

ELETROFORESE DE ISOENZIMAS DE PLÂNTULAS NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Brachiaria*¹

CIBELE C. MARTINS², DAGOBERTO MARTINS³, EDSON S. MORI³, FRANCISCO H. D. DE SOUZA⁴ e PAULO R.R. RAMOS⁵

RESUMO

Lotes de sementes de braquiária comercializados no Brasil vem apresentando contaminações com sementes de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero. Deste modo, uma das espécies de braquiária atuaria como planta infestante da outra no agroecossistema e a erradicação da espécie infestante seria dificultada pela agressividade característica do gênero e pela falta de seletividade dos herbicidas disponíveis no mercado. Esses fatores ressaltam a importância da comercialização e utilização de lotes de sementes isento de sementes de outras espécies e a utilização de metodologias precisas de identificação das principais espécies de braquiária no controle de qualidade das empresas produtoras de sementes. Neste trabalho, buscou-se avaliar o potencial discriminante da técnica de eletroforese, utilizando quatro sistemas enzimáticos presentes em plântulas de quatro espécies do gênero *Brachiaria*, quer sejam *B. brizantha* cv. Marandu,

B. decumbens cv. Basilisk, *B. humidicola* cv. comercial e *B. plantaginea*. Foram realizadas análises de eletroforese de isoenzimas testando-se 50 indivíduos de cada espécie por tratamento, utilizando-se coleótilos de plântulas obtidas a partir de sementes germinadas a 30°C, no escuro. Para a eletroforese foi utilizado como meio suporte géis de poliácridamida, nas concentrações de 7,0 e 7,5%. As isoenzimas Glutamato desidrogenase e Glucose-6-fosfato desidrogenase, embora eficientes na diferenciação entre *B. plantaginea* e *B. humidicola* e entre as sementes dessas espécies e as de *B. brizantha* ou *B. decumbens*, não se mostraram capazes de diferenciar as sementes destas duas últimas espécies. Entretanto, as isoenzimas α - e β -esterase possibilitaram uma nítida diferenciação das quatro espécies de *Brachiaria* estudadas.

Palavras Chave: Planta daninha, sementes, mistura varietal, controle de qualidade.

ABSTRACT

Electrophoresis of *Brachiaria* seedling isoenzymes as a tool for species identification

Undesirable physical seed mixture in commercial seed lots of several *Brachiaria* species is a cause of growing concern in Brazil. Such a mixtures often result in the contamination of cultivated areas by species which are difficult to eradicate in consequence of their aggressivity and of the low selectivity of available herbicides. The obtention of contamination-free seed lots is, therefore, of great interest and so are the

techniques for the precise identification of *Brachiaria* species, which would allow the improvement of quality control by commercial enterprises. This paper reports an attempt of evaluating the discriminatory potential of the electrophoretic technique applied to four enzymatic systems present in seedlings of four *Brachiaria* species, namely, *B. brizantha* cv. Marandu, *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. humidicola* "cv.

¹ Recebido para publicação em 12/06/98 e na forma revisada em 20/12/98.

² Bolsista Jovem Pesquisador/FAPESP/Deptº Produção Vegetal da FCA/UNESP. C.P.237, CEP: 18603-970 Botucatu/SP, Brasil. E-mail: cibele@fca.unesp.br

³ Profº Assistente Doutor do Deptº de Produção Vegetal da FCA/UNESP.

⁴ Engº Agrº, Doutor, Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste. C.P. 339, CEP: 13560-970, São Carlos/SP.

⁵ Profº Assistente Doutor do Deptº Física e Biofísica do IB/UNESP. C.P. 510, CEP: 8618-000, Botucatu/SP.

common”, and *B. plantaginea*. Fifty coleoptiles of each species, obtained from seeds germinated in the dark at 30°C, were used in each treatment. Polyacrylamide gels, at 7.0% and 7.5%, were used as supporting gels. The banding pattern resulted from the electrophoresis of the isozymes Glutamate dehydrogenase and Glucose-6-phosphate dehydrogenase allowed the differentiation of

B. plantaginea and *B. humidicola* between themselves and these from *B. brizantha* and *B. decumbens*, but not the differentiation between the later species. However, when the isozymes α - and β -esterase were used, a clear distinction of the four species studied was possible.

Key words: Weed, seed, varietal mixture, quality control.

INTRODUÇÃO

No Brasil, *B. decumbens*, *B. brizantha*, e *B. humidicola* são utilizadas como pastagens perenes, estimando-se que, no mínimo, 35 milhões de equitares são cultivados com essas espécies (Vera *et al.*, 1992). A *B. plantaginea*, apesar de apresentar algum valor forrageiro, é reconhecida como uma das principais plantas daninhas de áreas cultivadas. Também a *B. decumbens* tem se destacado como planta daninha, em especial, em áreas de cultivo de cana-de-açúcar e de essências florestais.

