

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR
DA COLEÇÃO BÁSICA DE TREVO-BRANCO
(*Trifolium repens* L.)**

Dissertação de Mestrado

Fernanda Bortolini

Porto Alegre, 2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR
DA COLEÇÃO BÁSICA DE TREVO-BRANCO
(*Trifolium repens* L.)**

**FERNANDA BORTOLINI
Bióloga (UPF)**

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Mestre
em Zootecnia, área de concentração Plantas Forrageiras

Porto Alegre (RS), Brasil

Março - 2004

Agradecimentos

Ao meu grande orientador, Miguel Dall’Agnol que me acolheu de braços abertos, pela amizade, dedicação, preocupação em passar seus conhecimentos e experiências, e pela constante presença e auxílio.

À minha belíssima co-orientadora, Maria Teresa Schifino-Wittmann, pela amizade, carinho, apoio, confiança e bons conselhos.

Ao CNPq pela bolsa de estudos que me concedeu.

Aos colegas de laboratório, Paula Menna Barreto Dias e Marcelo Gomes Steiner, pela grande ajuda, tanto no campo quanto no laboratório e, principalmente, pela amizade e gargalhadas compartilhadas.

A todos os bolsistas e voluntários, que foram indispensáveis para a realização deste trabalho, em especial à Fernanda Guedes, pela imensa ajuda e amizade.

Aos funcionários da Estação Experimental Agronômica, Carlos, Roberto e Celso, pelo humor e valiosa ajuda no campo, e aos secretários e amigos, Ione, Rogério e Kátia pela ajuda com a parte burocrática.

Aos professores, pelo aprendizado que me proporcionaram, especialmente, aos Carlos Nabinger e Luís Mauro Rosa pela assistência na morfologia e à Simone Meredith Scheffer-Basso e Daniel Montardo pela grande força com as análises estatísticas.

A todos os novos amigos, entre eles, Tatiana Terra, Mirela Lunardi, Miriam Trevisan, Vladirene Vieira, Armando dos Santos, Ionara Conterato, Elaine Biondo, Janice Leivas, Viviane Pretz, Rogério Jaworsky, Carine Simioni, Rodrigo Lopez, Fernando Gimenez, Doriane Sachetto, Marisa Pozzobon e Júlio Marques.

Aos meus lindos pais, pelo seu amor e por me apoiarem e incentivarem a realizar mais essa etapa, e aos meus queridos irmãos, pela amizade e companheirismo permanentes e pela companhia em alguns finais de semana.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Plantas de Lavoura pela força sempre que precisei.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço à Deus pela vida maravilhosa que tem me concedido, pelos pais e irmãos brilhantes que tenho e pelos meus grandes amigos e amores.

Faço minhas as palavras do grupo O Rappa na voz de Marcelo Falcão: “Brindo à casa, brindo à vida, meus amores, minha família...”

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA COLEÇÃO BÁSICA DE TREVO-BRANCO (*Trifolium repens* L.)¹

Autora: Fernanda Bortolini

Orientador: Miguel Dall'Agnol

Co-orientadora: Maria Teresa Schifino-Wittmann

RESUMO

O trevo-branco é uma das espécies de leguminosas mais utilizadas em pastagens consorciadas durante o inverno e primavera no RS, mas apesar disso pode apresentar problemas de persistência, principalmente no verão. O objetivo deste trabalho foi avaliar características moleculares e morfológicas de 79 acessos pertencentes à coleção básica de trevo-branco obtida do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a fim de caracterizar a variabilidade genética existente. A caracterização molecular foi feita utilizando-se *bulks* de 20 indivíduos por acesso, que foram caracterizados através de marcadores do tipo RAPD. Os resultados indicaram similaridade genética média entre os acessos variando de 0,18 a 0,58 (índice de Jaccard) e permitiram a identificação e diferenciação dos acessos estudados. A análise morfológica foi realizada em 17 plantas de cada acesso, que foram estabelecidas na EEA/UFRGS, em Eldorado do Sul. Os resultados mostraram, através do cálculo da distância Euclidiana, que os acessos 57 (Índia) e 80 (EUA) foram os que apresentaram a maior distância (3,18), ao passo que a menor distância (0,17) foi verificada entre os acessos 58 (Índia) e 68 (Jamaica). O comprimento de estolão foi o caracter com maior contribuição relativa para divergência genética (50%), seguido pela estatura da planta (22%) e área foliar (14%). A análise de correlação simples entre as variáveis mostraram correlação altamente significativa entre comprimento de estolão e comprimento de entrenós ($r=0,65$). Os resultados evidenciaram a grande variabilidade genética existente na coleção e a vantagem do uso conjunto das análises molecular e morfológica para a identificação de genótipos para utilização em programas de melhoramento do trevo-branco.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Plantas Forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (106p.) Março, 2004.

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF WHITE CLOVER (*Trifolium repens* L.) COLLECTION²

Author: Fernanda Bortolini

Adviser: Miguel Dall' Agnol

Co-adviser: Maria Teresa Schifino-Wittmann

ABSTRACT

White clover is one of the most used species in mixed pastures in RS during the winter and spring, but it can have problems with persistence, especially during the summer. This work was aimed to evaluate molecular and morphological features of the white clover core collection obtained from the United States Department of Agriculture (USDA), represented by 79 accessions, in order to characterize the existent genetic variability. The molecular characterization was made by analyzing bulked DNA from 20 individuals from each access. The results showed average genetic similarity ranging from 0,18 to 0,58 (Jaccard index) and allowed the identification of each accession. The morphological evaluation was made in 17 plants from each access, established in the field at the Estação Experimental Agronômica da UFRGS, in Eldorado do Sul. The Euclidian distance showed that the access 57 (Indian) and 80 (USA) presented the biggest genetic distance while the smallest was presented by the accesses 58 (Indian) and 68 (Jamaica). The stolon length was the character with the biggest relative contribution to the genetic divergence (50%), followed by the plant's high (22%) and leaf area (14%). The correlation analysis between stolon length and internodes length was high (0,65) and highly significant. The results pointed out to a large genetic variation among the access and to potential to the simultaneous use of molecular and morphological analysis, which would allow for the identification of accesses to be used in white clover breeding programs.

² Master of Science dissertation in Forage Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (106p.) March, 2004.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 Considerações gerais sobre a espécie	04
2.2 Melhoramento genético e caracterização morfológica	10
2.3 Marcadores RAPD e caracterização da variabilidade genética	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Material Vegetal	31
3.2 Semeadura em casa de vegetação	34
3.3 Caracterização molecular	35
3.3.1 Extração e quantificação de DNA	35
3.3.2 Reação de amplificação de DNA	36
3.3.3 Visualização dos fragmentos de DNA e análise dos dados de RAPD	38
3.4 Caracterização morfológica	39
3.4.1 Caracterização do clima	40
3.4.2 Caracterização do solo	40
3.4.3 Avaliação das plantas no campo	41
3.4.3.1 Estatura e hábito de crescimento das plantas	42

3.4.3.2 Intensidade do florescimento	42
3.4.3.3 Comprimento de estolão e número de nós por estolão	43
3.4.3.4 Diâmetro de estolão	44
3.4.3.5 Produção de matéria seca	44
3.4.3.6 Área foliar por folha	45
3.4.4 Análise estatística	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Caracterização molecular	46
4.2 Caracterização morfológica	52
4.2.1 Análise de divergência genética	58
4.2.2. Correlação entre as variáveis	64
4.3. Comparação entre resultados moleculares e morfológicos	67
5. CONCLUSÕES	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
7. APÊNDICES	77

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Identificação dos acessos da coleção básica de trevo-branco... ..	32
2. Iniciadores testados e, em destaque (azul), os incluídos no estudo.....	37
3. Cronograma de atividades do ano de 2003.....	42
4. Características morfológicas da coleção básica de trevo-branco (M = média e s = desvio-padrão).....	53
5. Contribuição relativa dos caracteres para divergência nas duas análises realizadas.....	60
6. Correlações simples entre as variáveis: comprimento de estolão (CES), número de nós/estolão (NN), comprimento de entrenós (CEN), diâmetro de estolão (DE), estatura (ES), hábito de crescimento (HAB), intensidade de florescimento (FLOR), área foliar/folha (AF) e produção total de matéria seca (MS total).....	64

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Plantas de trevo-branco em casa de vegetação, UFRGS, 2003.....	34
2. Visão geral do experimento na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2003..	41
3. Plantas de trevo-branco com diferentes intensidade de florescimento: A) sem nenhuma inflorescência ou botão floral (nota 0); B) com poucas inflorescências (nota 1); C) com um número médio de inflorescências (nota 2); e D) florescimento intenso (nota 3). EEA/UFRGS, 2003.....	43
4. Detalhe da medição do comprimento de estolão	43
5. Detalhe da medição do diâmetro de estolão	44
6. Detalhe do corte para avaliação da produção de MS	44
7. Dendrograma de similaridade genética baseado em dados RAPD entre os 79 acessos de trevo-branco.....	50
8. Dendrograma de dissimilaridade genética pelo método do vizinho mais distante para 78 acessos de trevo-branco baseado em 9 caracteres morfológicos (levando em consideração os dados de MS total).....	59
9. Dendrograma de dissimilaridade genética pelo método do vizinho mais distante para 78 acessos de trevo-branco baseado em 8 caracteres morfológicos (retirando da análise os dados de MS total).....	63

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AF.....	Área foliar
AFLP.....	Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
CEN.....	Comprimento de entrenós
CES.....	Comprimento de estolão
DE.....	Diâmetro de estolão
ES.....	Estatura
FLOR.....	Intensidade de florescimento
HA.....	Hábito de crescimento
IF.....	Intensidade de florescimento
MS.....	Matéria seca
NN.....	Número de nós
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
RAPD.....	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
RFLP.....	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição de DNA
s.....	Desvio-padrão

1. INTRODUÇÃO

Algumas espécies do gênero *Trifolium* L. apresentam papel fundamental nas pastagens do Rio Grande do Sul, uma vez que a maior parte da atividade pecuária baseia-se em regimes extensivos de produção, cuja principal fonte alimentar são os campos naturais, os quais apresentam o seu pico de crescimento na primavera e verão (Eisinger & Paim, 1994). Dentre as espécies desse gênero, a que mais se destaca é o trevo-branco (*Trifolium repens* L.), tanto pelo seu alto rendimento como pela sua qualidade de forragem (Nabinger, 1980).

O trevo-branco é uma das espécies de leguminosas mais utilizadas em pastagens consorciadas durante o inverno e primavera no RS. Em regiões mais frias e com boa distribuição de chuvas, vegeta o ano inteiro. Porém, apresenta um período de produção reduzido em regiões mais quentes e sujeitas a estiagens e, ainda, comporta-se como espécie anual de ressemeadura natural em situações extremas (Paim & Riboldi, 1994).

Essa espécie tem sido melhorada desde 1930 (Mather et al., 1995) e a caracterização do seu germoplasma tem sido geralmente realizada por marcadores morfológicos (Jahufer et al., 2002), cujas limitações tem gerado a necessidade de buscar outras alternativas que sejam mais eficientes para caracteres mais complexos e, portanto, de difícil identificação (Milach, 1999).

Com as tecnologias de marcadores moleculares tornou-se possível a detecção de polimorfismo genético ao nível de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998), a partir de amostras de células ou tecidos, podendo ser utilizado em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, e ainda com as vantagens de não sofrer influência ambiental e de identificar mutações que ocorrem em regiões não codificadoras de genes (Milach, 1999).

Os marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) estão entre os mais difundidos e utilizados (Cruz & Milach, 1998), e tem sido largamente usados na caracterização de genótipos e detecção da variabilidade genética intra e interpopulacional, entre outras.

A caracterização molecular é de grande importância, pois possibilita ao melhorista acessar o genótipo do indivíduo ao invés de apenas o fenótipo, permitindo, além de um melhor conhecimento do germoplasma, o planejamento dos cruzamentos a serem realizados, com base em informações de relacionamento genético estimado por marcadores moleculares. Além disso, Milach (1998) ressalta que a impressão digital genômica (*fingerprinting*) que tem sido usada para descrever o padrão molecular de um genótipo é importante para o patenteamento de cultivares. Barbosa Neto & Bered (1998) afirmam que com a nova lei de proteção da produção intelectual fica assegurada aos melhoristas de plantas a propriedade sobre os novas variedades criadas, sendo fundamental o estabelecimento de critérios que permitam a caracterização genética de cultivares com elevada precisão.

Portanto, a caracterização genética através do uso de marcadores moleculares de DNA acrescenta eficiência aos programas de melhoramento,

possibilitando o planejamento adequado dos cruzamentos, otimizando a identificação de combinações genéticas superiores (Barbosa Neto & Bered, 1998).

A fim de caracterizar a variabilidade genética existente na coleção básica de trevo-branco obtida do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), foi realizada a caracterização morfológica juntamente com a caracterização molecular do germoplasma da espécie. Para isso foram traçados os seguintes objetivos:

- 1) obter *fingerprints* genômicos de cada acesso;
- 2) verificar a variabilidade genética entre os acessos através de *bulks* genômicos;
- 3) avaliar 11 características morfológicas em 17 plantas por acesso.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações gerais sobre a espécie

O trevo-branco (*Trifolium repens* L.) é uma das leguminosas forrageiras mais importantes e amplamente distribuída no mundo, sendo originária da região do Mediterrâneo. Possui uma ampla variação de adaptação climática, alta qualidade nutricional e elevada capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico (Zohary & Heller, 1984). Sua ampla distribuição, ligada à sua natureza alógama, tem originado essa extensa variação adaptativa, principalmente em resposta a fatores climáticos (Garcia, 1995). O trevo-branco é hoje um membro da flora de qualquer continente. Nas Américas, sua distribuição estende-se do Alasca ao extremo sul da América do Sul (Gibson & Hollowell, 1966).

É uma espécie alotetraplóide com 32 cromossomos somáticos que pareiam regularmente formando 16 bivalentes e com herança dissômica. Apesar de ser uma espécie alógama e autoincompatível, algumas, poucas, plantas autógamas têm sido encontradas. A polinização é realizada normalmente por abelhas das espécies *Apis mellifera* L. e *Bombus* spp. (Pederson, 1995).

É uma leguminosa de ciclo hibernar, rasteira, estolonífera, com folhas compostas longamente pecioladas, folíolos obovais e bordos

denticulados, podendo apresentar manchas esbranquiçadas (Carámbula, s.d.; Alcântara & Bufarah, 1988). Apresenta inflorescência em glomérulo com um grande número de flores, de 50 a 200, de coloração branca ou rosada. Os frutos contêm geralmente três ou quatro sementes (Carámbula, s.d.). As sementes são muito pequenas, redondas a ovais, com aproximadamente 1,1 a 1,2 mm de comprimento e 0,9 a 1 mm de largura e variam de amarelo a marrom-avermelhado, dependendo da idade e do ambiente (Pederson, 1995), sendo de ótima qualidade, apresentando pureza de até 98% e valor germinativo de 80%, incluindo um máximo de 40% de sementes duras (Alcântara & Bufarah, 1988). Conforme Garcia (2000) existem dois motivos pelos quais a produção de sementes é importante para essa espécie: primeiro, que o sucesso da propagação de um cultivar depende de níveis de produção de semente que permitam uma multiplicação eficiente, assegurando uma oferta de sementes a preços competitivos; segundo, é que para a ressemeadura poder ser um mecanismo de persistência em anos favoráveis, a mesma dependerá de que exista um abundante banco de sementes no solo.

Sob o ponto de vista de persistência, o trevo-branco é classificado botanicamente como perene; porém, dependendo das interações favoráveis ou desfavoráveis dos fatores climáticos que atuam sobre o seu desenvolvimento, pode ser anual de ressemeadura natural ou bienal (Gibson & Hollowell, 1966). Com base nas características morfológicas e fisiológicas da espécie e em mais de 30 anos de experimentação e observação, Hollowell (1966) propõe que o trevo-branco seja classificado como anual de inverno, podendo comportar-se como perene quando vegetativamente.

Segundo Mather et al. (1995), com o passar do tempo, a seleção natural, auxiliada pelos melhoristas, tem separado os genótipos da espécie em diferentes tamanhos de folhas, ampliando a utilidade do trevo-branco. Garcia (2000) afirmou que o tamanho de folha tem sido a principal característica de diferenciação dos cultivares de trevo-branco e que normalmente são reconhecidos três grandes grupos: de folha pequena, média e grande. Conforme Carámbula (s.d.) e Mather et al. (1995), os tipos de folhas pequenas são mais indicados em situações de pastejo pesado, onde a persistência é importante, nesse grupo se inclui o tipo selvagem, apresentando plantas muito prostradas, estolões longos, flores pequenas, ciclo curto e baixos rendimentos. Os tipos de folhas grandes são mais apropriados para pastejos leves, sendo a maioria desses trevos do tipo Ladino, de porte mais alto, com estolões mais grossos e flores grandes; apresentam muito boa produção de matéria verde em condições úmidas. Smith et al. (1986) afirmaram que o trevo Ladino é uma forma gigante do trevo-branco, que é utilizada em áreas temperadas dos EUA, principalmente em pastagens consorciadas. Esse cultivar apresenta bom crescimento em associação com gramíneas perenes de estação fria como a festuca (*Festuca aundinacea* Schreb.) e a faláris (*Phalaris aquatica* L.), e mesmo com gramíneas perenes de verão, como *Paspalum dilatatum* Poir. (Ball et al., 1996). Mather et al. (1995) comentaram ainda que o extenso uso do trevo-branco tem sido para os tipos de folhas médias, os quais possuem características intermediárias em tamanho, entre a forma pequena e a grande, sendo que seu florescimento é mais abundante do que as do tipo grande e são utilizados principalmente em pastagens de média e curta duração.

Sendo uma das leguminosas forrageiras mais nutritivas e amplamente distribuída no mundo, o trevo-branco tem mostrado sua principal adaptação dentro de zonas temperadas (Mather et al., 1995). Planta típica de área temperada, não se adapta bem em regiões com altas temperaturas, adaptando-se a diversos tipos de solo, sendo que o melhor crescimento é encontrado em solos neutros, ricos em matéria orgânica e que tenham certa umidade, pois não tolera solos arenosos e secos (Carámbula, s.d.; Alcântara & Bufarah, 1988).

O trevo-branco é mais sensível ao déficit de água no solo do que as outras leguminosas perenes de inverno, devido à escassa profundidade do sistema radicular de seus estolões e ao pobre controle da transpiração. Boas condições de umidade e/ou o excesso hídrico aumentam sua produção de forragem e reduzem seus rendimentos de sementes, sendo que o teor de umidade ótimo para produzir sementes é menor do que aquele indicado para a produção de forragem (Garcia et al., 2000).

Os principais fatores envolvidos na baixa persistência dessa leguminosa são principalmente de origem climática, tais como as elevadas temperaturas estivais associadas a déficits hídricos superficiais (Arana et al., 2000). Segundo Paim (1988), o problema do trevo-branco no Rio Grande do Sul é sua baixa persistência, devido às altas temperaturas do verão e à baixa disponibilidade de água nesse período. De acordo com Paim (1993), nas condições climáticas do Estado, a sobrevivência do estolão e a ressemeadura natural são fatores importantes que asseguram a persistência da espécie nas pastagens. Aumentando a persistência pela sobrevivência do estolão durante

períodos secos, a produção de forragem seria mais uniformemente distribuída ao longo do ano. Nabinger (1980) ressalta ainda que a persistência e produção da espécie podem ser reduzidas tanto pelos níveis tóxicos de alumínio e manganês, como pela deficiência de fósforo, que caracterizam os solos de grande parte do RS. Por isso, são necessárias práticas para corrigir a acidez do solo e a realização de adubação fosfatada.

Outra característica do trevo-branco diz respeito a cianogênese, ou seja, as plantas liberam ácido cianídrico (HCN) quando suas folhas são danificadas. Paim et al. (1978), nos EUA, caracterizando progênies e cultivares dessa espécie obtiveram resultados de que a produção de HCN por plantas de trevo-branco pode funcionar como um mecanismo de defesa contra pequenos herbívoros. Verificaram ainda que populações com relativamente altas produções de HCN apresentaram, em média, florescimento precoce e maior comprimento de entrenós dos estolões. No entanto, Dall’Agnol et al. (1982) verificaram baixos conteúdos de ácido cianídrico para todos os cultivares e progênies avaliados na EEA em Eldorado do Sul, não obtendo nenhuma associação entre o conteúdo de HCN e rendimento de matéria seca (MS) ou sobrevivência de trevo-branco.

A espécie é utilizada preferencialmente como pastagem, sendo também próprio para feno e silagem; em áreas temperadas é a leguminosa mais importante (Alcântara & Bufarah, 1988). Após o estágio inicial de plântula, os estolões emergem da axila das folhas formando uma rede de estolões ramificados; durante essa fase, o trevo-branco tem ampla capacidade de propagação e seu comportamento é condicionado pelo microambiente ao redor

dos estolões (Frame et al., 1997). A importância do estolão está relacionada com a persistência da planta, uma vez que a permanência do trevo na pastagem se dá pela produção continuada de estolões ou por sementes. Além disso, o comprimento do estolão está relacionado aos diferentes tipos morfológicos, sendo que as plantas com estolões mais longos geralmente apresentam folhas e flores pequenas, hábito prostrado, ciclo curto e baixos rendimentos (Carámbula, s.d.).

De acordo com Pupo (1988), é uma espécie muito palatável, sendo equivalente à alfafa (*Medicago sativa* L.) em valor nutritivo. É normalmente estabelecido em associação com gramíneas, sendo que a escolha dessas depende da localização geográfica e da compatibilidade com o trevo (Pederson, 1995).

Dall'Agnol et al. (1982) avaliando cultivares e progênies de policruzamento de trevo-branco consorciados com azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e pensacola [*Paspalum sauræ* (Parodi) Parodi], obtiveram rendimentos de matéria seca, particularmente os de trevo-branco, bastante elevados, variando de 4.112 kg/ha, para a mistura com o cultivar Huia, a 9.041 kg/ha com a progênie 78-510. Em um ano, os rendimentos médios totais de MS de trevo-branco alcançaram 7.275 kg/ha, e a média de todos os tratamentos para o rendimento de MS total de todos os componentes da mistura foi de 7.680 kg/ha, sendo 5.440 kg de trevo-branco (71%), 1.910 kg de azevém (25%) e de 330 kg de inços (4%).

2.2 Melhoramento genético e a caracterização morfológica

Leguminosa dominante das pastagens temperadas, o trevo-branco tem sido aperfeiçoado através do melhoramento desde 1930. A Nova Zelândia é a maior região produtora de sementes dessa espécie, provendo de 50 a 55% do comércio mundial, seguida pela Dinamarca, Estados Unidos e América do Sul (Mather et al., 1995). Identificando pesquisas que melhorem a eficiência das estratégias de melhoramento para trevo-branco na Austrália, Jahufer et al. (2002) discutiram o papel fundamental do uso do germoplasma no melhoramento e a importância de caracterizar a diversidade genética dentro e entre acessos para atributos importantes que são bem documentados. Nesse estudo, quatro áreas foram identificadas como prioridades para pesquisas futuras: 1) capturar a diversidade genética potencial entre acessos introduzidos e ecótipos adaptados a condições limitantes, tais como estresse hídrico de verão e o uso de marcadores moleculares para acessar a diversidade genética; 2) compreender a morfologia e fisiologia da raiz e os mecanismos que envolvem o uso eficiente da água pela plântula de trevo-branco, com o objetivo de identificar critérios de seleção apropriados; 3) estimar os parâmetros genéticos quantitativos de atributos morfofisiológicos importantes, possibilitando prever respostas à seleção em ambientes alvos; 4) modelar estratégias de melhoramento de trevo-branco para avaliar as oportunidades de integração de estratégias moleculares com programas de melhoramento convencional.

A variabilidade genética é a base de todo o melhoramento de plantas (Allard, 1971) e pode ser verificada através de características

morfológicas ou moleculares (Federizzi, 1998). Contudo, a caracterização do germoplasma dessa leguminosa tem sido geralmente restrita à medição de atributos morfológicos (Jahufer et al., 2002).

Avaliando o crescimento de trevo-branco em relação à sua produção de sementes, Thomas (1980) afirmou que o estolão é a unidade básica de crescimento da espécie, e que, portanto, a sua morfologia deve ser levada em consideração em programas de melhoramento. Segundo Collins et al. (1997), o comprimento dos estolões por unidade de área, o tamanho das folhas e a produção de pecíolos são importantes indicadores da produção dessa forrageira quando a mesma é submetida ao pastejo. Em Eldorado do Sul, Viecelli (2000), avaliando o comprimento de estolões e número médio de nós por estolão de progênies provenientes de blocos de cruzamento, observou diferença significativa entre os 49 genótipos de trevo-branco estudados, verificando relação positiva e altamente significativa entre o diâmetro da planta e o comprimento dos estolões. Com base nos resultados, o autor concluiu que existe uma grande variabilidade entre os genótipos e que o tamanho do folíolo, o comprimento de estolão e a persistência serviram para caracterizar tipos morfológicos distintos entre as progênies, confirmando as observações de outros autores sobre isso.

De acordo com Sanderson et al. (2003), a persistência do trevo-branco em pastagens se deve principalmente ao crescimento de estolão. Baseados nisso, os autores realizaram um estudo com o objetivo de documentar os efeitos de estresses bióticos (insetos, fungos, larvas) e abióticos (chuva, seca, temperatura) no crescimento e complexidade do estolão. Os

resultados sugeriram que o clima e estresses bióticos são os principais fatores que controlam a oscilação na densidade de estolão de trevo-branco em pastagens do nordeste dos EUA. É necessário um manejo que mantenha um grande comprimento e massa de estolão, para auxiliar na persistência e competitividade da espécie.

Brink et al. (1999) compararam crescimento e persistência relacionados às características morfológicas de populações naturalizadas de trevo-branco (ecótipos) encontradas em muitas pastagens do sudeste dos EUA, com cultivares selecionados e germoplasma melhorado sob pastejo, em quatro estados do sudeste dos EUA. No final do experimento de dois anos, os autores verificaram que o comprimento do estolão dos ecótipos normalmente excedeu o dos cultivares e do germoplasma melhorado, em todos os locais, particularmente no inverno e primavera. Observaram um crescimento vegetativo superior dos ecótipos, atribuído à grande proporção de estolões com nós começando a expansão e enraizamento, particularmente durante o verão e, concluíram que os ecótipos são fontes de germoplasma disponíveis para incorporar em programas de melhoramento ou desenvolver diretamente um cultivar mais persistente.

Rosso & Pagano (2001), coletando e caracterizando morfológicamente 53 acessos de trevo-branco obtidos de populações naturalizadas na Argentina, relataram que a coleção foi agrupada em sete grupos distintos, sendo que as diferenças entre os grupos foram determinadas por diferenças agroecológicas nos locais de coleta e pelas 14 características avaliadas, entre as quais, estatura da planta, comprimento e largura do folíolo,

comprimento do pecíolo, espessura do estolão. Esse agrupamento forneceu uma estrutura adequada, onde a amostragem de uma grande diversidade dos acessos é desejada, e que a produtividade sazonal da pastagem e a densidade e espessura do estolão são características relevantes para o melhoramento.

