

CRISTIANE ZORZATTO

**PROSPECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD E SSR  
LIGADOS À APOMIXIA EM *Brachiaria humidicola***

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
DEZEMBRO – 2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CRISTIANE ZORZATTO

**PROSPECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD E SSR  
LIGADOS À APOMIXIA EM *Brachiaria humidicola***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para a obtenção do título de Mestre.

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
DEZEMBRO – 2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Z88p Zorzatto, Cristiane, 1983-  
Prospecção de marcadores moleculares RAPD e SSR ligados à apomixia em *Brachiaria humidicola* / Cristiane Zorzatto. -- Maringá, 2010.  
58 f. : il., figs.

Orientador : Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Suely Pagliarini.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, 2010.

1. *Brachiaria humidicola* - Variedade melhorada. 2. Melhoramento genético - *Brachiaria humidicola*. 3. *Brachiaria humidicola* - Reprodução. 4. Apomixia - *Brachiaria humidicola*. 5. Marcador RAPD. 6. Gramínea forrageira. I. Pagliarini, Maria Suely, orient. II. Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 21.ed. 633.27

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve. A vida é muito para ser insignificante”.

Charles Chaplin.

Aos meus amores Roberto, Ângela, Jessica, João Carlos e Renato, meus maiores amigos e incentivadores.

**Com muito amor, dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, aos que recorro nas horas difíceis, pela proteção e coragem para seguir a vida. Aprendi que só a força e a fé nos mantêm firmes em nossos objetivos.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade da realização do Curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

À minha orientadora, professora doutora Maria Suely Pagliarini, pelo voto de confiança em meu trabalho e ensinamentos transmitidos.

À minha co-orientadora, pesquisadora doutora Lucimara Chiari, profissional de extrema competência com quem tive a honra de trabalhar, tanto na graduação quando no mestrado, aprendendo a fazer pesquisa com responsabilidade.

À pesquisadora doutora Cacilda Borges do Valle, responsável pelo programa de melhoramento de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Corte, por toda atenção e disponibilidade.

À Embrapa Gado de Corte pelas possibilidades oferecidas durante a execução deste trabalho.

À UNIPASTO e à FUNDECT pelos recursos financeiros destinados ao desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu grande pai, José Roberto Zorzatto, meu maior incentivador, decisivo em todas as minhas escolhas, amigo e, sem dúvida, a pessoa que mais acredita em meu potencial.

À minha mãe, Ângela Cacho Zorzatto, minha maior riqueza, minha professora, amiga, companheira e a quem tenho verdadeiro e único amor. Eu nada seria sem seus ensinamentos e as suas orações.

Aos meus lindos irmãos, Jessica e João Carlos Zorzatto, simplesmente por existirem. Vocês são minha inspiração e o que tenho de mais precioso.

Ao meu amor, Renato Dante de Souza Santos, que torna minha vida alegre, que me faz sonhar e acreditar em um futuro feliz ao seu lado. Obrigada pela paciência e cuja presença, deu-me forças e serenidade para realização deste trabalho.

À Gisele Ovilas de Campos Leguizamon, pela maravilhosa convivência no laboratório, meu braço direito para a execução de toda a experimentação desenvolvida neste estudo.

À Andréia Ribeiro Teles Galvão, amiga de estágio que, muita atenciosa, ofereceu-me transporte um ano inteiro e quem me ensinou a frase: “A mulher inteligente edifica seu lar e a tola o destrói com suas próprias mãos”.

À Kellen Boldrini, amiga que me acolheu quando cheguei à cidade de Maringá e tornou a ausência de minha família menos dolorosa.

Aos meus amigos, Celina, Juliana Friedrich, Isaac, Anelise, Lorena, Lara, Simone, Elisangela e Fabiana pelos momentos de alegria. Levarei-os sempre em meu coração.

Enfim, a toda minha família e a todos os amigos que torcem pelas minhas vitórias.

## **BIOGRAFIA**

CRISTIANE ZORZATTO, filha de José Roberto Zorzatto e Ângela Cacho Zorzatto, nascida em Campinas, estado de São Paulo, no dia onze de julho de 1983.

Concluiu o Ensino Fundamental no MACE Pedro Chaves dos Santos, na cidade de Campo Grande - MS, no ano de 1997. Em 2000, na mesma Instituição de Ensino, concluiu o Ensino Médio.

Ingressou, em 2002, no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus de Campo Grande, graduando-se em Bacharelado e Licenciatura Plena, no ano de 2006. Trabalhou com isoterápicos e também se interessava pela área de Biologia Molecular. Realizou estágio nesta área na Embrapa Gado de Corte - Laboratório de Biotecnologia Vegetal, sob a orientação da pesquisadora doutora Lucimara Chiari.

Em 2007, matriculou-se no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Mestrado, na Universidade Estadual de Maringá. Buscando dar continuidade ao aprendizado em Biologia Molecular, desenvolveu pesquisas com marcadores ligados à apomixia.

## ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Plantas forrageiras: aspectos gerais e evolutivos.....	4
2.2. O gênero <i>Brachiaria</i> .....	5
2.2.1. Histórico e origem das espécies.....	5
2.2.2. Germoplasma.....	6
2.2.3. Melhoramento genético.....	8
2.2.4. <i>Brachiaria humidicola</i> .....	11
2.3. Citogenética de <i>Brachiaria</i> : aspectos gerais.....	12
2.4. Modo de reprodução de <i>Brachiaria</i> .....	13
2.4.1. Herança da apomixia.....	15
2.4.2. Metodologias de determinação de modo de reprodução em <i>Brachiaria</i> .....	18
2.5. Marcadores moleculares: aspectos gerais.....	20
2.5.1. Polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD).....	23
2.5.2. Microssatélites ou seqüências simples repetidas (SSR).....	24
2.5.3. Marcadores moleculares ligados à apomixia.....	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. Material vegetal.....	27
3.2. Extração de DNA.....	28
3.3. Quantificação de DNA.....	29
3.4. Reação de RAPD e eletroforese dos produtos amplificados.....	29
3.5. Marcadores microssatélites e condições de amplificação.....	33
3.6. Análise de bulks segregantes.....	35
3.7. Análise de ligação.....	36
3.8. Eficiência de seleção.....	36
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
4.1. Marcadores RAPD.....	37
4.2. Marcadores microssatélites.....	44
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>

## RESUMO

ZORZATTO, Cristiane. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, dezembro de 2008. **Prospecção de marcadores moleculares RAPD e SSR ligados à apomixia em *Brachiaria humidicola***. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Suely Pagliarini. Conselheira: Dr<sup>a</sup> Lucimara Chiari.

A apomixia tem um incontestável potencial no melhoramento de plantas, uma vez que permite fixar o vigor híbrido por meio de sementes produzidas sem fertilização do embrião. Este modo de reprodução assexual (aposporia) ocorre naturalmente em *Brachiaria humidicola*, uma importante gramínea forrageira tropical. O objetivo deste trabalho foi a identificação de marcadores moleculares ligados ao locus que controla a aposporia em uma população F1 intraespecífica. Essa população originou-se do cruzamento entre a cultivar apomítica BRS Tupi e o genitor sexual, denominado H31. A busca de um marcador molecular ligado à apomixia foi feita usando polimorfismos do DNA amplificado ao acaso (RAPD) e seqüências simples repetidas (SSR) ou microssatélites, junto à técnica de análise de bulks segregantes (BSA). Não foi encontrada nenhuma marca SSR ligada a aposporia, porém foi identificada uma marca RAPD denominada 64\_650 relacionada a apo-região. Dados de segregação foram usados para gerar um mapa de ligação e essa marca RAPD foi localizada a 4,61 cM a partir do locus da apomixia. Este marcador poderá ser utilizado como uma ferramenta eficiente para o screening rápido e precoce de progênes geradas a partir do mesmo cruzamento, a fim de determinar o seu modo de reprodução visando ao desenvolvimento de cultivares de gramíneas comercialmente muito importantes.

Palavras-chave: modo de reprodução, marcadores moleculares, mapa de ligação.

## ABSTRACT

ZORZATTO, Cristiane. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, December, 2008. **Exploration of RAPD and SSR molecular markers linked to apomixis in *Brachiaria humidicola***. Advisor Teacher: Dr<sup>a</sup> Maria Suely Pagliarini. Committee Member: Dr<sup>a</sup> Lucimara Chiari.

Apomixis has an undeniable potential in plant breeding, since it fixes hybrid vigor through seeds produced without fertilization of the embryo. This asexual mode of reproduction (apospory) occurs naturally in *Brachiaria humidicola*, an important tropical forage grass. The objectives of this work were to identify molecular markers tightly linked to the gene(s) controlling apospory in an F<sub>1</sub> intra-specific population. The original cross was between an apomictic cultivar and a sexual parent. The search for a molecular marker linked to apomixis was done using a combination of random amplified polymorphic DNA (RAPD), simple sequence repeats (SSR) and bulked segregant analysis (BSA) techniques. It was not possible to find a SSR markers for apospory, but an RAPD marker related to the apo-region was identified. Segregation data were used to generate a map of this region. This RAPD marker, with 650 bp, was located at 4.61 cM from the apomixis locus. This marker provides an efficient tool for rapid and reliable screening of the progenies to determine their mode of reproduction. This tool is invaluable to increase efficiency and accuracy in the breeding program aiming at the development of cultivars of this commercially very important grass.

Key words: molecular markers, mode of reproduction, linkage map.

