



Análise da diversidade genética de genótipos e acessos de arroz irrigado do Banco de Germoplasma da Epagri por AFLP

Fernando Adami Tcacenco¹, Anderson Ferreira²,
Luiz Anderson Teixeira de Mattos³ e Antônio Costa de Oliveira⁴

Resumo – Estudos com marcadores moleculares vêm sendo utilizados no melhoramento genético do arroz, destacando-se a técnica AFLP pela precisão e reprodutibilidade dos dados gerados. No presente trabalho, utilizou-se esta técnica para caracterizar 19 cultivares pertencentes ao Banco de Germoplasma de Arroz Irrigado da Epagri, além de três genótipos F_5 cuja base genética é constituída pelas cultivares Epagri 108 e Epagri 109 com introgressão de genes do genótipo multiespigueta. Procurou-se ainda estabelecer a relação entre os agrupamentos formados e a genealogia dos componentes de cada grupo. Foram observados 169 locos polimórficos, gerando dois grupos homogêneos com 17 dos 22 acessos avaliados. Oito das dez cultivares lançadas pela Epagri, bem como os três genótipos multiespigueta, posicionaram-se no mesmo grupo, apresentando similaridade maior do que 50%. Seis dessas cultivares são oriundas de cruzamentos realizados no Ciat, e as outras duas são oriundas de cruzamentos realizados na Embrapa/CNPAF, o que pode explicar em parte a similaridade genética entre elas.

Termos para indexação: *Oryza sativa*, marcadores moleculares, similaridade genética.

Analysis of the genetic diversity of genotypes and cultivars of rice from Epagri through AFLP

Abstract – Studies with molecular markers have been used in rice breeding programs, particularly AFLP, due to its high accuracy and reproducibility of generated data. In the present work, 19 rice cultivars from the Germplasm Bank from Epagri and three genotypes F_5 with a genetic basis from the cultivars Epagri 108 e Epagri 109 with introgression of genes from the multi-spikelet genotype were characterized using AFLP. A total of 169 polymorphic markers were detected, generating two homogeneous groups with 17 out of 22 evaluated accesses. Eight out of the ten cultivars released by Epagri, as well as the three F_5 genotypes, clustered in the same group, with similarity greater than 50%. Six of the cultivars are derived from crosses from Ciat, and the other two from crosses from Embrapa/CNPAF, which can explain in part the genetic similarity between them.

Index Terms: *Oryza sativa*, molecular markers, genetic similarity.

Introdução

No Brasil, o arroz aparece como uma das principais culturas, com cerca de 4 milhões de hectares, sendo que 25% das lavouras estão situadas na Região Sul, que se destaca tanto

pelo volume de produção quanto pela alta produtividade em lavouras irrigadas. O aumento crescente na produtividade de arroz é devido a resultados de pesquisas realizadas em várias áreas, incluindo fitossanidade, tratos culturais,

adubação e melhoramento genético. Dessas, o melhoramento genético tem se destacado, gerando incrementos na produtividade, na qualidade nutritiva e outras características agronômicas. Alguns desses avanços estão diretamente

Aceito para publicação em 16/8/2005.

¹Eng. agr., Ph.D., Epagri/Estação Experimental de Itajaí, C.P. 277, 88301-970 Itajaí, SC, fone: (47) 3341-5241, fax: (47) 3341-5255, e-mail: tcacenco@epagri.rct-sc.br.

²Biólogo, Especialista, Epagri/Estação Experimental de Itajaí, e-mail: ferreirabiotec@epagri.rct-sc.br.

³Eng. agr., Dr., UFPEL/Centro de Genômica e Fitomelhoramento/DFT/Faem, e-mail: andersonufpel@hotmail.com.

⁴Eng. agr., Ph.D., UFPEL/Centro de Genômica e Fitomelhoramento/DFT/Faem, e-mail: acostol@terra.com.br.

relacionados com estudos de diversidade genética usando marcadores moleculares, que podem facilitar a identificação de linhagens com características de interesse para os programas de melhoramento genético. Dentre os marcadores mais conhecidos destacam-se RFLP (Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição), RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), microssatélites e AFLP (Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados). Este último é uma tecnologia baseada em PCR (Reação da polimerase em cadeia) e envolve a amplificação de fragmentos de restrição provenientes de uma digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, após a sua ligação a adaptadores (Vos et al., 1995).