A fim de estudar a variabilidade morfofisiológica de sete populações de trevo-branco, Scheffer-Basso et al. (2002) conduziram dois ensaios. Um, em casa de vegetação onde foram avaliados 21 parâmetros, e outro ensaio, no campo, onde foram realizadas duas medições, diâmetro e estatura das populações. Os autores concluíram que há variabilidade morfofisiológica entre populações da espécie, indicando possibilidade de seleção, sendo comprimento do pedúnculo floral, pecíolo foliar e diâmetro das plantas os caracteres que permitiram diferenciar os genótipos.

Segundo Seker et al. (2003), a plasticidade do trevo-branco resulta em mudanças no hábito da planta em resposta a diferentes estresses ambientais. A fim de caracterizar essas mudanças morfológicas associadas com a plasticidade dos clones, os autores submeteram 90 clones a quatro diferentes tratamentos: sem corte, ou cortes com intervalos de sete dias, e barreiras para enraizamento do estolão, ou ausência de barreira. Os clones foram medidos para as seguintes características: peso da matéria seca (PS) de folha, de estolão e de raiz, comprimento de estolão e número de ápices do estolão com comprimento ≥ 1 cm, além do PS de forragem (PS de folha + PS de estolão), PS de biomassa (PS de raiz + PS de forragem), relação folha:caule (PS de folha + PS de estolão) e relação parte aérea:raiz (PS de forragem + PS de raiz). Os resultados mostraram que a média das plantas foi

reduzida significativamente para todas as características com cortes repetidos. A barreira de enraizamento reduziu significativamente o número de ápices do estolão, PS de raiz, e relação folha:caule, enquanto aumentou o PS de estolão e a relação parte aérea:raiz. Em outras palavras, foram verificadas mudanças na relação entre algumas características das plantas expostas a diferentes estresses. Como conclusão os autores afirmaram que a magnitude da plasticidade parece ser um fenômeno clone-específico que pode mascarar os ganhos com seleção de progênes avaliadas em diferentes ambientes.

Eisinger & Paim (1994) conduziram um estudo, em Eldorado do Sul, para verificar a variabilidade de 27 clones de trevo-branco, obtidos a partir da cultivar Jacuí S2, cultivados em solos com diferentes doses de calcário (Ca) e fósforo (P), em relação a características relacionadas com produção de forragem. Para isso foram analisadas as taxas de crescimento em altura e diâmetro, comprimento de entrenós e produção de MS de cada clone. O comprimento de entrenó não apresentou correlação significativa ($P \geq 0,01$) com as demais variáveis, ao passo que as correlações entre as taxas de crescimento e dessas com a produção de MS forma positivas e significativas ($P \leq 0,01$). As diferenças entre os clones e os níveis de P foram significativas ($P < 0,05$) para todas as variáveis analisadas e o efeito do Ca foi significativo apenas para a taxa de crescimento em diâmetro, assim como a interação Ca x P. Com isso, os autores puderam concluir que o uso de calcário e adubação fosfatada é indispensável para a produção de forragem de trevo-branco, nas condições da Depressão Central, e que a população de trevo-branco cv. Jacuí

apresenta variabilidade para crescimento, comprimento de entrenó e produção de MS, justificando seu uso em programas de seleção.

Conforme Lüscher et al. (2001), a identificação de características morfológicas e fisiológicas que contribuam para aumentar a persistência e crescimento durante o inverno, como também aumentar a habilidade de competição do trevo-branco nas baixas temperaturas da primavera são de grande importância. Esses autores realizaram um estudo na Suíça com o objetivo de examinar a dinâmica de desenvolvimento da folha de dois cultivares de trevo-branco (AberHerald e Grasslands Huia), sob condições de campo e determinar a importância da área foliar no inverno e da competição com azevém perene (*Lolium perenne* L.) para sobrevivência ao inverno e rebrote do trevo na primavera. Os resultados demonstraram o papel positivo crucial da área foliar durante o inverno, o efeito negativo da competição e a importância do trevo para sobrevivência ao inverno e subsequente rebrote da espécie na primavera.

Helgadóttir et al. (2001) realizaram um estudo com os objetivos de caracterizar a morfologia de populações sobreviventes de cultivares de trevo-branco, AberHerald e Undrom, selecionadas sob condições de frio intenso, investigar a resposta do crescimento de populações selecionadas sob simulação de temperaturas da primavera e estudar como essas respostas afetam a persistência e produção potencial das populações quando crescidas sob condições de campo na Islândia. Quanto à morfologia geral, os resultados do experimento em casa de vegetação mostraram que as populações formaram três grupos distintos, dependendo de sua origem geográfica. A

população AberHerald pode ser descrita como população “sul” e é caracterizada pelo alto rendimento, folhas grandes e grossas, pecíolos curtos e estolões grossos. As três populações norueguesas (HoKv9238, HoKv9262 e HoKv9275), ao contrário, possuem folhas pequenas, estolões finos, baixa produção de biomassa e altas taxas de aparecimento de folhas e nós. Entretanto, uma dessas, a HoKv9238 mostrou mais rápida taxa de extensão de estolão que todas as outras populações. As populações Undrom são intermediárias em rendimento, tamanho da folha e diâmetro do estolão, mas foram caracterizadas por pecíolos curtos. Os autores relataram que, interessantemente, mudanças morfológicas observadas nas sobreviventes Undrom foram opostas as da AberHerald. Desse modo, a seleção natural favoreceu, nesse caso, plantas com altas taxas de extensão de estolão, longos entrenós e grande comprimento específico de estolão. A área foliar e a acumulação de matéria seca total não foram afetadas. Os autores afirmaram ainda que resultados demonstraram a importância da plasticidade fenotípica das características da folha na manutenção da produção potencial, e que a seleção deve ser conduzida em mais de um ambiente. O crescimento sob simulação das temperaturas da primavera e um fotoperíodo de 12 h levou às principais mudanças na morfologia, comparando com o crescimento sob condições ótimas em casa de vegetação. As baixas temperaturas causaram um notável declínio nas taxas de extensão de estolão e aparecimento de folhas, comprimento dos pecíolos, área foliar e acúmulo de matéria seca em todas as populações. Outras características, tais como diâmetro de estolão,

comprimento de estolão específico e área foliar específica aumentaram com a redução da temperatura.

Em um estudo para verificar de que maneira a intensidade de luz e diferentes temperaturas influenciam na taxa de crescimento de trevo-branco, Beinhart (1963) submeteu alguns genótipos a várias temperaturas e intensidades luminosas em câmaras de crescimento. Verificou que ambos os fatores modificaram as taxas de crescimento das plantas por influenciarem a produção de área foliar. A temperatura mudou as taxas de produção de folhas primárias afetando os meristemas ativos e a ativação de novos meristemas (taxa de expansão), ao passo que a intensidade de luz teve pequeno ou nenhum efeito na atividade de meristemas ativos, mas influenciou a expansão. O autor verificou a menor taxa de expansão com altas temperaturas e baixas intensidades luminosas. Observou também que o acúmulo de matéria seca foi proporcional à área foliar sobre uma ampla variação de temperatura e intensidade luminosa.

Segundo Woodfield & Caradus (1994), a melhoria do desempenho do trevo-branco nas últimas seis décadas pode ser atribuída ao aumento do uso de fertilizantes, melhores práticas de manejo e ao desempenho de cultivares geneticamente superiores. Os autores avaliaram, na Nova Zelândia, a taxa de melhoramento genético durante as seis décadas passadas utilizando uma coleção mundial de 110 ecótipos e cultivares da espécie em um mesmo ambiente. Os cultivares foram agrupados de acordo com a década de lançamento, clima em que foram originados e tipo de plantas (tamanho das folhas). Os resultados mostraram que o ganho genético de rendimento e a

porcentagem de trevo na pastagem foi maior nos tipos de folha pequena (7,5 e 8,7% por década) e tipos de folha grande (6,6 e 8,3% por década), sendo observada a menor taxa de melhoramento nos cultivares de folhas médias, refletindo, segundo os autores, a ênfase no critério de seleção que favoreceu tamanhos de folhas pequeno e grande. A seleção para aumentar o rendimento de forragem, freqüentemente, resulta na troca de tamanho de folhas pequeno para médio e desse último para grande, ao contrário da seleção para aumentar a persistência que geralmente diminui o tamanho de folha. Quanto ao clima, cultivares originários de clima frio (oscilando de 3°C a 13°C) apresentaram melhores taxas de ganhos, tanto para rendimento, como para porcentagem de peso na pastagem (8,3 e 8,1% por década) do que os originários de climas mais frios, < 3°C, (3,5 e 3,2% por década) ou mais quentes, > 13°C, (1,5 e 2,6% por década). Conforme os autores, o declínio de rendimento de cultivares de clima quente desde 1960 é preocupante, mas pode simplesmente refletir a ênfase no critério de seleção que não o rendimento, tais como persistência e resistência a doenças.

Tradicionalmente, os melhoristas têm utilizado descritores morfológicos para o registro e lançamento de novas variedades. Ainda que a caracterização de cultivares feita dessa forma continue sendo predominante e importante, as limitações desse tipo de descritor têm gerado a necessidade de buscar outras alternativas, como os descritores de proteína, que são de grande utilidade em culturas como o trigo (*Triticum aestivum* L.), e mais recentemente, os descritores de DNA, especialmente pelo seu potencial de distinção de

genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados (Milach, 1999).

A diversidade fenotípica observada para muitas características pode ser devida a variações no genótipo, a variações no efeito do ambiente e na resposta diferencial de alguns genótipos ao ambiente (Federizzi, 1998). Através da utilização de descritores de DNA tornou-se possível acessar diretamente o genótipo de um indivíduo, evitando a influência do ambiente sobre a expressão do fenótipo, e permitindo uma ampla amostragem do genoma de um indivíduo (Milach, 1999).

2.3 Marcadores RAPD e a caracterização da variabilidade genética

Os marcadores moleculares permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética do germoplasma utilizado pelo melhorista, auxiliando-o na seleção dos progenitores de populações básicas ao estabelecer programas de melhoramento (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Conhecer a distância genética entre cultivares é útil em programas de melhoramento, pois permite uma amostragem eficiente, assim como a utilização dos recursos do germoplasma (Kongkiatngam et al., 1996).

Ferreira & Grattapaglia (1998) afirmaram que, com o advento das técnicas modernas de biologia molecular surgiram vários métodos de detecção de polimorfismo genético ao nível de DNA. Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição de

DNA). Mais recentemente, em meados da década de 80, o desenvolvimento do PCR (*Polimerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase, ou seja, processo de amplificação em cadeia utilizando a enzima DNA polimerase) levou ao desenvolvimento de outras classes de marcadores moleculares. PCR é uma técnica poderosa, utilizada para ampliar pequenas seqüências específicas de nucleotídeos em quantidades acessíveis à análise, a partir de uma quantidade mínima de DNA. Baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e de *primers* (iniciadores) específicos ou não. Tais iniciadores delimitam a seqüência de DNA de fita dupla a ser amplificada, cujos resultados são milhões de cópias idênticas.

O RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou “Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso”, Williams et al., 1990) ou AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction* ou “Polimorfismo Amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase”, Welsh & McClelland, 1990) é um dos vários tipos de marcadores que se baseiam no princípio da PCR. Esse marcador oferece a oportunidade de gerar, de modo simples e rápido, grande quantidade de polimorfismo de fragmentos de DNA, espalhados por todo o genoma, incluindo regiões de DNA repetitivo, usando iniciadores escolhidos ao acaso, nas reações de amplificação (Brammer, 2000). Suas aplicações incluem: a) obtenção de *fingerprints* genômicos de indivíduos, variedades e populações; b) análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; c) construção de mapas genéticos e localização de genes de interesse econômico.

O *fingerprinting*, ou impressão digital, tem sido utilizado para descrever o padrão molecular de um genótipo e sua demanda tende a crescer nos próximos anos no Brasil, especialmente em decorrência da Lei de Proteção de Cultivares (Milach, 1999). A tecnologia do RAPD é bastante acessível, com capacidade de detectar polimorfismo pela visualização direta das bandas no gel, eliminando todas etapas de transferência de DNA para membranas, hibridização com sondas e autoradiografia. Além disso, necessita quantidade mínima de DNA para análise genotípica (100 vezes menos que RFLP), e possui grande sensibilidade de detecção de polimorfismo. A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco - detecta apenas um alelo por loco, não permitindo que genótipos heterozigotos sejam diretamente discriminados dos homozigotos (dominância); outra limitação se refere às condições de amplificação, as quais não estando muito bem padronizadas podem resultar em ambigüidade na interpretação de algumas bandas; um terceiro fator limitante, é ainda ser uma técnica relativamente cara, devido ao custo da enzima *Taq polimerase* (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os autores afirmam ainda que a disponibilidade de marcadores RAPD permitiu estudos de diversidade e/ou classificação de cultivares de diversas espécies para as quais estudos desta natureza não eram possíveis devido à inexistência de baterias de sondas de RFLP. De acordo com Cruz & Milach (1998), os marcadores moleculares do tipo RAPD estão entre os mais utilizados e difundidos devido a sua facilidade de uso, rapidez na obtenção dos resultados e menor custo se comparado com outros marcadores moleculares.

Caracterizar a diversidade genética e o grau de associação entre e dentro de variedades de trevo-branco e coleções de ecótipos naturalizados é o primeiro passo para desenvolver e melhorar o germoplasma e cultivares de trevo-branco (Gustine et al., 2002). De acordo com Gustine & Huff (1999), a tecnologia do RAPD é um método seguro para caracterizar variação dentro e entre espécies e populações.

Gustine & Sanderson (2001) conduziram um estudo na Pensilvânia para determinar de que maneira a dinâmica da estrutura de clones de trevo-branco afeta a variação genética intraespecífica na espécie em três locais pastejados, amostrando para isso, 37 locais, totalizando 2133 amostras, 1160 coletadas em 1997 e 973 no ano de 1998. Utilizando três iniciadores com a técnica de RAPD, observaram inicialmente 32 bandas, das quais 28 foram selecionadas por estar representando todas as datas. Eles concluíram que a variabilidade genética da espécie é dinâmica, em escala local, o que contribui para sua grande persistência em áreas pastejadas.

A fim de avaliar a variação genética dentro e entre populações de trevo-branco de pastagens do nordeste dos EUA, através da análise de RAPD, em 22 populações de 18 locais de três estados, e utilizando três iniciadores, Gustine & Huff (1999) observaram, através da Análise de Variância Molecular (AMOVA), que as populações foram diferentes entre os 18 locais de amostragem, mas não diferiram entre os três estados. Encontraram considerável variância das distâncias genéticas dentro das populações (60-75%) e entre populações dentro dos três estados (25-35%). Em contraste, encontraram pequena variância na distância genética entre os estados (1-

10%). Segundo os autores esses resultados indicam que as populações dos três estados provavelmente representam aquela região sem nenhuma subdivisão na estrutura.

Gustine et al. (2002), com o objetivo de avaliar, quantificar e comparar a variação genética em cinco populações coletadas nos EUA e Canadá e três cultivares de trevo-branco (Regal, Sacramento e Will), utilizaram três iniciadores que produziram 28 marcadores polimórficos. Como resultados, devido ao alto nível de similaridade, as populações foram separadas em apenas dois grupos, um grupo consistindo de quatro acessos coletados de pastagens estabelecidas há bastante tempo, e o outro grupo incluindo os três cultivares mais uma população, originalmente derivada de coleções de pastagem e que tem um tamanho de folha grande. A surpreendente similaridade genética das oito populações derivadas de diferentes climas e regiões geográficas do continente pode indicar uma origem européia comum para muitos dos trevos-brancos naturalizados em pastagens norte americanas. Após a AMOVA, os autores encontraram alta variância genética dentro das populações (de 88 a 100%) e baixa variância entre pares de populações (de 0 a 12%), concordando com a natureza alógama da espécie.

Campos-de-Quiroz & Ortega-Klose (2001), num estudo para avaliar o relacionamento genético e os níveis de variabilidade genética existente entre um grupo de 16 progenitores elite de trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.), espécie alógama, organizados em quatro subgrupos de quatro pais cada, através da análise de RAPD, utilizando 21 iniciadores que produziram 135 bandas polimórficas confiáveis, concluíram que a técnica de RAPD representa

uma valiosa fonte de informação genética para programas de melhoramento da espécie estudada.

Utilizando marcadores morfológicos, isoenzimáticos e RAPD para estimar a variação genética dentro e entre dois cultivares de trevo-vermelho, Kongkiatngam et al. (1995) constataram que isoenzimas e RAPD podem ser usados com maior eficácia do que os marcadores morfológicos, pois fornecem melhores estimativas da variação genética, provendo ferramentas úteis para caracterização de germoplasma, conservação e utilização, bem como para estudos de genética e melhoramento de trevo-vermelho.

Um estudo prévio em populações de *Medicago polymorpha* L. (espécie autógama), coletadas ao longo do gradiente ambiental revelou notável diferenciação ecotípica em muitas características adaptativas (Paredes et al., 2002). Esses autores, então, utilizaram o RAPD para avaliar a divergência genética em 36 acessos coletados por todo o longo gradiente de aridez no Chile central (1000 Km). Os 40 iniciadores revelaram um alto grau de polimorfismo e geraram um total de 295 bandas, das quais 230 (78%) foram polimórficas. A média de similaridade entre os genótipos foi 91%, indicando baixo grau de divergência, com um grande grupo (22 acessos coletados mais ao norte) mostrando uma similaridade de 100%, e os 17 acessos restantes apresentando uma maior divergência, com valores de similaridade maiores que 90%. Conforme os autores, uma das explicações para esse fato é que a espécie foi introduzida há pouco tempo, e um pequeno número de indivíduos estariam envolvidos na introdução original dessa espécie no Chile, e isso levou a um longo e permanente “efeito do fundador”, especialmente no norte onde as

espécies foram primeiramente introduzidas. E se a linha de expansão ou invasão, de *M. polymorpha* e de outras cinco espécies naturalizadas desse gênero, foi realmente do norte para o sul, é possível concluir que as populações do norte tiveram mais tempo para se especializar do que as do sul.

Segundo Kölliker et al. (2001), a análise de uma coleção de germoplasma inteira pode ser limitada pelo grande número de plantas individuais necessárias, mas, a fim de superar a limitação pode-se utilizar amostras em *bulk* (mistura) de cultivares ou acessos. Análises em *bulk* de DNA, não somente, reduzem drasticamente o número de amostras necessárias, como também resultam em uma diluição de alelos raros e conseqüentemente simplifica o perfil individual de um cultivar ou acesso. *Bulks* de DNA e amostras de tecidos têm sido usados para investigar variação genética entre cultivares de várias espécies incluindo canola (*Brassica napus* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.) e trevo-vermelho. A maioria desses estudos foram baseados em marcadores do tipo RAPD, com alguns estudos destinados ao desenvolvimento de estratégias para avaliar a variabilidade genética usando amostras em *bulk*. Mesmo com outras técnicas, como por exemplo AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), o uso de uma única mistura de folhas por cultivar ou acesso permite aos melhoristas separar rapidamente grandes coleções de germoplasma.

Kölliker et al. (2001) demonstraram que análises de AFLP utilizando amostras em *bulks* para três cultivares de trevo-branco, geraram dados correspondentes aos de análise de plantas individuais dos mesmos três

cultivares. Concluíram que as amostras de folhas em *bulk* provaram ser uma ferramenta poderosa para avaliar a diversidade genética entre cultivares e acessos de trevo-branco, pois aproximadamente 90% das bandas presentes em plantas individuais estavam sempre presentes nas misturas. A maioria das bandas ausentes nos *bulks* eram bandas raras que ocorrem em menos de 25% das plantas individuais.

Kongkiatngam et al. (1996) avaliando o uso de marcadores RAPD de uma mistura de amostras de DNA genômico (*bulk*) para identificar cultivares de trevo-vermelho, e testando o efeito dos diferentes números de indivíduos na mistura, concluíram que os padrões de RAPD de *bulks* de 20 indivíduos são bons representantes dos cultivares heterogêneos de trevo-vermelho, pois foram capazes de remover as variações intracultivares obtidas com *bulks* de dois, três, quatro, cinco e dez indivíduos; e pelo menos dois iniciadores foram requeridos para diferenciar os 15 cultivares da espécie, os quais apresentaram alto nível de polimorfismo. Portanto, afirmaram que a análise de RAPD é uma poderosa ferramenta para identificação de cultivares e determinação de genótipos.

Fu et al. (2003) em um estudo com cinco acessos de linho (*Linnum usitatissimum* L.), realizado para avaliar a estratégia de *bulks* em análise de RAPD, verificaram que: 1) tanto os *bulks* formados antes de extrair o DNA como os formados após a extração geraram dados RAPD consistentes para análise; 2) diferentes amostras misturadas de um acesso heterogêneo apresentaram padrões diferentes de variação pois, dependendo do tamanho da amostra utilizada, alguns *bulks* podem não amostrar todos os alelos de baixa

freqüência de algum loco. *Bulks* 10 indivíduos por acesso detectaram variações na maioria dos locos, já *bulks* com mais de 10 indivíduos não necessariamente adicionaram mais resolução para análise de RAPD em linho; 3) os *bulks* geraram relacionamentos genéticos compatíveis com os resultados obtidos através das amostras individuais. Os autores concluíram que os resultados foram animadores para a utilização de *bulks* em análise de RAPD de linho, assim como, germoplasma de outras plantas.

Em um estudo para investigar a variabilidade de 20 populações abandonadas de chá coreano [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] usando a metodologia do RAPD e processo de *bulk* de DNA (20 indivíduos misturados para cada população), Young-Goo et al. (2002) testaram 50 iniciadores, sendo que 13 desses revelaram diversidade entre as populações e geraram 26 marcadores polimórficos. A similaridade variou de 0 a 0,79, com média de 0,44. Os autores citaram que essa baixa diversidade genética pode ser explicada pelo estreitamento da base genética dessas populações introduzidas da China, pela curta história e ambiente relativamente homogêneo dessas populações, pela destruição em massa das plantações locais de chá no século XIV, assim como pelo modo de reprodução da espécie, a qual é alógama e, por isso mantém uma alta variabilidade intrapopulacional quando comparada com a variabilidade interpopulacional. Concluíram que a técnica de RAPD com o uso de misturas de DNA além de permitir avaliar a diversidade genética entre as plantações de chá coreano, ajuda na formulação de estratégias de conservação para a espécie.

Por outro lado, alguns autores criticam o uso de *bulks* por encontrarem diferenças entre o padrão obtido através da análise individual e o *bulk*. Dulson et al. (1998) comentaram que essas diferenças podem estar relacionadas com o número total de sítios alvo disponíveis por reação, os quais variam tanto pela seqüência do iniciador como pela amostra de DNA utilizada. Isso alteraria as chances de anelamento de qualquer sítio com o iniciador e produziria uma abundância do fragmento amplificado, gerando uma competição pelos sítios de amplificação. Segundo Brummer et al. (1995) essas diferenças surgem porque os alelos raros podem não ser amplificados devido a competição dos sítios mais comuns quando o DNA é misturado. Entretanto, vários autores, entre eles, Kongkiatngam et al. (1996); Dulson et al. (1998); Mengoni et al. (2000); Kölliker et al. (2001) afirmaram que grandes *bulks* (20 indivíduos) são eficientes, pois não modificam substancialmente os resultados independente da quantidade e estrutura do polimorfismo.

De acordo com Thompson & Nelson (1998), a grande habilidade dos marcadores RAPD é o grande número de iniciadores aleatórios disponíveis e o grande conjunto de dados que podem ser gerados por eles. Entretanto nem todos os iniciadores são igualmente informativos. Por isso, os autores buscaram identificar um pequeno conjunto de primers RAPD que possam descrever adequadamente os relacionamentos entre 35 ancestrais norte americanos de soja [*Glycine max* (L.) Merr.]. Utilizaram análise de componentes principais para identificar os fragmentos RAPD associados com a maior origem de variação, após fizeram uma análise de agrupamento e em seguida a validação desse conjunto de iniciadores. Os resultados da análise de

agrupamento foram comparados com os obtidos por Thompson et al. (1998), e confirmaram que um grupo de 35 iniciadores fornecem uma medição acurada dos relacionamentos entre os 35 genótipos.

A disponibilidade de novas tecnologias, como marcadores moleculares e transgênicos, tem aberto uma nova dimensão para o melhoramento, e o uso dessas tecnologias poderá complementar as estratégias convencionais. A aplicação de marcadores moleculares para seleção assistida será útil para atributos difíceis de medir por métodos convencionais (Jahufer et al., 2002), além de reduzir consideravelmente os custos de seleção dessas características (Oram & Lodge, 2003). Em um futuro próximo, o desenvolvimento de marcadores moleculares para características complexas do trevo-branco tais como morfologia de raiz, habilitará a identificação rápida de genótipos adequados (Jahufer et al., 2002).

Crochemore et al. (1998) estudando a estruturação da diversidade genética da alfafa através da utilização de características agronômicas e morfológicas e sua relação com marcadores RAPD, relataram que a análise da relação entre as distâncias baseadas nas características morfológicas e nos marcadores RAPD, que foram realizadas em 26 populações, mostraram que ambos os tipos de características separam os principais grupos de variação de maneira similar.

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), a tendência geral do melhoramento genético de plantas é a integração das técnicas clássicas com aquelas mais modernas da biotecnologia, levando-se em consideração as vantagens e limitações de cada uma delas. Por exemplo, Steiner & Santos

(2001) em um estudo para caracterizar e comparar classificações de marcadores morfológicos e RAPD de 28 genótipos ecologicamente variados da coleção de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) do NPGS (*National Plant Germoplasma System* USDA) e determinar o relacionamento de descritores, morfológicos e RAPD, com características ecogeográficas dos locais de coleta dos genótipos, concluíram que a utilidade de combinar características genéticas, morfológicas e ecológicas revela combinações entre vários genótipos, as quais não seriam evidenciadas com a utilização de somente uma medida, e podem fornecer um entendimento mais completo da diversidade em cornichão e da coleção de germoplasma dessa espécie.

Portanto, a utilização de marcadores moleculares a curto prazo envolve basicamente, a identificação e geração de genótipos; já a médio e longo prazo, os marcadores permitem quantificar a variabilidade genética ao nível de DNA e correlacioná-la com a expressão fenotípica com procedimentos de mapeamento genético. Esses marcadores geram grande quantidade de caracteres adicionais que, combinados com características fenotípicas, fornecem um quadro mais completo para o agrupamento de genótipos e o planejamento de cruzamentos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho apresentou um enfoque molecular e outro morfológico. A caracterização molecular foi realizada com 79 acessos - o acesso 52 não foi incluído na análise devido a problemas de germinação e estabelecimento - através de marcadores RAPD utilizando 29 iniciadores. A caracterização morfológica foi realizada medindo-se 11 variáveis em 17 plantas de cada acesso, sendo elas: CES (comprimento de estolão); DE (diâmetro de estolão); NN (número de nós/estolão); CEN (comprimento de entrenós); AF (área foliar/folha); ES (estatura da planta); HA (hábito de crescimento); IF (intensidade de florescimento); MS (produção de matéria seca por planta) no primeiro corte, no segundo corte e total. Devido a problemas no estabelecimento dos indivíduos no campo, os acessos 36 e 52 apresentaram poucas repetições e por isso foram retirados da análise, portanto a análise morfológica foi realizada para 78 acessos.