## 1. INTRODUÇÃO

Na pecuária bovina brasileira, a produção de carne e leite se faz quase que exclusivamente a pasto, resultando no que é denominado “boi verde”. Tal fato representa o diferencial no mercado externo, aquecendo as exportações de carne e leite brasileiros e tornando as pastagens elemento crucial para a competitividade no mercado internacional.

O Brasil explora atualmente cerca de 100 milhões de hectares com pastagens cultivadas, que alimentam um rebanho de aproximadamente 188 milhões de bovinos (Torres Jr. et al., 2004). Estima-se que 85% das áreas de pastagens cultivadas sejam ocupadas por gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* (Macedo, 2006).

Esse gênero é caracterizado por uma maioria de espécies poliplóides e apomíticas. A apomixia é uma forma de reprodução assexuada, presente em mais de 35 famílias de plantas, que gera sementes geneticamente idênticas (clones) às plantas-mãe (Gauer e Cavalli-Molina, 2000).

Muitos esforços têm sido dedicados à elucidação das bases citológicas e genéticas da apomixia nos últimos 20 anos e, graças a isso, já se considera a possibilidade de manipular e controlar a apomixia como ferramenta no melhoramento genético de plantas. A apomixia, associada à sexualidade num programa de melhoramento genético, permite combinar características desejáveis de progenitores por meio de cruzamentos e fixá-las permanentemente pela seleção de híbridos altamente apomíticos (Valle, 2008).

O Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte da EMBRAPA (Embrapa Gado de Corte) possui um programa de melhoramento genético de *Brachiaria*, que teve início na década de 1980. Esse programa visa obter híbridos persistentes e agronomicamente superiores, que reúnam características desejáveis, tais como, adaptação a solos ácidos, alta produtividade, bom valor nutritivo e, principalmente, resistência às cigarrinhas-das-pastagens, principal praga dessas pastagens. Para tanto, cruzamentos intra e interespecíficos vêm sendo realizados, entre plantas

sexuais e apomíticas, e o modo de reprodução nas progênes vem sendo estudado, a fim de identificar os híbridos apomíticos (Valle et al., 2008).

Uma das espécies que compõe o banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte é *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick (Família *Poaceae*, Subfamília *Panicoideae*, Tribo *Paniceae*). Essa espécie originária do leste e sudeste da África é uma das poucas forrageiras adaptadas a áreas mal-drenadas ou temporariamente alagadas (Keller-Grein et al., 1996).

Estudos sobre o modo de reprodução no germoplasma dessa espécie identificaram um único acesso sexual obrigatório, denominado H31 (Valle e Glinke, 1991), que abriu a oportunidade de realização de cruzamentos intraespecíficos entre ele e acessos apomíticos.

Dentre os desafios do melhoramento de forrageiras tropicais encontram-se as dificuldades em compreender o mecanismo da reprodução por apomixia e a identificação precoce do modo de reprodução em progênes híbridas. Tradicionalmente, a determinação do modo de reprodução dessas plantas é realizada pelo estudo citoembriológico de ovários clarificados, que é um método demorado e trabalhoso. Além disso, muitas vezes os ovários não apresentam suas estruturas bem definidas, dificultando a sua caracterização. Essa análise só pode ser realizada após o florescimento das plantas para a coleta de flores e extração dos ovários.

O uso de marcadores moleculares juntamente com a técnica de análise de bulks segregantes, do inglês Bulk Segregant Analysis (BSA), é uma ferramenta importante para identificar um potencial marcador quando a característica tem caráter monogênico e dominante. Esse parece ser o caso da apomixia em algumas gramíneas (Savidan, 1982; Valle et al., 1994; Sherwood et al., 1994) e mais recentemente no estudo realizado com progênie intraespecífica de *B. humidicola* (Bitencourt et al., 2007), que apresentou segregação 1:1, da apomixia sobre a sexualidade. Um marcador ligado à apomixia em *B. humidicola* seria de extrema relevância para seleção precoce de plantas apomíticas, o que resultaria na redução no tempo, na mão-de-obra e nos custos para obtenção de novas cultivares forrageiras.

A técnica de análise de bulks segregantes proposta por Michelmore et al. (1991) é um método rápido para identificar marcadores ligados a qualquer gene específico ou região do genoma. O método envolve a comparação de dois *pools* de amostras de DNA dos indivíduos de uma população segregante originária de um único cruzamento. Dentro de cada *pool* ou bulk, os indivíduos são identificados para características ou gene de interesse, mas são arbitrários para todos os outros genes. Marcadores que são polimórficos entre os bulks podem estar geneticamente ligados ao loco que determina a característica usada para construir os bulks (Ferreira e Grattapaglia, 1998) .

Neste trabalho, dois tipos de marcadores moleculares foram utilizados na busca de marcas ligadas à apomixia, RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA* ou Polimorfismos do DNA Amplificado ao Acaso) e SSR (*Simple Sequence Repeats* ou Seqüências Simples Repetidas), também denominados de microssatélites. A opção por utilizar esses marcadores deve-se às seguintes vantagens: 1) são marcadores de baixo custo e fácil execução e utilização, com poucas etapas que consistem de preparo da reação e visualização dos resultados em gel. No caso dos marcadores SSR, essa sentença é verdadeira, uma vez que eles foram determinados para a espécie em questão; 2) podem ser facilmente aplicados a um grande número de plantas; 3) utilizam pequenas quantidades de DNA e 4) os SSR são mais estáveis e reproduzíveis que marcadores RAPD (Chiari e Cançado, 2008). Para *B. humidicola*, existe uma biblioteca enriquecida de microssatélites construída, em que 23 pares de primers foram desenhados e testados nos acessos do germoplasma dessa espécie (Vigna et al., 2007), dispensando as etapas iniciais de obtenção desses marcadores.

Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar marcadores moleculares RAPD e SSR estreitamente ligados à apomixia em uma progênie segregante de *Brachiaria humidicola*, de modo a auxiliar na seleção precoce de híbridos apomíticos, agilizando o processo de obtenção de novas cultivares e também na seleção de híbridos sexuais que podem ser futuros genitores para novos cruzamentos no programa de melhoramento genético dessa espécie.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Plantas forrageiras: aspectos gerais e evolutivos

Plantas forrageiras podem ser definidas como plantas que, inteiras ou em parte, servem de alimento aos animais domésticos e silvestres. Assim, forragens constituem-se nas partes comestíveis dessas plantas utilizadas como alimento pelos animais em pastejo ou, ainda, nas partes colhidas para arromamento em estágio fresco ou conservado. As principais espécies que apresentam potencial forrageiro são encontradas dentro de duas famílias: Gramineae e Leguminosae (Pereira et al., 2001).

A evolução conjunta entre plantas, gramíneas ou leguminosas, e os animais herbívoros proporcionou o que hoje conhecemos das forrageiras. Em milhares de anos, a África abrigou numerosa quantidade de ruminantes de grande porte, pertencente à família Bovidae, que se alimentavam, principalmente, das gramíneas nativas. Ao mesmo tempo, a América Tropical, embora apresentasse uma grande riqueza em espécies de gramíneas, apresentava poucas espécies de animais herbívoros, a maioria de pequeno porte. A pressão de seleção sobre as plantas consumidas sob pastejo contribuiu, de forma decisiva, para sua evolução como planta forrageira. Isto explica, em parte, porque a maioria das gramíneas tropicais, utilizadas como forrageiras, apresentam como centro de origem e diversificação o continente africano (Walton, 1983).

Os centros de diversidade das espécies forrageiras constituem sítios em que as plantas vêm evoluindo há mais de 20 milhões de anos. Este processo de coevolução entre animais e plantas foi responsável pela seleção de características forrageiras importantes, como o perfilhamento e a persistência da planta sob ação do pastejo. Essas características, presentes em espécies de *Brachiaria*, *Panicum* e *Pennisetum*, por exemplo, possibilitaram a seleção de genótipos superiores que constituem, atualmente, a maioria das cultivares forrageiras existentes (Pereira et al., 2001).

## 2.2. O gênero *Brachiaria*

### 2.2.1. Histórico e origem das espécies

O gênero *Brachiaria* pertence à tribo *Paniceae* e foi primeiramente descrito como uma subdivisão do gênero *Panicum* (Trinius, 1834) e, posteriormente, elevada à categoria de gênero por Grisebach (1853). Porém, até hoje, há superposição de características com outros gêneros como *Uroclhoa* e *Panicum* (Renvoize et al., 1996) e para alguns autores, a exemplo de Morrone e Zuloaga (1992) e Nelson e Fernandez (1998), algumas espécies de *Brachiaria* são consideradas *Uroclhoa*, tais como *U. decumbens*, *U. humidicola* e *U. ruziziensis*.

Existem cerca de 100 espécies de *Brachiaria* distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios, com concentração no continente africano. A adaptação dessas espécies é ampla e elas vegetam em habitats muito variados, tais como várzeas inundáveis, margens de florestas ralas e até regiões semidesérticas. A ocorrência mais comum, no entanto, é em regiões de savanas. Há espécies reconhecidamente adaptadas a solos de baixa fertilidade e mal-drenados (Bogdan, 1977).

As espécies americanas deste gênero não apresentam características interessantes para pastagens. Entretanto, no continente africano, existe uma grande quantidade de espécies de *Brachiaria* com características forrageiras, resultantes de milhares de anos de coevolução com os ruminantes de grande porte, conforme discutido anteriormente.