A identificação correta das diferentes espécies é de interesse científico e econômico. Identificações incorretas possibilitam misturas de espécies e variedades, por exemplo, na produção e no comércio de sementes. Isto resulta em prejuízos por levar à utilização de técnicas inadequadas de manejo, utilização ou controle de espécies vegetais. Este fato é de tal importância, que a maioria dos países adotam padrões legais de tolerância máxima de contaminação de lotes de sementes por sementes de outras espécies e variedades e de plantas daninhas. Deve-se considerar que, uma vez implantada a pastagem, a erradicação de uma espécie de braquiária em área formada com outra espécie do mesmo gênero é dificultada pela agressividade e rusticidade das plantas e pela falta de seletividade dos herbicidas disponíveis no mercado (Rodrigues e Reis, 1994).

Espécies e variedades do gênero *Brachiaria* podem ser identificadas pelas características morfológicas das plantas (Sendulski, 1977). No entanto, a identificação é difícil ou, às vezes, impossível, quando baseada

exclusivamente na morfologia das sementes. Este tipo de identificação é um procedimento padrão dos laboratórios de análise de sementes. Características como coloração, tamanho, pilosidade, entre outras, variam em função de condições de fertilidade de solo e clima do local de sua produção; época de colheita, período de armazenamento, tempo de contato com o solo e a escarificação das sementes também contribuem para descaracterizá-las (Souza, 1994). A diferenciação pelas características das sementes, mesmo quando estas apresentam-se intactas, é particularmente difícil entre *B. decumbens* e *B. brizantha*, que pertencem ao mesmo complexo agâmico (Sendulski, 1977).

O potencial de técnicas eletroforéticas em sistemas de enzimas polimórficos, na identificação de espécies e variedades de plantas, tem sido largamente reconhecido, principalmente em função de se constituírem em marcadores estáveis, pouco influenciados pelo meio-ambiente (Keller-Grein *et al.*, 1996). Ferguson & Grabe (1986) citam trabalhos realizados com plantas de nove gêneros de poaceas e de leguminosas, tanto de polinização cruzada quanto de auto-polinização, onde este potencial foi avaliado. No caso de espécies apomíticas, tal como é o caso de muitas espécies do gênero *Brachiaria* (Valle & Savidan, 1996), esta técnica pode ser especialmente interessante face à inexistência de variações anatômicas ou morfológicas entre as plantas deste grupo, o que deve aumentar o grau de precisão nas interpretações dos resultados da eletroforese. Por estas razões, esta técnica tem sido utilizada na identificação de híbridos de *Brachiaria* (Cruz *et al.*, 1989; Hacker, 1988; Keller-Grein *et al.*, 1996).

Os princípios destas técnicas são detalhados por Payne (1987). Vários protocolos para análise eletroforetica foram determinados (Cheliak & Pitel, 1984; Alfenas, 1998). A principal limitação do seu uso consiste da necessidade de se conhecer, para cada espécie ou grupo de espécies, os sistemas enzimáticos mais discriminantes. Uma vez conhecidos, esta técnica é relativamente simples e rápida.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial discriminante da técnica de eletroforese, utilizando quatro sistemas enzimáticos presentes em plântulas de quatro espécies do gênero *Brachiaria*.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia do Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP-Campus de Botucatu (SP). Foram utilizadas sementes genéticas de *B. brizantha* cv. Marandu, procedentes do CNPQC/EMBRAPA, sementes

fiscalizadas de *B. humidicola* cv. comum e de *B. decumbens* cv. Basilisk procedentes do Estado do Mato Grosso do Sul e sementes de *B. plantaginea* coletadas de várias plantas espontâneas em Santo Antonio de Posse/SP. Estas sementes foram postas a germinar a 30°C, no escuro, sobre duas folhas de papel tipo filtro umedecidos com 2 g de água destilada por grama de papel em caixas de plástico transparente, com tampa, contendo 100 sementes. Plântulas apresentando coleótilos com 0,5 cm - 3,0 cm de comprimento, foram coletadas e submetidas à análise eletroforética.

Foram comparados os graus de polimorfismo de quatro sistemas isoenzimáticos: alfa e beta esterase, glutamato desidrogenase e glucose-6-fosfato desidrogenase. Os procedimentos de extração, de fixação e de coloração, bem como os reagentes e soluções utilizadas estão listados nas Tabelas 1 e 2. O grau de resolução das bandas no gel, o número de locos aparentes e presença de polimorfismo por espécie estudada foram os critérios utilizados na escolha do protocolo.

TABELA 1. Composições das soluções-estoque utilizadas para o preparo dos géis utilizados para a eletroforese de quatro sistemas de isoenzimas, em meio suporte de poliacrilamida, extraídos de plântulas de quatro espécies de *Brachiaria*. Adaptado de Davis (1964).