AFLP vem sendo usado em estudos com arroz cultivado (Bligh et al., 1999; Flowers et al., 2000; Larson et al., 2000; Koyama et al., 2001; Malone et al., 2003; Mao et al., 2004; Tcacenco et al., 2004) e também com plantas daninhas dessa cultura, como, por exemplo, arroz-vermelho (Federici et al., 2001) e capim-arroz (Tsuji et al., 2003). Nesses estudos, a técnica AFLP tem se mostrado eficiente na avaliação da variabilidade genética de indivíduos, populações e espécies.

O presente trabalho teve como objetivo utilizar marcadores AFLP para caracterizar genótipos de arroz irrigado do programa de melhoramento e do Banco de Germoplasma da Epagri, bem como para estabelecer relações entre os agrupamentos formados e a genealogia dos materiais avaliados. O trabalho foi dirigido para o conhecimento da base genética dos materiais estudados, particularmente das cultivares lançadas pela Epagri, como um subsídio ao programa de melhoramento genético.

Material e métodos

Material vegetal e extração de DNA. Foram analisadas 19 cultivares pertencentes ao Banco de Germoplasma de Arroz Irrigado da Epagri, além de três genótipos F_5 cuja base genética é constituída pelas cultivares Epagri 108 e Epagri 109 com introgressão de genes do genótipo multiespigueta (Yokoyama

et al., 1999), totalizando 22 acessos (Tabela 1). Foram coletadas folhas jovens de várias plantas adultas cultivadas a campo ou em laboratório. A extração de DNA seguiu o protocolo descrito por Ferreira et al. (2004), sendo o DNA estocado a 20°C negativos até a realização das análises de AFLP.

Reações de AFLP. As reações de AFLP foram realizadas com o kit comercial Analysis System I (Invitrogen-Life Technologies) seguindo o manual de instruções do fabricante e o protocolo descrito por Vos et al. (1995). Para tanto, 100ng de DNA total foram digeridos com duas enzimas de restrição: *EcoRI* e *MseI*, ambas na concentração de 5 unidades/ μ l. A solução de digestão foi incubada por três horas a 37°C e posteriormente por 15 minutos a 70°C. Após as reações de ligação dos adaptadores e pré-amplificação, quatro pares de iniciadores (M-CAT/E-AGC, M-CTT/E-ACA, M-CAG/E-AAC e M-CAT/E-ACT) foram usados para amplificação seletiva. As reações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research).

A eletroforese realizou-se em gel de poliácridamida 6% utilizando uma cuba de seqüenciamento manual (Hofer SQ3 Sequencer), onde inicialmente foi realizada uma pré-corrida com tampão TBE a 1.700 volts, 60 watts e 40 miliampères por 20 minutos. Em seguida, os produtos da amplificação foram misturados com 6 μ l de tampão de carregamento (98% formamida, 10mM EDTA, 0,025% bromofenol blue, 0,025% xileno cianol) e desnaturados a 94°C durante 6 minutos. Após a desnaturação, 8 μ l de cada amostra foram carregados no gel para a eletroforese, que obedeceu às mesmas condições de pré-corrida, exceto pelo tempo de duração que foi elevado para 2 horas. A revelação dos géis foi realizada com nitrato de prata (Briard et al., 2000).

Para cada par de iniciadores foram avaliadas as bandas polimórficas e monomórficas; somente bandas fortes e consistentes foram consideradas. As bandas polimórficas foram classificadas como presentes ou ausentes e utilizadas para a geração de uma matriz de similaridade pelo coeficiente de Jaccard, através do programa

NTSYS-pc versão 2.1 (Rohlf, 2000). Essa matriz foi submetida à análise de conglomerados pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA). Para a comparação entre os agrupamentos formados e a constituição genética dos acessos, a genealogia, os cruzamentos e a instituição responsável pelos mesmos foram anotados. Esta comparação foi feita com o intuito de se revelar uma possível correlação entre agrupamentos com base em marcadores AFLP e a origem dos materiais analisados.

Resultados e discussão

Os quatro pares de iniciadores geraram 169 locos polimórficos (M-CAT/E-AGC, 29 locos; M-CTT/E-ACA, 46 locos; M-CAG/E-AAC, 46 locos; e M-CAT/E-ACT, 48 locos); o número de locos por par (42,25) está dentro do padrão para o kit utilizado, segundo o qual devem ser obtidas de dez até cem bandas. A análise de conglomerados gerou dois grupos homogêneos com similaridade genética mínima de 50%, englobando 17 dos 22 acessos estudados, sendo que os cinco acessos restantes se posicionaram isoladamente (Figura 1). A genealogia e os cruzamentos que deram origem ao material estudado, bem como os locais onde os cruzamentos foram realizados, encontram-se na Tabela 1.

