*, no geral, ainda são preliminares, muitas vezes englobando a caracterização genética de poucas espécies, restritas ou mais adaptadas a regiões subtropicais do país, com auxílio de marcadores moleculares, no geral, multi-locos (RAPD, ISSR) como, por exemplo, os estudos realizados na Faculdade de Agronomia, Instituto de Biociências (UFRGS) e colaboradores (supracitados).

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados, os microssatélites apresentam características apreciáveis, tais como, codominância (em diplóides), multialelismo e alto

grau de polimorfismo, contudo, estes marcadores são, no geral, espécie-específico, e para *Paspalum*, poucos marcadores microssatélites estavam disponíveis para as espécies *P. vaginatum* Sw. (Liu *et al.*, 1995) e *P. dilatatum* Poir. e espécies relacionadas (Speranza & Malosetti, 2007).

No presente trabalho um conjunto de marcadores moleculares microssatélites é disponibilizado para diferentes espécies de *Paspalum*. O trabalho de desenvolvimento desses marcadores iniciou-se em 2006 por nosso grupo, a partir da construção de bibliotecas genômicas, enriquecidas em sequências repetitivas, para *P. atratum*, *P. notatum*, *P. regnellii* e, posteriormente, para *P. dilatatum*. Uma vez construídas as bibliotecas, foram sequenciados um total de 192 clones isolados para cada espécie e, das sequências obtidas, foram desenhados um total 86, 74, 46 e 94 pares de *primers* para cada espécie, respectivamente. Até o presente momento, foram testados os *primers* desenhados para *P. atratum* e *P. notatum*, razão pela qual somente os microssatélites desenvolvidos para estas duas espécies são apresentados.

Avanços significativos foram alcançados nos estudos em *Paspalum* durante a execução deste trabalho. Nos Capítulos IV e V, são apresentados os primeiros relatos de isolamento de microssatélites para as espécies *P. atratum* e *P. notatum*, e locos polimórficos foram identificados e mostraram-se eficazes para avaliar a variabilidade natural existente nas diferentes espécies.

Apesar das dificuldades encontradas durante a caracterização dos microssatélites desenvolvidos para *P. atratum* (grupo Plicatula), pois este acesso talvez possa corresponder a um híbrido natural, como relatado no Capítulo IV, a maioria desses locos foi amplificado com sucesso em outras espécies, possibilitando uma avaliação mais abrangente, incluindo

35 espécies de *Paspalum*, pertencentes a 14 grupos informais. Através desse estudo, apresentado detalhadamente no Capítulo VI, foi possível discriminar a maioria das espécies analisada, dessa forma fornecendo subsídios para auxiliar na identificação botânica de muitos acessos de *Paspalum* conservados em bancos de germoplasma. Contudo, estudos mais detalhados devem ser feitos, principalmente, em relação ao complexo de espécies pertencentes ao grupo Plicatula de *Paspalum*, como discutido no Capítulo citado. Por outro lado, esses marcadores não se mostraram tão eficientes na caracterização genética intraespecífica de *P. notatum*.

Finalmente, no Capítulo VII, com um estudo mais abrangente e sofisticado envolvendo a análise genética de acessos de *P. notatum*, uma espécie que apresenta ampla variação morfológica e genética (Barreto, 1974; Canto-Dorow, 1993; Steiner, 2005; Cidade *et al.*, 2008), foi observado uma estruturação genética dos acessos em sete distintos grupos gênicos. Tais agrupamentos foram corroborados por diferentes métodos de análise. As evidências morfológicas e moleculares obtidas neste estudo suportam a divisão dessa espécie em três variedades botânicas, previamente descritas por Döll (1877) e Parodi (1948), pois houve uma forte tendência de acessos de variedade botânica idêntica agruparem-se nos mesmos grupos gênicos.

Apesar dos avanços obtidos neste trabalho de tese, há ainda um imenso caminho para trilhar, pois o gênero *Paspalum* apresenta complexos mecanismos envolvidos ao longo da formação de suas espécies.

Capítulo IX
CONCLUSÕES

IX. CONCLUSÕES

A principal conclusão deste trabalho refere-se à contribuição significativa que ele trouxe para o conhecimento da variabilidade genética e a sua organização no gênero *Paspalum*, tanto em nível intra quanto interespecífico, os quais serão mais bem explicados a seguir. Tais resultados foram obtidos pelo estudo de inúmeros acessos de diferentes espécies de *Paspalum* com uma metodologia genético-molecular, empregando-se marcadores moleculares do tipo microssatélites.

A metodologia empregada na construção da biblioteca enriquecida foi eficiente nas duas espécies estudadas e possibilitou o desenvolvimento de marcadores polimórficos que podem ser utilizados na avaliação da diversidade genética de coleções, no estudo de estrutura de populações naturais, na distinção de variedades comerciais, entre outras aplicações.