A		B		Tampão do eletrodo	
Tris.....	36,6 g	Tris.....	5,98 g	Tris.....	1,211g
HCl (1N)....	48 ml (pH 8,9)	HCl (1N).....	48 ml (pH 6,9)	Glicina...	0,75g (pH 8,3)
H ₂ O q.s.p.....	100ml	H ₂ O q.s.p.....	100 ml	H ₂ O q.s.p.....	1000 ml
C		G			
Acrilamida.....	30,0 g	Persulfato de amônia.....	0,14 g		
Bis-Acrilamida.....	0,80 g	H ₂ O q.s.p.....	100ml		
H ₂ O q.s.p.....	100ml				

Nas análises de eletroforese de isoenzimas foram utilizados 50 coleótilos de cada espécie por tratamento, que foram congelados em N líquido e macerados a frio. As enzimas foram extraídas pela adição de 0,5 ml da solução de

extratora número 1 de Alfenas (Alfenas, 1998) e 0,2 ml de água gelada, para cada 0,2 g de tecido vegetal fresco. Os extratos obtidos foram centrifugados a 13.000 rpm, por 10 minutos a 3°C. O sobrenadante foi re-centrifugado sob as mesmas

condições. Na corrida eletroforética, foram utilizadas alíquotas de 50 µl dos sobrenadantes, mais 0,5 ml do corante azul de bromofenol na solução tampão do eletrodo, como marcador. Cada

corrida foi realizada com amostras diferentes e recém-extraídas, ou armazenadas por um dia, em nitrogênio líquido.

TABELA 2. Soluções, reagentes e procedimentos utilizados na análise eletroforética de quatro sistemas enzimáticos, extraídos de plântulas de quatro espécies de *Brachiaria*. Adaptado de Cheliak & Pitel (1984).

Enzima/Código	Soluções para revelação	Procedimentos
Alfa-esterase Alfa-EST-E.C.3.1.1.1	A N-Propanol..... 2,5ml Sol.α-naftil acetato (1%)..... 2ml Tampão fosfato (pH 6,0)..... 30ml B Tampão fosfato (pH 6,0)..... 10ml Fast Garnet GBC salt..... 0,04 g	Adicionar solução A e deixar 15 min a 35°C. Após esse período adicionar a solução B. Fixar com glicerol 10%.
Beta-esterase Beta-EST-E.C.3.1.1.1	A N-Propanol.....2,5 ml Sol.β-naftil acetato. (1%)..... 2 ml Tampão fosfato (pH 6,0)..... 30 ml B Tampão fosfato (pH 6,0)..... 10 ml Fast Garnet GBC salt.....0,04 g	Adicionar solução A e deixar 15 min a 35°C. Após esse período adicionar a solução B. Fixar com glicerol 10%.
Glutamato desidrogenase GDH-E.C.1.4.1.3.	Ác. L- glutâmico, Na 1M (Ph8,0) 8ml NAD ⁺ 0,008 g MTT..... 0,008 g CaCl ₂ 0,008 g PMS..... 0,0008 g Tris HCl, 0,1M (pH8,0).....40ml	Incubar no escuro a 35°C até aparecerem as bandas (1h e 10 min). Fixar com glicerol 10%.
Glucose-6-fosfato desidrogenase G6PDH-E.C.1.1.1.49	Glucose-6- fosfato Na ₂ 20 mg NADP ⁺ , Na ₂ 7,5 mg MTT ou NBT..... 10 mg PMS..... 2 mg MgCl ₂ (1M)..... 0,5 ml Tris HCl 0,1M (pH7,5)..... .p/ 50 ml	Incubar o gel no escuro a 35°C até aparecerem as bandas (30 min). Descartar a solução e fixar com glicerol 10%.

Para a eletroforese foram utilizados géis de poliacrilamida (Davis, 1964), testando-se as concentrações de 7,0 e 7,5%. As soluções estoques utilizadas para a confecção dos géis, denominadas de A, B, C e G, estão descritas na Tabela 1. No preparo do gel separador a 7,5%, utilizou-se estas soluções nas seguintes proporções: 1A : 2C : 1 H₂O : 4G + 1 gota de TEMED, enquanto que para o gel separador a 7,0% as proporções utilizadas

foram 1A : 1,87C : 1,13 H₂O : 4G + 1 gota de TEMED; no caso do gel empilhador, as proporções foram 2B : 1C : 1G : 4 H₂O + 1 gota de TEMED. As corridas foram conduzidas utilizando-se uma cuba dupla para eletroforese vertical, dentro de câmara incubadora regulada à temperatura de 4±1°C. A corrente elétrica para a corrida eletroforética foi de 150 V e 20 mA até a marca do corante alcançar o gel separador; a partir

desse ponto foi de 220 V e 40 mA, até a marca do corante aproximar-se do final do gel (2 horas). Utilizou-se o gel na espessura de 0,9 mm, largura de 7,5 cm e altura de 7,0 cm, para o gel separador, e 0,5 cm de altura para o empilhador. Para a identificação das bandas foram realizadas aproximadamente 8 corridas para as enzimas glutamato desidrogenase e glucose-6-fosfato desidrogenase e 10 corridas para as enzimas α - e β -esterase.