O **grupo homogêneo 1** compreende as cultivares lançadas pela Epagri, exceto Empasc 101 e SCS 112, e inclui também a cultivar CICA 8. Dentro desse grupo, destacou-se o subgrupo 1A, formado pelas cultivares Epagri 108, Epagri 109 e os três genótipos F_5 envolvendo essas cultivares e o genótipo multiespigueta, com similaridade de 72%. Observando-se a genealogia dos componentes deste agrupamento, verifica-se que as cultivares Epagri 108 e Epagri 109 são seleções dentro de um mesmo cruzamento, justificando assim seu posicionamento próximo. Já os genótipos multiespigueta avaliados no estudo são oriundos do cruzamento e retrocruzamento do genótipo multiespigueta original com as cultivares Epagri 108 e Epagri 109, sendo que as duas últimas foram utilizadas como parental recorrente.

Tabela 1. Genealogia e agrupamentos formados por análise de AFLP de acessos do Banco de Germoplasma de Arroz Irrigado da Epagri/Estação Experimental de Itajaí. Itajaí, SC, 2005

Genótipo	Genealogia/linha	Cruzamento	Local
Grupo Homogêneo 1 (Similaridade: 55%)⁽¹⁾			
Subgrupo 1A (Similaridade: 72%)			
Epagri 108 (SC 140)	CT-8008-16-31-3P-M	17719 / 5738 // IR 21015-72-3-3-3-1 (= CT 7347 / IR 21015-72-3-3-3-1)	Ciat, Colômbia
Epagri 109 (SC 141)	CT-8008-16-10-41-M	17719 / 5738 // IR 21015-72-3-3-3-1 (= CT 7347 / IR 21015-72-3-3-3-1)	Ciat, Colômbia
Multiespigueta 1	Plantas F ₅ de população F ₄	Epagri 108 / multiespigueta // Epagri 108	Epagri, SC
Multiespigueta 2	Plantas F ₅ de população F ₄	Epagri 108 // Epagri 108 / multiespigueta	Epagri, SC
Multiespigueta 3	Plantas F ₅ de população F ₄	Epagri 108 / multiespigueta // Epagri 109	Epagri, SC
Subgrupo 1B (Similaridade: 67%)			
Epagri 106	CT-7363-13-5-7-M	P 3085-F4-54 // IR-5853-118-5 / IR 19743-25-2-2-3-1 (= P 3085-F4-54 / CT 6771)	Ciat, Colômbia
Epagri 107	P 2017-F4-66-1B-1B	CICA 4 // BG-90-2 / CICA 7 (= CNA 5259)	Ciat, Colômbia
Subgrupo 1C (Similaridade: 69%)			
SCSBRS Tio Taka	CNA-IRAT 4M/2/1-75-B-B-2-2-B (= CNA 8644)	Nove parentais masculinos (BG 90-2, CNA 7, CNA 3815, CNA 3848, CNA 3887, Colômbia 1, Eloni, Nanicão, UPR 103-80-1-2) / IR36 (macho-estéril)	Embrapa/CNPAF, GO, e Irat, França
CICA 8	P918-25-1-4-2-3-1B-1131-1	CICA 4 // IR 665-23-3 / Tetep	Ciat, Colômbia
Demais componentes do grupo 1			
Empasc 102	P 738-137-4-1	IR 930-53 / IR 579-160	Ciat, Colômbia
Empasc 103	P 791-B4-14	IR 930-2 / IR 665-31-5-8	Ciat, Colômbia
SCSBRS 111	CNAx 3157-45-34-2	P 2867 F4-31-5 / P 4382 F3-75	Embrapa/CNPAF, GO
Grupo Homogêneo 2 (Similaridade: 59%)			
Subgrupo 2A (Similaridade: 72%)			
Batatais	-	Informações não-disponíveis	IAC, SP
Dawn	B 505 A1-28-7-1-2	Century Patna 231 / HO 12-1-1	Texas, USA
Demais componentes do grupo 2			
Mochigome	-	Variedade asiática, glutinosa	-
Preto	-	Informações não-disponíveis	Itália
Labelle	B 6311A-5584-5-8	Belle Patna / Dawn	Texas, USA
Grupo 3 (demais cultivares)			
Empasc 101	P 780-55-1-1	IR 930-80 / IR 532-E-208	Ciat, Colômbia
SCS 112	EEI 10 (= SC 151)	Empasc 101 / CICA 8	Epagri, SC
IRGA 408	IR 930-31-10	IR 8 / IR 12-178-2-3	Irga, RS
CICA 9	P 901-22-11-26-2-2-1B	IR 665-23-3-1 / IR 841-63-5-104-1B / C46-15	Ciat, Colômbia
Pratão Precoce	-	Mutação da cultivar Dourado Precoce	IAC, SP

⁽¹⁾Similaridade medida pelo coeficiente de Jaccard.