Keller-Grein et al. (1996) descreveram a dispersão das espécies mais importantes de *Brachiaria* dentro do continente de origem, a África. *Brachiaria brizantha* é, sem dúvida, a mais cosmopolita, tendo sido extensamente coletada na Etiópia, Quênia, Uganda, Ruanda, Burundi, Tanzânia, Zâmbia, Zimbábue e norte da África do Sul. Aparece ainda nos países do Golfo da Guiné, como Nigéria e Camarões. A segunda espécie em abrangência é a *B. humidicola* encontrada nos mesmos países que *B. brizantha*, porém em locais mais úmidos ou mal-drenados. *Brachiaria decumbens* e *B. ruziziensis* apresentam uma distribuição bem mais restrita, tendo sido coletadas em Uganda, Ruanda e Burundi e, menos

frequentemente, no Zaire. *Brachiaria dictyoneura* está restrita a países do extremo leste, como Tanzânia e Quênia e *B. mutica* e *B. arrecta* são originárias do oeste africano e são forrageiras muito palatáveis e extremamente bem adaptadas a solos encharcados e férteis.

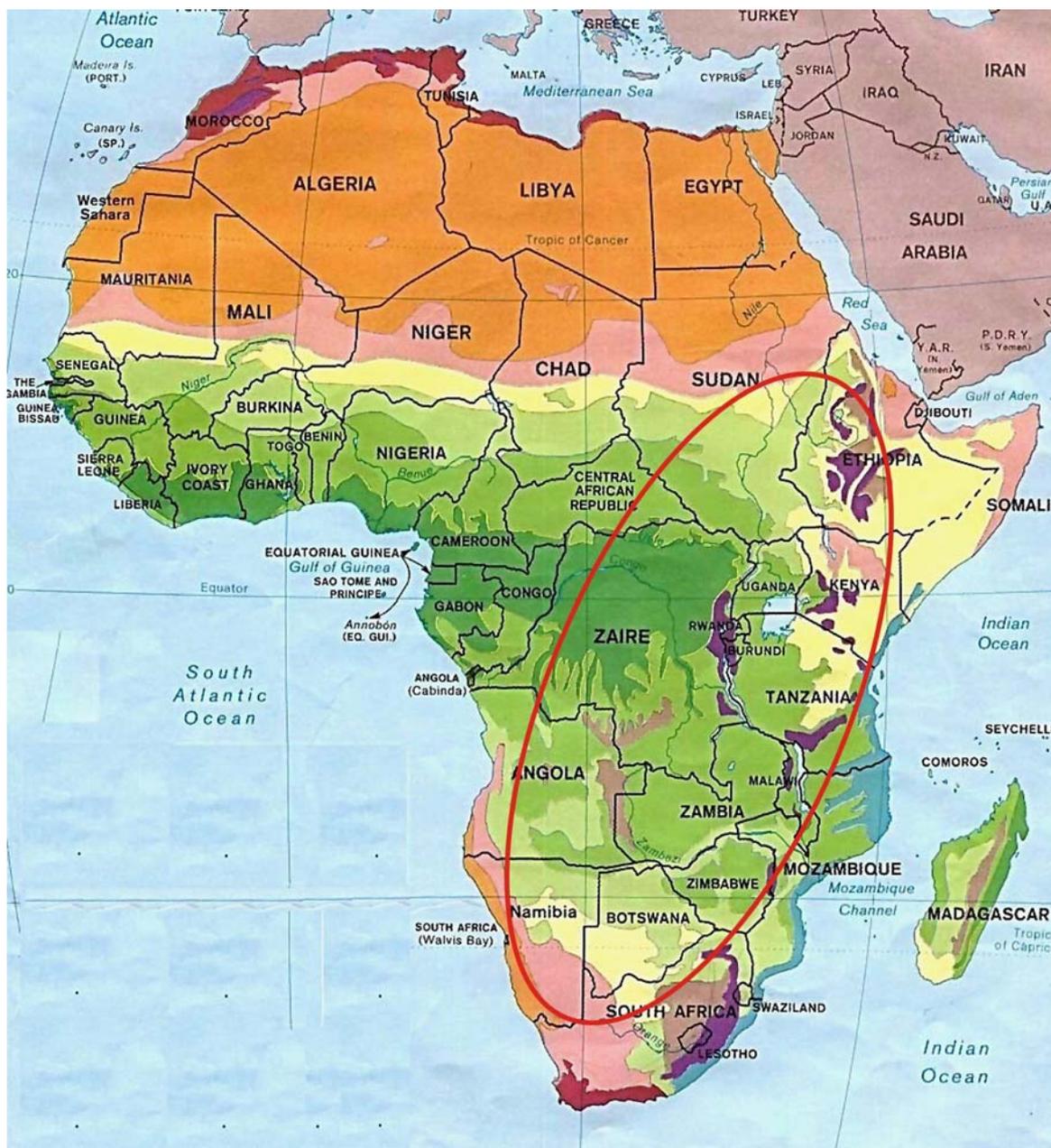
No Brasil, foram encontradas cinco espécies nativas de *Brachiaria*: *B. adspersa*, *B. fasciculata*, *B. mollis*, *B. reptans* e *B. venezuelae*. Outras três espécies são consideradas naturalizadas, por terem sido introduzidas desde o período colonial, como cama para os escravos em navios negreiros: *B. extensa*, *B. mutica* e *B. plantaginea* (Parsons, 1972; Sendulsky, 1978).

No entanto, as espécies forrageiras de *Brachiaria* mais cultivadas no Brasil são originárias da África Tropical. *Brachiaria decumbens* foi introduzida oficialmente em 1952, *B. brizantha*, em 1965, e *B. ruziziensis*, na década de 1960 (Sendulsky, 1978), enquanto outras, como *B. humidicola* e *B. dictyoneura*, foram introduzidas mais recentemente no ano de 1982 (Renvoize et al., 1996).

As espécies de *Brachiaria* economicamente importantes não podem ser consideradas domesticadas, pois essas espécies não dependem do homem para sobrevivência e ainda não sofreram modificação em sua adaptação ecológica e diferenciação morfológica (Pereira et al., 2001). Essas espécies são de utilização recente e, até o momento, existem apenas duas cultivares híbridas disponíveis no mercado, “Mulato” e “Mulato II”, e nenhuma cultivar transgênica.

### **2.2.2. Germoplasma**

As variedades comerciais de *Brachiaria* existentes no Brasil, assim como em outros países da América Tropical, são poucas e, por serem exóticas e reproduzirem-se essencialmente por apomixia, nova variabilidade não é criada. Dessa maneira, em resposta à grande demanda por diversificação das pastagens tropicais e buscando reunir variabilidade genética do gênero *Brachiaria*, entre os anos de 1984 e 1985, o CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), financiado pelo IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources) com colaboração do ILCA (International Livestock Center for Africa) realizou uma ampla coleta de germoplasma no Leste e Sul da África (Figura 1).



Fonte: <[HTTP://www.africa-turismo.com/mapasmapa-politico.htm](http://www.africa-turismo.com/mapasmapa-politico.htm)>.

Figura 1- Mapa da cobertura vegetal da África, com destaque para a região de maior ocorrência das espécies de *Brachiaria* coletadas pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Uma coleção de 687 acessos encontra-se no CIAT (Colômbia) e 520 acessos no ILCA (Etiópia). Parte dessa coleção reunida foi introduzida no Brasil, num acordo com a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), e encontra-se hoje alocada na Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande/MS, onde 455 acessos estão disponíveis para o programa de melhoramento genético do gênero (Valle et al., 2008).

Com exceção das cinco espécies mais importantes, essa valiosa coleção permanece pouco explorada pela falta de conhecimentos básicos e equipes estruturadas para conduzi-los. As espécies passíveis de melhoramento genético, até o momento, são *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*, que formam um complexo agâmico que possibilita a geração de híbridos interespecíficos, e *B. humidicola*, onde podem ser realizados cruzamentos intraespecíficos, mas outras espécies poderão representar novos avanços tão logo seja conhecida a filogenia desse gênero (Valle et al., 2008).

### **2.2.3. Melhoramento genético**

A pecuária bovina brasileira baseia-se, essencialmente, na utilização de pastagens para a produção animal. Graças aos milhões de hectares ocupados por forrageiras cultivadas, destinados à alimentação de um rebanho de aproximadamente 188 milhões de bovinos, o Brasil detém o maior rebanho comercial do mundo, consagrando-se, em 2003, como o maior exportador mundial de carne bovina (Torres Jr et al., 2004; Ferreira e Pereira, 2005).

O gênero *Brachiaria* viabilizou a atividade pecuária nos solos pobres e ácidos, criando novos pólos de desenvolvimento e colonização no Brasil Central. Uma dinâmica e progressista indústria de produção de sementes desenvolveu-se no Centro-Sul brasileiro graças às braquiárias. O Brasil é o maior mercado exportador de sementes de braquiária para a América Latina e este mercado continua em expansão (Santos Filho, 1996). Estima-se que o Brasil possua uma área de mais de 100 milhões de hectares de pastagens cultivadas e que mais de 85% dessa área seja ocupada por gramíneas do gênero *Brachiaria* (Macedo, 2006).

O programa de melhoramento genético de *Brachiaria*, realizado pela Embrapa Gado de Corte, teve início na década de 1980 com a importação do germoplasma vindo da África, como já mencionado. Até recentemente, a seleção de acessos superiores nesse germoplasma tem sido o principal método de melhoramento utilizado para obtenção de cultivares forrageiras no Brasil. O sucesso deste programa pode ser comprovado pelo lançamento das cultivares mais comercializadas hoje no país:

1. Capim-marandu, cultivar de *Brachiaria brizantha*, também conhecido como “braquiarião”, disponível desde 1984. É cultivado em cerca de 70 milhões de hectares no Brasil e estima-se que, em 2006, os benefícios econômicos gerados foram superiores a 3,9 bilhões de reais. É a melhor alternativa de forrageira resistente às cigarrinhas típicas de pastagens, como *Notozulia entreriana*, *Deois flavopicta*, *D. incompleta*, *D. schach* e *Aeneolamia selecta*.