Após a coloração, os géis foram fotodocumentados e a interpretação dos resultados foi baseada na presença, nitidez e localização das bandas. Para a identificação das bandas nas repetições das corridas, para cada sistema isoenzimático testado, foi calculado o coeficiente de mobilidade relativa (Rf), que representa a relação entre a distância de migração da isoenzima (I) e a distância de migração do corante (Fm), isto é: $Rf = I / Fm$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das corridas mostraram que a melhor separação e visualização das bandas de α - e β -esterase foi obtida com o gel separador na concentração de 7,5%, enquanto que nos casos de glutamato desidrogenase e glucose-6-fosfato desidrogenase, a concentração de 7,0% foi mais eficiente, utilizando-se os géis obtidos nessas condições para a obtenção dos coeficientes de mobilidade relativa e para a fotodocumentação.

Os graus de polimorfismo foram estimados a partir da comparação dos perfis eletroforéticos dos quatro sistemas de isoenzimas. Para tanto, foram considerados os números e a posições das bandas, de acordo com seus respectivos Rfs, nos perfis. Uma vez que não foi possível controlar a quantidade de isoenzimas nas amostras, apesar de haverem sido utilizadas alíquotas de mesmo volume dos extratos nas corridas eletroforéticas, a espessura das bandas constituiu-se em um parâmetro menos preciso de avaliação do grau de polimorfismo.

Os perfis eletroforéticos fotodocumentados das isoenzimas glutamato

desidrogenase e glucose-6-fosfato desidrogenase das espécies estudadas são mostrados na Figura 1. Para cada uma dessas isoenzimas, foram identificados três tipos de perfis, apesar de que, no caso de *B. decumbens* cv. Basilisk e a *B. brizantha* cv. Marandu, estes perfis revelaram-se idênticos, não sendo portanto possível distinguí-las desta forma. No entanto, os perfis foram distintos o suficiente para permitir uma nítida diferenciação destas duas espécies tanto da *B. plantaginea* quanto da *B. humidicola* as quais, por sua vez, apresentaram perfis eletroforéticos característicos e distintos entre si.

Conforme mostram os zimogramas dos perfis eletroforéticos (Figura 2), no caso da glutamato desidrogenase, a *B. decumbens* cv. Basilisk e a *B. brizantha* cv. Marandu, podem ser diferenciadas da *B. plantaginea* pela espessura e posicionamento das primeiras duas bandas do perfil, enquanto que a *B. humidicola* pode ser diferenciada das demais pela presença de uma única banda no perfil (Rf 1,1). Por sua vez, para a isoenzima glucose-6-fosfato desidrogenase, verificou-se que a *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Marandu, podem ser diferenciadas da *B. plantaginea* pela presença de uma banda adicional de posição Rf 1,3 no perfil, enquanto que a *B. humidicola* se distingue das demais pela ausência da primeira banda (Rf 0,9) e pela menor espessura da última banda (Rf 2,1).

A eletroforese das isoenzimas α - e β -esterase, cujos perfis fotodocumentados são mostrados na Figura 3, resultou em bandas distintas e características, cujos números, posições e espessuras permitiram diferenciar cada uma das quatro espécies estudadas. Tal como mostra o zimograma destes perfis eletroforéticos (Figura 4), que para a α -esterase, pode-se verificar que dentre as bandas que podem ser utilizadas para diferenciar as espécies, destacam-se a banda na posição Rf 0,09, que é encontrada exclusivamente em *B. plantaginea*, a banda na posição Rf 0,43, exclusiva de *B. decumbens* cv. Basilisk, a banda Rf 0,79 exclusiva de *B. brizantha* cv. Marandu e que, embora ocupe posição próxima à banda Rf 0,77, que caracteriza a *B. humidicola*, não pode ser confundida com essa devido à espessura menor.