No grupo 1, encontram-se também os subgrupos 1B (Epagri 106 e Epagri 107) e 1C (SCSBRS Tio Taka e CICA 8), com similaridade interna de 67% e 69%, respectivamente. As duas cultivares do primeiro subgrupo são oriundas de cruzamentos realizados no Centro Internacional de Agricultura Tropical – Ciat –, na Colômbia. O cruzamento que deu origem à cultivar Epagri 107 envolveu as cultivares CICA 4 e CICA 7, sendo que a primeira (CICA 4) também fez parte do cruzamento que originou

a cultivar CICA 8, pertencente ao subgrupo 1C, possivelmente explicando a junção de Epagri 107 e CICA 8 no grupo 1. No entanto, a cultivar SCSBRS Tio Taka, que pertence ao mesmo subgrupo de CICA 8, é oriunda de cruzamento realizado em conjunto entre a Embrapa/CNPAF e o Institute de Recherches Agronomiques Tropicales – Irat –, na França e, segundo os dados de genealogia disponíveis (Tabela 1), não apresenta ancestrais em comum com a cultivar CICA 8. Outras três

cultivares da Epagri (Empasc 102, Empasc 103 e SCSBRS 111) fazem parte do grupo homogêneo 1; exceto por SCSBRS 111, que é oriunda de um cruzamento da Embrapa/CNPAF, as outras cultivares são oriundas de cruzamentos realizados no Ciat.

O grupo homogêneo 2, também com mais de 50% de similaridade interna, compreende algumas cultivares exóticas, tais como Dawn, Mochigome, Preto e Labelle, além da cultivar paulista Batatais. Visto que inexistem informações de

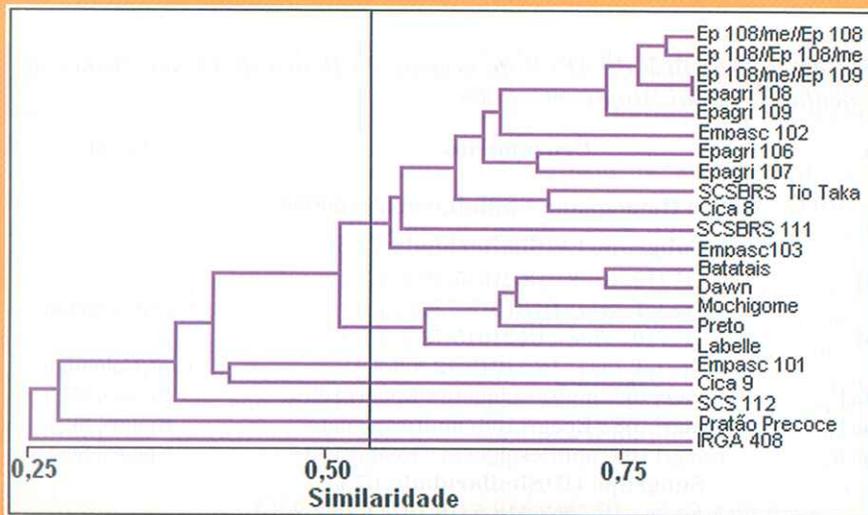


Figura 1. Dendrograma baseado em 169 marcadores AFLP polimórficos de 19 acessos do Banco de Germoplasma de Arroz Irrigado da Epagri e três genótipos F_2 , cuja base genética é constituída pelas cultivares Epagri 108 e Epagri 109, com introgressão de genes do genótipo multiespigueta. Os marcadores foram comparados pelo coeficiente de similaridade de Jaccard e submetidos à análise de conglomerados pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA). A linha vertical de corte indica similaridade igual a 55%

genealogia para as três últimas, torna-se difícil fazer inferências a respeito da correlação entre genealogia e similaridade genética dos componentes desse grupo.