3.1 Material Vegetal

Foram utilizados 80 acessos de trevo-branco, numerados de 01 a 80, sendo que os primeiros 78 acessos foram obtidos da coleção básica de trevo-branco, cujas sementes foram provenientes do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA – *United States Department of*

Agriculture). Já as sementes do acesso 79 foram procedentes da Nova Zelândia, e as do acesso 80 oriundas dos EUA. A numeração dos acessos e sua respectiva identificação encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação dos acessos da coleção básica de trevo-branco

Nº do acesso	Identificação	País em que foi obtido	Estado de melhoramento
1	SD G 14024	Itália	Incerto
2	SD	Israel	?
3	SD SRVR	Estados Unidos	Melhorado
4	SD FM-80	Marrocos	Selvagem
5	SD G 26444	China	Mat. cultivado
6	SD T-39	Romania	Selvagem
7	SD ILCA 11623	Etiópia	Selvagem
8	SD G 24600	Alemanha	Mat. cultivado
9	SD TO-C-740216	Japão	Incerto
10	SD 134	Grécia	Selvagem
11	SD 262	Itália	Selvagem
12	SD N° 491	Cazaquistão	Incerto
13	SD M-40	Espanha	Incerto
14	SD G 25971	Noruega	Incerto
15	SD GRASSLANDS C2478	Nova Zelândia	Melhorado
16	SD A 1835	Colombia	Incerto
17	SD K 53945	Camarões	Incerto
18	SD A-1067	Polónia	Incerto
19	SD NSL 085524	Costa Rica	Mat. cultivado
20	SD NLS 085525	Uruguai	Melhorado
21	SD NLS 085526	Austrália	Incerto
22	SD NLS 083062	Hungria	Incerto
23	SD BLANCA (R.V.P. La)	Bélgica	Cultivar
24	SD N° 16003	Espanha	Selvagem
25	SD N° 49	Chile	Incerto
26	SD N° 51	Chile	Incerto
27	SD CANADIAN LADINO	Canadá	Cultivar
28	SD REELI	Austrália	Cultivar
29	SD SELOMME	França	Tipo local
30	SD PLOVDIV	Bulgária	Tipo local
31	SD NORTH AMERICAN LA	Estados Unidos	Cultivar
32	SD	Irlanda	Incerto
33	SD	Irlanda	Incerto
34	SD N° 17515	Áustria	Selvagem
35	SD	Paquistão	Incerto
36	SD	Nigéria	Incerto
37	SD N° 3608	Portugal	Incerto
38	SD N° 3717	Irã	Incerto

Tabela 1. Continuação...Identificação dos acessos da coleção básica de trevo-branco

Nº do acesso	Identificação	País em que foi obtido	Estado de melhoramento
39	SD N° 17065	Grécia	Selvagem
40	SD K 716	Afeganistão	Selvagem
41	SD 17269	Iugoslávia	Selvagem
42	SD N° 17504	Áustria	Selvagem
43	SD ST-41	Bósnia-Herzegovina	Selvagem
44	SD ML-48-65	Estados Unidos	Melhorado
45	SD NORA	Suécia	Cultivar
46	SD PODKOWA	Polônia	Cultivar
47	SD ROBUSTA	Suécia	Cultivar
48	SD N° 9-55	Israel	Incerto
49	SD NEW ZEALAND WHITE	África do Sul	Tipo local
50	SD N° 522	África do Sul	Cultivar
51	SD N° A-811	Argentina	Incerto
52	SD N° 888	Tunísia	Selvagem
53	SD N° A-1343	Peru	Incerto
54	SD GRASSLANDS PITAU	Nova Zelândia	Cultivar
55	SD D-1601	Federação Russa	Selvagem
56	SD AC 3346	Turquia	Incerto
57	SD N° 9425	Índia	Tipo local
58	SD N° 10808	Índia	Incerto
59	SD N° 9981	Líbano	Incerto
60	SD NLS 085499	Holanda	Melhorado
61	SD NLS 083032	Costa Rica	Selvagem
62	SD N° 16081	França	Selvagem
63	SD N° 16319	Suíça	Selvagem
64	SD N° 16236	Suíça	Selvagem
65	SD MORSO OTOFTE I	Dinamarca	Cultivar
66	SD KAMEKE	Alemanha	Cultivar
67	SD N° 3516	Portugal	Incerto
68	SD NLS 083034	Jamaica	Incerto
69	SD P. F. 810	Argentina	Incerto
70	SD NLS 078354	Turquia	Incerto
71	SD Shaftal	Afeganistão	Mat. cultivado
72	SD K.5181	Quênia	Cultivar
73	SD JBR II / 64	Polônia	Cultivar
74	SD 610	Brasil	Mat. cultivado
75	SD 558	Uruguai	Mat. cultivado
76	SD DT-3189	China	Selvagem
77	SD S-35-26	Romania	Incerto
78	SD GR 391	Marrocos	Selvagem
79	GRASSLANDS HUIA	Nova Zelândia	Cultivar
80	cv. Ladino Regal	Estados Unidos	Cultivar

? = não se tem informação; Mat. cultivado = material cultivado.

3. 2 Semeadura em casa de vegetação

Foram semeadas 25 sementes de cada acesso em bandejas de isopor contendo terra vegetal para floriculturas. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para copos plásticos, permanecendo uma planta em cada copo. Os acessos 36, 52 e 76 apresentaram problemas de germinação e, por isso suas sementes foram escarificadas manualmente com lixa fina para quebra da dormência. Depois da escarificação, as sementes foram colocadas em placas de Petry contendo papel filtro umedecido com água destilada e mantidas em câmara de germinação com temperatura constante de 25°C. Após a germinação dessas sementes, as plântulas foram transplantadas para bandejas de isopor e posteriormente transferidas para copos plásticos (Figura 1).



Figura 1. Plantas de trevo-branco em casa de vegetação, UFRGS, 2003.

Após três a cinco meses, realizou-se a coleta dos folíolos jovens para análise genética e, passados um a 12 meses, essas plantas foram transplantadas para condição de campo na Estação Experimental Agronômica

da UFRGS em Eldorado do Sul, RS para as medições dos atributos morfológicos, conforme 3.4.3.

3.3 Caracterização molecular

3.3.1 Extração e quantificação de DNA

Foi coletado um folíolo jovem de 20 indivíduos por acesso com o auxílio de uma pinça e utilizando luvas para evitar contaminação do material. Os folíolos foram macerados juntos (misturados em proporções iguais) formando uma amostra por acesso. Após a maceração, as amostras foram conservadas em freezer para posterior extração de DNA, que era geralmente realizada no dia seguinte. O protocolo de extração utilizado foi o de Doyle & Doyle (1987), que é fundamentado na utilização do detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), com algumas modificações. Em seguida, foi realizada a quantificação do DNA das amostras através de espectrofotômetro Spectronic Gênesis 2 para controle da qualidade e estimativa da concentração do DNA. Para isso, fez-se, de cada acesso, uma diluição de 5 μ L da solução de DNA extraído em 495 μ L de água MilliQ estéril, a qual foi colocada em uma cubeta e submetida a leitura no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, a fim de determinar a concentração e pureza de DNA e polissacarídeos, respectivamente. A pureza da amostra do DNA foi medida pela razão entre as duas leituras (260/280), sendo que o DNA puro deve ter uma razão de 1,8 e 2,0. Quando havia contaminação com fenol foi repetida a extração utilizando 5% de β -mercaptoetanol (em vez da concentração usual de

2%). Depois de realizada a quantificação, foi adicionada solução tampão TE pH 7,4 nas amostras de DNA para padronizar as concentrações a 500ng/ μ L, 200ng/ μ L e 100ng/ μ L, exceto para as amostras que não atingiram pelo menos 100ng/ μ L, as quais não sofreram modificações na concentração. Essas soluções constituíram as soluções estoques de DNA nas três concentrações anteriormente citadas e, a partir dessas foram preparadas as soluções de trabalho de cada acesso na concentração final de 3 ng/ μ L.

3.3.2 Reação de amplificação de DNA

A reação de PCR se deu conforme o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), com modificações. Foi conduzida em tubos 0,6 mL totalizando um volume final de 15 μ L. Os componentes para reação consistiram em 5 μ L da solução de trabalho de DNA (15ng/ μ L), 1,3 μ L de tampão PCR 10x, 0,4 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1,04 μ L de 10 mM dNTP mix contendo 2,5 mM de cada um dos quatro nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 3 μ L de *primer* (5ng/ μ L), 0,2 μ L de *Taq* DNA polimerase (5U/ μ L) e água MilliQ esterilizada para completar o volume.

Foram selecionados 44 iniciadores da Empresa Operon Technologies (Alameda, CA), de acordo com trabalhos já realizados com trevo-branco, trevo-vermelho e cornichão. Esses iniciadores foram testados, sendo que 24 deles amplificaram pelo menos um loco para a maioria dos acessos e, por isso foram utilizados neste trabalho (Tabela 2). Os 20 restantes desses iniciadores não foram incluídos devido a ausência de seqüências amplificadas em mais de 50 acessos.

Tabela 2. Iniciadores testados e, em destaque (azul) os incluídos no estudo

Primer	Seqüência (5' – 3')	Primer	Seqüência (5' – 3')
OPA-08	GTGACGTAGG	OPH-15	AATGGCGCAG
OPA-10	GTGATCGCAG	OPAB-14	AAGTGCAGACC
OPB-06	TGCTCTGCCC	OPAG-20	TGCGCTCCTC
OPB-07	GGTGACGCAG	OPAK-05	GATGGCAGTC
OPB-08	GTCCACACGG	OPAL-12	CCCAGGCTAC
OPB-13	TTCCCCCGCT	OPAN-03	AGCCAGGCTG
OPB-14	TCCGCTCTGG	OPAP-01	AACTGGCCCC
OPG-03	GAGCCCTCCA	OPAP-19	GTGTCTGCCT
OPG-04	AGCGTGTCTG	OPAQ-02	ACCCTCGGAC
OPG-05	CTGAGACGGA	OPAQ-04	GACGGCTATC
OPG-06	GTGCCTAACC	OPAQ-09	AGTCCCCCTC
OPG-16	AGCGTCCTCC	OPAR-06	TGGGGCTCAA
OPG-17	ACGACCGACA	OPAR-19	CTGATCGCGG
OPG-18	GGCTCATGTG	OPAS-06	AACCCTTCCC
OPH-02	TCGGACGTGA	OPAT-14	GTGCCGCACT
OPH-04	GGAAGTCGCC	OPAV-08	TGAGAAGCGG
OPH-06	ACGCATCGCA	OPBA-19	CCATCCGTTG
OPH-07	CTGCATCGTG	OPBC-03	GGCTTGACCT
OPH-09	TGTAGCTGGG	OPBC-09	GTCATGCGAC
OPH-12	ACGCGCATGT	OPBC-16	CTGGTGCTCA
OPH-13	GACGCCACAC	OPBF-03	GAGCCCCGAA
OPH-14	ACCAGGTTGG	OPBF-12	CTTCGCTGTC

Para a amplificação das seqüências de DNA dos *bulks* foram utilizados dois termocicladores PTC-100 (*Programmable Thermal Controller MJ Research, INC.*). As condições de amplificação seguiram o protocolo de Gustine & Huff (1999), descrito a seguir: primeiramente, um ciclo de 4 min a 96°C (desnaturação), 50 s a 36°C (anelamento do iniciador com o DNA) e 1 min e 45 s a 72°C (extensão do fragmento) - este primeiro ciclo apresenta um maior tempo de desnaturação para favorecer a separação das fitas de DNA; em seguida, 42 ciclos de amplificação de 50 s a 94°C, 50 s a 36°C e 1 min e 45 s a 72°C; o último compreende um ciclo de 50 s a 94°C, 50 s a 36°C e 2 min e 30 s a 72°C (com maior tempo de extensão do fragmento, para permitir que a

enzima finalize a extensão) e, por fim, a temperatura permanece a 4°C por tempo indefinido, para manutenção do produto amplificado.

3.3.3 Visualização dos fragmentos de DNA e análise dos dados de RAPD

Após o término da reação de PCR, as amostras eram retiradas do termociclador e adicionava-se 2 μ L de TA (azul de bromofenol) a cada uma, sendo logo após aplicadas em gel de agarose a 1,5%. Como a capacidade de cada gel era para 70 amostras, carregava-se o gel com 68 amostras e nos poços que restavam colocava-se o padrão de fragmentos de tamanho conhecido (Gibco BRL com 100 pares de base). O gel era colocado em uma cuba de eletroforese horizontal contendo solução tampão TBE 1x, o qual possibilitava a condução da corrente elétrica de 100 volts que era fornecida por uma fonte através de eletrodos. Depois de 8 cm de deslocamento das amostras a partir do ponto de aplicação, o gel era retirado da cuba e suporte, e colocado em solução de brometo de etídio (0,4 μ L/mL) em agitação branda durante 30 min, a fim de corar as bandas (fragmentos de DNA), que foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta, com comprimento de onda de 260nm. Após, os géis foram fotografados sob luz UV e os fragmentos determinados através da comparação com o padrão de 100pb, utilizando-se o programa Kodak EDAS 290 (*Electrophoresis Documentation and Analysis System*) (Apêndice 4).

Com o auxílio do programa computacional “*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*” NTSYSpC versão 2.1 (Rohlf, 2001), o

próximo passo foi criar uma matriz binária de dados onde foi atribuído o valor 1 para presença e 0 para ausência de bandas, considerando 79 acessos com os 24 iniciadores. A partir dessa matriz de dados, utilizando o coeficiente Jaccard para análise de similaridade das diferentes misturas dos 20 acessos da espécie, foi gerada uma matriz de similaridade e, posteriormente, com os dados de similaridade foi realizada a análise de agrupamento (módulo SAHN do NTSYS), utilizando o método da média das distâncias (UPGMA, *Unweighted Pair-Group Method using an Arithmetic Average*) e, por último, foi construído o dendrograma de similaridade entre os acessos.

A fim de verificar a consistência dos agrupamentos gerados no dendrograma, foi construída uma matriz de distância cofenética, utilizando o módulo COPH do programa NTSYS. Em seguida, a matriz de similaridade original foi correlacionada com a matriz de distância cofenética usando o módulo MXCOMP do mesmo programa, que gera um teste subjetivo para medir a qualidade do ajuste. Após foi realizado o teste de Mantel com 1000 permutações para determinar o nível de significância do coeficiente de correlação entre a matriz de similaridade e a matriz cofenética.

3.4 Caracterização morfológica

A Estação Experimental Agronômica da UFRGS está situada no município da Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, aproximadamente no Km 47 da rodovia federal Porto Alegre-Uruguaiana (BR- 290); na região fisiográfica da Depressão Central, a 30°06' de latitude Sul, 51°39' de longitude Oeste e altitude média de 46 metros.

3.4.1 Caracterização do clima

O clima da região onde se localiza a EEA da UFRGS pertence à variedade específica Cfa – subtropical úmido, com verão quente, pela classificação climática de Köppen. Ele se caracteriza pela fórmula B₁rB'₃a' – mesotérmico úmido, com pouca deficiência hídrica e com evapotranspiração do verão inferior a 48% da total anual, pela classificação climática de Thornthwaite. Janeiro e fevereiro são os meses mais quentes, ao passo que junho e julho são os mais frios. As médias mensais da temperatura do ar, em abrigo meteorológico, oscilam de 9 a 25°C, aproximadamente. O outono é mais frio do que a primavera. Considerando dados de 30 anos (1970-2000), a precipitação total média do ano é de 1445,8mm, com média mensal de 125,5mm. Junho, julho e agosto são os meses mais chuvosos, em termos de altura pluviométrica, duração da chuva e número de dias de chuva (Bergamaschi et al., 2003).

3.4.2 Caracterização do solo

O solo da área experimental pertence a unidade de mapeamento “São Jerônimo” que classifica-se como Argissolo Vermelho distrófico típico – Pvd (Streck et al., 2002). De acordo com a análise do solo realizada em janeiro de 2003, ou seja, antes da implantação do experimento, o solo apresentava pH (H₂O) de 6,2; índice SMP igual a 6,6; 1,4 mg/L de fósforo; 81mg/L de potássio; 1,8% de matéria orgânica; ausência de alumínio; 2,2 cmol/L de cálcio e 1,3 cmol/L de magnésio. O solo foi corrigido, então, com 160 kg/ha de P₂O₅ sob a

forma de superfosfato simples e, 60 kg/ha de K_2O sob a forma de cloreto de potássio.

3.4.3 Avaliação das plantas no campo

Nos dias 14 e 15 de maio de 2003 foi realizado o transplante de 17 plantas de cada um dos 78 acessos de trevo-branco para o campo (Figura 2).

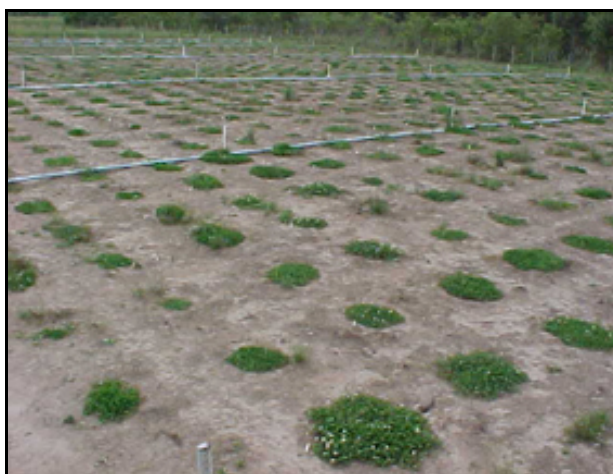


Figura 2. Visão geral do experimento na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2003.

As plantas foram espaçadas 1,25 m uma das outras, sendo cada planta considerada uma unidade experimental, em um delineamento completamente casualizado, com 17 repetições (Apêndice 1). No dia 06 de junho foram levados para o campo os indivíduos dos dois acessos que faltavam, o 79 e o 80, e também foram substituídas as plantas que haviam morrido até essa data, por outras do mesmo acesso. Foi realizada aplicação de 17 mL de inoculante (*Rhizobium* sp) por planta no dia 08 de agosto. Todos os descritores morfológicos utilizados nesse trabalho foram sugeridos no IBPGR,

1992. As avaliações foram realizadas quando a maioria dos acessos já se apresentavam florescidos, com exceção dos que nunca floresceram.

Tabela 3. Cronograma de atividades do ano de 2003

DATA	ATIVIDADE
14 e 15 de maio	Transplante das plantas para o campo
06 de junho	Substituição das plantas mortas e transplante dos acessos 79 e 80 para o campo
08 de agosto	Aplicação de inoculante (<i>Rhizobium</i> sp)
15 e 16 de setembro	Primeiro corte dos trevos
25 de setembro	Marcação dos estolões com arame colorido
24, 26 e 27 de outubro	Segundo corte dos trevos
15 de novembro	Medições: CES, NN/estolão e DE
10 de dezembro	Coleta das folhas e medição da área foliar
17 de dezembro	Medições: EST, HAB e FLOR

CES = comprimento de estolão; NN/estolão = número de nós por estolão; DE = diâmetro de estolão; EST = estatura; HAB = hábito de crescimento; FLOR = florescimento.

3.4.3.1 Estatura e hábito de crescimento das plantas

Essas medições foram realizadas uma única vez no dia 17 de dezembro. A estatura das plantas foi medida usando uma régua graduada em centímetros, a qual era colocada verticalmente no centro da planta. O hábito de crescimento foi medido visualmente, onde foram atribuídas notas 1, 2 e 3 para plantas prostradas, decumbentes e eretas, respectivamente.

3.4.3.2 Intensidade do florescimento

Para essa medida, realizada no dia 17 de dezembro, foram atribuídas notas de zero a três, onde: 0 correspondia a plantas sem nenhuma inflorescência ou botão floral; 1 para plantas com uma ou poucas inflorescências; 2 para as que possuíam um número médio de inflorescências; e 3 para aquelas plantas que apresentavam muitas inflorescências (Figura 3).

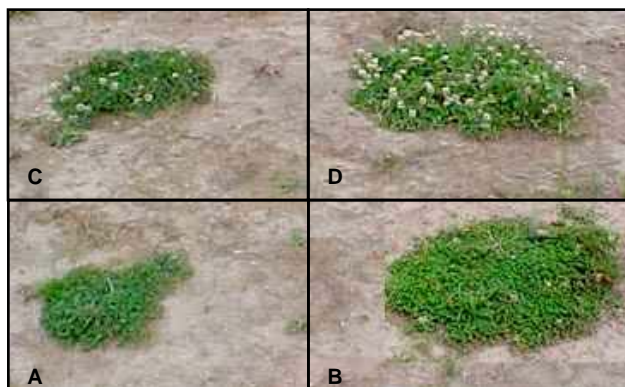


Figura 3. Plantas de trevo-branco com diferentes intensidades de florescimento: A) sem nenhuma inflorescência ou botão floral (nota 0); B) com poucas inflorescências (nota 1); C) com um número médio de inflorescências (nota 2); e D) florescimento intenso (nota 3). EEA/UFRGS, 2003.

3.4.3.3 Comprimento de estolão e número de nós por estolão

Em cada planta foi marcado um estolão primário com um arame colorido. Esse estolão foi medido no dia 15 de novembro com o auxílio de uma régua graduada em centímetros, a qual era colocada na base da planta e medida a distância até o ápice; após fez-se a contagem do número de nós. Utilizando os valores de comprimento do estolão e número de nós do mesmo, foi calculado o comprimento dos entrenós em centímetros (Figura 4).



Figura 4. Detalhe da medição do comprimento de estolão.

3.4.3.4 Diâmetro de estolão

Foi medido no dia 15 de novembro utilizando um paquímetro, o qual foi colocado no primeiro entrenó, ou seja, entre o primeiro e segundo nós, imediatamente após o primeiro nó (Figura 5).



Figura 5. Detalhe da medição do diâmetro de estolão.

3.4.3.5 Produção de matéria seca

Essa avaliação foi realizada através de dois cortes, o primeiro se deu nos dias 15 e 16 de setembro e o segundo nos dias 24, 26 e 27 de outubro. As plantas foram cortadas com auxílio de tesouras de esquilas (Figura 6), deixando um resíduo com altura aproximada de 3 cm do solo; o material foi colocado individualmente em sacos de papel e em estufas a 60°C até peso constante.



Figura 6. Detalhe do corte para avaliação da produção de MS.

3.4.3.6 Área foliar por folha

No dia 10 de dezembro foram coletadas quatro folhas (12 folíolos) por planta e colocadas em caixas de isopor contendo gelo, para conservação até a chegada ao Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, onde foi realizada a medição da área foliar total em cm^2 dos 12 folíolos por indivíduo em um planímetro ótico modelo LICOR 3100. Depois foi calculada a média dos folíolos medidos, a fim de obter a área foliar por folha.

3.4.4 Análise estatística

Os dados de produção de matéria seca no primeiro e segundo cortes não foram considerados diretamente nas análises estatísticas, sendo apenas utilizados para compor a produção de matéria seca total.

Primeiramente, as variáveis avaliadas foram submetidas à análise estatística através do Programa Genes (Cruz, 2001), onde foi realizado o estudo de dissimilaridade genética através do cálculo da distância Euclidiana média, assim como a análise de agrupamento pelo método do vizinho mais distante. Foi realizada uma primeira análise utilizando todas as variáveis e, a segunda retirando a produção total de MS.

Posteriormente, foi realizada a análise de correlação simples entre as variáveis, através do SANEST (sistema de análise estatística para microcomputadores, ALVES et al., 1993).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização molecular

Para a obtenção dos marcadores RAPD, foram analisados 24 iniciadores, os quais revelaram de 03 (OPAL-12) a 29 bandas (OPG-06), gerando um total de 371 bandas polimórficas e apenas uma monomórfica, que foram usadas para avaliar a variabilidade genética entre os 79 acessos de trevo-branco. Os tamanhos dos fragmentos obtidos variaram de 50 a 3098 pares de bases (Apêndice 2).

Através da matriz de similaridade gerada, verificou-se que a similaridade genética interpopulacional variou de 0,05 a 0,58 (Índice de Jaccard), com média de 0,24 (Apêndice 3). Esses valores de similaridade obtidos corroboram os resultados de Lange & Schifino-Wittmann (2000) que ao analisarem 36 acessos de oito espécies de *Trifolium* com quatro sistemas isoenzimáticos, encontraram similaridade genética menor que 0,50 entre os acessos de trevo-branco. Os menores valores de similaridade genética ocorreram entre os acessos 51 (Argentina) e 9 (Japão) com valor de similaridade de 0,05, e comparando-se o acesso 51 com o 1 e o 11 da Itália, e o acesso 80 (EUA) com o 12 (Cazaquistão) e o 16 (Colômbia), apresentando índice de similaridade de 0,06. Verificou-se que os acessos 24 (Espanha), e 78 (Marrocos) foram os que apresentaram menor similaridade média (0,18) em

relação a todos os outros acessos, ou seja, comparando cada um com o grupo de acessos restante.

Neste estudo, devido à utilização de misturas de cada acesso, só foi possível verificar a variação interpopulacional. Os baixos valores de similaridade genética observados deixaram evidente a grande diversidade genética entre os acessos de trevo-branco de diferentes origens geográficas e/ou estados de melhoramento. Entre os acessos estudados, estão presentes desde materiais selvagens até tipos locais, além de cultivares utilizados nos mais diversos países. Esse alto grau de diversidade genética pode estar relacionado à alogamia (Campos-de-Quiroz & Ortega-Klose, 2001) e à natureza tetraplóide da espécie (Mengoni et al., 2000). Além disso, por se tratar de uma espécie alógama e autoincompatível, essa variabilidade tende a ser bem maior dentro de cada acesso, ou seja, entre os indivíduos (Young-Goo et al., 2002). Isso foi verificado, entre outros autores, por Gustine e Huff (1999), com marcadores RAPD, Kölliker et al. (2001), com AFLP e, em cornichão por Steiner & Santos (2001), com RAPD. Entretanto, Kongkiatngam et al. (1995) afirmaram que estimativas de variação genética obtidas com marcadores RAPD podem ser maiores do que realmente são, devido à natureza dominante do marcador, assumindo que uma banda corresponde a um loco, e também por detectar seqüências codificadoras e não codificadoras do genoma, sendo que essas últimas são mais variáveis.

Conforme Kongkiatngam et al. (1996), os marcadores moleculares têm maior capacidade de detectar mais variação genética comparados com isoenzimas e marcadores morfológicos, mas eles apresentam também o

inconveniente de detectar maior variação intracultivares, que precisa ser reduzida quando se trabalha com identificação de cultivares alógamas, pela diluição através de *bulks*. Os autores ressaltaram que quando se trabalha com *bulks*, se remove essa variação intrapopulacional, pois os alelos raros são eliminados, fazendo com que o padrão de amplificação represente as características compartilhadas dentro de uma população heterogênea, ou seja, só irão amplificar as seqüências de DNA compartilhadas entre a maioria dos indivíduos de um determinado acesso.