2. Capim-xaraés, cultivar de *Brachiaria brizantha*, disponível desde 2003. É mais tolerante a solos com drenagem deficiente quando comparada a cv. Marandu.

3. Capim-piatã, cultivar de *Brachiaria brizantha*, disponível desde 2006. É uma opção para a diversificação das pastagens, tendo produção de forragem de melhor qualidade que as cv. Marandu e Xaraés, maior acúmulo de folhas e maior tolerância a solos com má drenagem que a cv. Marandu, bem como maior aptidão para o pastejo diferido que a cv. Xaraés.

4. Recentemente, a Embrapa Gado de Corte registrou uma nova cultivar de *Brachiaria humidicola* (cv. BRS Tupi), com lançamento previsto para 2009.

Há alguns anos, cruzamentos interespecíficos vêm sendo realizados a fim de lançar novas cultivares híbridas, passíveis de proteção, envolvendo principalmente *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*, as duas primeiras com uma maioria de acessos apomíticos e tetraplóides naturais e a última caracterizada por sexualidade no nível diplóide. Para que o cruzamento entre acessos com níveis de ploidia pudesse ser realizado com sucesso, acessos de *B. ruziziensis* foram tetraploidizados artificialmente, na Bélgica, por Swenne et al. (1981) e Gobbe et al. (1981) pelo uso de colchicina.

Os acessos tetraploidizados de *B. ruziziensis* formam a população básica para cruzamentos que visam reunir a alta produtividade de *B. brizantha* cv Marandu, com a tolerância aos solos ácidos e vigor da *B. decumbens* cv Basilisk e o alto valor nutritivo, florescimento concentrado e rápida rebrota da *B. ruziziensis* (Figura 2).

Os híbridos apomíticos são avaliados, primeiramente, sob corte em pequenas parcelas para aspectos de produção de forragem e, também, é dado ênfase

na avaliação de ataques de pragas e doenças. Na fase seguinte, os materiais selecionados são avaliados sob corte em parcelas um pouco maiores, normalmente em ensaios regionais (5 a 7 locais), em que a adaptação a diferentes condições ambientais é averiguada. A seguir, os materiais selecionados nessa fase, são avaliados em grandes ensaios de pastejo para mensurar a produção por animal e por área. Por fim, os híbridos selecionados sob pastejo, já nomeados para registro e em fase de pré-lançamento, são validados em fazendas (Araújo et al., 2008).

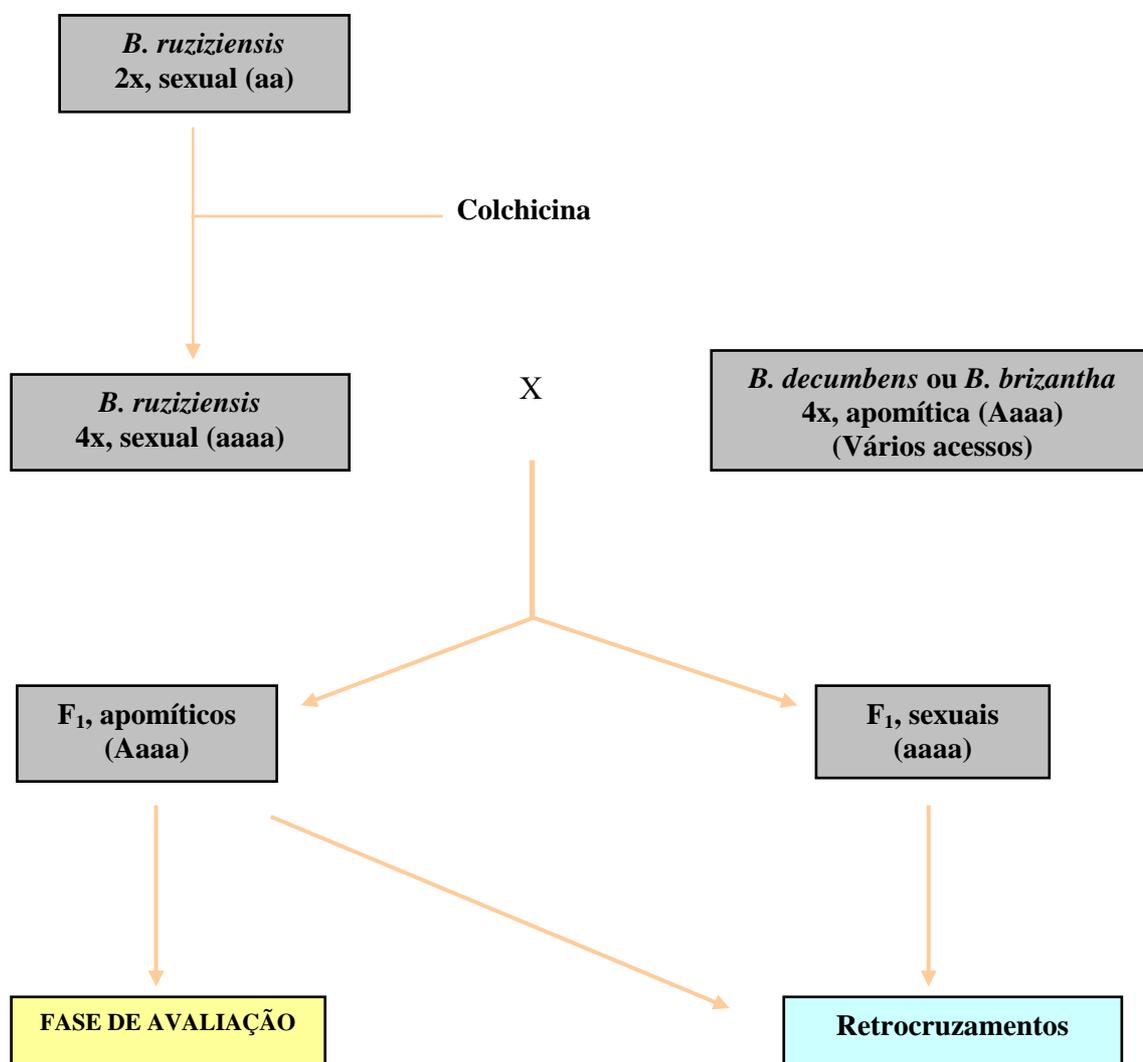


Figura 2 - Esquema simplificado dos cruzamentos realizados no programa de melhoramento genético de *Brachiaria* desenvolvido na Embrapa Gado de Corte.

No caso de *B. humidicola*, a existência de um acesso sexual possibilitou a realização de cruzamentos intraespecíficos que gerou a população estudada neste trabalho, de forma similar ao esquema apresentado na Figura 2.

#### **2.2.4. *Brachiaria humidicola***

A espécie *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick é nativa do leste e sudeste da África Tropical, especialmente de zonas com altas precipitações. É a segunda espécie em abrangência de distribuição no continente africano, perdendo apenas para *B. brizantha*. Foi extensamente coletada na Etiópia, Quênia, Uganda, Ruanda, Burundi, Tanzânia, Zâmbia, Zimbábue e norte da África do Sul em locais mais úmidos ou de drenagem deficiente (Keller-Grein et al., 1996). É utilizada em diversos países e é conhecida também por Quicuío da Amazônia, "Creeping signal grass", "Koronivia grass" e Capim-agulha.

Trata-se de uma gramínea perene, ereta (Smith et al., 1982; Alcântara e Bufarah, 1992) ou decumbente (Salerno et al., 1990), rizomatosa (Alcântara e Bufarah, 1992) ou estolonífera (Pupo 1980, Smith et al., 1982, Salerno et al., 1990). Os colmos são solitários, geniculados na base e a partir da ramificação, ascendentes e delgados. Folhas com bainhas bem mais curtas que os entrenós; lâminas foliares ascendentes, linear-lanceoladas, subagudas, com 6-11 cm de comprimento e 1,0-1,2 cm de largura, com margens espessadas e miudamente serrilhadas (Smith et al., 1982).

Quanto ao solo, é pouco exigente, vegeta bem em locais úmidos ou secos, sendo resistente à geada. Esta espécie é adaptada a solos mal-drenados e, desse modo, seu cultivo é recomendado em áreas de solos úmidos e/ou temporariamente úmidos, sendo promissora para a região amazônica (Pupo, 1980; Alcântara e Bufarah, 1992). Seu valor nutritivo é menor quando comparado a outras espécies de *Brachiaria* e não é resistente às cigarrinhas-das-pastagens (Kelemu et al., 1995).

Incluída no programa de melhoramento de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte, essa espécie conta com 58 acessos conservados no banco ativo de germoplasma (BAG) desse centro de pesquisa, sendo que, desses, 42 já foram caracterizados morfológicamente.

### 2.3. Citogenética de *Brachiaria*: aspectos gerais

O gênero *Brachiaria* é caracterizado por uma maioria de espécies poliplóides (4x, 6x, 8x e até 10x), apresentando três números básicos de cromossomos,  $x = 6$  (Risso-Pascotto et al., 2006),  $x = 7$  e  $x = 9$  (Valle e Savidan, 1996).

Essas variações no nível de ploidia e número básico de cromossomos tornam sua investigação prioritária na escolha de genitores para a realização de cruzamentos intra e interespecífico em *Brachiaria*. Os procedimentos mais comuns para a determinação da ploidia dos materiais são a contagem de cromossomos em células de ponta de raiz (mitose) ou em meiócitos e estudos utilizando citometria de fluxo.