Dentre os microssatélites desenvolvidos, doze amplificaram eficientemente em diferentes espécies de *Paspalum*, os quais se mostram muito úteis na discriminação dos táxons estudados, exceto para as espécies do grupo *Plicatula*, as quais devem ser reavaliadas. O uso desses locos em uma avaliação inicial do banco de germoplasma pode auxiliar na identificação das espécies e também pode ser útil em estudos de hibridação interespecífica. No entanto, a utilização desses microssatélites em estudos populacionais de diferentes espécies de *Paspalum* deve ser realizada com cautela devido à possível presença de alelos nulos.

Trinta locos SSRs desenvolvidos ao longo desse trabalho foram eficazes na avaliação da diversidade genética do banco de germoplasma de *P. notatum*, revelando uma

grande diversidade genética e estruturação genética entre os acessos. A abordagem metodológica utilizada permitiu uma melhor compreensão da organização genética de diferentes genótipos de *P. notatum*, e a comparação com caracteres morfológicos forneceu evidências para apoiar a existência de três variedades botânicas [*P. notatum* var. *notatum*, *P. notatum* var. *saurae* e *P. notatum* var. *latiflorum* (Parodi, 1948)], as quais são representadas por *pool* gênicos diferentes, com poucas exceções. No entanto, houve uma grande variação genética dentro de cada variedade, merecendo um estudo mais detalhado. Sugerimos o uso da abordagem metodológica desse trabalho em estudos de outras espécies vegetais, especialmente aquelas que têm grande variação morfológica e são difíceis de identificar.

Além disso, os microssatélites utilizados e desenvolvidos ao longo deste trabalho mostraram-se promissores para o uso como DNA fingerprinting na identificação de cultivares de *P. notatum*. Estes marcadores SSR podem auxiliar substancialmente na classificação taxonômica e em programas de melhoramento da espécie.

Capítulo X
PERSPECTIVAS

X. PERSPECTIVAS

Os marcadores microssatélites desenvolvidos ao longo deste trabalho servirão como ferramentas moleculares para futuros estudos genéticos em *Paspalum*, podendo ser usados: na identificação de híbridos, caracterização de cultivares, identificação de diferentes espécies, seleção de genitores para cruzamentos, avaliação do fluxo gênico, estrutura populacional e verificação da taxa de cruzamento, entre outras aplicações.

Um grande número dos marcadores microssatélites desenvolvidos para *P. notatum* possui características desejáveis para utilização como DNA *fingerprint* em diferentes cultivares dessa espécie. Futuros estudos envolvendo cultivares de *P. notatum* devem ser realizados, a fim de confirmar o potencial uso desses marcadores na identificação de cultivares, pois bandas específicas foram observadas em algumas cultivares, como a cultivar André da Rocha. No nosso trabalho, a maioria dos acessos analisados não eram cultivar.

Além disso, nós também observamos que o Grupo Plicatula de *Paspalum*, provavelmente, ainda permanece com problemas de circunscrição de algumas espécies. Tais problemas se dão, principalmente devido à complexidade evolutiva deste grupo, onde a hibridação natural, a poliploidia e a apomixia estão envolvidas. Além disso, as características morfológicas apresentadas entre muitas espécies deste grupo são contínuas, o que dificulta a identificação das espécies. Tendo em vista uma melhor compreensão desse grupo, há uma necessidade de um estudo genético mais detalhado, envolvendo marcadores cloroplastidiais, além dos nucleares específicos a integrantes do grupo Plicatula. Sendo assim, propõe-se para melhorar o conhecimento do grupo Plicatula a realização de análises envolvendo abordagens de filogenética molecular, bem como de genética molecular,