Kölliker et al. (2001) acrescentaram que essa é a grande vantagem de se trabalhar com *bulks* grandes, pois eles permitem cobrir uma grande proporção da população em uma única análise. Com a utilização de marcadores AFLP, os autores verificaram que bandas que ocorrem em mais que 50% das plantas individuais de trevo-branco estavam sempre presentes nas amostras em *bulk*, bem como, que a maioria das bandas ausentes nos *bulks* eram bandas raras, as quais ocorrem em menos de 25% das plantas individuais.

Essa redução do número de fragmentos amplificados, devido a utilização de *bulks* ao invés de avaliações individuais do acesso, pôde ser verificada em vários estudos, utilizando marcadores RAPD, com diversas espécies, tais como azevém perene (Sweeney & Danneberger, 1994), trevo-vermelho (Kongkiatngam et al., 1995), *Bromus auleticus* TRINIUS (EX-NEES) (Yanaka, 2002) e algumas pertencentes ao gênero *Adesmia* L. (Dias, 2003). Valores muito baixos de similaridade interpopulacional podem estar relacionados a erros da técnica devido à competição por sítios de amplificação

e pobre reprodutibilidade fazendo com que os acessos pareçam mais variáveis do que realmente são (Halldén et al., 1996).

Como objetivo do trabalho foi a obtenção de *fingerprints* genômicos de cada acesso para, assim, poder discriminá-los entre si, não seria necessário quantificar a variabilidade intrapopulacional, e sim obter padrões mais eficientes, que seriam bons representantes dos acessos, para poder identificá-los e diferenciá-los. Mesmo com essa redução da variabilidade dentro dos acessos através da utilização de *bulks*, houve uma grande diversidade entre os mesmos, representada pelo número de bandas gerado. Kölliker et al. (2001) afirmaram que amostras de folhas em *bulks* demonstraram ser uma ferramenta útil para avaliar a diversidade genética entre cultivares e acessos de trevo-branco, além da identificação de cultivares e determinação de genótipos em trevo-vermelho (Kongkiatngam et al., 1996).

Observando-se o dendrograma gerado a partir da matriz de similaridade genética (Figura 7), e tomando a similaridade genética média (0,24) como ponto de corte, verifica-se que os 79 acessos agruparam-se em sete grupos. O primeiro grupo formado pelos acessos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 21, 22, 23, 15, 18, 19, 20, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 e 32; o segundo compreendendo os acessos 33, 34, 35 e 36; o terceiro grupo apresentando somente o acesso 37; um quarto grupo consistindo dos acessos 24, 57 e 75; o quinto formado pelos acessos 49, 74, 79 e 80; o sexto grupo compreendendo os acessos 38, 41, 43, 42, 44, 45, 46, 47, 50, 48, 56, 53, 55, 54, 58, 60, 59, 61, 62, 64, 65, 66, 63, 39, 40 e 51; e o último que tem como integrantes os acessos 67, 68, 71, 69, 70, 72, 73, 76, 77 e 78.

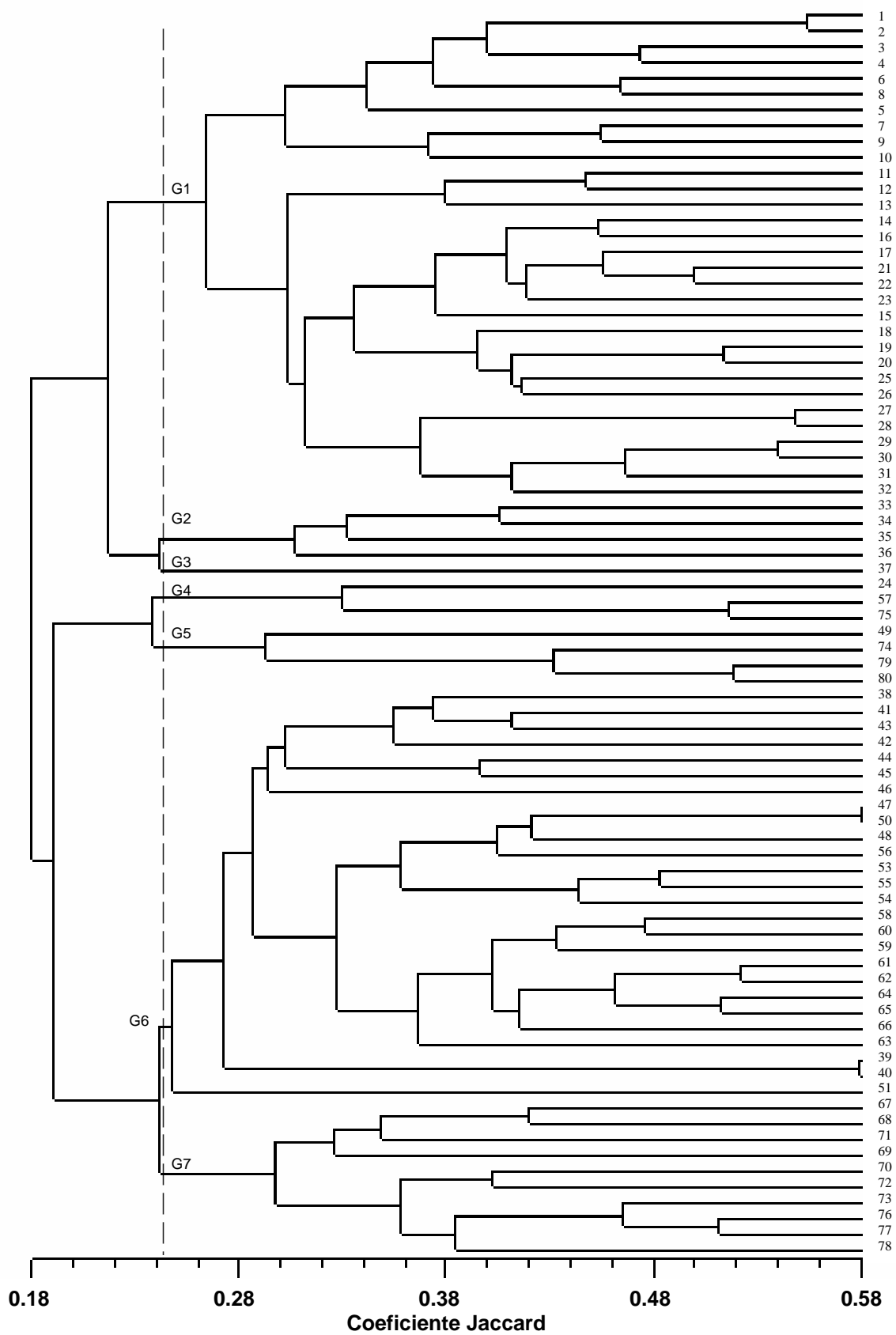


Figura 7. Dendrograma de similaridade genética baseado em dados RAPD entre os 79 acessos de trevo-branco.

Pode-se notar também que os maiores índices de similaridade (0,58) ocorreram entre dois materiais selvagens, o acesso 39 da Grécia e o 40 do Afeganistão, e entre dois cultivares, o acesso 47 da Suécia e o 50 da África do Sul. Entre os acessos 1 (Itália) e 2 (Israel), a similaridade foi de 0,56; e entre dois cultivares, 27 e 28, do Canadá e da Austrália, respectivamente, com 0,55 de similaridade. O coeficiente de correlação cofenética foi bom, apresentando um $r = 0,80$, indicando a consistência dos agrupamentos gerados no dendrograma, ou seja, que o dendrograma representou bem a matriz de similaridade.

Os acessos 79 (cv. Huia) e 80 (cv. Ladino Regal) provenientes, respectivamente, da Nova Zelândia e dos EUA, apresentaram similaridade de 0,52, e ambos agruparam com o acesso 74, material cultivado brasileiro, com 0,43 de similaridade. Os dois acessos (25 e 26) do Chile se agruparam, com índice de similaridade de 0,42. A maioria dos acessos obtidos em um mesmo país não se agruparam, apresentando-se em grupos diferentes, como por exemplo, os acessos 4 e 78, materiais selvagens do Marrocos, onde o 4 apresentou-se no grupo 1 e o 78 no grupo 7; os acessos da Irlanda (32 e 33), onde o 32 ficou no grupo 1 e o 33 no grupo 2, entre outros.

Essa análise permitiu discriminar os acessos de maneira eficiente, pois cada um apresentou um padrão diferente de bandas, possibilitando a identificação de cada acesso individualmente, ou seja, a obtenção de *fingerprints* genômicos de cada um, permitindo a sua diferenciação. Foram necessários apenas três iniciadores (OPG-06, OPAB-14 e OPH-12), dos 24

utilizados, para produzir padrões RAPD que poderiam discriminar todos os acessos individualmente.

Com base nesses resultados será possível selecionar os pais mais distantes geneticamente para a realização de cruzamentos, e com isso ampliar a variabilidade para o melhoramento da espécie.

4.2 Caracterização morfológica

Os valores médios para as características morfológicas medidas nos acessos estudados, com os respectivos desvios-padrão encontram-se na Tabela 4.

Com relação à área foliar, ou tamanho médio dos folíolos (AF), o acesso 1 (Itália) foi o que apresentou maior média, sendo $13,16 \text{ cm}^2$ com um desvio padrão (s) de 3,34, ao passo que o acesso 10 (Grécia) foi o que obteve o menor valor, média de $1,85 \text{ cm}^2$ de área foliar e $s = 0,98$.

Os acessos 67 (Portugal) e 2 (Israel) apresentaram maior comprimento de estolão (CES), respectivamente, sendo que o acesso 2 (Israel) se destacou ainda por apresentar maior comprimento de entrenós (CEN), 2,28cm com $s=0,53$, assim como, maior produção de matéria seca (MS) no primeiro e segundo cortes, sendo o acesso com maior produção total. Ao contrário, o acesso 80 (EUA) foi o que obteve menores valores para as três características. O acesso 34 (Áustria), que possui folhas pequenas, foi o que apresentou menor produção de MS no primeiro corte.

Tabela 4. Características morfológicas da coleção básica de trevo-branco (M = média e s = desvio-padrão)

Acessos	CES (cm)		DE (mm)		NN		CEN (cm)		AF (cm ²)		ES (cm)		HA		IF		MS/planta (g)					
																	Corte 1		Corte 2		Total	
	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	
1	20,9	6,8	16,0	5,7	2,8	0,4	1,3	0,3	13,2	3,3	18,8	4,4	3	0,9	1	1,0	3,9	2,3	12,9	9,1	16,7	
2	32,1	11,1	14,1	3,5	2,7	0,5	2,3	0,5	9,5	2,9	15,0	3,4	1	1,0	2	0,9	13,2	6,0	56,6	28,9	69,8	
3	22,2	9,2	16,5	5,1	3,2	0,8	1,3	0,5	12,2	3,7	17,4	5,9	3	0,8	1	1,3	7,7	4,2	24,0	19,5	31,7	
4	24,8	9,4	15,9	4,3	2,8	2,6	1,6	0,4	4,0	1,7	6,2	2,6	1	0,6	3	0,9	5,2	4,0	17,2	13,0	22,4	
5	18,1	6,8	18,5	5,9	2,2	0,5	1,0	0,7	4,9	2,8	10,1	4,8	1	0,5	0	0,8	4,7	4,8	9,2	8,5	13,9	
6	16,5	5,5	15,6	6,2	1,8	0,5	1,1	0,3	3,9	1,2	8,5	3,8	1	0,7	1	3,5	5,2	5,5	7,3	5,6	12,5	
7	28,4	8,4	14,0	3,8	2,4	0,4	2,0	0,6	6,2	1,6	11,2	3,7	1	0,9	3	0,8	8,3	7,3	27,5	16,5	35,8	
8	23,5	5,9	17,4	5,3	2,1	0,5	1,4	0,5	6,2	1,8	10,3	3,2	1	0,8	1	1,3	4,4	2,3	11,9	14,4	16,2	
9	20,5	8,2	17,5	5,0	2,7	0,6	1,2	0,3	11,6	3,0	15,5	4,0	3	0,8	0	0,9	4,2	3,0	9,2	5,3	13,4	
10	18,3	7,0	16,6	4,7	1,8	0,4	1,1	0,5	1,8	1,0	4,7	2,9	1	0,0	2	1,0	3,5	3,5	4,6	3,8	8,1	
11	25,1	7,5	15,9	3,0	1,8	0,4	1,6	0,3	5,2	1,8	9,2	3,2	1	0,7	1	1,3	6,3	5,6	11,3	6,9	17,6	
12	11,4	5,3	14,0	7,0	2,0	0,5	0,8	0,3	3,9	1,2	6,9	2,1	1	0,7	1	0,9	3,9	4,3	4,1	2,6	8,0	
13	26,7	6,3	17,6	3,9	2,4	0,5	1,5	0,4	6,4	2,1	10,6	3,3	1	0,8	1	1,2	10,9	4,7	18,4	12,1	29,3	
14	18,3	7,6	18,8	6,1	2,1	0,6	1,0	0,3	4,3	1,9	8,0	2,8	1	0,6	0	0,5	4,7	4,1	6,3	6,1	11,0	
15	18,7	8,5	15,7	6,0	2,1	0,6	1,2	0,2	6,6	2,9	12,5	4,6	1	0,9	0	0,5	7,3	3,9	14,5	8,5	21,8	
16	21,7	12,1	17,9	6,7	3,6	5,7	1,2	0,5	5,7	2,6	9,4	4,4	1	0,8	2	1,0	7,6	3,9	17,4	10,2	25,0	
17	27,1	13,1	12,5	3,4	2,0	0,6	2,2	1,0	6,4	1,3	12,0	2,6	1	1,0	3	0,8	8,2	5,0	28,2	17,1	36,5	
18	22,6	8,0	18,2	5,5	2,4	0,7	1,2	0,3	8,3	2,1	14,1	3,5	3	0,7	1	1,0	7,3	4,7	19,2	13,9	26,6	
19	20,8	6,0	15,4	4,8	1,9	0,4	1,4	0,4	4,5	1,6	10,1	3,0	1	0,6	3	0,8	7,1	4,4	26,8	19,2	33,9	
20	27,9	11,2	14,5	4,9	2,4	0,5	1,9	0,6	6,3	2,3	10,8	3,7	1	0,9	3	0,5	11,7	7,7	36,8	22,6	48,5	
21	21,9	6,5	15,1	3,5	2,4	0,4	1,4	0,3	7,7	3,0	11,5	4,2	1	0,9	1	1,1	7,7	5,2	20,1	14,8	27,9	
22	17,1	8,8	16,0	4,8	1,9	0,5	1,1	0,3	7,0	2,6	12,3	2,6	1	1,0	0	0,6	7,1	4,4	14,2	6,8	21,3	
23	22,3	7,8	18,4	5,8	2,6	0,6	1,2	0,3	6,7	1,6	12,5	3,1	1	1,0	1	1,1	5,3	4,1	11,6	7,0	16,9	
24	21,1	8,4	16,9	5,5	2,1	0,5	1,2	0,4	6,3	4,5	10,2	3,8	1	0,7	1	1,0	4,6	1,9	7,6	5,1	12,3	
25	29,6	8,1	17,9	4,6	2,4	0,7	1,7	0,4	10,2	3,8	16,5	5,0	1	1,0	1	1,1	8,1	5,8	15,5	7,8	23,6	
26	21,1	8,3	14,8	6,1	1,9	0,4	1,4	0,7	6,8	1,8	12,2	4,3	1	0,9	1	1,1	7,5	5,3	17,8	13,3	25,2	
27	19,4	5,3	17,8	5,6	2,0	0,4	1,1	0,3	6,2	2,4	8,9	4,0	1	0,7	0	0,8	3,9	1,9	8,5	4,6	12,4	
28	23,7	7,5	17,3	5,0	1,9	0,5	1,4	0,5	4,5	2,2	7,9	3,6	1	0,5	3	0,4	7,3	4,1	19,3	17,7	26,7	
29	19,8	7,8	17,9	5,8	1,9	0,3	1,1	0,4	5,1	2,0	9,5	4,9	1	0,6	1	1,1	8,2	7,3	15,3	13,2	23,6	

Tabela 4. Continuação...Características morfológicas da coleção básica de trevo-branco (M = média e s = desvio-padrão)

Acessos	CES (cm)		DE (mm)		NN		CEN (cm)		AF (cm ²)		ES (cm)		HA		IF		MS/planta (g)					
																	Corte 1		Corte 2		Total	
	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	
30	17,0	5,7	17,9	5,1	1,9	0,3	1,0	0,2	5,2	2,1	11,8	3,1	1	1,0	0	0,9	5,2	3,9	12,6	7,0	17,9	
31	21,5	10,6	16,9	6,8	5,5	10,5	1,3	0,3	8,4	3,3	14,5	6,5	1	1,0	0	0,2	4,2	1,9	14,5	13,4	18,6	
32	17,3	7,9	15,8	5,8	1,8	0,4	1,1	0,3	3,1	2,1	5,8	4,4	1	0,4	0	0,7	4,1	3,3	6,9	6,7	11,0	
33	28,6	8,1	18,0	5,7	2,4	0,6	1,6	0,5	8,2	3,2	13,9	5,8	1	0,9	2	1,3	8,8	5,4	23,9	16,7	32,7	
34	19,0	7,5	15,9	5,1	1,9	0,4	1,2	0,3	3,1	2,7	6,8	4,3	1	0,6	0	0,9	2,7	2,2	4,3	5,7	7,0	
35	13,4	6,2	16,8	7,2	1,9	0,3	0,8	0,4	4,1	2,4	7,7	3,5	1	0,8	1	3,0	3,3	2,3	4,1	3,3	7,4	
37	26,3	10,4	15,4	4,3	2,0	0,5	1,7	0,5	5,7	2,4	9,3	3,4	1	0,7	2	1,2	6,5	3,4	17,6	14,3	24,2	
38	21,5	11,0	12,8	4,9	2,0	0,5	1,7	0,6	6,4	2,6	9,3	2,9	1	0,6	1	1,0	8,0	4,1	15,1	12,5	23,1	
39	18,8	7,6	16,2	4,7	1,6	0,3	1,2	0,4	2,8	1,7	5,9	3,3	1	0,4	2	1,3	6,2	5,0	9,2	8,7	15,4	
40	25,1	11,0	16,6	4,3	1,9	0,4	1,5	0,4	6,4	2,2	9,1	3,2	1	0,7	2	1,4	5,0	4,9	12,5	13,1	17,5	
41	18,9	7,1	16,4	5,6	1,6	0,5	1,2	0,3	3,2	2,0	7,1	4,7	1	0,4	1	1,2	4,4	2,8	4,5	2,9	8,8	
42	20,5	7,0	16,9	4,8	2,0	0,6	1,2	0,3	6,1	2,3	11,0	2,7	1	0,9	0	0,8	3,7	1,9	8,9	5,2	12,5	
43	19,9	7,4	18,4	5,5	1,9	0,6	1,1	0,2	4,7	1,7	10,2	2,4	1	0,8	0	0,9	4,2	3,7	10,0	7,6	14,2	
44	12,1	5,8	16,2	7,4	2,0	0,6	0,8	0,3	4,3	1,4	8,4	3,1	1	0,5	0	1,1	3,3	1,5	6,4	3,8	9,7	
45	16,3	6,1	14,7	3,1	2,0	0,3	1,1	0,3	4,9	1,3	8,3	3,1	1	0,7	0	0,7	5,0	2,6	12,0	8,2	16,9	
46	15,6	22,4	17,4	5,7	2,3	0,5	0,9	1,8	5,7	2,0	12,2	4,1	1	0,9	0	0,8	5,0	4,2	11,3	5,8	16,2	
47	16,4	9,6	18,7	8,5	2,2	0,6	0,9	0,3	5,6	2,1	10,6	3,8	1	0,9	0	0,5	6,2	4,4	6,5	5,5	12,6	
48	23,4	7,3	14,9	4,5	2,5	0,5	1,6	0,4	5,6	1,3	10,5	4,0	1	0,8	0	1,0	9,4	6,5	23,4	16,5	32,8	
49	23,9	8,1	18,2	5,7	2,7	0,6	1,3	0,3	12,0	4,2	17,0	5,7	3	0,7	1	1,1	4,8	2,8	17,0	17,4	21,8	
50	24,8	10,1	18,8	5,0	2,8	0,5	1,3	0,4	11,2	3,6	16,8	5,1	3	0,9	1	1,3	5,0	3,3	15,4	8,9	20,4	
51	19,7	8,7	16,6	6,3	1,9	0,4	1,2	0,4	4,6	2,1	9,3	3,6	1	0,7	1	1,4	6,7	5,2	11,3	7,7	18,0	
53	25,5	6,5	17,9	5,8	1,9	0,5	1,4	0,4	6,4	2,3	8,7	3,5	1	0,7	3	0,8	6,0	4,2	15,0	11,0	21,0	
54	16,6	6,6	14,7	5,0	2,3	0,5	1,1	0,3	7,2	2,5	15,8	3,1	1	0,9	1	0,9	7,5	5,4	17,0	13,5	24,4	
55	16,9	7,7	18,5	7,2	1,9	0,5	0,9	0,3	4,0	1,6	8,3	2,7	1	0,5	0	0,6	3,4	3,4	8,7	4,6	12,2	
56	22,6	8,0	15,8	3,9	1,7	0,4	1,4	0,3	5,1	1,3	9,2	3,9	1	0,4	1	1,3	5,3	2,4	15,2	15,0	20,5	
57	23,8	11,6	20,8	4,8	1,8	0,3	1,1	0,4	4,3	1,4	6,3	2,8	1	0,4	0	0,8	4,0	3,5	12,2	9,5	16,2	
58	22,7	7,6	15,6	4,5	2,0	0,3	1,5	0,4	5,0	1,6	7,9	3,5	1	0,5	2	1,1	8,1	5,9	18,0	11,3	26,1	
59	27,3	8,0	16,0	4,4	2,2	0,4	1,7	0,3	4,3	0,9	9,4	2,5	1	0,7	2	1,2	7,9	2,9	24,0	14,5	31,9	
60	17,8	6,1	17,8	5,4	1,7	0,5	1,0	0,3	3,1	1,2	6,9	3,5	1	0,6	0	0,3	5,1	4,4	8,8	6,1	13,9	

Tabela 4. Continuação... Características morfológicas da coleção básica de trevo-branco (M = média e s = desvio-padrão)

Acessos	CES (cm)		DE (mm)		NN		CEN (cm)		AF (cm ²)		ES (cm)		HA		IF		MS/planta (g)				
	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	M	s	Corte 1	Corte 2	Total		
																		M	s	M	s
61	21,2	7,9	18,2	6,8	2,2	0,4	1,2	0,5	4,1	1,6	8,9	4,6	1	0,7	1	1,1	7,3	5,1	14,3	12,6	21,6
62	21,0	9,2	15,7	5,2	2,8	0,6	1,3	0,3	8,0	2,5	13,8	4,0	1	1,0	0	0,2	7,1	3,9	18,6	16,2	25,7
63	20,2	7,2	15,1	5,6	2,1	0,5	1,3	0,3	6,2	2,2	12,7	4,5	1	1,0	0	0,2	3,7	4,2	10,7	8,6	14,4
64	22,7	6,1	18,8	3,4	2,1	0,4	1,2	0,3	7,2	2,8	11,1	4,6	1	0,9	0	1,0	6,1	4,3	14,7	8,9	20,9
65	16,9	5,4	17,1	6,7	2,5	0,6	1,0	0,3	5,4	1,3	10,5	4,6	1	0,9	0	0,0	6,6	4,5	11,6	6,1	18,1
66	19,7	7,7	19,1	7,3	1,9	0,5	1,0	0,3	6,7	2,0	12,1	2,8	1	1,0	0	0,6	6,8	4,5	13,9	6,5	20,7
67	33,0	10,7	14,9	4,5	2,4	0,5	2,2	0,5	7,5	3,0	11,1	4,4	1	0,7	2	0,8	8,5	5,9	22,6	18,4	31,1
68	21,5	8,5	15,4	4,1	2,1	0,4	1,4	0,6	4,3	1,7	7,5	2,5	1	0,5	2	1,0	7,3	5,2	18,1	14,6	25,4
69	24,0	9,1	17,2	4,7	2,2	0,4	1,4	0,6	6,4	2,1	10,4	3,5	1	0,8	2	1,4	8,4	5,1	20,4	12,4	28,8
70	19,6	12,3	15,6	7,2	1,7	0,5	1,3	0,5	4,6	3,4	8,8	4,4	1	0,6	1	1,2	4,8	5,7	15,3	22,6	20,1
71	17,1	8,4	16,9	6,3	1,9	0,4	1,0	0,4	3,4	1,2	7,5	3,5	1	0,7	1	1,7	3,6	4,8	4,6	7,5	8,2
72	20,9	10,1	14,8	6,4	1,9	0,4	1,4	0,4	4,8	1,8	9,4	2,2	1	0,6	2	1,1	7,5	7,3	15,0	8,8	22,5
73	16,0	6,8	17,3	6,7	2,1	0,4	0,9	0,3	6,3	2,6	11,9	3,3	1	1,0	0	0,2	8,1	3,4	18,9	14,6	27,0
74	23,5	9,9	19,1	5,6	3,1	0,9	1,2	0,6	12,5	3,9	17,6	3,5	3	0,7	2	1,1	7,8	4,3	18,5	11,7	26,2
75	31,0	7,5	15,1	4,2	2,6	0,3	2,1	0,6	10,3	3,4	14,3	4,8	1	1,0	3	1,0	11,8	8,9	46,0	22,0	57,8
76	19,6	7,3	18,3	5,1	2,1	0,5	1,1	0,3	5,1	4,8	7,7	3,9	1	0,5	0	1,0	3,7	4,4	4,8	3,4	8,5
77	17,9	7,5	17,6	6,1	1,7	0,4	1,0	0,3	5,5	1,6	13,4	3,6	1	0,9	0	0,2	3,2	1,8	10,8	4,3	14,0
78	27,0	12,3	21,6	30,0	2,4	0,7	1,2	0,7	7,1	2,2	9,4	3,3	1	0,8	3	0,8	10,1	6,8	30,1	16,1	40,2
79	10,2	3,9	9,7	5,1	1,5	0,5	1,1	0,4	5,9	3,9	8,4	2,9	1	0,2	0	0,4	-	-	2,5	2,3	2,5
80	9,6	5,3	8,2	4,0	2,6	0,7	1,2	0,4	12,2	6,9	16,5	4,0	3	0,5	1	1,2	0,5	0,6	2,7	1,8	3,2
M global	21,1	9,5	16,5	6,5	2,2	1,5	1,3	0,6	6,3	2,4	10,7	5,1	1	0,8	1	1,3	6,2	4,3	15,4	10,8	21,2

CES = comprimento de estolão; DE = diâmetro de estolão; NN = número de nós/estolão; CEN = comprimento de entrenós; AF = área foliar/folha; ES = estatura da planta; HA = hábito de crescimento (1=prostrado, 2=decumbente, 3=ereto); IF = intensidade de florescimento (0=não florescido, 1=pouco florescido, 2=florescimento médio, 3=florescimento intenso); MS = produção de matéria seca por planta.

Os acessos 2, 7, 17, 20, 25, 33, 59, 67 e 75 foram os que apresentaram maiores valores de CES, entre 33 e 27 cm. Os menores valores de CES foram observados nos acessos 12, 44, 79 e 80, apresentando comprimentos de 9,6 a 12,1 cm.