Utilizando citometria de fluxo, Penteadó et al. (2000) avaliaram acessos de algumas espécies do germoplasma de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Corte e detectaram variação intra e interespecífica na quantidade de DNA entre os acessos, evidenciando diferentes níveis de ploidia entre e dentro das espécies de *Brachiaria*.

A maioria das espécies apresenta  $x = 9$  como número básico (Valle e Savidan, 1996; Bernini e Marin-Morales, 2001; Mendes-Bonato et al., 2002, 2006; Utsunomiya et al., 2005). No entanto, recentemente, Risso-Pascotto et al. (2006) descreveram um novo número de cromossomo,  $x = 6$ , encontrado em acessos de *B. dictyoneura* com 24 cromossomos. Este número básico foi também encontrado em acessos de *B. humidicola* (Boldrini, não publicado). Conforme já mencionado, essa diferença no número básico de cromossomos restringe as possibilidades de cruzamentos interespecíficos nos programas de melhoramento.

Sobre o comportamento meiótico em acessos e híbridos de *Brachiaria*, estudos desenvolvidos no Laboratório de Citogenética da Universidade Estadual de Maringá revelaram a ocorrência de inúmeras anormalidades, como: migração precoce dos cromossomos para os pólos nas metáfases e retardatários, levando à formação de micronúcleos que permanecem nas tétrades; fusões nucleares, dando origem a sincícios e falhas na citocinese que podem originar gametas não reduzidos no final da meiose (Mendes-Bonato et al., 2002, 2006; Utsunomiya et al., 2005; Risso-Pascotto et al., 2006; Felismino et al., 2006).

A poliploidia está relacionada, muitas vezes, com anormalidades que comprometem a estabilidade meiótica. Um dos problemas relacionados à poliploidia é a formação de quadrivalentes, trivalentes e univalentes, no lugar de bivalentes durante a meiose. Essas irregularidades na segregação cromossômica observadas na diacinese ocasionam a formação de gametas com números cromossômicos não balanceados (Valle, 2007).

Ressalta-se que, para um melhoramento genético bem sucedido, é de suma importância o máximo conhecimento dos acessos com os quais os cruzamentos serão efetuados, bem como um rígido acompanhamento da citogenética nos híbridos produzidos, visando identificar aqueles potencialmente interessantes e o descarte de híbridos com anormalidades que comprometam a produção de sementes. Do ponto de vista citogenético, características como o número de cromossomos, comportamento meiótico e modo de reprodução são muito importantes e devem ser consideradas no momento de se realizar um cruzamento que resulte em híbridos férteis (Valle, 1990).

#### **2.4. Modo de reprodução de *Brachiaria***

As braquiárias reproduzem-se, na sua maioria, por apomixia, um tipo de reprodução assexuada que se caracteriza por originar embriões sem fertilização, portanto, geneticamente idênticos à planta-mãe (Nogler, 1984; Asker e Jerling, 1992; Richards, 1997).

A apomixia já foi descrita em cerca de 300 espécies (Hanna e Bashaw, 1987), a maioria delas pertencentes às famílias Gramineae (Poaceae), Asteraceae e Rosaceae (Dall'Agnol e Schifino-Wittmann, 2005). Dependendo da origem do embrião, a apomixia pode ser classificada em apomixia esporofítica ou gametofítica (Nogler, 1982).

Na apomixia esporofítica, também chamada de embrionia adventícia, comum em espécies de *Citrus* e *Mangifera*, não há formação de sacos embrionários, mas os embriões diplóides desenvolvem-se diretamente a partir de células somáticas dos envoltórios do óvulo (Asker e Jerling, 1992; Koltunow, 1993).

A apomixia gametofítica é a mais amplamente distribuída, incluindo plantas de interesse econômico, especialmente, gramíneas forrageiras incluindo os gêneros *Brachiaria*, *Cenchrus*, *Panicum*, *Paspalum*, *Poa*, entre outras (Dall’Agnol e Schifino-Wittmann, 2005).

Na apomixia gametofítica há formação de um saco embrionário não reduzido (diplóide), por dois caminhos diferentes: diplosporia ou aposporia (Nogler, 1984; Asker e Jerling, 1992). Na diplosporia, a célula-mãe da megáspora (MMC) que dará origem ao saco embrionário não sofre divisão meiótica ou sofre uma meiose incompleta, levando à formação de um saco embrionário não-reduzido. Na aposporia, a MMC não chega a se desenvolver, ocorrendo a ativação de uma célula nucelar somática, que é chamada de célula inicial apospórica (AI) que dá origem a um saco embrionário não-reduzido contendo somente quatro núcleos (Carneiro e Dusi, 2002) (Figura 3). Todos esses processos culminam na produção de sementes contendo embriões com carga genética idêntica à planta mãe.

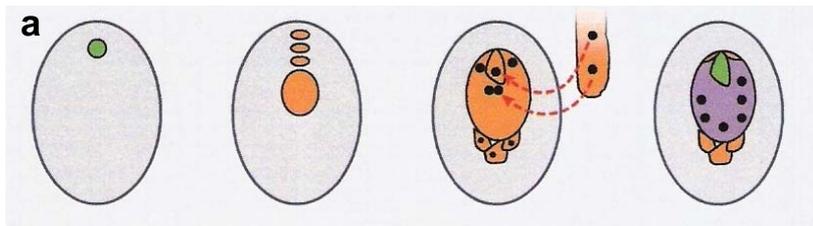
A reprodução apomítica em *Brachiaria* é do tipo apospórica (Lutts et al., 1984; Valle, 1990) e é descrita como pseudogâmica, ou seja, é necessário que ocorra fecundação da célula central do saco embrionário para haver formação da semente (Ngendahayo, 1988). Além disso, sacos embrionários meióticos podem ser observados em diferentes frequências nos óvulos das plantas apomíticas de *Brachiaria*, associados a um ou múltiplos sacos embrionários apospóricos (Araújo et al., 2005). Nesses casos, são consideradas apomíticas mesmo aquelas plantas em que os sacos embrionários meióticos estejam presentes em altas porcentagens, indicando uma apomixia facultativa (Valle, 1990). Por outro lado, as plantas sexuais não apresentam nenhum saco embrionário apospórico (Valle e Savidan, 1996).

A reprodução sexual em *Brachiaria*, como na maioria das angiospermas, é caracterizada pela redução do número de cromossomos pela meiose para a formação de gametas e pelo desenvolvimento do embrião e endosperma após a dupla fecundação culminando com a produção de sementes (Figura 3).

O modo de reprodução apomítico está relacionado, na maioria dos casos, à poliploidia, enquanto a sexualidade é encontrada no nível diplóide. A espécie *B. ruziziensis*, predominantemente diplóide, apresenta sexualidade, assim como alguns

acessos diplóides de espécies em que a apomixia predomina (Valle e Glienke, 1991). No entanto, estudos recentes sobre o modo de reprodução no germoplasma de *B. humidicola* da Embrapa Gado de Corte revelaram um acesso sexual ( $2n=36$ ).

**(a) REPRODUÇÃO SEXUAL**



**(b) DIPLOSPORIA (c) AOSPORIA**

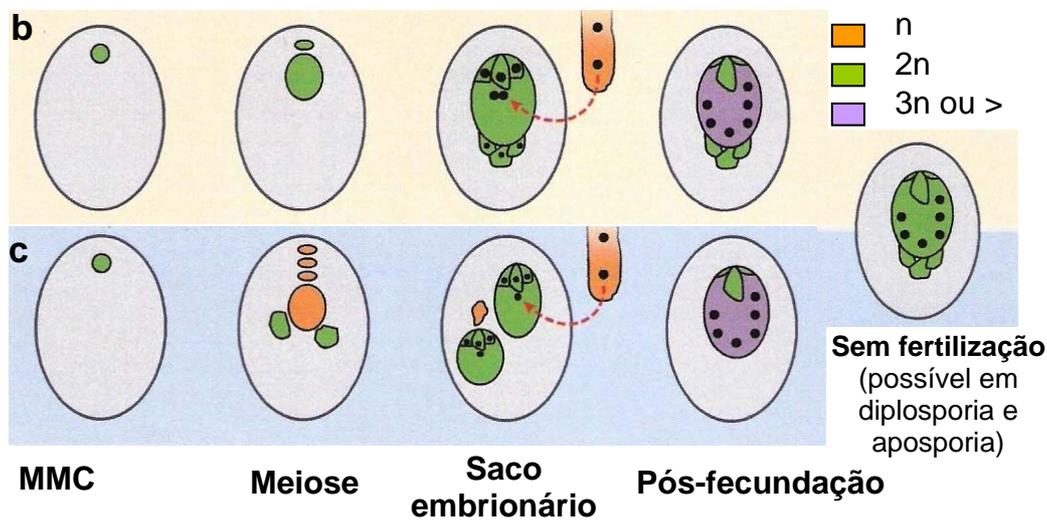


Figura 3 - Representação esquemática da reprodução sexual (a), apomixia gametofítica dos tipos diplospórica (b) e apospórica (c) em ovários de plantas. (a) Uma única célula do interior do nucelo torna-se a célula mãe da megáspora (MMC), que sofre meiose e cada uma das quatro megásporas resultantes é haplóide. (b) Na meiose diplospórica, a primeira divisão de restituição (FDR) resulta em mitose que produz duas megásporas diplóides, uma das quais sobrevive. Mitose diplospórica também é possível, no qual, a MMC nunca entra em meiose. (c) A meiose é completa em aposporia, as quatro megásporas resultantes não sobrevivem e as iniciais apospóricas (AI) se desenvolvem a partir de células somáticas do nucelo nas proximidades da MMC (adaptado de Ozias-Akins e Dijk, 2007).