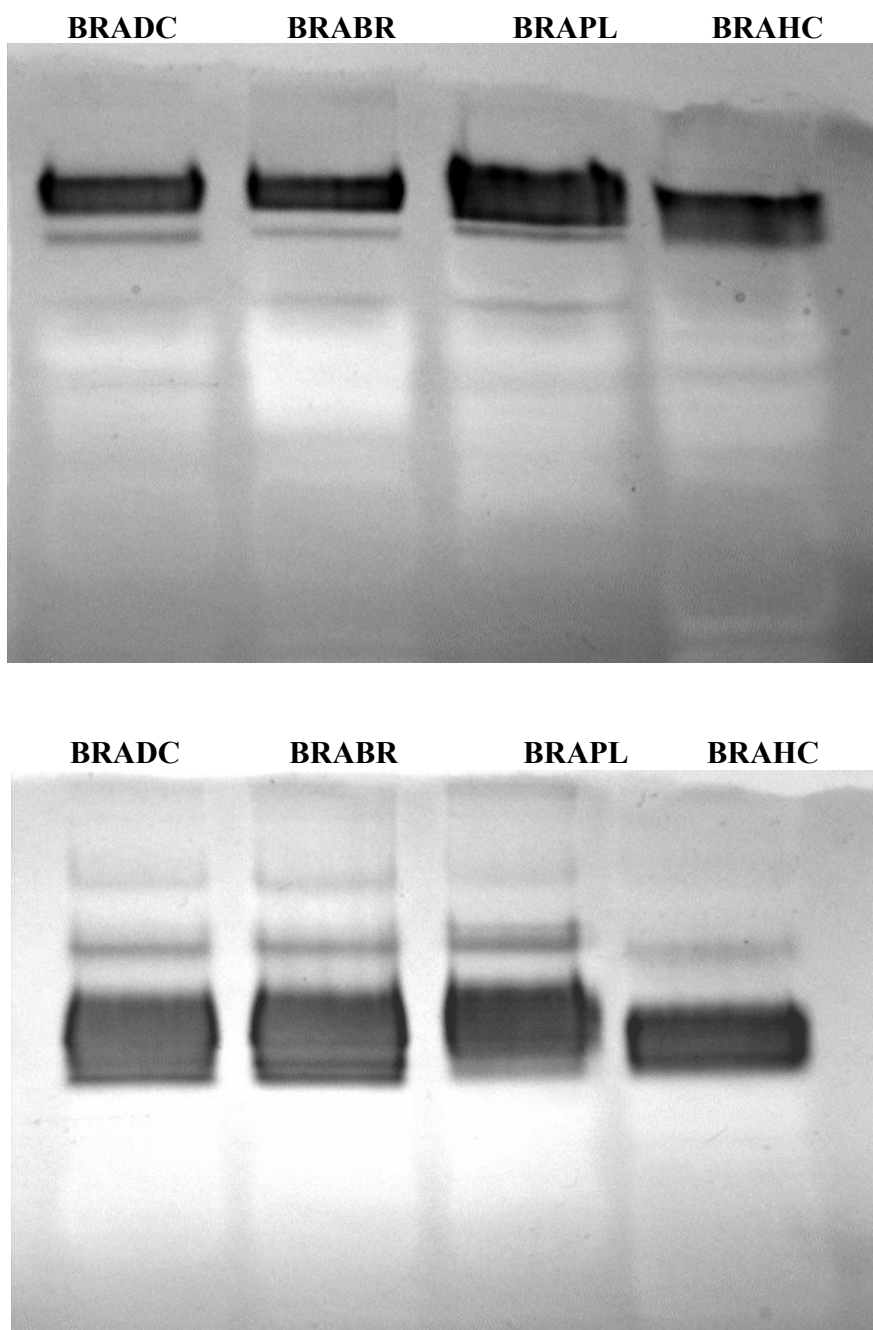


FIGURA 1. Perfil eletroforético da isoenzima Glutamato desidrogenase (acima) e Glucose-6-fosfato desidrogenase (abaixo) para diferentes espécies de *Brachiaria*: *B. decumbens* (BRADC), *B. brizantha* cv. Marandú (BRABR), *B. plantaginea* (BRAPL) e *B. humidicola* (BRAHC).