buscando encontrar os grupos geneticamente mais próximos, e comparando os resultados obtidos aqueles resultantes de estudos envolvendo análises morfológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; BATISTA, L. A. R. Chromosome number and microsporogenesis in *Paspalum maritimum* (caespitosa group; gramineae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 3, p. 301-305, 2000.
- ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; BONATO, A. B. M.; BATISTA, L. A. R.; VALLS, J. F. M. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 773-780, 2005.
- ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 2, p. 135-41, 2005.
- APPELS, R.; MORRIS, R.; GIL, B. S.; MAY, C. E. Multiples of basic chromosome numbers – Polyploidy. In: R. Appels; R. Morris; B. S. Gil; C.E. May (Eds.); **Chromosome Biology**. p.139-158, 1998. Boston: Kluwer Academic.
- ARAÚJO, A. A. **Principais gramíneas do Rio Grande do Sul (agrostologia rio-grandense)**. Porto Alegre: Sulina, 1971.
- ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. O emprego de enzimas de restrição para análise de polimorfismos no DNA. In: S. R. MATIOLI (Ed.); **Biologia Molecular e Evolução**. p.143-152, 2001. Ribeirão Preto: Holos.
- BARRETO, I.L. Contribuição ao estudo das gramíneas indígenas e cultivadas do Rio Grande do Sul. **Veterinária**, v. 6, n. 4, p. 153-186, 1952.
- BARRETO, I.L. Las especies afines a *Paspalum virgatum* en la América del Sur. **Revista Argentina de Agronomía**, v. 21, n. 3, p. 125-142, 1954.
- BARRETO, I.L. 1956. Las especies afines a *Paspalum plicatulum* en Rio Grande del Sur (Brasil). **Revista Argentina de Agronomía**, v. 23, n. 2, p. 53-70, 1956.
- BARRETO, I.L. Las especies de *Paspalum* com dos racimos conjugados en Rio Grande del Sur (Brasil). **Revista Argentina de Agronomía**, v. 24, n. 3, p. 88-117, 1957.

- BARRETO, I.L. As espécies de *Paspalum* (Gramineae) afins a *Paspalum corcovadense* no Rio Grande do Sul. **Revista Argentina de Agronomia**, v. 7, n. 3/4, p. 197-210, 1965.
- BARRETO, I.L. Las especies afines a *Paspalum quadrifarium* (Gramineae) en la América del Sur de clima subtropical y templada. **Darwiniana**, v. 14, n. 1, p. 130-155, 1966.
- BARRETO, I. L. **O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1974.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BASHAW, E. C.; FORBES, J. R. Chromosome numbers and microsporogenesis in dallisgrass *Paspalum dilatatum* Poir. **Agronomy Journal**, v. 50, p. 441-445, 1958.
- BATISTA, L. A. R.; GODOY, R.; VALLS, J. F. M. Melhoramento genético de forrageiras do gênero *Paspalum*. Encontro Internacional sobre melhoramento genético de *Paspalum*. **Anais...** p.49, 1987. Nova Odessa.
- BATISTA, L.A.R.; GODOY, R.; PEREIRA, J.M.C. Avaliação do potencial forrageiro de espécies do gênero *Paspalum*. Ensaio 1992/93. Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...** 31, 1994, Maringá.
- BATISTA, L.A.R.; GODOY, R.; PEREIRA, J.M.C. 1995 Potencial forrageiro de acessos do gênero *Paspalum* no ensaio de 1993/94. Anais da XXXII Reunião Anual da SBZ. **Anais...** p. 62-64, 1995, Brasília, DF.
- BATISTA, L.A.R.; GODOY, R. Variabilidade intraespecífica em *Paspalum notatum* Flügge. 43º Congresso Nacional de Genética, Goiânia. **Anais...** p. 323, 1997, Ribeirão Preto.
- BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Capacidade de produção de sementes em acessos do gênero *Paspalum*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 5, p. 841-847, 1998.
- BATISTA, L.A.R.; GODOY, R. Caracterização Preliminar e Seleção de Germoplasma do Gênero *Paspalum* para Produção de Forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 23-32, 2000.
- BATISTA, L. A. R., MEIRELLES, P. R. L., GODOY, R. (2005) Produção e qualidade da forragem em acessos selecionados de “*Paspalum*” na região central do Estado de São

- Paulo. In: Reunião **Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, **42**, 2005, Goiânia, Anais...Goiânia: UFG, Virtual, PROEC, 4p. 1 CD ROM.
- BOLDRINI, I.; MARASCHIN, G. E. Introdução e avaliação de gramíneas nativas para o Sul do Brasil – I- *Paspalum plicatulum* Michx.; II- *Paspalum notatum* Fl. (preliminares). Congresso Latinoamericano de Botânica, 4., 1986. **Anais...** , 1986. Medellín: Anais. Medellín.
- BORNET, B.; MULLER, C.; PAULUS, F.; BRANCHARD, M. Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri-and tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.). **Genome**, v. 45, n. 5, p. 890–896, 2002.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v. 23, n. 3, p. 314-331, 1980.
- BRAMMER, S. P. **Variabilidade e diversidade genética vegetal: requisito fundamental em um programa de melhoramento**. Passo Fundo: Embrapa, 2002.
- BULLETIN OF MISCELLANEOUS INFORMATION. *Paspalum dilatatum*, an American Fodder-Grass. **Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Gardens, Kew)**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 1902.
- BURSON, B. L. Genome relations between *Paspalum conspersum* and two diploid *Paspalum* species. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 20, p. 365-372, 1978.
- BURSON, B. L. Phylogenetic of apomict *Paspalum dilatatum*. XVI Internacional Grassland Congress, 1989. **Anais...** p.413-414, 1989. Nice.
- BURSON, B. L. Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. **Botanical Gazette**, v. 152a, n. 2, p. 219-223, 1991.
- BURSON, B. L. Homology of chromosomes of the X genomes in common and Uruguayan dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. **Genome**, v. 34, p. 950-953, 1991.