**2.4.1. Herança da apomixia**

Apomixia é conhecida em mais de 40 famílias de plantas (Carman, 1997). Os estudos pioneiros de Nogler (1984) e Savidan (1982) revelaram que a apomixia

está sob controle genético, embora sua expressividade possa ser afetada por condições ambientais ou por genes modificadores (Koltunow e Grossniklaus, 2003).

Nos cruzamentos, plantas apomíticas são utilizadas como doadoras de pólen para a planta sexual feminina. A análise genética da apomixia é complicada devido à natureza poliplóide dos apomíticos, a incompatibilidade de ploidia de plantas sexuais e apomíticas, e a dificuldade na análise da descendência (Koltunow e Grossniklaus, 2003).

A apomixia parece ser controlada qualitativamente por poucos genes. Tanto ações gênicas recessivas como dominantes tem sido relatadas para a mesma espécie como para espécies distintas. A presença de apomixia obrigatória e facultativa na mesma espécie, assim como variações no grau de expressão da apomixia facultativa na espécie, indica que a apomixia pode ser afetada por genes modificadores e também pela constituição genética das populações (Hanna, 1995).

Os primeiros trabalhos sugeriam herança recessiva da apomixia em relação à sexualidade, como em *Parthenium argentatum*, em que o fenótipo apomítico seria determinado por vários genes recessivos (Asker e Jerling, 1992), *Cenchrus ciliaris* (Bashaw et al., 1970) e *Paspalum notatum* (Burton e Forbes, 1960). Entretanto, com o progresso das pesquisas, foi verificado o oposto e, atualmente, é aceito que, como regra geral, a apomixia é dominante em relação à sexualidade (Sherwood, 2001).

Vários autores estudaram a herança da apomixia em diferentes espécies. Em *Ranunculus*, a apomixia é do tipo apospórica e é dominante (Nogler, 1982) e com claras evidências de atividade de modificadores com efeitos no desenvolvimento (Koltunow et al., 2000).

Em *Paspalum notatum*, Martinez et al. (2001) verificaram um modelo modificado de herança tetrassômica de um só gene dominante com efeito pleiotrópico e penetrância incompleta. Em *Poa pratensis*, análises com RAPD e AFLP mostraram uma ligação altamente significativa entre alguns marcadores e apomixia, reforçando a hipótese de herança monogênica desta característica (Barcaccia et al., 1998). Em *Tripsacum*, Grimanelli et al. (1997, 1998a, 1998b), utilizando RFLP para mapear o cromossomo que controla a apomixia, concluíram que o fracasso da meiose seria controlado por um gene dominante; o processo geral

da apomixia seria complexo e potencialmente controlado por genes ligados; a herança do loco seria tetrassômica; o(s) gene(s) controlando a apomixia estariam ligados a um sistema que distorce a segregação, promovendo a eliminação dos alelos da apomixia quando transmitidos por gametas haplóides, o que explicaria a relação apomixia-poliploidia.

No caso de *Brachiaria*, os estudos foram realizados no complexo agâmico *B. ruziziensis* (R) – *B. decumbens* (D) – *B. brizantha* (B), em que as plantas sexuais tetraploidizadas de R foram polinizadas por um ou outro dos tetraplóides apomíticos (D ou B). O modo de reprodução dos híbridos interespecíficos foi determinado por citoembriologia e, em alguns casos, por teste de progênie. Cruzamentos de segunda geração do tipo retrocruzamento e tri-cross (F1[RxD sexual] x B e vice versa) também foram realizados (Valle et al., 2004). Conforme apresentado por Miles e Valle (1996), os resultados são indicativos de herança tetrassômica monogênica, com a apomixia dominante sobre a sexualidade, em concordância com o que havia sido determinado para *Panicum maximum* (Savidan, 1982). Assim, a segregação observada num cruzamento de plantas sexuais e apomíticas resulta numa proporção de híbridos sexuais e apomíticos próxima de 1:1, enquanto autopolinização de sexuais ou cruzamentos entre sexuais, tanto em nível diplóide como tetraplóide sempre produz progênie sexuais indicando recessividade da sexualidade. O modelo tetraplóide sugerido é Aaaa para o genitor apomítico, aa para o sexual diplóide e aaaa para o sexual tetraploidizado (Valle et al., 2004) (Figura 2).

Bitencourt et al. (2007), utilizando análise citoembriológica para determinação do modo de reprodução, realizaram, pela primeira vez, o estudo da herança da apomixia numa população segregante de *Brachiaria humidicola*, resultante do cruzamento intraespecífico entre a cultivar BRS Tupi e o único acesso sexual do germoplasma da Embrapa Gado de Corte. Os resultados sugeriram que a apomixia nessa espécie segue esse mesmo modelo tetraplóide e monogênico de herança, sendo o genitor apomítico Aaaa e o genitor sexual tetraplóide natural aaaa. Ressalta-se que esta mesma progênie foi utilizada nesta pesquisa.

#### **2.4.2. Metodologias de determinação de modo de reprodução em *Brachiaria***

O processo de formação do saco embrionário, ou megagametogênese, vai determinar o modo de reprodução e a natureza da progênie, se clonal ou segregante (Valle et al., 2004).

Métodos indicativos do modo de reprodução compreendem as avaliações morfológicas em teste de progênie, análise de ovários em microscopia (por corte e coloração ou clareamento), citometria de fluxo, teste com auxina, métodos bioquímicos (isoenzimas) e moleculares (Valle et al., 2004).

Tradicionalmente, o teste de progênie representa a forma mais simples de detecção: uniformidade fenotípica denota a origem apomítica, enquanto heterogeneidade indica recombinação, portanto sexualidade. A relativa simplicidade desta metodologia contrapõe-se à limitação no número de indivíduos na amostra (20 a 25 plantas por família para determinar a presença da apomixia, no entanto, mais de 100 plantas para quantificar a apomixia), no espaço que ocupa e tempo necessário para um ciclo de crescimento. Além disso, a ocorrência de apomixia facultativa ou homozigose de progenitores podem causar erros na determinação do grau de apomixia (Valle et al., 2004).

As técnicas citoembriológicas de estudo da estrutura do ovário usando microscopia permitem uma identificação menos empírica do modo de reprodução comparado aos testes de progênie. Cortes seriados e coloração são frequentemente usados, e permitem visualizar a megagametogênese e detectar a apomixia. Porém, como rotina, a técnica é extremamente laboriosa e inviável no estudo de grandes populações de híbridos ou coleções de germoplasma.

Outras metodologias usando clarificação do ovário e microscopia de fase ou interferência (Crane e Carman, 1987; Herr, 1971; Young et al., 1979) viabilizaram rotinas de triagem com mais eficiência e segurança. Resumidamente, este método consiste na coleta de flores em antese e extração de ovários; clarificação destes com salicilato de metila e análise por microscopia de contraste de interferência (Miles e Valle, 1996). Na prática, duas lâminas com cerca de 30 ovários/lâmina são analisadas e o aparecimento de sacos apospóricos simples ou múltiplos indica apomixia (Valle e Savidan, 1996).

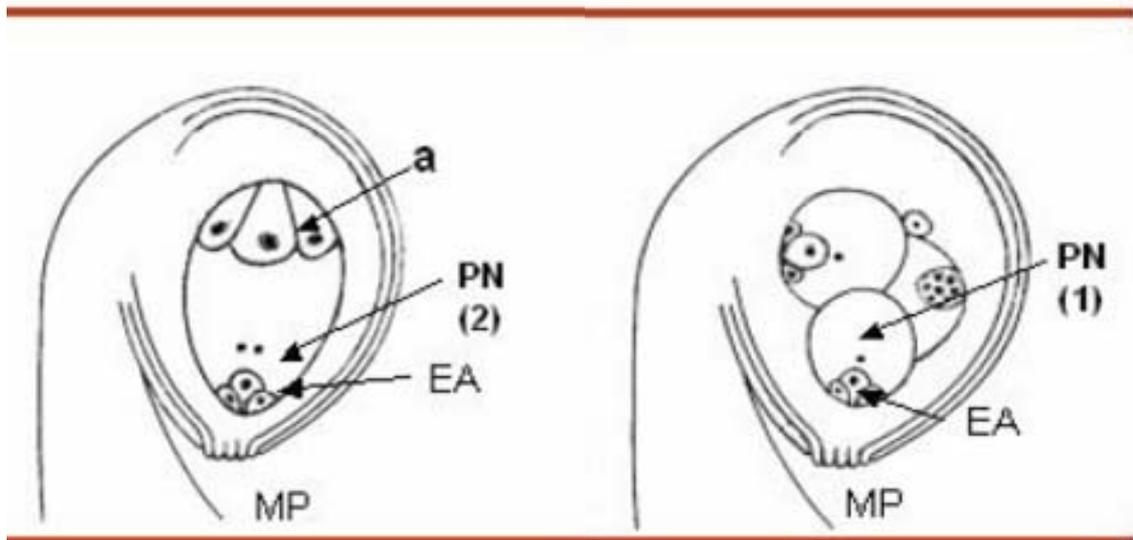


Figura 4 - Representação esquemática de ovários de *Brachiaria*. À esquerda, um óvulo contendo somente um saco embrionário do tipo *Polygonum* que caracteriza sexualidade. a = antípodas; PN = núcleos polares; EA = célula ovo; MP = micropila. À direita sacos embrionários apospóricos do tipo *Panicum* no mesmo óvulo (adaptado de Carneiro et al., 2006).