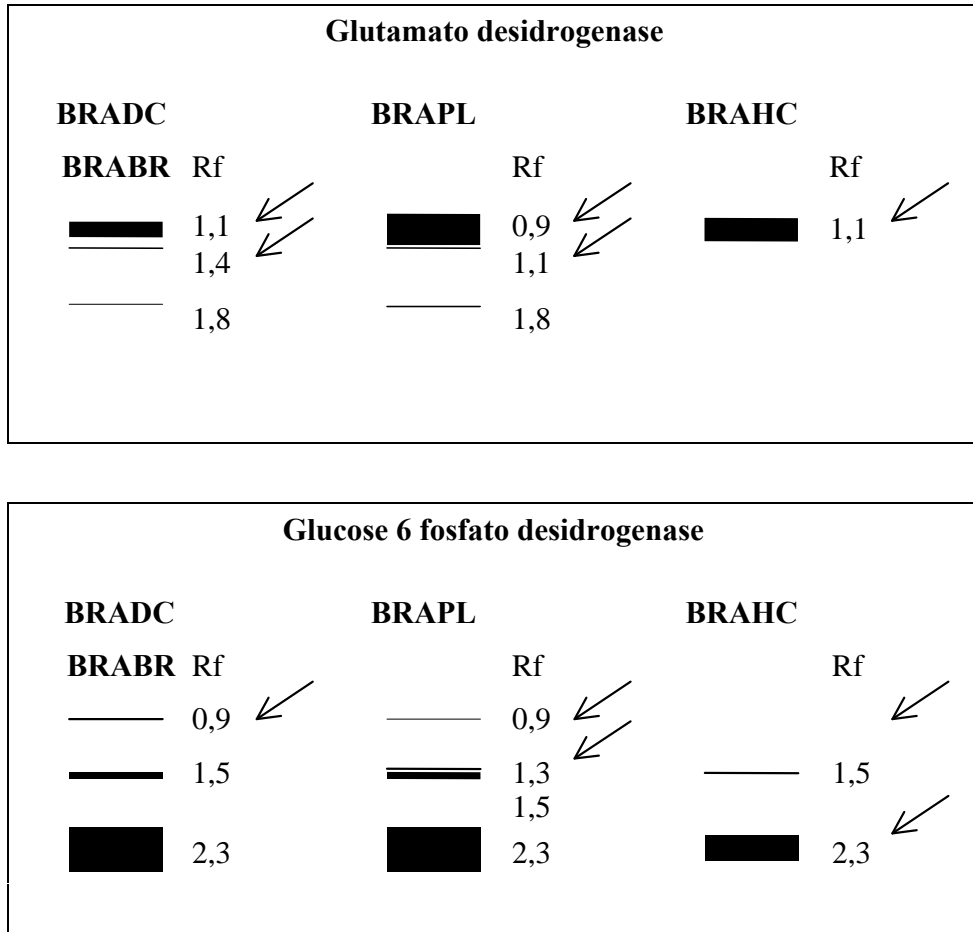
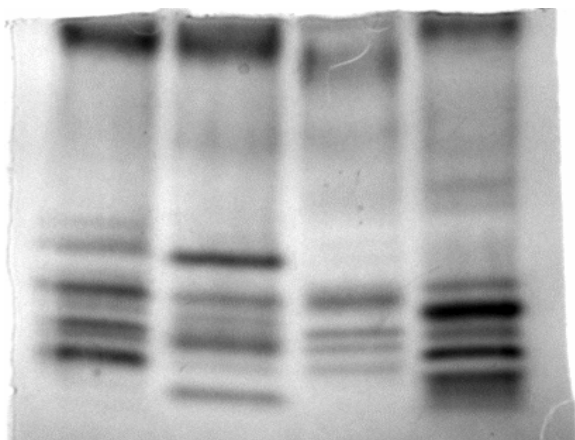


FIGURA 2. Zimograma para as isoenzimas Glutamato desidrogenase (acima) e Glucose-6-fosfato desidrogenase (abaixo) para diferentes espécies de *Brachiaria*: *B. decumbens* (BRADC), *B. brizantha* cv. Marandú (BRABR), *B. plantaginea* (BRAPL) e *B. humidicola* (BRAHC).

BRADC BRABR BRAPL BRAHC



BRADC BRABR BRAPL BRAHC

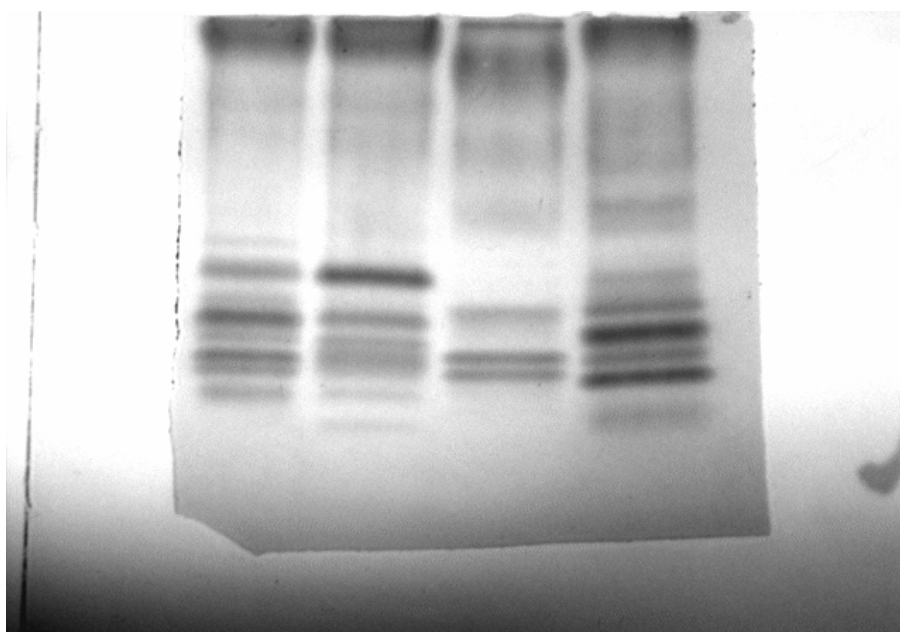


FIGURA 3. Perfil eletroforético das isoenzimas α -esterase (acima) e β -esterase (abaixo) para plântulas de diferentes espécies de *Brachiaria*. : *B. decumbens* (BRADC), *B. brizantha* cv. Marandú (BRABR), *B. plantaginea* (BRAPL) e *B. humidicola* (BRAHC).