- BURSON, B. L. Genome relationship and reproductive behavior of intraspecific *Paspalum dilatatum* Hybrids: Yellow-Anthered x Uruguaiana. **International Journal of Plant Sciences**, v. 156, n. 3, p. 326 - 331, 1995.
- BURSON, B. L. Apomixis and sexuality in some *Paspalum* species. **Crop science**, v. 37, n. 4, p. 1347-1351, 1997.
- BURSON, B. L.; LEE, H.; BENNETT, H. W. Genome relations between tetraploid *Paspalum dilatatum* and four diploid *Paspalum* species. **Crop Science**, v. 13, n. 6, p. 739-743, 1973.
- BURSON, B. L.; QUARÍN, C. L. Cytology of *Paspalum virgatum* and its relationship with *P. intermedium* and *P. jurgensii*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 24, n. 2, p. 219-226, 1982.
- BURSON, B. L.; VOIGT, P. W.; EVERS, G. W. Cytology reproductive behavior, and forage potential of hexaploid dallisgrass biotypes. **Crop science**, v. 31, n. 3, p. 636-641, 1991.
- BURTON, G. W. A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 60, p. 193-197, 1940.
- BURTON, G. W. Dallisgras seed sources. **Journal of the American Society of Agronomy**, V. 37, n. 2, p. 458-68, 1945.
- BURTON, G. W. The method of reproduction in common Bahia grass, *Paspalum notatum*. **Journal American Society of Agronomy**, v. 40, p. 443-452, 1948.
- BURTON, G. W. Conventional breeding of dallisgrass *Paspalum dilatatum* Poir. **Crop Science**, v. 2, n. 6, p. 491-494, 1962.
- BURTON, G. W. A search for the origin of Pensacola Bahia grass. **Economic Botany**, v. 21, n. 4, p. 379-382, 1967.
- CANTO-DOROW, T. S. **Revisão taxonômica das espécies sul-riograndenses de *Paspalum* L. (grupo Notata) Poaceae - Paniceae, com ênfase na análise da variação intra-específica de *Paspalum notatum* Flüge**, 1993. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- CANTO-DOROW, T. S.; LONGHI-WAGNER, H. M.; VALLS, J. F. M. Revisão taxonômica das espécies de *Paspalum* grupo Notata (Poaceae-Paniceae) do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, v. 47, p. 3-44, 1996.
- CAPONIO, I.; QUARÍN, C. L. Intra-and interspecific hybridization between dallisgrass and vaseygrass. **Crop science**, v. 30, p. 362-364, 1990.
- CARVALHO, F. I. F.; LORENCETTI, C. **Condução de populações no melhoramento genético de plantas**. 2nd ed. Pelotas: UFPel, 2003.
- CASA, A. M.; MITCHELL, S. E.; LOPES, C. R.; VALLS, J. F. M. RAPD analysis reveals genetic variability among sexual and apomictic *Paspalum dilatatum* Poiret biotypes. **Journal of Heredity**, v. 93, n. 4, p. 300-302, 2002.
- CHASE, A. The North American species of *Paspalum*. **Contributions from the United States National Herbarium**, v. 28, p. 1-310, 1929.
- CHEN, Z. J.; NI, Z. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 28, n. 3, p. 240-52, 2006.
- CIDADE, F. W. **Análise da variabilidade genética de *Paspalum notatum* Flüggé (Poaceae, Panicoideae) com o uso de marcadores moleculares, morfológicos e citometria de fluxo**, 2006. UFRGS.
- CIDADE, F. W.; DALL'AGNOL, M.; BERED, F.; SOUZA-CHIES, T. T. Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flüggé (Paniceae: Panicoideae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, n. 2, p. 235-246, 2008.
- CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. **Genera graminum: grasses of the world**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986.
- COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature reviews. Genetics**, v. 6, n. 11, p. 836-46, 2005.
- CONDIT, R.; HUBBELL, S. P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, v. 34, n. 1, p. 66-71, 1991.