Levando-se em conta que o acesso 80 (cv. Ladino Regal) apresenta folhas grandes, o 79 (cv. Grassland Huia) possui folhas intermediárias, e o 34 (Áustria), folhas pequenas, foram verificados os valores de área foliar para esses acessos e atribuídos intervalos de AF correspondente a cada grupo; então, agrupou-se os acessos nessas três classes. Com isso, verificou-se que os acessos de folhas grandes (acima de 11cm^2 de AF) foram: 1, 3, 4, 9, 18, 49, 50, 74 e 80; os de folhas pequenas (com AF de no máximo $4,09\text{ cm}^2$) compreenderam os acessos 4, 6, 10, 32, 34, 35, 39, 41, 60, 61 e 71; os acessos restantes foram enquadrados no tipo de folhas intermediárias, apresentando AF de $4,09$ a 11cm^2). Concordando com Garcia (1995) e Carámbula (s.d.), verificou-se que as plantas de folhas pequenas apresentaram hábito prostrado, ao passo que as de folhas grandes mostraram-se eretas. Segundo Gustine et al. (2002), os tipos de folhas pequenas são menos suscetíveis à alta pressão de pastejo e apesar do baixo rendimento mostraram-se mais persistentes em relação aos de folhas grandes, provavelmente devido a um mecanismo de escape ao pastejo.

Os acessos que apresentaram maior estatura (ES) coincidiram com os de maior área foliar, excluindo o acesso 80, apresentando estatura entre 14,06 e 18,82 cm. Já, os de menor estatura foram os acessos 10, 12, 34, 39, 57, 60, com 4,7 a 6,9 cm.

O maior número de nós/estolão (NN), 20 e 21, ocorreu nos acessos 57 e 78, respectivamente, os quais apresentaram, em média, hábito prostrado. Entretanto, o menor NN, 8 e 9, foi verificado nos acessos 80 e 79, sendo que o primeiro apresentou-se, em média, ereto e o segundo, prostrado. Esse baixo NN, juntamente com menores CES e produções de MS para os dois cortes, desses dois últimos acessos, podem ser explicados por terem sido levados ao campo 22 dias após os outros 78 acessos avaliados, apresentando-se menores que os outros devido ao tempo de crescimento, uma vez que no primeiro corte nenhuma planta do acesso 79 pôde ser cortada.

Quanto ao florescimento, os acessos que apresentaram maior intensidade de florescimento (IF), em média, foram aqueles classificados, neste trabalho, como intermediários quanto ao tamanho de folha: 7, 17, 19, 20, 28, 53, 75 e 78, com exceção do acesso 4, o qual foi classificado como tipo de folhas pequenas, corroborando com Mather et al. (1995), os quais afirmaram que os tipos de folha intermediários apresentam florescimento mais abundante que as do tipo grande. Em contrapartida, a grande maioria dos acessos não florescidos pertencem a esse mesmo grupo (folhas intermediárias), poucos ao de folhas pequenas (32, 34 e 60) e apenas o acesso 9 de folhas grandes.

O acesso 31 (EUA) foi o que apresentou, em média, maior diâmetro de estolão (DE), 5,62 mm com $s=0,49$, sendo mais que o dobro do encontrado para a maioria dos outros acessos. Já, o acesso 39 (Grécia) foi o que obteve menor DE, 1,56 mm com $s= 0,34$.

Considerando os dados de produção de MS, o acesso 2 foi o que apresentou maior produção total, assim como no primeiro e segundo cortes,

sendo, em média, 69,7; 13,2 e 56,6 g/planta, respectivamente. Seguido dos acessos 75, 20 e 78, 7, 48, 33, 59, 3 e 67 com produção total de MS acima de 30 g/planta. E observando com maior cuidado, verifica-se que esses resultados foram ao encontro dos obtidos por Viecelli (2000), de que as plantas mais precoces em termos de produção de forragem foram as que apresentaram maiores produções totais de MS. O acesso 79, o qual foi cortado apenas no segundo corte (MS total = MS corte 2), pois apresentava-se muito pequeno, com pouquíssimas folhas, foi o que obteve menor produção de MS. O segundo de menor MS foi o acesso 80, seguido dos acessos 34, 35, 12, 10, 71, 76, 41 e 44, com menos de 10 g/planta.

4.2.1 Análise de divergência genética

Os resultados da análise de divergência genética entre os acessos, com base nos caracteres morfológicos e produtivos, através da distância Euclidiana média, encontram-se nas Figura 8 e 9. Primeiramente, foi realizada uma análise com todas as características avaliadas, exceto produção de MS do primeiro e segundo cortes. A análise de agrupamento evidenciou a formação de cinco grupos (Figura 8). O primeiro grupo formado pelos acessos 58, 68, 72, 19, 28, 53, 11, 56, 37, 40, 13, 69, 59, 78, 25, 33, 21, 26, 38, 48, 31, 62, 23, 54, 4 e 16; um segundo grande grupo que reuniu os acessos 10, 39, 35, 44, 12, 32, 34, 41, 71, 6, 51, 70, 45, 55, 60, 14, 76, 27, 43, 57, 64, 66, 8, 24, 29, 61, 46, 65, 5, 47, 30, 73, 15, 22, 42, 63 e 77; o terceiro abrangendo os acessos 1, 9, 49, 50, 74, 3 e 18; o quarto grupo incluindo os acessos 2, 75, 7, 17, 20 e 67, os

quais apresentaram maior produção total de MS; e o último grupo compreendendo os acessos 79 e 80.

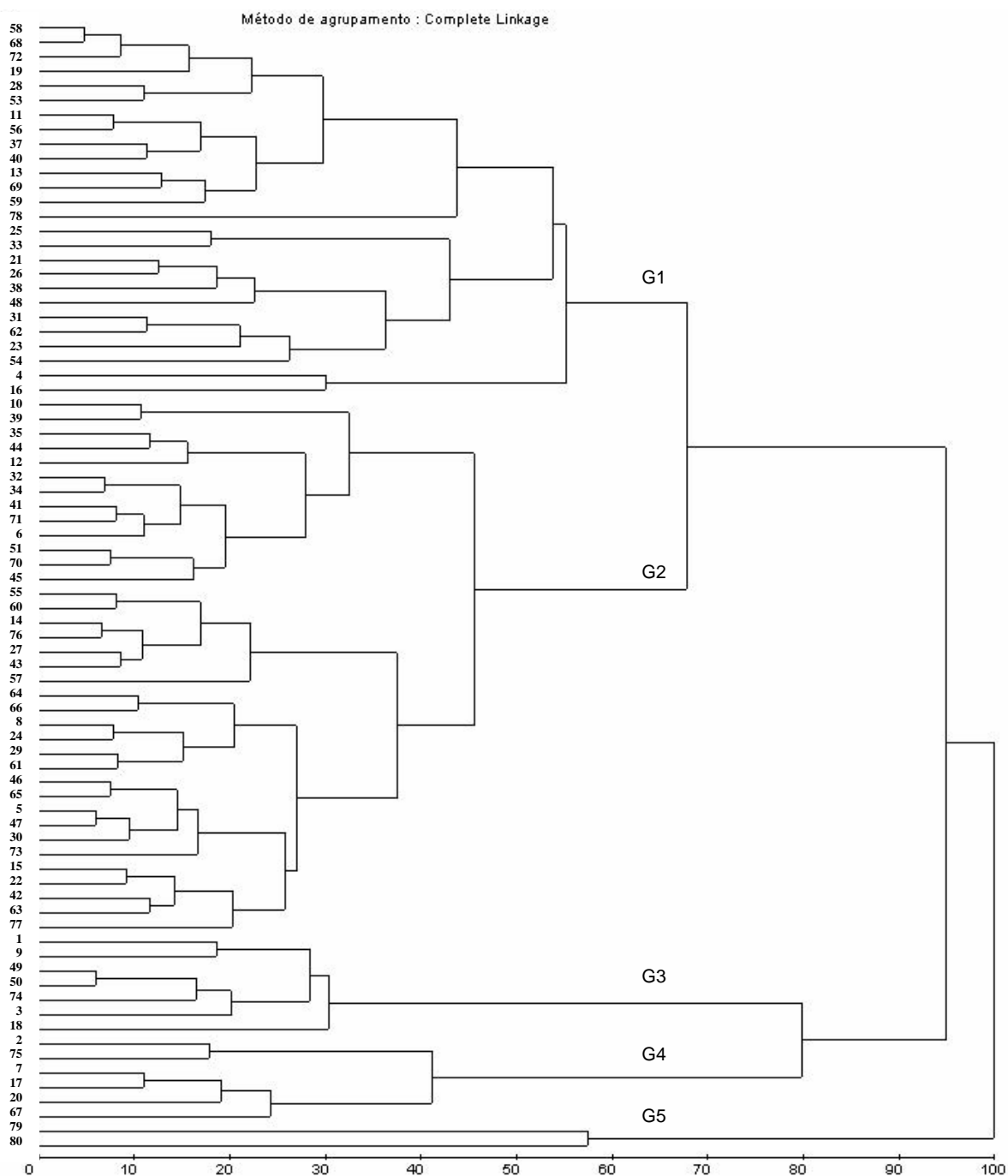


Figura 8. Dendrograma de dissimilaridade genética pelo método do vizinho mais distante para 78 acessos de trevo-branco baseado em 9 caracteres morfológicos (levando em consideração os dados de MS total).

Nesta análise, a produção total de matéria seca foi o caracter responsável por 74,11% da divergência entre os genótipos e o comprimento de estolão foi o segundo de maior porcentagem, representando 13,07% da divergência (Tabela 5). O valor máximo de divergência foi 3,27 verificado entre os acessos 2 (Israel) e 79 (Nova Zelândia) e o mínimo (0,16) entre os acessos 58 (Índia) e 68 (Jamaica).

Tabela 5. Contribuição relativa dos caracteres para divergência nas duas análises realizadas

Variável	Valor (%)	
	1ª análise	2ª análise
Produção total de matéria seca (g)	74,11	-
Comprimento de estolão (cm)	13,07	50,48
Estatua (cm)	5,87	22,68
Área foliar (cm ²)	3,60	13,91
Número de nós/estolão	2,53	9,76
Intensidade de florescimento	0,61	2,34
Diâmetro de estolão (mm)	0,10	0,39
Comprimento de entrenós (cm)	0,06	0,24
Hábito de crescimento	0,05	0,21

Para a segunda análise foram retirados os dados de matéria seca, a fim de permanecerem somente os caracteres morfológicos, e observou-se que as variáveis com maior importância na diversidade genética dos acessos foram, em ordem decrescente de grandeza: comprimento de estolão, estatura da planta, área foliar/folha e número de nós/estolão. A maior contribuição relativa (50,48%) do comprimento de estolão mostrou a importância de sua avaliação em trevo-branco, concordando com Carámbula (s.d.), Thomas (1980) e Sanderson et al. (2003), os quais afirmaram que a morfologia do estolão deve ser levada em consideração em programas de melhoramento. Essas quatro características juntas contribuíram com 96,83% da divergência entre os

acessos estudados (Tabela 5). Nota-se que a área foliar, neste trabalho, não teve tanta importância para a divergência dos acessos, como a obtida por Caradus et al. (1989), que classificando a coleção mundial composta por 109 cultivares de trevo-branco através da morfologia, florescimento, cianogênese e marcas nas folhas, obtiveram a formação de quatro grupos, em que os critérios mais importantes para distinguir os grupos foram a área foliar e cianogênese. É importante ressaltar a pequena importância relativa do diâmetro de estolão e comprimento de entrenós, que outros autores (Carámbula, s.d.; Eisinger & Paim, 1994; Roso & Pagano, 2001) haviam ressaltado como importantes. O máximo de divergência foi 3,18 e ocorreu entre um tipo local da Índia (acesso 57) e o cv. Ladino Regal dos EUA (acesso 80). O 57 apresentou-se prostrado com estolões longos e grossos, grande número de nós/estolão, pequena área foliar e boa produção de MS; já o acesso 80 mostrou-se ereto com estolões curtos e delgados, pequeno número de nós/estolão, grande área foliar e baixa produção de MS. O mínimo de divergência foi 0,17 entre dois materiais com estado incerto de melhoramento, os acessos 58 (Índia) e 68 (Jamaica), ambos apresentando valores muito semelhantes para todas as características avaliadas, sendo plantas prostadas, com estolões longos, baixa área foliar, boa produção de MS e florescimento médio.

Analisando o dendrograma do agrupamento dos acessos gerado para essa segunda análise (Figura 9), verificou-se a formação de seis grupos. O primeiro grande grupo abrangendo os acessos 58, 68, 72, 19, 28, 53, 10, 39, 37, 59, 40, 69, 13, 11, 56, 21, 26, 38, 48, 55, 60, 14, 76, 27, 43, 57, 4 e 16; o segundo grupo formado pelos acessos 31, 62, 23, 54, 46, 65, 5, 47, 73, 15, 63,

42, 22, 77, 64, 66, 8, 24, 29, 61, 25, 33 e 78; um terceiro pequeno grupo compreendendo os acessos 7, 20, 17, 2, 75 e 67, os quais apresentaram maior CES e foram os poucos com mais de 30g de MS por planta; o quarto grupo contendo os acessos 35, 44, 12, 32, 34, 45, 51, 70, 6, 71, 41 e 79; um quinto, reunindo os que apresentaram maior estatura e área foliar, que foram os acessos 9, 18, 1, 3, 49, 50 e 74; e o sexto e último composto somente pelo acesso 80.

Observando esse dendrograma, verificou-se que os acessos que apresentaram, em média, maior estatura e área foliar/folha, formaram um grupo distinto (grupo 5), assim como os acessos que apresentaram, em média, maior comprimento de estolão e produção total de matéria seca, os quais encontravam-se presentes em maioria no grupo 3. O acesso 80 (cv. Ladino Regal) que apresenta folhas grandes, foi o único integrante do grupo 6, o qual apresentou-se similar ao grupo 5. Para os outros grupos formados, não pôde-se fazer essas constatações, principalmente por serem constituídos pelos acessos com valores intermediários para as características avaliadas, como também, pela dispersão de alguns acessos com caracteres semelhantes.

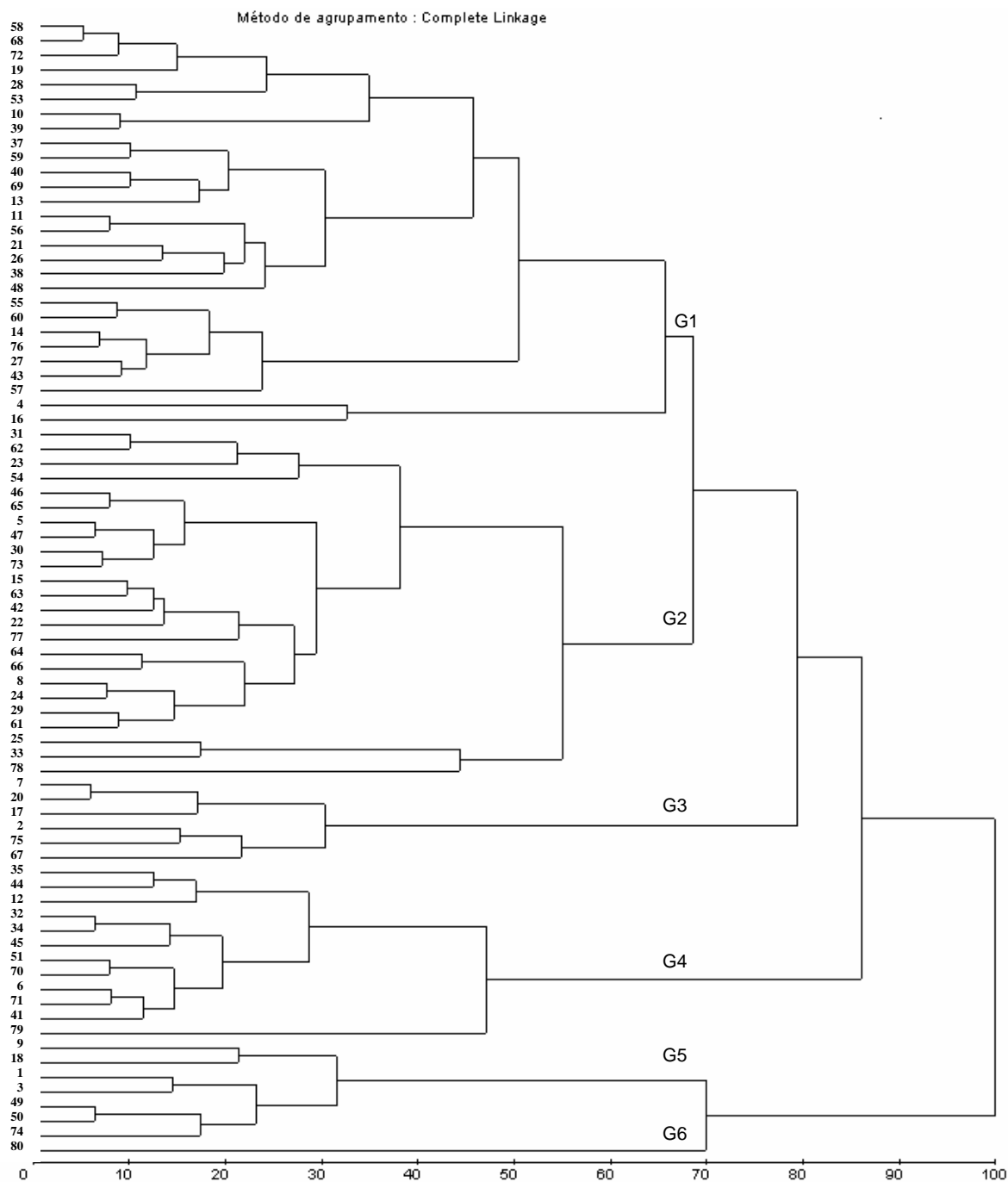


Figura 9. Dendrograma de dissimilaridade genética pelo método do vizinho mais distante para 78 acessos de trevo-branco baseado em 8 caracteres morfológicos (retirando da análise os dados de MS total).

4.2.2. Correlação entre as variáveis

A análise de correlação simples foi realizada utilizando-se dez repetições por acesso para cada um das nove variáveis analisadas (Tabela 6). Embora várias correlações entre as variáveis tenham sido significativas, muitas delas apresentaram baixos valores numéricos, indicando sua limitada importância biológica e, por isso seus resultados devem ser discutidos com cautela.

Tabela 6. Correlações simples entre as variáveis: comprimento de estolão (CES), número de nós/estolão (NN), comprimento de entrenós (CEN), diâmetro de estolão (DE), estatura (ES), hábito de crescimento (HAB), intensidade de florescimento (FLOR), área foliar/folha (AF) e produção total de matéria seca (MS total)

	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MS total
CES		0.53**	0.65**	0.19**	0.23**	0.12**	0.27**	0.07	0.27**
NN			-0.23**	0.12**	0.12**	0.05	-0.06	0.00	-0.04
CEN				0.11*	0.15**	0.09**	0.37**	0.07	0.35**
DE					0.24**	0.24**	0.09**	0.24**	0.11*
ES						0.60**	0.05	0.40**	0.19**
HAB							0.01	0.33**	-0.05
FLOR								0.06	0.14**
AF									0.15**
MS total									

** Significativo a 1% de probabilidade pela estatística t ($P \leq 0,01$).

* Significativo a 5% de probabilidade pela estatística t ($P < 0,05$).

Observando-se os resultados, verifica-se a alta correlação entre o comprimento de estolão e o comprimento dos entrenós ($r=0,65$), assim como entre o CES e o número de nós/estolão ($r=0,53$), ambas altamente significativas, as quais evidenciaram a importância biológica desses caracteres. Esses resultados indicaram que quanto maior o número de nós/estolão, maior foi o comprimento de entrenós e comprimento de estolão. Conforme Sanderson et al. (2003), a persistência do trevo-branco nas pastagens deve-se

principalmente pelo crescimento do estolão, e é necessário um manejo que mantenha um importante comprimento e massa de estolão, para auxiliar na persistência e competitividade do trevo-branco.

Outra correlação verificada foi entre a estatura e o hábito de crescimento, indicando, como era esperado, que quanto mais prostrada a planta, menor sua estatura. Segundo Roso & Pagano (2001), populações de locais pastejados apresentaram menor estatura e hábito mais prostrado do que as de lugares não pastejados. Além disso, afirmaram que os acessos com hábito prostrado apresentaram alto rendimento de sementes.

A análise de correlação confirmou o citado anteriormente, apresentando correlação positiva, embora um pouco baixa, entre a estatura das plantas e a área foliar, devido ao comprimento do pecíolo, pois plantas com maior área foliar apresentam maior pecíolo e, em consequência, uma maior estatura, concordando com os resultados obtidos por Carámbula (s.d.), Beinhart (1963), Viecelli (2000) e Olmos et al. (2003). Do mesmo modo, foram verificadas correlações entre área foliar e hábito de crescimento, corroborando com o citado por Carámbula (s.d.) de que as plantas de trevo-branco com folhas pequenas apresentam-se mais prostradas. Esse último autor afirmou ainda que além da área foliar servir para classificar o trevo-branco, serve como parâmetro para selecionar tipos morfológicos mais persistentes em condições adversas de alta temperatura e baixa umidade.

De acordo com Gustine et al. (2002), plantas de trevo-branco de folhas grandes apresentaram maiores pecíolos, maiores entrenós e estolões mais delgados e pobremente enraizados. Entretanto, Carámbula (s.d.) e

Mather et al. (1995) afirmaram que os tipos de folhas grandes apresentam porte mais alto, estolões mais grossos e hábito mais ereto. Neste estudo o diâmetro de estolão apresentou baixa correlação (0,24) com as três variáveis, estatura, área foliar e hábito de crescimento, não deixando evidente a associação do diâmetro de estolão com essas características.

Carámbula (s.d.) e Eisinger & Paim (1994) verificaram que plantas com estolões mais longos geralmente apresentaram um menor rendimento de matéria seca e, em adição, Roso & Pagano (2001) citaram que populações de folhas grandes apresentaram maiores rendimentos de MS. Ambas afirmativas não puderam ser verificadas neste trabalho, pois embora altamente significativas, tanto as correlações entre MS total e comprimento de estolão, como entre MS total e área foliar foram baixas (0,27 e 0,15, respectivamente), não evidenciando real associação entre essas variáveis. Segundo Collins et al. (1997), o comprimento dos estolões, o tamanho das folhas e a produção de pecíolos são importantes indicadores da produção do trevo-branco quando o mesmo é submetido ao pastejo.

A correlação entre produção de MS total e comprimento de entrenós também foi positiva e altamente significativa, apesar de um pouco baixa (0,35), de maneira que quanto mais compridos foram os entrenós, maior a produção total de MS. E, ainda, as plantas que possuíam maiores entrenós, também foram as que apresentaram florescimento intenso, evidenciando a associação entre comprimento de entrenós e intensidade de florescimento, embora o coeficiente de correlação também tenha sido um pouco baixo.

Eisinger & Paim (1994) observaram que os clones de trevo-branco que apresentaram baixa produção de MS foram os mesmos que cresceram menos em altura, evidenciando a correlação positiva entre produção de MS e estatura. Essa relação não foi confirmada neste trabalho.

É preciso salientar que algumas correlações podem não ter sido muito eficientes pelo fato das plantas terem sido avaliadas individualmente, sem pastejo e por um curto período de tempo, de setembro a dezembro (três meses).

4.3. Comparação entre resultados moleculares e morfológicos

Observando-se os dendrogramas gerados, nota-se que os acessos apresentaram grande divergência genética, tanto pelos dados morfológicos como pelos dados moleculares. Entretanto, as duas abordagens (RAPD e morfologia) formaram grupos distintos entre elas, ou seja, cada uma apresentou resultados diferentes de similaridade ou dissimilaridade entre os acessos, formando grupos diferentes.

No agrupamento através de semelhanças morfológicas, pôde-se notar a formação de alguns grupos distintos de acordo com as algumas características compartilhadas, como por exemplo, o grupo 5 da segunda análise, que foi formado por acessos com maior estatura e área foliar (Figura 9). Já, no agrupamento através dos dados moleculares esses grupos verificados no dendrograma dos caracteres morfológicos não foram observados. Steiner & Santos (2001) afirmaram a possibilidade de diferenças entre os genótipos em uma única característica que afeta a morfologia, não

serem detectadas por RAPD. Os autores ressaltaram que a ausência de relação entre a similaridade molecular e morfológica sugerem que traços específicos de valor adaptativo podem ser acumulados em habitats sujeitos a condições ecológicas semelhantes. Em outras palavras, que essa divergência entre as classificações morfológicas e moleculares pode ser devido a conservação de traços morfológicos sob seleção natural em ambientes similares, apesar da ocorrência de mutações ao acaso que tenderiam a causar eventuais diferenças entre populações geograficamente distantes.

Neste trabalho, tanto o agrupamento dos acessos com base nas características moleculares, como pelas características morfológicas não foram fortemente associados com a origem geográfica dos materiais, concordando com os resultados de Steiner & Santos (2001) e Johnson et al. (2002), que utilizaram RAPD e marcadores morfológicos para caracterizar a coleção de germoplasma do USDA de cornichão e de *Poa pratensis* L., respectivamente. Assim como com os obtidos por Kongkiatngam et al. (1996), que detectaram a variação genética entre cultivares de trevo-vermelho, em *bulks*, através de marcadores RAPDs; também estão de acordo com os resultados de Crochemore et al. (1998), os quais relacionaram a diversidade genética de populações de alfafa obtida através de caracteres agrônômicos e morfológicos, com a diversidade obtida por marcadores RAPD.

No entanto, o uso conjunto das duas análises permitiria a separação dos acessos em grupos com características morfológicas e moleculares marcadamente diferentes, que poderiam servir de base para um programa de melhoramento genético da espécie.

5. CONCLUSÕES

Há uma grande variabilidade genética na coleção básica de trevo-branco verificada através de caracteres moleculares e morfológicos.

Cada acesso apresenta um padrão diferente de bandas, possibilitando a sua identificação e diferenciação. Apenas três iniciadores são suficientes para diferenciar os acessos analisados.

O comprimento de estolão, a estatura, a área foliar e o número de nós por estolão foram os principais caracteres discriminatórios dos acessos.

Houve correlação positiva e altamente significativa entre o comprimento de estolão e o comprimento de entrenós, assim como entre o comprimento de estolão e o número de nós por estolão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, P. B.; BUFARAH, G. **Plantas forrageiras: gramíneas e leguminosas**. São Paulo: Nobel, 1986. 150 p.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. Rio de Janeiro: USAID, 1971. 381 p.

ALVES, M.I.F.; MACHADO, A.A.; ZONTA, E.P. Tópicos especiais de estatística experimental utilizando o SANEST (Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores). In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 5.; REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 38., 1993, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Departamento de Estatística da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1993. p.1-110.

ARANA, S. et al. Riego y manejo en la productividad de pasturas con trébol blanco. In: JORNADA DE TREBOL BLANCO, 1., 2000, Estanzuela. [**Anais...**] Estanzuela: INIA, 2000. p. 5-12. (Serie Actividades de Difusión, 241).

BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. **Southern forages**. Georgia: Potash & Phosphate Institute (PPI) and Foundation for Agronomic Research (FAR), 1996. 264 p.