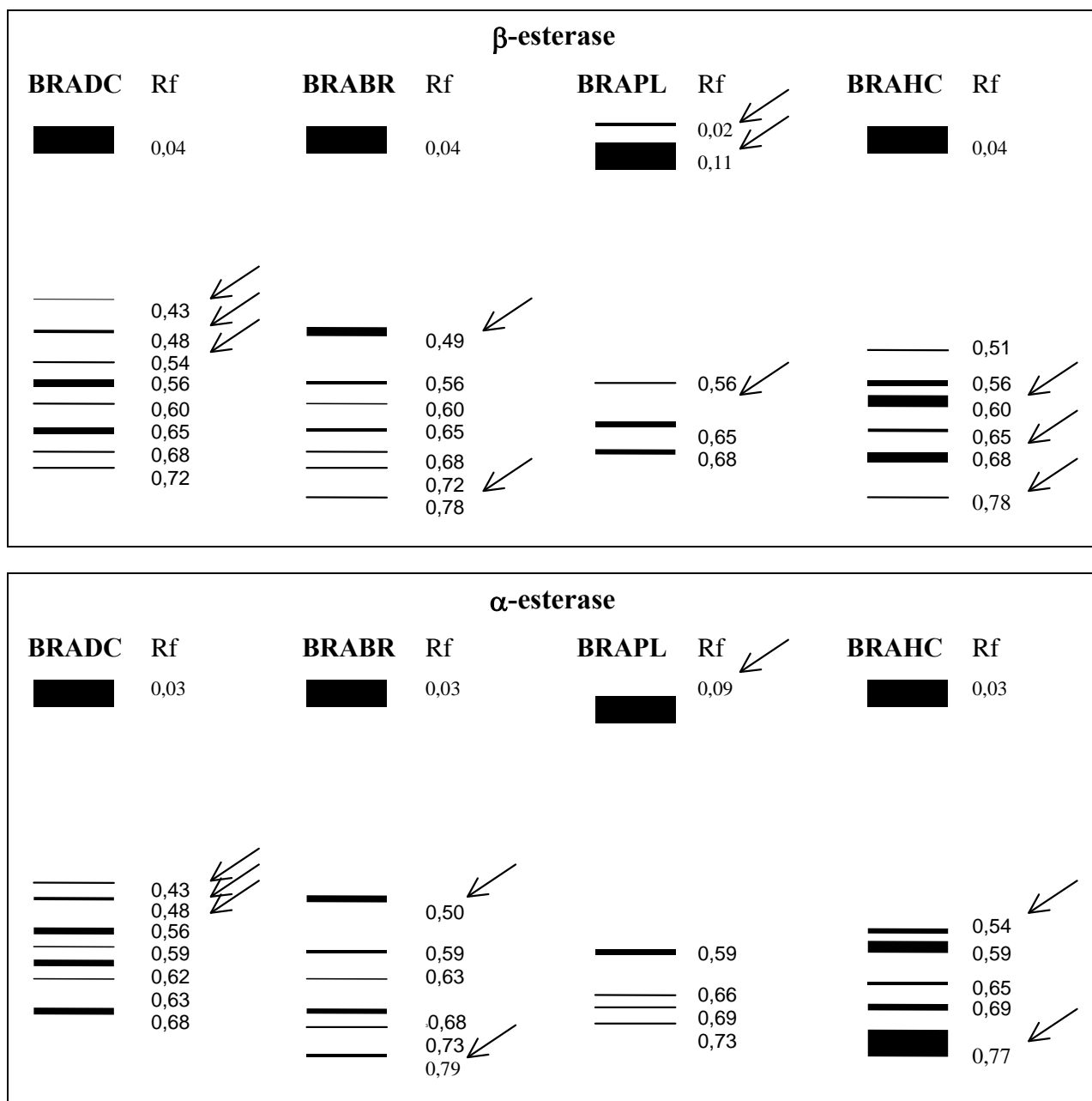


FIGURA 4. Zimograma para as isoenzimas α -esterase (acima) e β -esterase (abaixo) para diferentes espécies de *Brachiaria*: *B. decumbens* (BRADC), *B. brizantha* cv. Marandú (BRABR), *B. plantaginea* (BRAPL) e *B. humidicola* (BRAHC).

Em associação à essas bandas, a presença e ausência de outras bandas podem também ser utilizada na identificação, tais como as bandas Rf 0,48 ou Rf 0,50 presentes em *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Marandu mas não em *B. plantaginea* e *B. humidicola*, e as bandas Rf 0,56 e Rf 0,54 presentes em *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. humidicola*, mas não em *B. brizantha* cv. Marandu e *B. plantaginea*.

Observando-se a Figura 4, para a β -esterase, pode-se verificar que dentre as bandas que podem ser utilizadas para diferenciar as espécies, destacam-se as bandas nas posições Rf 0,02 e Rf 0,11, que são encontradas exclusivamente em *B. plantaginea* e as bandas na posição Rf 0,43 e Rf 0,54 exclusivas de *B. decumbens* cv. Basilisk. Em associação à essas bandas, a presença e ausência de outras bandas deve ser utilizada para a identificação, tais como as bandas Rf 0,48 e Rf 0,49 presentes exclusivamente em *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Marandu mas apresentando maior espessura em *B. brizantha* cv. Marandu, a banda Rf 0,60 ausente apenas em *B. plantaginea* e presente em maior espessura em *B. humidicola*, a banda Rf 0,68 presente em todas as espécies mas com maior espessura em *B. humidicola* e a banda Rf 0,78, presente em *B. brizantha* cv. Marandu e *B. humidicola*.