O **terceiro grupo** é formado por cultivares que apresentam pouca similaridade, tanto entre si quanto com as cultivares de outros grupos. Este grupo apresenta duas cultivares lançadas pela Epagri (Empasc 101 e SCS 112), além de CICA 9, IRGA 408, lançada pelo Instituto Rio Grandense do Arroz – Irgra –, e Pratao Precoce, uma mutação da cultivar Dourado Precoce (Luiz E. Azzini, IAC, comunicação pessoal), lançada pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC.

Constata-se, com base nos dados levantados no presente trabalho, que oito das dez cultivares lançadas pela Epagri posicionaram-se no mesmo grupo, apresentando similaridade maior do que 55%. Seis dessas cultivares são oriundas de cruzamentos realizados no Ciat, e as outras duas são oriundas de cruzamentos realizados na Embrapa/CNPAF, o que pode explicar em parte a similaridade genética entre elas. Em adição, os três genótipos F_2 , cuja base genética

é constituída pelas cultivares Epagri 108 e Epagri 109 com introgressão de genes do genótipo multiespigueta, também formaram um conglomerado com essas oito cultivares, indicando que, mesmo que o genótipo multiespigueta seja considerado divergente, a seleção ao longo das gerações parece ter favorecido a base genética de Epagri 108 e 109 nesses cruzamentos.

Em outros trabalhos com arroz irrigado, a estreita base genética já havia sido evidenciada. Em uma ampla avaliação do arroz no Brasil, Rangel et al. (1996) verificaram que apenas dez ancestrais contribuíram com 68% do conjunto gênico das variedades brasileiras de arroz irrigado. Utilizando marcadores RAPD, Vieira et al. (2004) verificaram que as quatro cultivares de arroz da Epagri estudadas (Epagri 108, Epagri 109, SCS 112 e SCSBRS Tio Taka) mostraram-se idênticas, diferenciando-se de algumas linhagens do programa de melhoramento genético. Em trabalhos realizados no Rio Grande do Sul, foi demonstrada, através de marcadores moleculares e isoenzimáticos, a proximidade genética entre os materiais

estudados (Guidolin et al., 1994; Malone et al., 2003). Trabalhos realizados na Embrapa Arroz e Feijão (Brondani et al., 2004; Ribeiro et al., 2004) também já haviam verificado a estreita base genética das cultivares de arroz irrigado do Brasil. Os índices de diversidade gênica encontrados (0,53 e 0,56, respectivamente) foram considerados insatisfatórios, sendo que alguns conglomerados apresentaram distância zero entre as cultivares, levando os autores a iniciarem programas de análise de marcadores moleculares para ampliação da base genética, priorizando linhagens com alelos diferenciados para explorar a variabilidade genética e culminar com o lançamento de cultivares mais adequadas. Ainda segundo Rangel et al. (1996), reconhece-se a necessidade de aumentar a base genética das cultivares de arroz irrigado do Brasil, particularmente através da utilização de genitores geneticamente divergentes provenientes de outros programas de melhoramento ou da incorporação de variedades tradicionais e de espécies selvagens de arroz, principalmente *O. glaberrima*.

Em linha com essas observações, os dados de similaridade genética entre as cultivares e linhagens aqui relatados podem ser apropriados pelo programa de melhoramento genético de arroz da Epagri e utilizados no direcionamento de futuros cruzamentos.

Conclusões

A maioria das cultivares de arroz lançadas pela Epagri agrupa-se em um conglomerado com similaridade genética de 55%. Esse agrupamento pode estar ligado à origem dos materiais utilizados nos cruzamentos progenitores das cultivares, que na maior parte são provenientes do Ciat ou da Embrapa, refletindo, portanto, a base genética utilizada naquelas instituições.