BARBOSA NETO, J. F.; BERED, F. Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.29-40.

BEINHART, G. Effects of environment on meristematic development, leaf area, and growth of white clover. **Crop Science**, Madison, v. 3, n. 1, p.209-214, 1963.

BERGAMASCHI, H.; GUADAGNIN, M.R.; CARDOSO, L.S.; SILVA, M.I.G. da. **Clima da Estação Experimental da UFRGS (e região de abrangência)**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 78p.

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 7p. (Embrapa Trigo. Documentos Online 3). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p do03.htm>. Acesso em: 17 abr. 2001.

BRINK, G. E. et al. Growth of white clover ecotypes, cultivars, and germplasms in the southeastern USA. **Crop Science**, Madison, v. 39, p.1809-1814, 1999.

BRUMMER, E. C.; BOURTON, J. H.; KOCHERT, G. Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. **Genome**, Ottawa, v. 38, p. 362-367, 1995.

CAMPOS-DE-QUIROZ, H.; ORTEGA-KLOSE, F. Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 122, p.61-67, 2001.

CARADUS, J. R. et al. Classification of a world collection of white clover cultivars. **Euphytica**, Wageningen, v. 42, p.183-196, 1989.

CARÁMBULA, M. **Produccion y manejo de pasturas sembradas**. Montevideo: Hemisferio Sur, [19__]. 464 p.

CARÁMBULA, M. **Produccion de semillas de plantas forrajeras**. Montevideo: Hemisferio Sur, [19__]. 518 p.

CROCHEMORE, M.L. et al. Structuration of alfalfa genetic diversity using agronomic and morphological characteristics. Relationship with RAPD markers. **Agronomie**, Paris, v. 18, p.79-94, 1998.

COLLINS, R. P. et al. Response to divergent selection for stolon characters in white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 129, n. 3, p.279-285, 1997.

CRUZ, R. P. da; MILACH, S. C. K. Análise de RAPD. In: MILACH. S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.107-116.

CRUZ, C. D. **Programa Genes** – versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001.

DALL'AGNOL, M.; PAIM, N. R.; RIBOLDI, J. Cultivares e progênies de policruzamento de trevo branco consorciadas com gramíneas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 11, p.1591-1598, 1982.

DIAS, P. M. B. **Caracterização de espécies brasileiras de *Adesmia* DC. Por RAPD**. Porto Alegre, 2003. 130f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, [s. l.], 19, p.11-15,1987.

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

EISINGER, S. M.; PAIM, N. R. Avaliação de clones de trevo branco sob diferentes níveis de calcário e fósforo do solo. I. Taxas de crescimento e produção de forragem. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.23, n.3, p.383-393, 1994.

FEDERIZZI, L. C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.3-15.

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

FRAME, J.; CHARLTON, J. F. L.; LAIDLAW, A. S. **Temperate forage legumes**. Wallingford, UK: CAB International, 1997. 327 p.

FU, Y.B. et al. Assessment of bulking strategies for RAPD analysis of flax germoplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Wageningen, v. 50, p. 743-746, 2003.

GARCIA, J. A. **Variedades de trebol blanco**. Montevideo: INIA, 1995. 12 p. (Série Técnica, 70).

GARCÍA, J. A. Mejoramiento de trebol blanco. In: JORNADA DE TREBOL BLANCO, 1., 2000, Estanzuela. [**Anais...**] Estanzuela: INIA, 2000. p. 1-4. (Serie Actividades de Difusión, 241).

GARCÍA, J. A.; BARÚ, N.; VERNAZZA, R. Riego y producción de semillas de trebol blanco. In: JORNADA DE TREBOL BLANCO, 1., 2000, Estanzuela. [**Anais...**] Estanzuela: INIA, 2000. p. 13-18. (Serie Actividades de Difusión, 241).

GIBSON, P. B.; HOLLOWELL, E. A. White clover. In: **AGRICULTURE handbook**. Washington, D. C.: USDA, 1966. 314 p.

GUSTINE, D. L.; HUFF, D. R. Genetic variation within and among white clover populations from managed permanent pastures of the northeastern USA. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 2, p.524-530, 1999.

GUSTINE, D. L.; SANDERSON, M. Quantifying spatial and temporal genotypic changes in white clover populations by RAPD technology. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 4, p. 143-148, 2001.

GUSTINE, D. L.; SANDERSON, M. A. Molecular analysis of white clover population structure in grazed swards during two growing seasons. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 4, p. 1143-1149, 2001.

GUSTINE, D. L. et al. Genetic variation of RAPD markers for north american white clover collections and cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 343-347, 2002.

HALLDÉN, C. et al. Competition as a source of errors in RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.93, p.1185-1192, 1996.

HELGADÓTTIR, A.; DALMANNSDÓTTIR, S.; COLLINS, R. P. Adaptational changes in white clover population selected under marginal conditions. **Annals of Botany**, Oxford, UK, v.88, p.771-780, 2001.

HOLLOWELL, E. A. White clover *Trifolium repens* L., annual ou perennial? In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 10., Helsinki, 1966. **Proceedings...** Helsinki, 1966. p.184-187.

IBPGR. **Descriptors for white clover (*Trifolium repens* L.)**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1992.

JAHUFER, M. Z. Z. et al. Identification of research to improve the efficiency of breeding strategies for white clover in Australia – a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 53, p. 239-257, 2002.

JOHNSON, R. C. et al. Characterization of the USDA *Poa pratensis* collection using RAPD markers and agronomic descriptors. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Wageningen, v. 49, p. 349-361, 2002.

KÖLLIKER, R. et al. Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 89, p.355-361, 2001.

KONGKIATNGAM, P. et al. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 84, p.237-246, 1995.

KONGKIATNGAM, P. et al. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. **Euphytica**, Wageningen, v. 89, p.355-361, 1996.

LANGE, O.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Isozyme variation in wild and cultivated species of the genus *Trifolium* L. (Leguminosae). **Annals of Botany**, Oxford, UK, v.86, p.339-345, 2000.

LÜSCHER, A. et al. Leaf area, competition with grass, and clover cultivar: key factors to successful overwintering and fast regrowth of white clover (*Trifolium repens* L.) in spring. **Annals of Botany**, Oxford, UK, v.88, p.725-735, 2001.

MATHER, R. D. J; MELHUIISH, D. T; HERLIHY, M. Trends in the global marketing of white clover cultivars. In: WOODFIELD, D. R. **White clover: New Zealand's competitive edge**. New Zealand: Lincoln University, 1995. p. 7-14.

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

MILACH, S.C.K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S.R.R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br>. Acesso em: 30 set. 2002.

NABINGER, C. Técnicas de melhoramento de pastagens naturais no Rio Grande do Sul. In: SEMINÁRIO SOBRE PASTAGENS: "DE QUE PASTAGENS NECESSITAMOS", 1980, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: FARSUL, 1980. p. 28-58.

OLMOS, F.; WILMAN, D.; HAMILTON, R. S. Variation between and within *Trifolium repens* L. Populations collected from sown swards in Uruguay. **Euphytica**, Wageningen, v. 130, p.131-141, 2003.

ORAM, R.; LODGE, G. Trends in temperat Australian grass breeding and selection. **Australian Jounal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 54, p.211-241, 2003.

PAIM, N. R.; ARAGÃO, W. M.; MARKUS, R. Características de progênes e cultivares de trevo branco (*Trifolium repens* L.). **Agronomia sulriograndense**, Porto Alegre, v. 14, n.2, p. 311-327, 1978.

PAIM, N. R. Manejo de leguminosas de clima temperado. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 9, 1988, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1988. p. 341-358.

PAIM, N. R. White clover to improve natural grasslands in southern Brazil. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 17., 8-12 fev. 1993, Palmerston North. **Proceedings...** Palmerston North: 8-12 fev.1993. p.455-456.

PAIM, N. R.; RIBOLDI, J. Duas novas cultivares de trevo branco comparadas com outras disponíveis no Rio Grande do Sul, em associação com gramíneas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p.43-53, 1994.

PAREDES, M. et al. Ecotypic differentiation in *Medicago polymorpha* L. along an environmental gradient in central Chile. RAPDs studies show little genetic divergence. **Euphytica**, Wageningen, v. 123, p.431-439, 2002.

PEDERSON, G. A. White clover and other perennial clovers. In: BARNES, R. F. et al. **Forages**: an introduction to grassland agriculture. USA: Iowa State University Press, 1995. p.227-236.

PUPO, N. I. H. **Manual de pastagens e forrageiras**: formação, conservação, utilização. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1979. 342p.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. New York: Exeter Software, 2001.

ROSSO, B.S.; PAGANO, E.M. Collection e characterization of populations of white clover (*Trifolium repens* L.) in Argentina. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Netherlands, v. 48, p.513-517, 2001.

SANDERSON, M. A. et al. Growth and complexity of white clover stolons in response to biotic and abiotic stress. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 2197-2205, 2003.

SCHEFFER-BASSO, S. M. et al. Avaliação preliminar da variabilidade morfofisiológica de populações de trevo branco. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. CD-R-34 02sbz62.

SEKER, H.; ROWE, D. E.; BRINK, G. E. White clover morphology changes with stress treatments. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 2218-2225, 2003.

SMITH, D.; BULA, R.J.; WALGENBACH, R. P. **Forage management**. USA: Kendall; Hunt Publishing, 1986. 305 p.

STEINER, J.J.; SANTOS, G.G. de los. Adaptive ecology of *Lotus corniculatus* L. Genotypes: I. Plant morphology and RAPD marker characterizations. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 2, p. 552-563, 2001.

STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EMATER/RS; UFRGS, 2002. 128 p.

SWEENEY, P. M.; DANNEBERGER, K. T. Random amplified polymorphic DNA in perennial ryegrass: a comparison of bulk samples vs. individuals. **Hortscience**, Alexandria, v. 29, n.6, p.624-626, 1994.

THOMAS, R.G. Growth of the white clover plant in relation to seed production. In: LANCASHIRE, J. A. **Herbage seed production**. New Zealand: Editorial Service Limited, 1980. p.56-63.

THOMPSON, J. A.; NELSON, R. L. Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 1356-1362, 1998.

THOMPSON, J. A.; NELSON, R. L.; VODKIN, L. O. Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 1348-1355, 1998.

VIECELLI, L.C. **Melhoramento genético de trevo branco (*Trifolium repens* L.) visando persistência e produção**. Porto Alegre, 2000. 135f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

WOOLDFIELD, D. R.; CARADUS, J. R. Genetic improvement in white clover representing six decades of plant breeding. **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 1205-1213, 1994.

YANAKA F. Y. **Caracterização molecular e isoenzimática de acessos de *Bromus auleticus* TRINIUS (EX-NEES)**. Porto Alegre, 2002. 117f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

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

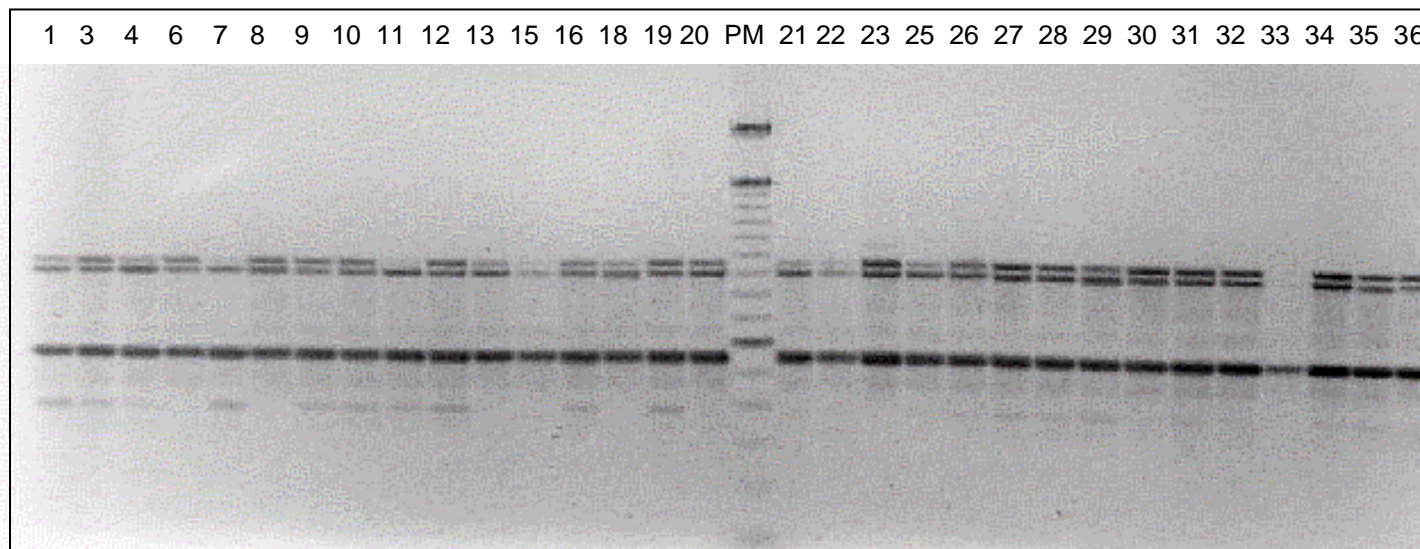
ZOHARY, M.; HELLER, D. **The genus *Trifolium***. Jerusalem: The Israel Academy of Sciences and Humanities, 1984. 606p.

7. APÉNDICES

Apêndice 2. Número e tamanho das bandas geradas para cada iniciador.

Iniciador	Nº total de bandas	Tamanho Min-max (pb)
OPA-08	06	393-1007
OPA-10	22	235-3098
OPB-07	22	324-2600
OPB-08	15	130-2470
OPB-14	09	267-1786
OPG-03	18	290-2040
OPG-05	17	350-1989
OPG-06	29	186-2371
OPG-16	19	335-2330
OPG-17	13	270-2500
OPH-02	13	480-2338
OPH-07	15	185-2072
OPH-12	20	239-2412
OPH-13	13	393-2182
OPH-15	19	274-2335
OPAB-14	23	150-2250
OPAG-20	12	415-1911
OPAL-12	03	530-925
OPAN-03	15	327-2072
OPAP-01	17	247-2397
OPAP-19	07	370-1786
OPAQ-02	22	213-2710
OPAQ-09	11	50-2204
OPAR-19	12	160-1803
TOTAL	24	372
		50-3098

Apêndice 4. Padrões de bandas obtidos com o iniciador OPAL-12 para 31 acessos em gel de agarose 1,5% (imagem invertida). No centro, o padrão de fragmentos de tamanho conhecido (PM = 100pb).



Apêndice 5. Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
1	1	15,0	15	1,0	2,8	15	3	0	18,5	20,0
1	2	16,0	17	0,9	1,2	23	3	3	11,2	6,9
1	3	27,0	30	0,9	3,2	25	3	0	14,4	17,0
1	4	21,0	12	1,8	3,0	23	3	2	14,6	21,6
1	5	21,0	17	1,2	2,7	23	3	2	13,0	6,5
1	6	30,0	24	1,3	2,9	23	3	0	12,0	33,1
1	7	31,0	16	1,9	2,5	17	2	2	14,4	33,1
1	8	23,0	19	1,2	1,8	21	3	0	13,9	30,6
1	9	24,0	18	1,3	2,9	12	3	0	12,1	10,3
1	10	26,0	19	1,4	2,9	16	2	0	18,3	9,5
2	1	11,0	7	1,6	3,0	14	3	3	6,7	48,3
2	2	25,2	12	2,1	2,9	8	2	3	10,1	96,2
2	3	49,0	22	2,2	2,5	16	3	3	9,1	60,4
2	4	25,0	12	2,1	2,5	12	3	3	10,8	58,5
2	5	46,0	14	3,3	3,0	18	3	3	8,3	67,7
2	6	23,0	11	2,1	2,4	18	3	3	6,3	67,7
2	7	20,0	13	1,5	2,9	18	3	3	10,1	52,6
2	8	29,0	13	2,2	2,5	12	2	3	12,0	68,2
2	9	25,0	12	2,1	2,0	14	2	1	4,7	85,3
2	10	19,0	18	1,1	2,9	16	3	1	5,6	35,6
3	1	17,0	18	0,9	3,2	14	3	0	13,6	16,2
3	2	14,5	12	1,2	3,0	5	1	0	14,8	8,1
3	3	43,5	18	2,4	4,0	28	3	2	8,6	27,2
3	4	19,0	10	1,9	3,0	15	3	1	19,9	6,4
3	5	32,0	18	1,8	2,5	15	3	1	7,7	38,2
3	6	25,0	15	1,7	5,0	25	3	0	18,0	30,9
3	7	27,5	15	1,8	2,0	8	2	3	10,3	88,2
3	8	13,0	11	1,2	3,4	18	3	0	10,3	18,5
3	9	18,0	21	0,9	3,2	21	3	0	15,1	70,2
3	10	24,0	19	1,3	4,0	15	3	3	11,7	40,1
4	1	26,0	16	1,6	2,4	11	3	3	2,4	38,8
4	2	29,0	18	1,6	2,4	4	1	0	5,6	37,5
4	3	32,0	19	1,7	3,0	7	2	3	4,6	45,3
4	4	4,3	9	0,5	1,3	4	1	3	3,4	14,7
4	5	31,0	20	1,6	2,8	10	3	3	2,5	6,2
4	6	24,7	20	1,2	2,6	12	3	1	9,2	34,8
4	7	40,0	17	2,4	1,5	4	1	3	3,2	30,8
4	8	30,0	18	1,7	2,4	7	1	3	4,2	37,6
4	9	29,0	18	1,6	2,2	6	1	3	4,7	18,2
4	10	30,5	21	1,5	1,9	6	1	3	4,0	17,9
5	1	31,7	28	1,1	3,0	18	3	1	3,8	15,8
5	2	13,3	21	0,6	2,5	4	1	0	13,6	11,2
5	3	20,0	19	1,1	2,0	7	1	0	8,0	42,0
5	4	13,0	9	1,4	3,0	10	1	0	4,4	9,3
5	5	26,0	28	0,9	2,4	22	3	0	3,0	14,3

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
5	6	22,0	17	1,3	3,0	6	1	0	1,8	12,8
5	7	20,0	20	1,0	2,0	9	1	0	3,0	6,6
5	8	14,0	19	0,7	2,2	7	1	3	3,7	8,4
5	9	22,0	25	0,9	1,9	7	1	0	3,7	8,9
5	10	13,0	18	0,7	2,0	8	1	0	5,3	6,1
6	1	22,0	12	1,8	2,1	7	1	3	3,6	8,1
6	2	16,0	13	1,2	1,5	3	1	0	3,8	8,4
6	3	10,0	7	1,4	1,0	11	1	3	4,1	6,3
6	4	7,0	12	0,6	2,2	6	2	0	4,4	15,9
6	5	16,0	18	0,9	1,8	8	2	0	3,2	30,1
6	6	16,0	11	1,5	1,2	12	1	0	7,3	15,2
6	7	19,0	16	1,2	2,4	7	1	0	2,7	14,8
6	8	22,0	16	1,4	2,0	6	1	0	3,0	20,3
6	9	15,0	15	1,0	2,0	8	3	0	5,5	4,1
6	10	17,0	12	1,4	2,0	12	3	0	4,6	6,2
7	1	34,0	19	1,8	2,8	9	3	3	6,3	49,3
7	2	26,0	13	2,0	2,0	23	3	0	5,9	73,4
7	3	23,0	11	2,1	2,0	8	3	3	8,3	27,1
7	4	35,0	14	2,5	1,8	13	2	2	9,0	51,2
7	5	31,5	20	1,6	2,5	13	3	3	4,5	16,7
7	6	24,0	11	2,2	2,5	8	2	3	4,8	31,1
7	7	30,0	10	3,0	3,0	8	1	3	5,1	12,8
7	8	35,0	17	2,1	3,0	13	2	3	5,0	27,5
7	9	20,0	7	2,9	3,0	8	2	3	4,4	22,5
7	10	20,0	11	1,8	1,8	11	2	3	4,2	33,5
8	1	24,0	18	1,3	1,9	15	3	0	7,6	22,5
8	2	21,0	20	1,1	2,6	14	3	0	6,1	13,1
8	3	18,0	10	1,8	2,4	15	3	2	9,4	3,9
8	4	25,0	18	1,4	2,0	13	2	0	8,5	65,3
8	5	25,0	17	1,5	2,0	12	3	2	5,6	16,1
8	6	12,5	10	1,3	1,5	10	3	0	1,6	13,6
8	7	26,0	22	1,2	2,0	11	3	3	3,7	11,4
8	8	17,0	20	0,9	2,4	9	1	0	7,5	16,2
8	9	18,5	29	0,6	2,5	11	2	3	8,0	14,9
8	10	30,0	23	1,3	3,0	11	1	1	5,7	9,4
9	1	28,0	29	1,0	3,1	21	3	0	17,8	15,2
9	2	27,0	21	1,3	3,4	18	3	2	11,1	9,2
9	3	10,0	12	0,8	2,0	13	3	0	12,6	12,8
9	4	13,0	18	0,7	3,5	11	3	0	11,7	10,8
9	5	21,5	21	1,0	3,0	9	3	0	9,7	15,1
9	6	21,0	17	1,2	3,0	9	3	3	14,1	5,8
9	7	13,0	10	1,3	1,5	17	3	0	10,5	7,7
9	8	24,5	17	1,4	2,2	20	2	0	11,7	7,2
9	9	14,5	18	0,8	3,0	16	3	0	6,8	8,5
9	10	9,0	7	1,3	3,0	16	3	0	8,1	23,8

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
10	1	12,0	15	0,8	2,3	3	1	0	1,5	7,7
10	2	20,0	21	1,0	2,1	4	1	3	1,6	5,9
10	3	10,0	13	0,8	1,7	3	1	2	1,3	5,4
10	4	27,0	23	1,2	2,8	5	1	3	2,7	9,8
10	5	16,5	16	1,0	2,3	13	1	3	2,0	18,7
10	6	24,8	25	1,0	2,4	7	1	3	2,8	15,7
10	7	15,0	13	1,2	2,0	3	1	3	1,4	8,1
10	8	17,5	16	1,1	1,5	3	1	0	0,9	9,4
10	9	28,0	19	1,5	1,5	2	1	2	1,7	2,9
10	10	11,0	4	2,8	1,0	7	1	2	1,0	6,6
11	1	13,0	9	1,4	1,4	9	3	3	3,9	26,7
11	2	20,0	18	1,1	2,0	8	1	0	4,4	16,9
11	3	41,0	21	2,0	2,0	5	1	2	5,3	13,9
11	4	24,0	14	1,7	2,0	10	1	0	5,5	17,2
11	5	35,0	17	2,1	1,5	12	3	2	4,9	12,1
11	6	29,0	16	1,8	1,5	12	2	3	11,0	4,3
11	7	18,5	16	1,2	2,0	8	3	0	4,3	30,9
11	8	27,0	17	1,6	1,5	14	2	0	2,8	27,3
11	9	18,5	17	1,1	1,9	8	1	1	5,4	15,3
11	10	24,0	14	1,7	2,0	5	1	0	6,0	11,0
12	1	17,8	21	0,8	2,1	6	2	1	5,5	6,4
12	2	8,0	10	0,8	1,0	11	3	3	3,8	7,3
12	3	18,0	24	0,8	2,0	5	1	2	3,3	3,1
12	4	4,0	3	1,3	2,0	4	1	1	4,0	12,2
12	5	13,0	12	1,1	1,0	8	1	2	4,9	19,2
12	6	21,0	21	1,0	3,0	6	1	1	2,6	6,5
12	7	13,5	18	0,8	1,9	6	1	0	2,1	4,6
12	8	13,0	13	1,0	2,2	9	2	2	4,0	3,6
12	9	7,0	5	1,4	3,0	6	1	0	3,2	5,0
12	10	15,5	23	0,7	1,5	5	2	0	3,0	1,7
13	1	26,0	17	1,5	2,2	15	3	3	7,3	36,2
13	2	19,7	17	1,2	2,2	6	3	0	4,6	22,0
13	3	30,0	22	1,4	3,2	15	3	3	8,5	61,4
13	4	31,2	21	1,5	2,0	7	1	0	6,1	36,5
13	5	41,5	21	2,0	2,0	9	1	3	7,7	7,2
13	6	19,0	25	0,8	2,4	10	3	2	6,2	21,2
13	7	24,0	14	1,7	3,0	6	1	1	3,8	42,6
13	8	32,0	17	1,9	2,8	13	2	0	9,0	21,6
13	9	23,5	17	1,4	2,3	16	2	1	7,2	21,6
13	10	24,0	12	2,0	2,0	8	1	0	5,1	20,1
14	1	17,5	29	0,6	2,0	12	3	0	7,8	14,4
14	2	18,0	19	0,9	1,8	9	1	0	4,5	17,9
14	3	29,0	19	1,5	2,5	10	1	0	3,7	5,8
14	4	37,0	21	1,8	3,0	13	1	0	5,0	7,2
14	5	24,0	31	0,8	3,5	5	2	1	5,9	8,1

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
14	6	4,5	9	0,5	2,0	4	1	0	2,7	33,8
14	7	13,0	13	1,0	2,4	7	2	0	4,2	11,5
14	8	26,0	25	1,0	2,0	9	2	0	2,9	6,7
14	9	14,0	24	0,6	2,0	7	1	1	2,8	5,7
14	10	9,0	11	0,8	2,7	7	1	0	4,2	6,0
15	1	22,0	22	1,0	2,4	17	3	0	3,8	26,8
15	2	22,0	23	1,0	2,0	19	3	0	3,7	8,8
15	3	28,0	22	1,3	1,8	20	3	0	3,0	27,9
15	4	8,5	8	1,1	1,8	12	1	0	4,0	18,8
15	5	31,5	24	1,3	1,7	14	2	0	7,7	17,4
15	6	11,0	12	0,9	2,5	4	1	0	6,6	39,3
15	7	8,5	7	1,2	2,0	19	3	0	5,1	32,7
15	8	11,0	10	1,1	2,5	16	2	0	5,6	17,6
15	9	15,0	12	1,3	1,5	10	2	0	4,5	25,7
15	10	22,0	13	1,7	2,0	11	2	2	13,4	7,9
16	1	22,0	20	1,1	2,4	6	2	3	3,8	7,0
16	2	31,0	15	2,1	25,0	13	3	3	12,9	32,2
16	3	11,0	14	0,8	2,0	16	3	2	6,7	18,3
16	4	20,0	16	1,3	2,0	7	2	2	5,8	11,5
16	5	20,0	19	1,1	2,0	7	2	2	4,7	8,5
16	6	42,0	26	1,6	1,7	7	1	3	5,6	53,1
16	7	37,0	18	2,1	1,5	8	2	3	6,3	25,2
16	8	8,0	13	0,6	2,0	4	2	1	7,4	34,5
16	9	29,5	27	1,1	2,3	11	2	1	10,9	37,6
16	10	43,0	31	1,4	3,5	20	3	2	4,5	28,4
17	1	48,0	15	3,2	1,5	18	2	0	8,7	36,8
17	2	17,5	12	1,5	3,0	13	3	3	6,0	52,6
17	3	39,0	17	2,3	3,0	14	3	3	6,8	59,9
17	4	43,0	13	3,3	2,5	8	3	3	6,0	7,8
17	5	12,0	10	1,2	1,5	10	1	3	4,8	37,7
17	6	12,0	13	0,9	2,4	10	3	3	5,2	45,0
17	7	13,0	8	1,6	3,0	12	2	3	5,1	18,0
17	8	15,0	8	1,9	1,5	12	3	3	7,7	31,8
17	9	42,0	17	2,5	2,2	12	2	3	4,9	17,3
17	10	10,5	10	1,1	1,8	8	3	3	5,8	17,8
18	1	13,0	13	1,0	1,8	18	3	0	8,1	60,8
18	2	26,0	21	1,2	2,6	17	3	0	11,7	26,4
18	3	26,0	27	1,0	2,7	14	3	0	5,2	18,8
18	4	34,0	27	1,3	3,0	15	3	0	6,7	21,8
18	5	26,0	22	1,2	3,0	12	3	0	7,1	39,9
18	6	11,0	12	0,9	2,0	7	1	0	10,1	24,9
18	7	16,0	17	0,9	2,0	18	3	0	6,7	31,8
18	8	38,0	19	2,0	3,0	9	3	3	6,0	64,2
18	9	22,0	16	1,4	3,0	14	3	0	9,2	6,9
18	10	23,0	24	1,0	2,0	18	3	0	5,0	38,2