Estes resultados mostram que os sistemas α - e β -esterase foram mais apropriados para a identificação das quatro espécies avaliadas. A eletroforese deste mesmo grupo de isoenzimas, extraídos de folhas coletadas em vários estádios de desenvolvimento das plantas, permitiram a Payne & Koszykowski (1983) distinguir cultivares de *Lolium perenne*, ao passo que o mesmo não foi possível com os isoenzimas peroxidase ou glutamato desidrogenase. Assim, portanto, este trabalho confirmou o alto polimorfismo dos sistemas α - e β -esterases e o menor polimorfismo do sistema glucose-6-fosfato desidrogenase, anteriormente identificados por outros autores (Keller-Grein *et al.*, 1996), além de caracterizar o baixo polimorfismo do sistema glutamato

desidrogenase, para as quatro espécies de *Brachiaria* estudadas.

Apesar da relativa facilidade da condução desta técnica, seu grau de sua precisão depende da adoção de certos cuidados durante sua execução como, por exemplo, a rápida utilização dos extratos obtidos, como forma de reduzir a ação de enzimas proteolíticos que podem resultar em alterações indevidas no padrão de bandas eletroforéticas (Jones, 1983) e o controle da quantidade de extrato colocado no gel; quantidades excessivas podem mascarar bandas adjacentes enquanto que quantidades insuficientes podem não permitir a identificação de determinadas bandas (Ferguson & Grabe, 1986).

LITERATURA CITADA

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa, 1998, 574 p.
- ANDRADE, R.P. Tecnologia de produção de espécies do gênero *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO BOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 11, Piracicaba, 1994. **Anais.** Piracicaba, FEALQ, 1994. p. 49-71.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- CHELIAK, W.M.; PITEL, J.A. **Techniques for starch-gel electrophoresis of enzymes from forest tree species.** Patawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service Information Report PI-X-42, 1984. 49p.
- CRUZ, R.; MILES, J.W.; ROCA, W. & RAMÍREZ, H. Apomixis y sexualidad en *Brachiaria*. 1. Estudios bioquímicos. **Rev. Cubana Cienc. Agric.**, v.23, n.3, p.301-305, 1989.

- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis; II. Method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v.121, p.404-27, 1964.
- FERGUSON, J.M. & GRABE, D.F. Identification of cultivars of perennial ryegrass by SDS-PAGE of seed proteins. **Crop Sci.**, v.26, n.1, p.170-176, 1986.
- JONES, T.W.A. Instability during storage of phosphogluco-isomerase isoenzymes from ryegrasses (*Lolium* spp.). **Physiol. Plant.**, v.58, p.136-140, 1983.
- HACKER, J.B. Sexuality and hybridization in signal grass, *Brachiaria decumbens*. **Tropical Grassl.**, v.22, n.3, p.139-144, 1988.
- KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. & HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collection. In: Miles, J.W.; Maass, B.L. & Valle, C.B. (eds.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Capítulo 2, p.16-35. CIAT, Cali, Colombia, 1996.
- MARTINS, C., SILVA, W.R. Estudos de bancos de sementes do solo. **Inf. ABRATES**, v.4, p. 49-56, 1994.
- PAYNE, R.C. Seed and cultivar identification. **Seed Sci. and Technol.**, v.15, p.641-644, 1987.
- PAYNE, R.C. & KOSZYKOWSKI, T.J. Eletrophoretic differences among field grown plants and cultivars of perennial ryegrass. **Association of Official Seed Analysts Newsletter**, v.57, p.90-93, 1983.
- RODRIGUES, L.R.A.; REIS, R.A. Estabelecimento de outras forrageiras em áreas de *Brachiarias*. In: SIMPÓSIO BOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 11, Piracicaba, 1994. **Anais**. Piracicaba, FEALQ, 1994. p. 299-325.
- SENDULSKY, T. *Brachiaria*: taxonomy of cultivated and native species in Brazil. **Hoehnea** v.7, p.99-139, 1978.
- SOUZA, F.H.D. Misturas varietais em sementes de gramíneas forrageiras: o caso do *Panicum maximum*. **Inf. ABRATES**, Londrina, v.4, p. 63-69, 1994.
- VALLE, C.B. & SAVIDAN, Y.H. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Miles, J.W.; Maass, B.L. & Valle, C.B. (eds.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Capítulo 10, p.147-163. CIAT, Cali, Colombia, 1996.
- VERA, R.R.; THOMAS, R.; SANINT, L. & SANZ, J.I. Development of sustainable ley-farming systems for the acid-soil savannas of tropical America. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.64 (Suplemento 1), p.105-125, 1992.