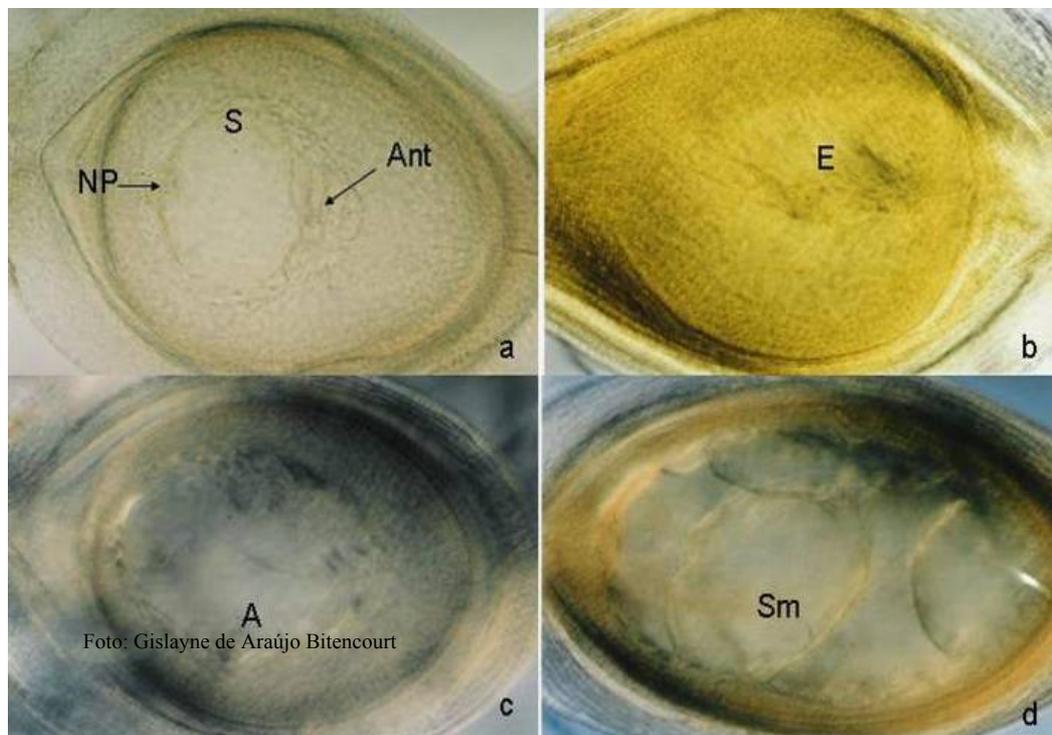


Figura 5 - Ovários clarificados vistos ao microscópio óptico 20x para verificação do modo de reprodução. S = saco embrionário meiótico (NP = núcleos polares, Ant = antípodas); E = saco embrionário estéril; A = Saco embrionário apospórico; Saco embrionário apospórico múltiplo.

Todos estes procedimentos implicam em aguardar o ciclo completo de crescimento, pois envolvem a observação de características na planta adulta, ou a coleta e fixação de flores recém abertas, extração do ovário, clarificação com diferentes soluções e posterior análise microscópica. A interpretação dos resultados de microscopia requer treinamento específico. A identificação da anatomia dos sacos embrionários por contraste de interferência é um trabalho criterioso e demorado, pois muitas vezes os ovários não apresentam suas estruturas bem definidas, o que dificulta a identificação. Além disso, é viável apenas nos casos em que a estrutura do ovário é morfológicamente distinta do ovário meiótico, como acontece na aposporia do tipo *Panicum*, comum no gênero *Brachiaria*. Neste caso, o saco embrionário contém apenas quatro núcleos: a oosfera, um núcleo polar e duas sinérgides, enquanto o saco tipo *Polygonum* (meiótico) contém os oito núcleos tradicionais: a oosfera, duas sinérgides, dois núcleos polares e três antípodas (Figuras 4 e 5).

Marcadores moleculares e bioquímicos que co-segregam com a apomixia foram mais recentemente desenvolvidos e têm como maior vantagem a precocidade na determinação do modo de reprodução que pode ser realizada em semente ou plântulas. Os maiores inconvenientes são a necessidade inicial de populações específicas e a definição de protocolos para identificação dos marcadores (Leblanc e Mazzucato, 2001). Ainda é preciso determinar se estes marcadores são aplicáveis a populações diferentes daquelas onde foram determinados, mas já mostraram contribuição significativa em programas de melhoramento onde são necessárias triagens rápidas de populações numerosas.

## **2.5. Marcadores moleculares: aspectos gerais**

Com o advento das tecnologias modernas de genética e da biologia molecular surgiram diversos tipos de marcadores moleculares que detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA. O princípio da utilização desses marcadores é baseado no dogma central da biologia molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, na maioria das vezes, diferenças fenotípicas (Figura 6).

Entre as vantagens dos marcadores moleculares sobre os morfológicos, pode-se citar a obtenção e um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta ou a partir de culturas de células e tecidos (Faleiro, 2007).

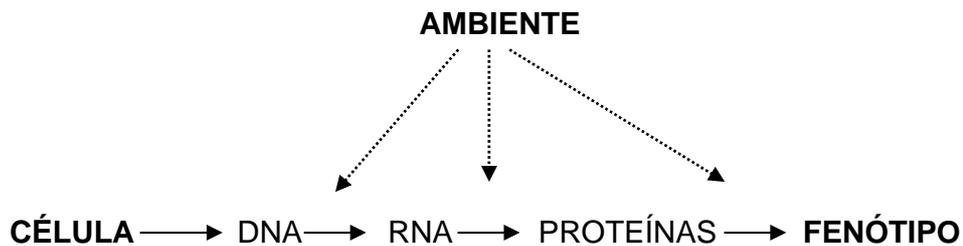


Figura 6 - Dogma Central da Biologia Molecular, evidenciando a influência direta do DNA no fenótipo.

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas (grupo de múltiplas formas moleculares de uma enzima resultante de variações alélicas de genes codificantes), ou de um segmento específico de DNA (correspondentemente a regiões expressas ou não do genoma) (Faleiro, 2007).

A seqüência de nucleotídeos e a função de um marcador molecular podem ou não ser conhecidas e, em geral, são desconhecidas. Ao se verificar o seu comportamento de acordo com as leis básicas de herança mendeliana, um marcador molecular é adicionalmente definido como marcador genético. Isso é feito, por exemplo, através do estudo do comportamento do marcador em uma população segregante. Portanto, é importante enfatizar que o simples fato do marcador ser DNA, ou produto da transcrição e tradução de uma seqüência de DNA, não implica em que se constitua em um marcador “genético”, como frequentemente se supõe. (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os principais tipos de marcadores de DNA podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou

amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) ou ASA (*Amplified Specific Amplicon*); Microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Existem ainda marcadores baseados na metodologia de seqüenciamento, tais como, os SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e modificações já existem para algumas das técnicas acima mencionadas. O detalhamento de cada um dos tipos de marcadores citados pode ser encontrado em Ferreira e Grattapaglia (1998).

Uma das principais utilizações desses marcadores moleculares é a incorporação de informações desses marcadores na seleção de genótipos superiores, conhecida como seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM) (Moro, 2008).

A SAMM apresenta algumas vantagens em relação à seleção fenotípica (SF), por exemplo, na realização de piramidação de genes, em que se busca concentrar em um único genótipo diferentes características de interesse (principalmente para resistência a diferentes raças de um mesmo patógeno, ou para resistência a diferentes patógenos), reduzindo o tempo necessário para obter esse genótipo. Para aqueles caracteres em que a avaliação fenotípica apresenta elevado custo, ou exige ambientes específicos (déficit hídrico, inoculação de patógenos etc.), ou quando as avaliações são subjetivas (organolépticas, por exemplo), ou ainda, quando exigem destruição da planta, a SAMM pode ser muito eficiente em comparação a SF. Quando o caráter de interesse só se manifesta em fases avançadas do desenvolvimento da planta, a SAMM pode ser realizada nos estágios iniciais, reduzindo significativamente o tempo necessário para um ciclo de seleção (Moro, 2008).

Neste trabalho, optou-se pelo uso de marcadores RAPD e SSR, visto serem técnicas relativamente simples, amplificam diretamente do DNA sem a necessidade de hibridação com sondas e não exigem muitos equipamentos. Como principal vantagem, a técnica de RAPD não necessita de conhecimento prévio do genoma, possibilitando o uso de um grande número de primers, enquanto os microssatélites necessitam do desenvolvimento de pares de primers específicos. Logo o número desses primers disponível é variável para cada espécie. No caso de *B. humidicola*, foram desenvolvidos, até o momento, apenas 23 pares de primers de SSR pelo Laboratório de Análise Genética e Molecular do Centro de Biologia Molecular e Genética (CBMEG) da UNICAMP, mas apenas 10 deles foram polimórficos em estudo realizado no germoplasma dessa espécie (Vigna et al., 2007) e eles poderão ser testados para identificar uma marca ligada à apomixia na população estudada neste trabalho.

### **2.5.1. Polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD)**

A técnica de RAPD, ao contrário do PCR convencional, utiliza apenas um primer curto (dez nucleotídeos) que, devido ao seu pequeno tamanho, pode parear em diversos pontos do genoma (Williams et al., 1990).

Caso duas cópias desse primer se liguem às fitas opostas do DNA a uma distância entre 200 e cerca de 2.000 pares de nucleotídeos, pela reação de PCR, a região flanqueada pelos primers pode ser amplificada. Portanto, é uma técnica que não exige o conhecimento prévio da seqüência que está sendo amplificada. Logo, um mesmo conjunto de primers pode ser usado para amplificar o DNA dos mais diversos tipos de organismos. Há empresas que comercializam kits de primers contendo mais de 1.000 diferentes tipos de seqüência (Alzate-Marin et al., 2005).