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
19	1	18,0	13	1,4	2,0	14	3	3	4,4	52,7
19	2	20,0	23	0,9	1,7	16	2	3	6,5	2,8
19	3	30,5	23	1,3	1,5	9	2	3	7,4	24,6
19	4	17,0	16	1,1	1,9	9	1	3	3,2	57,1
19	5	17,0	13	1,3	2,0	14	3	2	4,8	37,5
19	6	17,5	11	1,6	1,5	8	1	0	3,4	43,2
19	7	22,0	10	2,2	1,5	11	1	3	3,6	58,6
19	8	21,0	18	1,2	2,4	11	1	2	3,8	27,3
19	9	15,0	19	0,8	2,0	12	1	3	5,5	19,6
19	10	20,0	12	1,7	1,1	7	1	3	7,1	17,2
20	1	24,0	15	1,6	2,0	7	1	3	7,3	75,1
20	2	15,0	11	1,4	1,7	11	3	3	6,3	54,5
20	3	40,0	23	1,7	2,1	5	2	1	8,5	24,7
20	4	30,0	14	2,1	3,0	16	3	3	9,1	54,9
20	5	6,0	5	1,2	1,5	4	1	3	4,8	44,5
20	6	27,0	15	1,8	2,9	12	1	3	6,3	45,1
20	7	30,0	13	2,3	2,2	11	3	3	3,3	23,2
20	8	42,0	12	3,5	2,8	16	3	3	3,6	68,0
20	9	25,0	16	1,6	2,0	13	3	2	4,9	29,2
20	10	23,0	9	2,6	2,4	14	3	3	3,1	44,5
21	1	20,0	11	1,8	2,0	9	3	0	7,3	32,6
21	2	24,5	15	1,6	2,0	20	3	0	6,7	12,6
21	3	25,5	19	1,3	2,0	10	2	0	7,1	69,5
21	4	25,0	19	1,3	2,4	20	3	2	7,5	39,7
21	5	21,0	17	1,2	2,5	10	3	2	6,2	17,3
21	6	21,5	16	1,3	2,5	9	1	3	9,3	8,6
21	7	8,0	7	1,1	2,5	9	3	0	5,8	27,0
21	8	15,0	13	1,2	3,0	11	3	0	5,3	26,6
21	9	23,5	19	1,2	2,0	17	2	0	7,5	23,6
21	10	31,0	17	1,8	2,5	10	2	0	6,8	21,9
22	1	25,5	23	1,1	2,2	10	3	0	5,0	32,4
22	2	10,5	13	0,8	2,0	14	2	0	13,1	37,0
22	3	21,0	20	1,1	1,5	15	1	0	7,8	20,1
22	4	34,0	22	1,5	2,0	16	3	0	8,8	16,5
22	5	8,0	14	0,6	2,0	10	3	0	6,5	25,2
22	6	15,0	16	0,9	2,4	13	3	0	5,0	14,6
22	7	28,0	23	1,2	1,3	15	2	0	5,7	31,1
22	8	11,0	16	0,7	1,1	14	2	0	6,3	9,8
22	9	31,0	20	1,6	2,0	15	3	1	5,5	13,0
22	10	14,5	13	1,1	1,5	11	2	0	4,8	18,7
23	1	8,2	7	1,2	2,2	14	2	0	4,5	13,9
23	2	16,0	12	1,3	1,8	16	3	0	6,3	35,3
23	3	26,0	22	1,2	3,0	11	3	0	5,2	9,4
23	4	6,7	12	0,6	2,0	10	1	0	4,8	16,9
23	5	17,0	23	0,7	2,0	6	2	0	9,3	17,2

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
23	6	21,0	16	1,3	4,0	17	3	0	6,1	19,0
23	7	22,0	16	1,4	2,0	12	1	0	8,5	18,4
23	8	22,0	15	1,5	3,2	12	3	2	7,2	19,1
23	9	26,5	24	1,1	2,0	10	2	0	4,8	11,4
23	10	20,5	26	0,8	3,0	11	3	3	6,7	12,3
24	1	16,5	16	1,0	1,9	12	3	1	5,4	17,2
24	2	32,5	25	1,3	3,0	10	1	2	6,0	16,9
24	3	28,0	25	1,1	2,0	18	3	3	9,7	22,1
24	4	18,0	14	1,3	2,5	10	3	0	7,8	13,6
24	5	28,0	19	1,5	2,0	10	1	0	4,5	8,8
24	6	30,0	22	1,4	2,0	15	3	0	3,1	5,5
24	7	21,0	23	0,9	2,4	9	1	0	3,5	9,5
24	8	19,0	12	1,6	1,0	7	1	1	2,1	8,9
24	9	14,0	16	0,9	1,7	12	2	2	4,0	8,3
24	10	23,0	21	1,1	1,9	8	2	2	5,9	7,2
25	1	26,0	17	1,5	2,7	13	3	2	14,4	45,9
25	2	43,0	17	2,5	2,1	19	3	3	8,1	22,3
25	3	34,0	18	1,9	3,0	23	3	0	15,2	21,9
25	4	26,0	16	1,6	2,0	20	3	1	9,7	16,8
25	5	33,0	16	2,1	2,0	16	3	1	19,4	31,4
25	6	47,0	28	1,7	4,0	18	3	2	10,3	37,8
25	7	24,0	20	1,2	2,0	18	3	3	11,7	15,3
25	8	36,0	20	1,8	3,0	24	3	2	6,1	32,7
25	9	36,0	29	1,2	2,4	13	2	0	9,5	10,8
25	10	30,0	14	2,1	2,0	11	2	1	9,3	10,4
26	1	10,0	8	1,3	2,4	14	3	0	5,7	34,2
26	2	18,0	21	0,9	1,5	5	2	0	3,5	27,4
26	3	13,0	8	1,6	1,6	12	3	2	5,2	10,5
26	4	34,0	24	1,4	2,6	19	3	1	3,9	22,2
26	5	18,0	14	1,3	2,3	15	3	2	8,3	22,2
26	6	24,0	17	1,4	2,0	9	1	2	6,9	21,7
26	7	18,0	17	1,1	2,0	6	1	0	9,2	29,6
26	8	27,0	17	1,6	2,0	8	2	1	7,0	30,5
26	9	24,5	24	1,0	2,5	16	2	3	6,5	54,6
26	10	18,0	15	1,2	1,5	6	1	0	5,7	25,4
27	1	15,7	28	0,6	2,1	9	3	0	4,7	17,3
27	2	20,0	15	1,3	2,0	7	1	0	3,0	9,9
27	3	16,0	11	1,5	2,0	9	3	0	7,0	13,4
27	4	28,0	20	1,4	2,0	5	2	3	8,4	11,5
27	5	12,5	22	0,6	1,5	4	1	0	3,3	20,2
27	6	19,0	23	0,8	1,7	17	2	0	7,0	9,3
27	7	26,0	24	1,1	2,0	12	2	1	3,5	20,5
27	8	10,0	12	0,8	2,0	6	1	0	3,5	11,9
27	9	20,0	13	1,5	3,0	11	2	0	8,2	10,7
27	10	22,5	24	0,9	2,0	4	1	0	7,3	12,9

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
28	1	9,3	13	0,7	1,8	8	2	3	2,6	24,2
28	2	31,5	24	1,3	1,7	5	1	3	6,1	51,5
28	3	34,0	12	2,8	1,5	6	1	3	5,3	25,8
28	4	30,0	22	1,4	2,5	12	2	2	4,5	65,7
28	5	25,0	15	1,7	1,0	8	1	2	3,5	58,0
28	6	35,0	25	1,4	2,5	17	3	3	5,4	21,7
28	7	20,0	20	1,0	2,0	4	1	3	5,2	14,4
28	8	29,0	17	1,7	2,4	9	1	3	4,9	14,6
28	9	20,0	15	1,3	1,4	5	1	3	3,3	8,9
28	10	18,0	9	2,0	1,5	4	1	3	2,1	18,6
29	1	9,0	14	0,6	1,9	4	2	0	5,7	21,6
29	2	18,5	13	1,4	1,3	3	1	0	3,7	24,2
29	3	12,0	10	1,2	2,0	10	1	3	5,2	26,5
29	4	15,0	19	0,8	2,0	10	3	0	5,2	29,9
29	5	39,0	18	2,2	1,5	11	2	3	6,1	62,8
29	6	11,0	12	0,9	2,0	6	2	0	5,9	7,6
29	7	22,0	14	1,6	2,0	8	2	2	4,5	16,5
29	8	30,5	18	1,7	2,5	19	2	2	3,4	45,7
29	9	16,5	21	0,8	2,0	14	2	2	4,5	9,1
29	10	22,0	19	1,2	1,5	3	1	0	2,9	7,6
30	1	25,0	24	1,0	1,7	15	3	0	4,1	4,2
30	2	11,7	23	0,5	1,3	13	3	3	11,2	13,7
30	3	9,5	14	0,7	1,5	9	1	0	5,3	27,7
30	4	21,0	27	0,8	2,0	6	1	0	2,9	14,3
30	5	12,0	11	1,1	1,5	8	3	0	4,1	19,2
30	6	11,5	21	0,5	1,5	8	2	0	3,5	9,1
30	7	20,0	15	1,3	1,5	14	2	0	6,6	14,3
30	8	10,0	14	0,7	2,0	12	2	2	6,7	17,7
30	9	13,5	13	1,0	2,5	11	2	0	4,9	26,7
30	10	16,5	15	1,1	1,8	13	2	0	3,0	13,2
31	1	48,0	34	1,4	4,2	24	3	0	8,4	13,2
31	2	14,0	13	1,1	2,8	22	3	0	5,6	53,0
31	3	11,0	13	0,8	1,8	3	1	0	9,9	43,9
31	4	30,0	20	1,5	2,0	12	2	0	7,4	14,9
31	5	27,5	25	1,1	3,2	22	3	0	7,4	19,1
31	6	21,5	19	1,1	3,0	23	3	0	8,0	15,2
31	7	16,0	13	1,2	1,5	9	3	0	9,0	19,1
31	8	7,5	8	0,9	3,0	10	3	0	3,1	9,1
31	9	11,0	15	0,7	3,1	11	3	1	10,9	6,9
31	10	32,5	16	2,0	3,0	22	3	0	4,0	25,0
32	1	13,0	17	0,8	1,7	3	1	0	2,3	14,6
32	2	8,8	12	0,7	1,6	4	1	0	5,7	15,1
32	3	21,0	20	1,1	1,4	13	1	0	2,2	8,8
32	4	16,0	17	0,9	2,0	3	1	0	7,1	6,4
32	5	27,0	15	1,8	2,4	13	1	0	1,5	10,2

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
32	6	13,5	13	1,0	1,5	4	1	0	8,0	8,9
32	7	25,0	20	1,3	1,9	17	2	3	2,4	15,8
32	8	13,0	12	1,1	1,0	4	1	0	1,5	13,3
32	9	26,0	18	1,4	2,0	5	1	0	1,3	3,4
32	10	29,5	27	1,1	2,2	5	1	0	4,5	4,3
33	1	25,5	11	2,3	3,0	17	3	3	5,4	36,6
33	2	37,0	15	2,5	2,9	17	3	3	8,7	38,9
33	3	22,5	28	0,8	1,3	6	1	1	12,4	42,3
33	4	25,0	22	1,1	2,5	9	3	0	8,2	18,7
33	5	36,0	19	1,9	2,5	26	1	0	14,2	59,0
33	6	16,0	10	1,6	2,5	11	3	2	1,7	8,8
33	7	46,0	30	1,5	2,5	15	3	3	11,8	77,3
33	8	22,0	16	1,4	2,0	12	2	0	9,6	26,3
33	9	37,0	19	1,9	3,0	21	3	2	7,3	41,0
33	10	23,0	18	1,3	2,5	16	3	3	8,7	17,2
34	1	9,5	11	0,9	2,0	5	1	0	4,1	5,9
34	2	16,0	12	1,3	2,4	16	3	2	4,2	7,9
34	3	34,0	18	1,9	1,7	3	2	0	2,8	28,0
34	4	24,0	17	1,4	1,5	10	3	0	1,4	7,1
34	5	15,0	10	1,5	1,5	6	1	0	1,4	4,1
34	6	25,0	21	1,2	1,5	7	1	0	3,2	4,5
34	7	30,0	27	1,1	2,0	16	2	1	1,8	9,5
34	8	14,0	13	1,1	1,7	4	1	0	1,8	4,1
34	9	19,0	22	0,9	2,0	4	1	0	2,1	7,0
34	10	11,5	11	1,0	2,0	2	1	0	1,6	3,8
35	1	12,0	12	1,0	2,2	8	3	0	3,4	3,6
35	2	22,5	30	0,8	2,0	3	1	0	11,2	4,6
35	3	17,0	30	0,6	2,0	7	1	0	5,9	13,3
35	4	17,5	27	0,6	1,5	8	1	3	4,2	14,2
35	5	22,0	22	1,0	1,8	5	1	0	4,8	9,2
35	6	13,0	16	0,8	1,5	8	1	0	2,7	6,9
35	7	18,5	18	1,0	1,5	5	2	0	3,3	3,3
35	8	3,0	10	0,3	2,0	1	2	0	3,5	2,5
35	9	4,5	4	1,1	1,5	8	2	0	4,2	9,1
35	10	23,0	11	2,1	2,4	15	3	2	3,1	10,5
37	1	20,0	14	1,4	1,8	6	1	2	5,0	27,7
37	2	36,0	16	2,3	1,7	11	3	3	5,2	21,3
37	3	54,0	23	2,3	2,0	6	2	0	4,7	30,9
37	4	24,5	14	1,8	2,0	10	1	3	5,1	23,7
37	5	26,0	17	1,5	2,2	13	2	3	1,6	30,3
37	6	33,5	12	2,8	2,0	8	1	3	6,8	12,6
37	7	25,0	20	1,3	1,5	15	3	3	3,8	36,2
37	8	30,0	21	1,4	2,0	11	1	2	5,6	17,7
37	9	16,0	8	2,0	1,5	7	2	3	6,7	31,0
37	10	11,0	9	1,2	1,7	6	1	0	11,5	22,1

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
38	1	50,8	18	2,8	3,0	11	2	2	10,7	24,6
38	2	24,0	11	2,2	2,0	14	3	3	4,9	46,8
38	3	12,0	10	1,2	2,0	9	2	0	9,8	34,9
38	4	13,5	8	1,7	1,5	5	1	1	6,8	15,2
38	5	15,0	6	2,5	1,5	11	2	0	9,3	17,5
38	6	20,0	11	1,8	2,0	10	1	0	5,3	46,1
38	7	30,0	16	1,9	2,3	9	1	1	6,8	10,9
38	8	17,0	12	1,4	2,0	9	2	2	5,3	13,6
38	9	37,0	19	1,9	2,0	9	2	0	2,5	25,2
38	10	20,5	6	3,4	2,0	7	1	0	4,8	10,5
39	1	22,3	15	1,5	1,8	3	1	1	1,5	6,0
39	2	16,0	16	1,0	1,8	4	1	3	8,1	32,8
39	3	28,0	18	1,6	1,5	12	2	3	2,1	48,6
39	4	27,0	22	1,2	1,0	8	1	3	1,1	14,0
39	5	24,0	21	1,1	1,5	5	1	3	1,6	7,9
39	6	10,0	9	1,1	1,5	4	1	1	3,0	19,3
39	7	18,0	16	1,1	2,0	8	3	3	2,5	7,2
39	8	26,0	14	1,9	1,5	9	1	3	3,3	15,7
39	9	6,0	9	0,7	1,2	1	1	0	3,2	29,3
39	10	17,0	13	1,3	1,0	3	1	0	1,8	14,4
40	1	16,0	19	0,8	2,1	9	1	0	6,5	21,1
40	2	25,0	21	1,2	2,8	6	2	3	6,3	2,5
40	3	24,0	18	1,3	3,4	10	3	3	8,9	31,3
40	4	11,3	20	0,6	2,0	5	1	0	6,9	2,4
40	5	6,8	9	0,8	1,0	7	1	0	7,9	11,5
40	6	42,0	21	2,0	2,0	13	3	0	5,0	9,1
40	7	51,5	22	2,3	2,0	16	3	3	4,7	22,5
40	8	13,0	10	1,3	2,0	9	1	3	4,4	37,6
40	9	21,0	15	1,4	2,4	6	2	3	11,7	12,9
40	10	24,0	15	1,6	2,0	10	3	3	4,8	18,7
41	1	24,0	22	1,1	1,7	7	1	0	2,7	25,4
41	2	21,0	17	1,2	1,7	4	1	3	9,6	7,4
41	3	28,0	25	1,1	1,1	22	1	2	3,3	4,0
41	4	25,0	14	1,8	2,0	10	2	3	5,2	5,5
41	5	31,5	25	1,3	2,5	9	1	0	1,4	9,6
41	6	16,0	8	2,0	1,5	6	2	2	1,7	6,4
41	7	5,0	5	1,0	1,5	3	1	1	2,0	8,4
41	8	17,0	14	1,2	2,0	5	1	0	3,0	4,7
41	9	22,0	22	1,0	2,0	4	1	0	3,1	22,6
41	10	24,0	20	1,2	1,2	5	1	1	3,0	4,6
42	1	16,0	11	1,5	1,8	7	1	0	7,9	11,5
42	2	25,0	24	1,0	1,5	10	2	0	3,8	7,1
42	3	17,0	22	0,8	3,4	10	3	3	4,4	7,9
42	4	20,0	17	1,2	2,0	13	3	0	8,6	19,2
42	5	30,0	16	1,9	1,5	11	3	0	5,7	5,6

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
42	6	23,0	17	1,4	3,0	11	2	0	6,8	16,3
42	7	30,0	22	1,4	2,3	14	2	0	3,5	16,7
42	8	22,5	15	1,5	3,0	8	1	1	5,3	11,4
42	9	4,5	5	0,9	1,5	12	2	0	11,5	13,0
42	10	22,5	20	1,1	1,8	9	2	1	3,8	15,6
43	1	21,0	17	1,2	1,9	8	2	0	3,8	10,9
43	2	16,0	19	0,8	2,4	13	3	0	7,0	9,3
43	3	27,0	24	1,1	1,5	10	1	3	3,5	3,6
43	4	14,5	14	1,0	1,0	5	1	0	4,0	17,6
43	5	13,0	19	0,7	3,0	13	3	0	3,5	9,5
43	6	19,0	16	1,2	2,0	11	3	2	6,9	14,9
43	7	15,0	17	0,9	1,9	9	3	0	4,7	38,7
43	8	31,0	26	1,2	1,6	11	1	0	2,8	18,3
43	9	15,0	17	0,9	2,0	13	3	0	3,9	9,0
43	10	18,0	16	1,1	1,9	9	2	0	4,3	18,5
44	1	9,0	24	0,4	2,0	6	1	0	5,4	6,9
44	2	9,5	16	0,6	1,5	7	2	0	5,2	8,6
44	3	9,0	12	0,8	1,1	15	1	2	2,4	5,4
44	4	11,0	17	0,6	2,0	11	2	3	3,6	12,0
44	5	3,0	4	0,8	2,0	6	1	0	2,0	5,8
44	6	11,0	16	0,7	2,0	14	1	3	4,4	13,9
44	7	9,0	9	1,0	2,0	5	2	0	3,7	7,1
44	8	10,0	15	0,7	1,9	4	1	0	6,5	5,7
44	9	11,5	22	0,5	2,7	9	2	0	3,9	5,6
44	10	15,0	12	1,3	1,0	11	2	0	3,8	5,3
45	1	24,0	18	1,3	1,8	9	3	0	7,4	14,0
45	2	16,0	16	1,0	2,0	8	1	0	3,7	35,4
45	3	24,0	16	1,5	1,8	10	3	0	3,8	26,2
45	4	12,0	18	0,7	1,9	6	2	0	3,4	28,2
45	5	11,0	13	0,8	2,2	8	2	0	6,2	12,9
45	6	13,0	16	0,8	2,1	6	1	2	4,4	18,0
45	7	14,0	13	1,1	1,8	5	1	0	3,3	20,3
45	8	9,0	9	1,0	1,5	6	1	0	2,4	5,1
45	9	17,0	12	1,4	1,5	10	2	0	5,5	10,8
45	10	17,0	15	1,1	1,7	5	1	2	5,8	13,7
46	1	23,0	22	1,0	1,9	17	3	1	11,3	16,2
46	2	21,0	11	1,9	1,9	10	1	0	5,2	20,1
46	3	11,0	12	0,9	1,7	13	3	0	6,6	11,8
46	4	105,0	13	8,1	1,7	12	3	3	4,0	22,8
46	5	28,5	29	1,0	3,0	20	2	0	6,6	19,4
46	6	18,0	20	0,9	2,0	10	1	0	5,9	19,1
46	7	8,0	14	0,6	2,6	16	3	0	4,6	10,2
46	8	6,5	9	0,7	1,5	10	3	0	7,6	20,0
46	9	14,5	25	0,6	3,0	9	2	0	4,9	13,7
46	10	14,0	18	0,8	2,0	12	2	0	4,5	22,4

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
47	1	12,5	23	0,5	2,8	11	3	0	4,7	2,9
47	2	33,5	28	1,2	3,0	8	3	2	6,0	6,0
47	3	16,0	14	1,1	2,0	17	1	0	7,0	13,0
47	4	18,0	19	0,9	2,0	7	1	0	3,7	9,5
47	5	22,0	20	1,1	2,0	15	3	0	3,1	24,8
47	6	36,0	24	1,5	3,0	8	1	0	2,3	12,8
47	7	2,0	3	0,7	1,0	18	3	0	7,6	30,6
47	8	19,0	25	0,8	3,1	8	2	0	3,6	2,6
47	9	18,0	24	0,8	2,0	12	3	0	5,0	21,1
47	10	3,5	6	0,6	2,3	9	2	0	9,4	0,2
48	1	19,0	19	1,0	2,9	7	1	0	6,7	39,8
48	2	27,5	15	1,8	2,0	13	3	0	5,4	54,2
48	3	16,0	8	2,0	3,0	12	3	0	4,2	37,8
48	4	30,0	20	1,5	3,0	12	3	0	6,1	36,3
48	5	21,0	16	1,3	2,8	13	2	0	4,2	15,7
48	6	25,0	16	1,6	2,1	5	1	0	5,5	11,1
48	7	13,5	10	1,4	2,0	7	2	1	4,9	27,1
48	8	19,0	8	2,4	2,5	5	1	3	2,1	22,8
48	9	11,5	8	1,4	1,5	12	2	0	8,0	54,8
48	10	25,0	13	1,9	3,0	20	3	1	6,9	54,7
49	1	25,0	16	1,6	2,2	15	3	3	18,3	44,6
49	2	21,5	17	1,3	2,0	7	3	1	10,2	27,9
49	3	32,0	20	1,6	3,0	13	3	0	14,0	79,7
49	4	25,0	24	1,0	3,5	28	3	1	14,6	15,9
49	5	30,0	18	1,7	2,5	21	3	0	6,5	12,2
49	6	12,0	13	0,9	3,0	10	1	2	15,2	21,0
49	7	12,0	13	0,9	2,0	15	3	0	13,6	23,0
49	8	30,0	19	1,6	3,0	25	3	1	7,8	4,8
49	9	32,0	26	1,2	2,0	16	3	3	14,8	10,2
49	10	40,0	21	1,9	3,0	19	3	2	8,0	14,7
50	1	28,0	21	1,3	3,2	19	3	0	7,6	28,2
50	2	24,1	23	1,0	2,5	20	3	1	14,8	24,8
50	3	24,0	14	1,7	2,0	12	3	3	11,3	31,5
50	4	34,5	27	1,3	3,0	21	3	3	14,2	34,4
50	5	10,0	11	0,9	2,6	10	3	1	11,2	19,8
50	6	34,0	21	1,6	2,8	19	3	3	13,4	31,7
50	7	13,0	18	0,7	4,0	27	3	1	4,4	14,9
50	8	47,0	22	2,1	3,0	24	3	3	8,4	12,3
50	9	23,0	20	1,2	3,0	12	3	2	9,3	23,4
50	10	12,0	13	0,9	2,5	14	3	2	16,7	10,4
51	1	13,0	13	1,0	1,5	6	1	1	7,0	10,5
51	2	29,5	17	1,7	1,8	11	2	3	4,2	22,7
51	3	33,7	30	1,1	2,0	15	3	0	4,4	16,1
51	4	16,0	8	2,0	2,0	10	1	0	3,3	33,2
51	5	26,5	20	1,3	1,5	5	3	0	2,9	8,8