- CORDEIRO, G. M.; CASU, R.; MCINTYRE, C. L.; MANNERS, J. M.; HENRY, R. J. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to *Erianthus* and *Sorghum*. **Plant science**, v. 160, n. 6, p. 1115-1123, 2001.
- DAHMER-BALBINOT, N. **Variabilidade citogenética em uma coleção de acessos de *Paspalum notatum*** Flüggé, 2007. UFRGS.
- DAURELIO, L. D.; ESPINOZA, F.; QUARIN, C. L.; PESSINO, S. C. Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. **Plant Systematics and Evolution**, v. 244, n. 3-4, p. 189-199, 2004.
- DENHAM, S. S.; ZULOAGA, F. O. Phylogenetic relationships of the Decumbentes group of *Paspalum*, *Thrasya*, and *Thrasypopsis* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Aliso**, v. 23, p. 545-562, 2007.
- DENHAM, S. S. Revisión Sistemática del subgénero harpostachys de *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 92, n. 4, p. 463 - 532, 2005.
- DENHAM, S. S. A New Combination for *Thrasya robusta* in *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). **Novon**, v. 16, n. 3, p. 331, 2006.
- DENHAM, S. S.; ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. Systematic revision and phylogeny of *Paspalum* subgenus Ceresia (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 89, n. 3, p. 337 - 399, 2002.
- DÖLL, J. C. Gramineae II. In: C. F. P. Martius; A. W. Eichler (Eds.); **Flora brasiliensis**, vol. 2, pt. 2. p.276-296, 1877. Monachii: F. Fleischer.
- DUVALL, M. R.; NOLL, J. D.; MINN, A. H. Phylogenetics of Paniceae (Poaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, p. 1988-1992, 2001.
- ESPINOZA, F.; DAURELIO, L. D.; PESSINO, S. C.; VALLE, E. M.; QUARIN, C. L. Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 258, n. 3-4, p. 147-159, 2006.

- ESSI, L.; SOUZA-CHIES, T. T. Phylogeny of Linearia and Notata groups of *Paspalum* L. (Poaceae, Panicoideae, Paniceae) and related species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 4, p. 779-791, 2007.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. 1st ed. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1998.
- FERREIRA, T. F.; SOUZA-CHIES, T. T. Genetic diversity among *Paspalum* L. species (Poaceae) belonging to the Notata and Linearia groups based on restriction fragment length polymorphism analyses. **Genetica**, v. 125, n. 2-3, p. 133-40, 2005.
- FORBES, I.; BURTON, G. W. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecific hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüge. **Crop Science**, v. 1, p. 402-406, 1961.
- FREITAS, P. M.; TAKAYAMA, S. Y.; PAGLIARINI, M. S.; BATISTA, L. A. R. Evaluation of meiotic behavior in polyploid accessions of *Paspalum* (Plicatula group). **The Nucleus**, v. 40, n. 1,2, p. 47-52, 1997.
- GARCÍA, M. V.; BALATTI, P. A.; ARTURI, M. J. Genetic variability in natural populations of *Paspalum dilatatum* Poir. analyzed by means of morphological traits and molecular markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 5, p. 935-946, 2007.
- GATES, R. N.; QUARÍN, C. L.; PEDREIRA, C. G. S. Bahiagrass. In: L. Moser; B. L. Burson; L. E. Sollenberger (Eds.); **Warm-Season (C 4) Grasses, Agronomy Monographs 45**. p.651-680, 2004. Madison: ASA, CSSA, and SSSA.
- GAUER, L.; ALBARUS, M. H.; CAVALLI-MOLINA, S. Variabilidade isoenzimática em progênies de biótipos apomíticos de *Paspalum dilatatum* (Poaceae). **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 799-804, 2001.
- GIUSSANI, L. M.; COTA-SANCHEZ, J. H.; ZULOAGA, F. O.; KELLOGG, E. A. A molecular phylogeny of the grass subfamily Panicoideae (Poaceae) shows multiple origins of C4 photosynthesis. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 1993-2012, 2001.
- GIUSSANI, L. M.; ZULOAGA, F. O.; QUARÍN, C. L.; et al. Phylogenetic relationships in the genus *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae): An Assessment of the Quadrifaria and Virgata Informal Groups. **Systematic Botany**, v. 34, n. 1, p. 32-43, 2009.

- GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 39, p. 439-446, 1974.
- HONFI, A. I. ;; QUARIN, C. L. ;; VALLS, J. F. M. Karyological studies in South American grasses. **Darwiniana**, v. 30, p. 87-94, 1990.
- HU, J.; VICK, B. A. Target region amplification polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, n. 3, p. 289-294, 2003.
- IBGE. Censo Agropecuário. 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default.shtm>>. Acesso em: 28/11/2010.
- JACQUES, A. V. A.; NABINGER, C. O ecossistema pastagens naturais. I Simpósio de Forrageiras e Produção Animal. Importância e potencial produtivo da pastagem nativa. **Anais...** p.7-10, 2006. Porto Alegre: Editora da ULBRA.
- JARRET, R. L.; LIU, Z. W.; WEBSTER, R. W. Genetic diversity among *Paspalum* spp. as determined by RFLPs. **Euphytica**, v. 104, p. 119-125, 1998.
- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73, 1985.
- JUDZIEWICZ, E. J. Family 187. Poaceae (Gramineae). **Flora of the Guianas. Series A: Phanerogams. (A.R.A., Görts-van Rijn, ed.)**. v. 8, p.1-727, 1990. Königstein: Koltz Scientific Books.
- LINN, S.; ARBER, W. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 59, n. 4, p. 1300-1306, 1968.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 398-401, 1989.
- LIU, Z W; JARRET, R L; DUNCAN, R R; KRESOVICH, S. Genetic relationships and variation among ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers. **Genome**, v. 37, n. 6, p. 1011-7, 1994.