Literatura citada

1. BLIGH, H.F.J.; BLACKHALL, N.W.; EDWARDS, K.J.; McCLUNG, A.M.

- Using Amplified Length Polymorphisms and Single Sequence Length Polymorphisms to identify cultivars of brown and white milled rice. *Crop Science*, v.39, p.1715-1721, 1999.
2. BRIARD, M.; CLERA, V.L.E.; GNZEBELUS, D.; SENALIK, D.; SIMON, P.W. Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP™ analysis using silver stain on radioisotopes. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.18, p.235-241, 2000.
 3. BRONDANI, R.V.P.; RANGEL, P.N.; BORBA, T.; VAZ, A.R.C.; GRISI, M.C.M.; LOUZADA, G.A.; BRONDANI, C. Caracterização genética da coleção nuclear do arroz por marcadores ESTs visando a busca por diversidade alélica em genes que controlam características relacionadas à produção de grãos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50., 2004. Florianópolis, SC. *Resumos...* Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 1 CD ROM.
 4. FEDERICI, M.T.; VAUGHAN, D.; TOMOOKA, N.; KAGA, A.; WANG, X.W.; DOI, K.; FRANCIS, M.; ZORRILLA, G.; SALDAIN, N. Analysis of Uruguayan weedy rice genetic diversity using AFLP molecular markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.4, n.3, p.130-145, 2001.
 5. FERREIRA, A.; TCACENCO, F.A.; NOLDIN, J.A. Caracterização molecular de acessos de arroz-vermelho utilizando a técnica RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., 2004, São Pedro, SP. *Anais...* Londrina, PR: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2004. 1 CD ROM.
 6. FLOWERS, T.J.; KOYAMA, M.L.; FLOWERS, S.A.; SUDHAKAR, C.; SINGH, K.P.; YEO, A.R. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. *Journal of Experimental Botany*, v.51, n.342, p.99-106, 2000.
 7. GUIDOLIN, A.F.; OLIVEIRA, A.C. de; TERRES, A.L.; COSTA, F.C. da. Caracterização eletroforética das cultivares de arroz irrigado em uso no RS. *Lavoura Arrozeira*, v.47, n.414, p.3-5. 1994.
 8. KOYAMA, M.L.; LEVESLEY, A.; KOEBNER, R.M.D.; FLOWERS, T.J.; YEO, A.R. Quantitative trait Loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. *Plant Physiology*, v.125, p.406-422, 2001.
 9. LARSON, S.R.; RUTGER, J.N.; YOUNG, K.A.; RABOY, V. Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid 1 mutation. *Crop Science*, v.40, p.1.397-1.405, 2000.
 10. MALONE, G.; ZIMMER, P.D.; CASTELO BRANCO, J.S.; KOPP, M.M.; MALONE, E.; OLIVEIRA, A.C. de. Estimativa da variabilidade genética entre genótipos de arroz (*Oryza sativa*) brasileiros, japoneses e filipinos através de marcadores moleculares AFLP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 3. e REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 25., 2003. Balneário Camboriú, SC. *Anais...* Itajaí, SC: Epagri, 2003. p.128-130.
 11. MAO, C.; YI, K.; YANG, L.; ZHENG, B.; WU, Y.; LIU, F.; WU, P. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. *Journal of Experimental Botany*, v.55, n.394, p.137-143, 2004.
 12. RANGEL, P.H.N.; GUIMARÃES, E.P.; NEVES, P.C.F. Base genética das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.31, n.5, p.349-357, 1996.
 13. RIBEIRO, M.S.; BRONDANI, R.V.P.; RANGEL, P.N.; BORBA, T.; MENDONÇA, J.A.; RANGEL, P.H.N.; MORAIS, O.P.; BRONDANI, C. Análise da variabilidade genética de linhagens do programa de VCU de arroz de sequeiro por marcadores SSR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50., 2004. Florianópolis, SC. *Resumos...* Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 1 CD ROM.
 14. ROLHF, F.J. *NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 2.1. New York, USA: Exeter Publications. 2000.
 15. TCACENCO, F.A.; FERREIRA, A.; MATTOS, A.L.T.; OLIVEIRA, A.C. Caracterização de acessos do banco de germoplasma da Epagri por AFLP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50., 2004. Florianópolis, SC. *Resumos...* Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 1 CD ROM.
 16. TSUJI, R.; FISCHER, A.J.; YOSHINO, M.; ROEL, A.; HILL, J.E.; YAMASUE, Y. Herbicide-resistant late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): similarity in morphological and amplified fragment length polymorphism traits. *Weed Science*, v.51, n.5, p.740-747, 2003.
 17. VIEIRA, J.; CONCEIÇÃO, M.B.; MARSCHALEK, R. Caracterização genética de arroz (*Oryza sativa*) através de marcadores RAPDs. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50., 2004. Florianópolis, SC. *Resumos...* Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 1 CD ROM.
 18. VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.V.; HORNES, M.; FRITERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, v.23, p.4.407-4.414, 1995.
 19. YOKOYAMA, S.; BACHA, R.E.; ISHY, T. Multi-espiguetas, genótipo em potencial para uso em melhoramento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 1. e REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 23., 1999, Pelotas, RS. *Anais...* Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 1999. p.111.