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
51	6	16,0	12	1,3	2,0	10	1	0	3,0	13,1
51	7	25,0	25	1,0	3,0	4	1	0	7,7	11,0
51	8	24,0	17	1,4	2,0	10	3	2	8,2	32,5
51	9	14,0	19	0,7	2,0	18	3	0	3,9	12,9
51	10	6,0	7	0,9	2,0	8	1	3	2,9	18,2
53	1	33,0	29	1,1	1,7	7	1	3	8,0	9,1
53	2	42,5	22	1,9	2,5	16	2	3	8,2	18,0
53	3	29,0	19	1,5	1,5	5	1	3	3,8	9,8
53	4	24,0	18	1,3	1,5	12	3	0	4,0	21,8
53	5	21,0	11	1,9	1,5	10	3	3	5,2	43,5
53	6	26,0	24	1,1	1,9	6	1	2	8,8	17,1
53	7	35,5	21	1,7	2,0	7	1	3	2,1	9,4
53	8	27,0	14	1,9	2,5	12	1	3	8,2	24,9
53	9	27,0	29	0,9	1,9	9	2	3	5,9	18,2
53	10	19,0	18	1,1	1,4	5	1	3	10,3	6,0
54	1	25,0	20	1,3	2,4	17	3	0	10,5	35,9
54	2	9,0	12	0,8	1,8	20	3	0	8,8	32,5
54	3	24,5	22	1,1	3,0	16	3	0	6,1	16,4
54	4	18,0	13	1,4	2,5	15	3	1	8,2	62,1
54	5	17,0	16	1,1	2,0	18	3	3	4,8	21,1
54	6	24,0	20	1,2	2,4	15	3	1	12,8	19,4
54	7	14,0	12	1,2	1,9	14	3	0	6,9	23,8
54	8	16,0	14	1,1	2,0	22	3	2	8,3	18,4
54	9	10,5	12	0,9	2,1	13	2	0	8,0	29,7
54	10	21,0	12	1,8	2,5	20	3	0	4,9	13,5
55	1	16,0	15	1,1	1,5	8	3	0	3,0	35,1
55	2	13,0	12	1,1	1,5	12	1	0	2,6	7,8
55	3	29,0	27	1,1	2,0	6	1	1	4,2	5,7
55	4	21,0	23	0,9	2,0	6	1	0	7,5	20,1
55	5	17,0	13	1,3	2,0	7	1	0	2,7	10,3
55	6	5,0	4	1,3	1,5	14	3	0	3,6	13,1
55	7	32,0	28	1,1	2,0	13	1	0	4,4	3,2
55	8	9,0	9	1,0	1,5	5	1	0	5,0	13,2
55	9	19,0	16	1,2	2,0	10	3	0	6,0	8,4
55	10	4,0	17	0,2	2,9	7	1	1	6,5	8,1
56	1	16,0	11	1,5	2,9	5	2	2	7,0	19,5
56	2	24,5	17	1,4	1,7	17	2	3	6,1	10,2
56	3	31,0	19	1,6	1,8	15	2	0	5,4	60,8
56	4	16,5	15	1,1	1,5	11	1	3	4,7	18,8
56	5	11,0	9	1,2	2,0	5	1	3	5,4	16,6
56	6	17,0	11	1,5	1,0	13	1	2	2,2	30,6
56	7	18,0	16	1,1	2,0	14	1	0	4,2	8,6
56	8	31,0	18	1,7	1,5	8	1	1	4,1	39,6
56	9	32,0	17	1,9	1,5	4	1	3	5,3	27,6
56	10	22,0	17	1,3	1,5	6	1	0	4,6	6,9

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
57	1	22,0	23	1,0	1,9	9	1	0	6,7	18,9
57	2	43,0	22	2,0	2,0	4	1	0	2,6	4,1
57	3	32,8	32	1,0	1,3	10	1	0	4,4	22,9
57	4	55,0	25	2,2	2,0	5	1	3	5,5	34,5
57	5	19,0	20	1,0	2,0	3	3	0	5,0	6,1
57	6	12,0	14	0,9	1,2	5	1	0	3,5	23,6
57	7	13,0	16	0,8	1,6	9	1	0	4,8	9,7
57	8	21,5	18	1,2	1,5	8	1	0	3,6	20,3
57	9	13,5	15	0,9	2,0	2	1	0	2,8	28,8
57	10	12,0	22	0,5	2,0	11	2	0	4,5	4,8
58	1	14,0	9	1,6	2,0	5	1	3	5,3	46,8
58	2	19,0	15	1,3	2,4	7	1	2	3,4	21,0
58	3	15,0	16	0,9	2,0	7	2	3	5,7	31,7
58	4	22,0	13	1,7	2,4	10	1	3	5,4	32,8
58	5	29,0	17	1,7	2,0	5	1	3	7,5	13,1
58	6	37,0	19	1,9	2,0	7	1	1	5,0	30,6
58	7	5,0	5	1,0	2,0	9	1	2	4,5	44,3
58	8	24,0	18	1,3	2,6	10	1	2	3,5	12,7
58	9	18,0	12	1,5	2,0	3	1	3	4,3	10,8
58	10	21,0	21	1,0	1,9	8	2	3	8,9	37,5
59	1	28,3	13	2,2	2,0	9	2	2	3,4	69,1
59	2	37,6	20	1,9	2,4	11	3	2	4,6	23,3
59	3	28,5	19	1,5	1,8	10	2	0	4,1	17,0
59	4	35,0	22	1,6	2,0	8	3	0	5,6	24,0
59	5	24,0	14	1,7	2,0	14	3	0	3,0	70,7
59	6	24,0	16	1,5	2,0	11	1	3	4,6	24,0
59	7	26,0	11	2,4	2,0	9	1	3	3,8	13,7
59	8	8,0	5	1,6	1,5	8	1	3	3,8	31,2
59	9	22,0	13	1,7	2,5	11	1	0	4,0	30,9
59	10	21,0	14	1,5	1,5	7	1	3	4,5	21,2
60	1	7,0	11	0,6	1,6	11	3	1	2,6	15,4
60	2	21,0	16	1,3	1,8	8	1	0	3,5	8,1
60	3	12,0	14	0,9	1,6	11	1	0	3,9	14,6
60	4	24,5	28	0,9	1,5	6	2	0	2,5	15,1
60	5	28,5	15	1,9	1,0	4	1	0	2,4	28,8
60	6	9,0	12	0,8	1,5	6	2	0	4,9	11,7
60	7	10,0	13	0,8	1,6	8	1	0	2,9	25,2
60	8	21,0	13	1,6	2,4	16	3	0	3,2	9,3
60	9	20,0	23	0,9	1,9	8	2	0	3,6	9,3
60	10	19,0	18	1,1	1,5	8	1	0	2,8	5,9
61	1	10,0	9	1,1	2,0	7	2	1	4,3	7,1
61	2	24,0	34	0,7	2,5	10	3	0	3,5	13,4
61	3	10,0	18	0,6	2,0	3	1	1	5,4	21,2
61	4	23,0	12	1,9	1,9	5	2	1	2,4	15,6
61	5	37,0	26	1,4	2,0	12	1	0	1,6	14,7

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
61	6	14,5	15	1,0	2,0	12	3	0	3,7	21,3
61	7	25,0	19	1,3	2,0	3	1	0	5,1	19,9
61	8	18,0	17	1,1	1,6	7	1	0	8,1	19,3
61	9	20,2	21	1,0	2,0	4	1	3	4,2	6,4
61	10	30,0	29	1,0	3,0	19	2	3	4,2	15,6
62	1	15,0	13	1,2	2,4	15	3	0	12,4	38,5
62	2	23,0	18	1,3	2,7	14	3	0	10,5	41,8
62	3	23,0	19	1,2	2,9	15	3	0	11,6	11,5
62	4	16,0	15	1,1	2,4	21	3	0	5,1	26,7
62	5	27,0	19	1,4	3,0	13	3	0	9,8	35,2
62	6	14,0	11	1,3	4,0	14	3	0	9,6	34,0
62	7	13,0	9	1,4	1,5	12	2	0	8,3	17,0
62	8	18,0	10	1,8	3,0	11	3	0	4,6	26,6
62	9	24,0	18	1,3	2,0	12	2	0	4,6	76,0
62	10	23,0	23	1,0	2,2	9	2	0	5,0	13,4
63	1	19,0	13	1,5	2,0	13	3	0	3,8	8,0
63	2	32,0	20	1,6	3,0	20	3	0	4,1	25,1
63	3	15,0	7	2,1	2,2	19	3	0	6,3	9,1
63	4	13,0	11	1,2	2,0	15	3	0	7,6	28,7
63	5	24,0	20	1,2	1,0	9	2	0	5,5	15,5
63	6	24,0	20	1,2	1,0	8	3	0	5,2	6,1
63	7	10,0	8	1,3	1,5	9	1	0	7,3	23,9
63	8	14,0	10	1,4	2,0	11	2	0	4,7	19,3
63	9	16,5	10	1,7	2,0	15	3	0	6,2	31,1
63	10	20,0	18	1,1	2,4	16	2	0	11,0	5,4
64	1	31,0	25	1,2	3,1	21	3	0	11,7	49,4
64	2	31,0	18	1,7	2,9	15	3	0	8,7	14,0
64	3	18,3	19	1,0	2,0	13	3	0	8,2	36,6
64	4	24,0	17	1,4	2,0	2	3	3	8,5	34,6
64	5	19,0	16	1,2	3,0	17	3	3	8,4	20,7
64	6	12,0	22	0,5	1,5	6	1	0	10,8	21,5
64	7	20,0	15	1,3	1,5	12	3	0	3,2	9,1
64	8	33,0	20	1,7	2,5	13	3	0	6,3	14,1
64	9	17,0	17	1,0	1,5	6	3	0	5,3	6,8
64	10	13,0	18	0,7	2,0	12	3	0	4,0	22,0
65	1	19,0	13	1,5	2,0	17	3	0	6,5	12,9
65	2	22,0	22	1,0	4,0	7	3	0	5,9	28,9
65	3	11,0	10	1,1	2,5	12	2	0	4,6	18,0
65	4	7,5	8	0,9	1,5	14	3	0	8,4	9,5
65	5	25,0	20	1,3	2,5	12	3	0	6,1	11,1
65	6	8,0	4	2,0	2,0	6	2	0	6,1	6,4
65	7	19,0	15	1,3	2,5	11	3	0	4,6	22,4
65	8	18,5	22	0,8	2,5	3	1	0	6,8	16,5
65	9	23,5	28	0,8	2,7	12	3	0	5,3	20,0
65	10	21,0	20	1,1	2,3	11	2	0	4,5	31,0

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
66	1	28,5	23	1,2	1,8	11	3	0	5,7	15,4
66	2	21,0	23	0,9	1,8	14	2	0	7,5	8,0
66	3	25,0	28	0,9	2,0	15	2	0	10,5	24,9
66	4	11,0	12	0,9	1,0	8	3	0	8,4	31,6
66	5	22,0	22	1,0	1,5	14	3	2	5,2	24,9
66	6	28,0	23	1,2	2,5	11	3	0	3,2	5,0
66	7	32,0	28	1,1	3,0	11	2	0	8,8	19,9
66	8	14,0	12	1,2	2,0	11	3	0	4,4	15,9
66	9	11,5	11	1,0	2,0	17	3	0	8,2	20,0
66	10	4,5	3	1,5	1,0	11	2	0	8,8	22,6
67	1	16,0	10	1,6	1,8	18	3	3	10,1	24,9
67	2	15,3	9	1,7	1,5	6	1	3	6,5	23,6
67	3	35,5	19	1,9	2,0	14	2	3	9,4	46,8
67	4	29,5	11	2,7	2,5	14	2	2	11,4	26,9
67	5	30,0	13	2,3	2,0	12	3	3	6,4	28,5
67	6	32,5	13	2,5	3,0	13	3	2	6,9	83,7
67	7	50,5	15	3,4	2,5	16	3	3	4,7	50,8
67	8	22,0	10	2,2	1,8	10	1	2	14,7	10,0
67	9	22,0	13	1,7	2,8	4	2	2	7,5	42,4
67	10	30,0	16	1,9	2,0	7	1	2	4,8	23,1
68	1	23,0	9	2,6	3,1	10	2	3	2,8	42,1
68	2	18,8	13	1,4	2,4	8	1	2	3,5	37,9
68	3	28,5	15	1,9	2,0	12	2	0	5,5	27,3
68	4	41,0	17	2,4	3,0	9	2	0	5,7	60,0
68	5	30,0	19	1,6	2,0	11	1	3	7,5	19,2
68	6	17,0	11	1,5	2,5	5	1	3	6,9	13,9
68	7	23,0	17	1,4	2,2	11	2	2	4,5	37,7
68	8	26,0	22	1,2	1,8	7	1	3	3,8	51,7
68	9	28,0	21	1,3	2,5	6	1	2	2,3	19,9
68	10	13,5	17	0,8	2,1	7	1	1	2,6	29,3
69	1	44,5	17	2,6	2,5	12	2	3	8,0	62,3
69	2	31,0	15	2,1	2,0	16	3	3	9,0	34,3
69	3	8,0	6	1,3	2,0	14	2	3	3,8	15,8
69	4	20,0	12	1,7	2,5	11	1	2	5,4	28,6
69	5	36,0	14	2,6	2,0	9	1	3	9,6	60,2
69	6	31,0	19	1,6	3,0	7	3	0	5,7	15,0
69	7	27,0	10	2,7	2,0	11	1	0	8,7	17,3
69	8	13,0	16	0,8	1,8	3	1	0	8,8	11,6
69	9	31,5	22	1,4	2,3	13	3	1	6,7	45,4
69	10	28,5	20	1,4	2,0	9	2	3	5,1	32,8
70	1	11,0	15	0,7	1,4	11	3	0	4,4	5,1
70	2	22,8	15	1,5	1,1	5	1	0	8,8	4,5
70	3	15,5	10	1,6	1,8	10	3	3	3,7	5,7
70	4	51,0	25	2,0	2,0	9	1	0	4,8	26,5
70	5	45,7	34	1,3	2,5	8	1	0	2,6	26,1

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
70	6	12,0	11	1,1	2,0	14	1	0	2,4	49,3
70	7	33,0	20	1,7	1,5	15	3	2	2,7	22,2
70	8	6,0	14	0,4	2,4	9	3	0	16,2	13,3
70	9	10,0	4	2,5	2,0	18	3	3	2,6	16,8
70	10	17,5	20	0,9	2,0	6	1	0	4,6	90,0
71	1	7,0	13	0,5	2,1	8	1	1	3,4	5,3
71	2	38,0	21	1,8	2,4	12	3	3	4,1	17,9
71	3	25,0	21	1,2	2,8	8	3	3	4,6	28,6
71	4	18,5	29	0,6	2,5	6	3	0	3,1	9,9
71	5	4,8	7	0,7	2,0	11	3	2	1,5	4,7
71	6	14,0	12	1,2	1,5	7	1	0	6,5	5,0
71	7	18,0	13	1,4	2,0	4	1	0	2,6	2,7
71	8	11,0	11	1,0	1,5	9	2	0	2,5	4,1
71	9	24,5	20	1,2	2,0	7	1	0	2,3	4,2
71	10	19,5	16	1,2	1,5	7	1	1	4,0	3,3
72	1	18,0	11	1,6	2,3	10	1	0	4,1	43,0
72	2	18,0	10	1,8	2,0	8	1	2	6,7	16,1
72	3	11,0	8	1,4	1,5	10	1	2	9,1	32,0
72	4	31,0	24	1,3	1,5	9	3	2	4,6	11,5
72	5	3,0	3	1,0	2,0	6	3	2	3,6	15,8
72	6	19,0	14	1,4	1,5	13	1	3	3,8	35,8
72	7	20,0	17	1,2	1,0	8	1	3	2,3	21,6
72	8	10,0	8	1,3	2,0	7	1	1	6,4	11,1
72	9	10,0	9	1,1	1,7	9	2	2	4,8	21,0
72	10	26,0	16	1,6	2,0	12	1	3	3,3	24,5
73	1	16,0	20	0,8	1,9	11	3	0	8,1	29,7
73	2	22,8	24	1,0	2,0	14	3	0	8,0	22,8
73	3	6,0	8	0,8	2,0	10	3	0	9,7	19,6
73	4	8,0	7	1,1	1,5	10	3	0	6,1	7,4
73	5	33,0	30	1,1	2,0	17	3	0	3,2	64,0
73	6	10,0	17	0,6	1,5	6	3	0	4,6	18,9
73	7	18,0	14	1,3	2,0	14	3	0	6,9	45,5
73	8	11,0	20	0,6	2,4	9	2	0	5,4	16,1
73	9	13,0	16	0,8	2,4	17	3	0	3,8	17,9
73	10	16,0	12	1,3	2,0	12	1	0	6,4	32,6
74	1	23,0	9	2,6	3,1	19	3	3	13,2	29,1
74	2	14,0	18	0,8	3,0	18	3	1	21,2	19,6
74	3	18,5	18	1,0	3,0	18	3	3	15,8	47,2
74	4	36,2	25	1,4	2,7	21	3	3	12,2	14,0
74	5	24,5	21	1,2	3,0	24	3	3	7,8	22,5
74	6	20,0	17	1,2	2,0	20	3	2	7,8	34,0
74	7	38,0	26	1,5	4,0	16	3	3	14,2	11,1
74	8	24,0	22	1,1	3,6	14	3	2	16,9	23,5
74	9	12,5	15	0,8	2,0	13	3	0	12,9	46,3
74	10	19,5	24	0,8	3,0	17	2	1	8,4	25,8

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
75	1	34,0	18	1,9	3,0	17	3	3	9,4	40,6
75	2	47,0	14	3,4	3,2	19	3	0	14,8	92,2
75	3	25,0	8	3,1	3,0	4	3	3	10,3	72,4
75	4	31,0	12	2,6	2,5	22	3	3	16,2	64,1
75	5	20,0	9	2,2	2,0	12	3	3	11,9	22,8
75	6	28,0	16	1,8	2,4	11	3	2	7,1	76,9
75	7	33,0	11	3,0	2,6	17	3	3	3,8	49,6
75	8	39,0	17	2,3	3,0	23	3	3	11,8	18,7
75	9	26,0	16	1,6	2,3	16	2	3	9,0	80,4
75	10	33,0	20	1,7	2,5	15	2	3	7,1	45,6
76	1	12,0	13	0,9	3,0	7	1	0	4,7	11,1
76	2	15,5	16	1,0	2,0	16	1	3	17,0	5,2
76	3	30,0	16	1,9	3,0	16	3	3	18,2	3,0
76	4	25,0	27	0,9	1,5	11	1	0	6,0	12,4
76	5	13,0	12	1,1	2,0	7	3	0	4,0	8,8
76	6	16,0	12	1,3	3,0	6	1	0	3,4	1,6
76	7	20,0	19	1,1	2,0	3	2	0	4,0	9,5
76	8	19,5	21	0,9	2,5	11	2	0	4,4	11,3
76	9	19,5	25	0,8	2,0	7	1	0	3,4	18,2
76	10	27,0	20	1,4	2,0	7	1	0	2,2	17,2
77	1	25,0	22	1,1	1,9	18	3	0	4,0	30,8
77	2	10,0	10	1,0	1,9	12	2	0	5,2	10,8
77	3	17,0	17	1,0	1,5	10	1	0	8,8	16,4
77	4	26,8	30	0,9	2,0	16	2	0	4,0	6,6
77	5	34,0	19	1,8	1,0	8	1	0	7,1	12,4
77	6	13,0	9	1,4	1,5	10	2	1	7,1	11,2
77	7	13,0	19	0,7	1,7	9	1	0	4,9	13,6
77	8	17,0	16	1,1	1,9	17	3	0	6,6	4,4
77	9	24,8	14	1,8	1,7	17	3	0	5,5	10,8
77	10	21,5	25	0,9	1,7	10	2	0	3,4	22,8
78	1	25,5	10	2,6	1,9	10	2	3	8,0	100,4
78	2	19,0	15	1,3	1,8	9	2	3	10,7	42,9
78	3	36,0	17	2,1	2,2	10	3	3	4,4	46,6
78	4	28,0	15	1,9	2,7	11	3	3	5,7	14,1
78	5	52,8	26	2,0	4,1	6	2	3	4,2	50,6
78	6	26,5	16	1,7	3,0	10	3	3	9,3	13,0
78	7	12,5	4	3,1	2,5	5	1	3	7,0	57,4
78	8	28,0	14	2,0	2,5	8	1	3	3,1	41,0
78	9	7,5	5	1,5	1,5	13	1	3	7,8	72,3
78	10	28,0	14	2,0	2,1	8	1	3	8,1	39,7
79	1	15,0	14	1,1	2,2	12	3	0	5,1	0,8
79	2	10,0	10	1,0	1,8	6	2	0	2,8	4,0
79	3	15,8	16	1,0	1,8	9	2	0	3,8	2,9
79	4	9,0	11	0,8	1,8	5	1	0	7,4	7,6
79	5	8,0	5	1,6	1,0	9	2	0	5,0	2,8

Apêndice 5. Continuação...Valores obtidos para as nove variáveis avaliadas em dez repetições por acesso.

Acessos	Rep.	CES	NN	CEN	DE	ES	HAB	FLOR	AF	MStotal
79	6	9,0	5	1,8	1,0	8	3	0	8,1	2,3
79	7	18,0	16	1,1	2,0	6	3	0	3,7	0,5
79	8	9,0	6	1,5	1,9	12	1	1	3,4	0,5
79	9	13,0	9	1,4	1,6	6	2	0	18,9	2,7
79	10	3,0	4	0,8	1,0	4	1	0	4,3	0,5
80	1	9,5	6	1,6	3,8	20	3	0	12,0	2,2
80	2	21,0	16	1,3	3,0	13	3	0	12,4	3,9
80	3	14,5	7	2,1	2,5	17	3	0	12,8	3,5
80	4	7,0	7	1,0	2,0	15	3	0	7,5	1,4
80	5	4,0	5	0,8	2,2	25	3	3	9,6	3,6
80	6	8,0	9	0,9	2,5	23	3	2	14,5	6,5
80	7	7,0	5	1,4	2,5	13	3	3	11,9	1,0
80	8	6,5	7	0,9	2,2	16	3	0	35,4	1,0
80	9	10,0	7	1,4	2,2	12	3	2	7,7	3,7
80	10	20,0	17	1,2	3,8	17	3	0	6,6	1,8

Apêndice 7. Estatísticas descritivas geradas pelo programa Genes, a partir das médias dos acessos, para as nove variáveis analisadas: comprimento de estolão (CES), número de nós por estolão (NN), comprimento de entrenós (CEN), diâmetro de estolão (DE), estatura (EST), hábito de crescimento (HAB), intensidade de florescimento (FLOR), área foliar (AF) e produção total de matéria seca (MS total).

VARIÁVEL	VARIÂNCIA	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO
CES	1,0	4,490451	7,016414	2,039013
NN	1,0	7,979757	10,466504	3,978722
CEN	0,999996	3,998391	7,048011	2,318425
DE	1,000003	5,321768	9,383765	3,57361
EST	1,0	3,389974	5,970206	1,487793
HAB	1,000002	6,213927	6,549815	3,274908
FLOR	1,0	1,025982	2,963947	0,0
AF	1,0	2,525085	5,331035	0,749424
MS total	1,0	1,889398	6,229609	0,218755
TOTAL	9,000001			

Apêndice 8. Coeficientes de correlação simples e níveis de significância entre as nove variáveis analisadas: X1=comprimento de estolão (CES), X2=número de nós por estolão (NN), X3=comprimento de entrenós (CEN), X4=diâmetro de estolão (DE), X5=estatura (EST), X6=hábito de crescimento (HAB), X7=intensidade de florescimento (IF), X8=área foliar (AF) e X9=produção total de matéria seca (MS total), calculados através do SANEST para 780 observações (78 acessos com dez repetições).

X 1 e X 2 = 0.5325577 VALOR t = 17.5503 PROB.>t = 0.000001	X 1 e X 3 = 0.6507011 VALOR t = 23.9022 PROB.>t = 0.000001	X 1 e X 4 = 0.1868729 VALOR t = 5.3058 PROB.>t = 0.000011	X 1 e X 5 = 0.2328349 VALOR t = 6.6779 PROB.>t = 0.000001
X 1 e X 6 = 0.1249532 VALOR t = 3.5128 PROB.>t = 0.000794	X 1 e X 7 = 0.2743495 VALOR t = 7.9577 PROB.>t = 0.000001	X 1 e X 8 = 0.0668087 VALOR t = 1.8676 PROB.>t = 0.058779	X 1 e X 9 = 0.2717771 VALOR t = 7.8771 PROB.>t = 0.000001
X 2 e X 3 = -0.2321028 VALOR t = 6.6557 PROB.>t = 0.000001	X 2 e X 4 = 0.1202781 VALOR t = 3.3794 PROB.>t = 0.001134	X 2 e X 5 = 0.1172926 VALOR t = 3.2943 PROB.>t = 0.001426	X 2 e X 6 = 0.0456726 VALOR t = 1.2753 PROB.>t = 0.199648
X 2 e X 7 = -0.0609253 VALOR t = 1.7025 PROB.>t = 0.085071	X 2 e X 8 = 0.0029216 VALOR t = 0.0815 PROB.>t = 0.932833	X 2 e X 9 = -0.0448454 VALOR t = 1.2521 PROB.>t = 0.208170	X 3 e X 4 = 0.1102338 VALOR t = 3.0936 PROB.>t = 0.002454
X 3 e X 5 = 0.1490706 VALOR t = 4.2050 PROB.>t = 0.000134	X 3 e X 6 = 0.0948166 VALOR t = 2.6567 PROB.>t = 0.008005	X 3 e X 7 = 0.3733000 VALOR t = 11.2237 PROB.>t = 0.000001	X 3 e X 8 = 0.0651558 VALOR t = 1.8212 PROB.>t = 0.065353
X 3 e X 9 = 0.3456207 VALOR t = 10.2734 PROB.>t = 0.000001	X 4 e X 5 = 0.2423326 VALOR t = 6.9670 PROB.>t = 0.000001	X 4 e X 6 = 0.2423711 VALOR t = 6.9681 PROB.>t = 0.000001	X 4 e X 7 = 0.0871402 VALOR t = 2.4399 PROB.>t = 0.014228
X 4 e X 8 = 0.2443313 VALOR t = 7.0281 PROB.>t = 0.000001	X 4 e X 9 = 0.1056218 VALOR t = 2.9626 PROB.>t = 0.003502	X 5 e X 6 = 0.6040218 VALOR t = 21.1398 PROB.>t = 0.000001	X 5 e X 7 = 0.0469815 VALOR t = 1.3119 PROB.>t = 0.186695
X 5 e X 8 = 0.3991201 VALOR t = 12.1415 PROB.>t = 0.000001	X 5 e X 9 = 0.1881163 VALOR t = 5.3424 PROB.>t = 0.000010	X 6 e X 7 = 0.0118595 VALOR t = 0.3308 PROB.>t = 0.740257	X 6 e X 8 = 0.3292867 VALOR t = 9.7272 PROB.>t = 0.000001
X 6 e X 9 = 0.1433872 VALOR t = 4.0412 PROB.>t = 0.000201	X 7 e X 8 = 0.0616416 VALOR t = 1.7226 PROB.>t = 0.081421	X 7 e X 9 = 0.2503160 VALOR t = 7.2116 PROB.>t = 0.000001	X 8 e X 9 = 0.1529691 VALOR t = 4.3175 PROB.>t = 0.000101

VITA

Fernanda Bortolini, filha de Rogério Bortolini e Nilva Maria Grazziotin Bortolini, nasceu em 26 de setembro de 1979 na cidade de Passo Fundo - RS, onde realizou o ensino fundamental, médio e superior. Formou-se em Ciências Biológicas no dia 14 de dezembro de 2001 pela Universidade de Passo Fundo.

No ano de 1999 realizou estágio extracurricular na área de Botânica de Plantas Forrageiras na UPF e no subprojeto “Avaliação de genótipos de cereais de inverno quanto à resistência à giberela (*Gibberella zeae*)” na Embrapa Trigo.

Em 2000, atuou como bolsista de iniciação científica do PIBIC/UPF no projeto “Determinação da Qualidade de Forragem por Espectrometria de Reflectância do Infravermelho Proximal – NIRS” e, neste mesmo ano, realizou estágio extracurricular no Mini-Zoológico da UPF.

No ano de 2001, realizou estágio curricular na Embrapa Trigo, no subprojeto “Haplodiploidização em cereais de inverno através da cultura *in vitro* de embriões imaturos e anteras”, e também, estágios de docência no ensino médio e fundamental.

Em 2002, ingressou como aluna do Curso de Mestrado em Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.