- LIU, Z.-W.; JARRET, R.L.; KRESOVICH, S.; DUNCAN, R.R. Characterization and analysis of simple sequence repeat (SSR) loci in seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 1, 1995.
- LOPES, R. **Produção de sementes de espécies do gênero *Paspalum***, 2009. UFRGS.
- MARTÍNEZ, E J; URBANI, M. H.; QUARIN, C. L.; ORTIZ, J. P. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. **Hereditas**, v. 135, n. 1, p. 19-25, 2001.
- MARTÍNEZ, E. J.; HOPP, H. E.; STEIN, J.; ORTIZ, J. P. A; QUARIN, C. L. Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. **Molecular Breeding**, v. 12, n. 4, p. 319-327, 2003.
- MESELSON, M.; YUAN, R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. **Nature**, v. 217, n. 5134, p. 1110–1114, 1968.
- MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: S. C. K. Milach (Ed.); **Marcadores Moleculares em Plantas**. p.17-28, 1998. Porto Alegre: UFRGS.
- MIZ, R. B.; SOUZA-CHIES, T. T. Genetic relationships and variation among biotypes of Dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.) and related species using random amplified polymorphic DNA markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, n. 3, p. 541-552, 2006.
- MORAES-FERNANDES, M. I. B. **Citogenética e evolução no gênero *Paspalum* (Gramineae) Porto Alegre–RS**, 1971. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MORAES FERNANDES, M. I. B.; BARRETO, I. S.; SALZANO, F. M.; SACCHET, A. M. O. F. Cytological e evolutionary relationships in brazilian forms of *Paspalum* (Gramineae). **Caryologia**, v. 27, n. 4, p. 455-464, 1974.
- MORRONE, O.; CARBONÓ, E. Revision del Grupo Racemosa del Genero *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 82, n. 1, p. 82-116, 1995.
- MORRONE, O.; DENHAM, S. S.; ALISCIONI, S. S.; ZULOAGA, F. O. Revisión de las especies de *Paspalum* (Panicoideae: Paniceae), subgénero Anachyris. **Candollea**, v. 55, p. 105-135, 2000.

- MORRONE, O.; VEGA, A.; ZULOAGA, F. O. Revisión de las especies del género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae), grupo Dissecta (s. str.). **Candollea**, v. 51, p. 103-138, 1996.
- MORRONE, O.; DENHAM, S. S.; ZULOAGA, F. O. Revisión taxonómica del género *Paspalum* grupo Eriantha (Poaceae, Panicoideae, Paniceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 91, n. 2, p. 225–246, 2004.
- NABINGER, C. Princípios da exploração intensiva das pastagens. In: PEIXOTO, A. M., MOURA, J. C., FARIA, V. P. (Eds.). Simpósio sobre manejo de pastagens: produção animal a pasto, 13, 1997. **Anais...** p. 15-95, 1997. Piracicaba.
- NORRMANN, G. A. Citología y método de reproducción en dos especies de *Paspalum* (Gramineae). **Bonplandia**, v. 5, n. 17, p. 149-158, 1981.
- OLIVEIRA, R. C. **Revisão taxonômica das espécies brasileiras de *Paspalum* L., Grupo Linearia (Gramineae; Paniceae)**, 1996. Universidade Estadual de Campinas.
- OLIVEIRA, R. C. **O gênero *Paspalum* L., grupo Plicatula (Poaceae: Paniceae), no Brasil**, 2004. Universidade Estadual de Campinas.
- OLIVEIRA, R. C.; VALLS, J. F. M. Taxonomia de *Paspalum* L., grupo Linearia (Gramineae-Paniceae) do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 4, p. 371-389, 2002.
- ORTIZ, J. P. A.; PESSINO, S. C.; BHAT, V.; HAYWARD, M. D.; QUARIN, C. L. A genetic linkage map of diploid *Paspalum notatum*. **Crop science**, v. 41, n. 3, p. 823–830, 2001. Crop Science Society of America.
- OTERO, J. R. **Informações sobre algumas plantas forrageiras. Serviço de informação agrícola. n. 11**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1961.
- PAGLIARINI, M. S.; CARRARO, L. R.; FREITAS, P. M.; et al. Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. **Hereditas**, v. 135, n. 1, p. 27-34, 2001.
- PAGLIARINI, M. S.; TAKAYAMA, S. Y.; FREITAS, P. M.; et al. Failure of cytokinesis and 2n gamete formation in Brazilian accessions of *Paspalum*. **Euphytica**, v. 108, n. 2, p. 129-135, 1999.

- PARODI, L. R. Gramíneas Argentinas nuevas o críticas. I. La variación en *Paspalum notatum* Flüggé. **Revista Argentina de Agronomía**, v. 15, p. 53-57, 1948.
- PARODI, L. R. Estudios sistemáticos sobre las Gramineae-Paniceae argentinas y uruguayas. **Darwiniana**, v. 15, n. 1/2, p. 65-111, 1969.
- PEREIRA, E. **Estudo da produção agrônômica e utilização da análise de adaptabilidade e estabilidade como critério de seleção de uma coleção de acessos de *Paspalum nicorae* Parodi**, 2009. UFRGS.
- POZZOBON, M. T.; VALLS, J. F. M. Caracterização citogenética em acessos de germoplasma de espécies brasileiras de *Paspalum* (Gramineae). Encontro Internacional sobre melhoramento genético de *Paspalum*. **Anais...** p.73-78, 1987. Nova Odessa.
- POZZOBON, M. T.; VALLS, J. F. M. Chromosome number in Brazilian germplasm accessions of *Paspalum hydrophilum*, *P. modestum* and *P. palustre* (Gramineae; Paniceae). **Genetics and molecular biology**, v. 26, n. 3, p. 365-36, 2003.
- PRIETO, P.; SHAW, P.; MOORE, G. Homologue recognition during meiosis is associated with a change in chromatin conformation. **Nature cell biology**, v. 6, n. 9, p. 906-908, 2004.
- PUPILLI, F.; MARTINEZ, E. J.; BUSTI, A.; et al. Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. **Molecular genetics and genomics**, v. 270, n. 6, p. 539-48, 2004.
- QUARÍN, C. L. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. **Apomixis Newsletter**, v. 5, p. 8-15, 1992.
- QUARÍN, C. L.; BURSON, B. L.; BURTON, G. W. Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromoerhizon*. **Botanical Gazette**, n. 145, p. 420-426, 1984.
- QUARÍN, C. L.; LOMBARDO, I. P. Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). **Mendeliana**, v. 7, p. 101-107, 1986.
- QUARÍN, C.; NORRMANN, G A; URBANI, M. H. Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. **Apomixis Newsletter**, v. 1, p. 28-29, 1989.

- QUARÍN, C. L.; POZZOBON, M. T.; VALLS, J. F. M. Cytology and reproductive behavior of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: *Paspalum compressifolium*. **Euphytica**, v. 90, n. 3, p. 345-349, 1996.
- QUARÍN, C. L.; VALLS, J. F. M.; URBANI, M. H. Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. **Tropical Grasslands**, v. 31, p. 114-116, 1997.
- RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 2, p. 94-100, 2002.
- RAJORA, O. P.; MOSSELER, A. Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources. **Euphytica**, v. 118, n. 2, p. 197-212, 2001.
- REIS, C. A. O. **Caracterização citogenética e morfológica em uma coleção de acessos de *Paspalum nicorae* Parodi**, 2008. UFRGS.
- RITSCHHEL, P. S.; LINS, T. C. L.; TRISTAN, R. L.; et al. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC plant biology**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2004.
- RUA, G. H. Estudos filogenéticos em Paniceae: os casos de *Paspalum* e *Digitaria*. In: J. E. A. Mariath & R. P. Santos (Eds.); Anais do 57º Congresso Nacional de Botânica Os Avanços da Botânica no início do século XXI morfologia fisiologia taxonomia ecologia e genética. **Anais...** p.170-173, 2006. Porto Alegre: Sociedade Botânica do Brasil.
- RUA, G. H.; SPERANZA, P. R.; VAIO, M.; ARAKAKI, M. A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, p. 227-243, 2010.
- RUA, G. H.; ALISCIONI, S. S. A morphology-based cladistic analysis of *Paspalum* sect. Pectinata (Poaceae). **Systematic Botany**, v. 27, n. 3, p. 489-501, 2002.
- RÖDER, M. S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; et al. A microsatellite map of wheat. **Genetics**, v. 149, n. 4, p. 2007, 1998. Genetics Society of America.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 2, p. 151-157, 2004.

- SHAROPOVA, N.; MCMULLEN, M. D.; SCHULTZ, L.; et al. Development and mapping of SSR markers for maize. **Plant molecular biology**, v. 48, n. 5-6, p. 463-81, 2002.
- SINGH, R. J. Chromosomal aberrations – Numerical chromosome changes. In: R. J. Sing (Ed.); **Plant Cytogenetics**. 2nd ed., p.463, 2003. New York: CRC Press.
- SOARES, H. H. P. R. F.; SILVA, V. P. S.; BASSOLS, P. A.; GUTERRES, E. P.; PERES, P. S. Avaliacao de ecotipos de *Paspalum notatum* Fluegge e *Paspalum nicorae* Parodi em comparacao com Pensacola (*Paspalum sauræ* Parodi). **Anuario Tecnico do Instituto de Pesquisa Zootécnica. “Francisco Osório”**, v. 13, p. 87-119, 1986.
- SOLFERINI, V. N.; SCHEEPMAKER, D. S. Polimosfismos de isozimas. In: S. R. MATIOLI (Ed.); **Biologia Molecular e Evolução**. p.137-142, 2001. Ribeirão Preto: Holos.
- SOUZA-CHIES, T. T.; ESSI, L.; RUA, G. H.; VALLS, J. F. M.; MIZ, R. B. A preliminary approach to the phylogeny of the genus *Paspalum* (Poaceae). **Genetica**, v. 126, n. 1-2, p. 15-32, 2006.
- SPERANZA, P.; MALOSETTI, M. Nuclear and cytoplasmic microsatellite markers for the species of the Dilatata group of *Paspalum* (Poaceae). **Plant Genetic Resources**, v. 5, n. 01, p. 14, 2007.
- SPERANZA, P. R. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 282, n. 1-2, p. 43-56, 2009.
- STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Reading: Addison-Wesley, 1971.
- STEBBINS, G. L. Polyploidy, hybridization and the invasion of new habitats. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 72, n. 4, 824-832, 1985.
- STEIN, J; QUARIN, C. Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. **Theoretical and Applied Genetics**, 2004.

- STEIN, J.; PESSINO, S. C.; MARTÍNEZ, E. J.; et al. A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. **Molecular Breeding**, v. 20, n. 2, p. 153-166, 2007.
- STEINER, M. Caracterização agronômica, molecular e morfológica de acessos de *Paspalum notatum* Flugge e *Paspalum guenoarum* Arech. ,2005.
- SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer, 1992.
- TAKAYAMA, S. Y.; FREITAS, P. M.; PAGLIARINI, M. S.; BATISTA, L. A. R. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum* (Plicatula group) from different regions in Brazil. **Euphytica**, v. 99, n. 2, p. 89-94, 1998.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.
- TEMNYKH, S.; PARK, W. D.; AYRES, N.; et al. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 5, p. 697-712, 2000.
- TISCHLER, C. R.; BURSON, B L. Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicuticular wax content. **Euphytica**, v. 84, p. 229–235, 1995.
- VALENTIM, J. F.; CARNEIRO, J. C.; MOREIRA, P.; VAZ, F. A. **Capim Pojuca: opção forrageira para os solos de baixa permeabilidade do Acre**. Acre, 2000.
- VALLS, J. F. M. Recursos genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil. Encontro Internacional sobre melhoramento genético de *Paspalum*. **Anais...** p.3-13, 1987. Nova Odessa.
- VALLS, J.F.M. 1992. Origem do germoplasma de *Paspalum* disponível no Brasil para a área tropical. In: PIZZARRO, E.A. (Ed.). **Red Internacional de Evaluacion de Pastos Tropicales – RIEPT. 1a Reunión Sabanas**, p. 69-80, 1992. Brasília: EMBRAPA/CPACCIAT.
- VALLS, J. F. M. Impacto do conhecimento citogenético na taxonomia de *Paspalum* e *Axonopus*, Gramineae. Tópicos atuais em botânica: palestras convidadas do 51st Congresso Nacional de Botânica. **Anais...** p.57-60, 2000. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

- VALLS, J. F. M.; POZZOBON, M. T. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. Encontro Internacional sobre melhoramento genético de *Paspalum*. **Anais...** p.16-21, 1987. Nova Odessa.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.
- WANG, M. L.; CHEN, Z. B.; BARKLEY, N. A.; et al. Characterization of seashore *Paspalum* (*Paspalum vaginatum* Swartz) germplasm by transferred ssrs from wheat, maize and sorghum. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, n. 4, p. 779-791, 2006.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, n. 2, p. 176-183, 1994.
- ZULOAGA, F. O.; PENSIERO, J.; MORRONE, O. Systematics of *Paspalum* Group Notata (Poaceae- panicoideae- Paniaceae). **Systematic Botany Monographs**, v. 71, p. 1-75, 2004.
- ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v. 102, p. 1-297, 2005.