Apesar de todas essas vantagens, o RAPD apresenta uma desvantagem que limita, até certo ponto, o seu uso generalizado. A baixa temperatura necessária para a ligação do primer ao molde torna o processo bastante dependente das condições de amplificação. Portanto, modificações no termociclador utilizado, na DNA polimerase e em outros reagentes da mistura de reação podem alterar o padrão de amplificação. Isso pode não representar um grande problema em um grupo de

pesquisadores cuidadosos e que padronizam criteriosamente as condições de amplificação, mas pode impedir que dados sejam comparados entre diferentes laboratórios (Alzate-Marin et al., 2005).

Para contornar essa limitação, marcadores RAPD podem ser transformados em marcadores SCAR. Para tanto, a banda de DNA correspondente ao marcador RAPD é clonada, seqüenciada e dois primers mais longos que o original são sintetizados e utilizados para amplificar o mesmo marcador, só que agora numa temperatura de anelamento mais elevada. Nessa condição, o processo de amplificação é mais estável e reproduzível (Paran e Michelmore, 1993).

O polimorfismo evidenciado pelo RAPD é detectado em função de mutações no(s) sítio(s) de ligação do primer, que impedem o seu pareamento e a consequente amplificação, ou devido à ocorrência de deleções ou inserções na região compreendida entre os dois sítios, que alteram o tamanho do segmento amplificado. Como, na maioria das vezes, essas mutações impedem a amplificação do segmento de interesse, diz-se que a herança do RAPD é dominante, pois apenas duas classes fenotípicas serão detectadas, presença ou ausência da banda de DNA (Alzate-Marin et al., 2005). Assim, a detecção dos segmentos RAPD não tem sensibilidade quantitativa suficiente para discriminar os alelos de um indivíduo homocigoto (AA) de um heterocigoto (Aa) (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

### **2.5.2. Microssatélites ou seqüências simples repetidas (SSR)**

Os genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de seqüências repetidas, umas mais complexas (minissatélites) e outras mais simples (microssatélites) (Hamada et al., 1982; Tautz e Renz, 1984).

Seqüências simples repetidas (SSR), mais tarde denominadas também de “microssatélites” (Litt e Luty, 1989), consistem de pequenas seqüências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem (uma após a outra). Hoje, constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis. Ao se usar primers específicos que flanqueiam o microssatélite para sua amplificação, diferenças entre indivíduos de acordo com o número de repetições

da sequência podem ocorrer, ou seja, bandas de tamanhos diferentes serão produzidas (Neto, 2004).

A sua existência em plantas já havia sido sugerida com a observação de que oligonucleotídeos, contendo elementos repetidos de TG e GATA/GACA, detectam polimorfismo quando utilizados como sondas RFLP (Weising et al., 1989; Beyermann et al., 1992). Também nas plantas, sítios de microssatélites são largamente distribuídos com uma frequência de um a cada 50 mil pares de bases. Sua presença já é determinada em muitas espécies de plantas, como culturas anuais, espécies arbóreas, ornamentais e frutíferas (Neto, 2004).

Os marcadores microssatélites apresentam vantagens pela sua característica co-dominante, ou seja, distinguem os indivíduos heterozigotos dos homozigotos, sendo assim, são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo. Além disso, como são muitos pequenos e distribuídos ao acaso, permitem a mais completa cobertura do genoma eucarioto. Todas essas características reunidas fazem com que marcadores baseados em SSR sejam ideais para mapeamento genético e físico de genomas, para identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações. Assim, toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Na literatura, não há relatos do desenvolvimento de marcadores do tipo microssatélite para espécies de *Brachiaria*. Mas, em colaboração com a Embrapa, o Laboratório de Análise Genética e Molecular do CBMEG-UNICAMP vem trabalhando no desenvolvimento desses marcadores em diferentes espécies de *Brachiaria*: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*.

### **2.5.3. Marcadores moleculares ligados à apomixia**

Há interesse em localizar o locus relacionado à apomixia, tanto para estudá-lo comparativamente com outras espécies como para clonar o(s) gene(s) responsável por este modo de reprodução. Mapas genéticos do locus apomíticos têm sido obtidos em várias espécies por análises, com marcadores genéticos, de

populações segregantes, derivadas de cruzamentos entre plantas sexuais e apomíticas (Ozias-Akins et al., 1998).

O primeiro relato de co-herança de apomixia apospórica e marcadores moleculares foi em *Pennisetum*. Dois marcadores foram encontrados, um RFLP e um RAPD ligados à aposporia (Ozias-Akins et al., 1993).

Em várias espécies de gramíneas forrageiras também foram identificados marcadores moleculares relacionados à apomixia. Em *Rubus* (Antonius e Nybom, 1995), para a discriminação entre a progênie sexual e a apomítica; em *Paspalum notatum*, na análise de transmissão do modo de reprodução apomítico (Ortiz et al., 1997), em híbridos de milho e *Tripsacum* (Leblanc et al., 1995); e em *Pennisetum ciliare*, na identificação do grupo de ligação incluindo o gene da apomixia (Gustine et al., 1997).

Em *Brachiaria* já foram identificados marcadores moleculares ligados à apomixia em populações segregantes do cruzamento entre *B. decumbens* e *B. ruziziensis* (Pessino et al., 1997, 1998). Esses autores identificaram cinco marcadores RFLP; um marcador RAPD e dois marcadores AFLP que segregam com o caráter apospórico e mapearam o grupo de ligação, que inclui o gene da apomixia.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

Foram utilizados 107 híbridos de uma população F1 de *Brachiaria humidicola* oriunda do cruzamento entre genitor masculino H16 ( $2n=36$ , apomítico), cultivar BRS Tupi, e genitor feminino H31 ( $2n=36$ , sexual).

Essa população (Figura 7) foi gerada na Embrapa Gado de Corte (CNPGC) na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul e encontra-se no campo experimental deste centro de pesquisa.

Para realizar este trabalho, duas informações foram necessárias. Em primeiro lugar, a identificação dos híbridos, uma vez que não se faz a emasculação previa ao cruzamento e, portanto, algumas plantas da progênie podem ser resultantes de autofecundação. Após a identificação, torna-se necessário conhecer o modo de reprodução dos híbridos.



Foto: Cacilda Borges do Valle.

Figura 7 - Vista geral do campo de híbridos de *Brachiaria humidicola* no campo experimental da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande/MS.

A identificação segura e precoce de híbridos foi realizada por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD. Trinta e um marcadores (bandas de DNA) presentes no genitor paterno e ausentes no materno foram utilizadas nesse processo (Chiari et al., 2007).

O modo de reprodução desses híbridos foi analisado pela anatomia dos sacos embrionários em microscopia de contraste de interferência, sendo 55 plantas sexuais e 52 apomíticas. A segregação 1:1 (apomixia: sexualidade) foi testada e confirmada pelo teste do Qui-quadrado (Bitencourt et al., 2007).

### **3.2. Extração de DNA**

O DNA foi extraído de amostras de folhas jovens (folhas do segundo nó), de plantas individuais, segundo o protocolo de Bonato et al. (2002), conforme descrito a seguir.

Aproximadamente 300 mg de folhas foram pulverizadas com nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana. O pó fino obtido foi transferido para tubos de microcentrífuga de 2 mL, tomando cuidado para não descongelar.

Foram adicionados 900 µL de tampão de extração, contendo: 2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2% 2-β-mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8; 1% PVP 40. As amostras foram incubadas a 65°C por 60 minutos, invertendo-as suavemente a cada dez minutos e, posteriormente, centrifugadas a 13.400 g por dez minutos.

Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e adicionou-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os microtubos foram invertidos suavemente durante dez minutos e, depois, centrifugados.

A fase aquosa foi transferida para novos microtubos e esse procedimento foi repetido mais uma vez. Após nova centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e adicionou-se 2/3 do volume de isopropanol gelado. As amostras foram invertidas suavemente, incubadas a -20°C por 30 minutos e centrifugadas a 13.400 g por dez minutos, para obtenção do precipitado contendo DNA.

Os DNAs foram lavados duas vezes com etanol 70% gelado, secos à temperatura ambiente (TA) e ressuspensos em 400 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA pH 8).

Às amostras de DNA adicionou-se RNase na concentração final de 10 µg/mL e incubou-se por 30 minutos a 37°C, para degradação do RNA presente nas amostras. Para nova precipitação do DNA, foram adicionados 20 µL NaCl 5M e 800 µL de etanol absoluto gelado. Após suave inversão, as amostras foram incubadas a -20°C por duas horas e centrifugadas a 13.400 g por dez minutos. Os precipitados foram lavados duas vezes com etanol 70% gelado, secos a TA e ressuspensos em 100 µL de tampão TE.

### **3.3. Quantificação de DNA**

As amostras de DNA obtidas foram diluídas 1:10 (v:v) e suas concentrações foram estimadas em gel de agarose 0,8%, pré-corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Após eletroforese, realizada a 100 V por aproximadamente 30 minutos, os géis foram visualizados em luz ultravioleta (UV) e fotodocumentados em sistema digital L.Pix Image (Loccus Biotecnologia). As bandas de DNA obtidas foram comparadas com bandas de padrões do DNA lambda (Invitrogen) de concentrações (100 ng/µL, 200 ng/µL e 300 ng/µL).

Depois de quantificadas, as amostras de DNA obtidas foram diluídas para a concentração de 5 ng/µL (concentração de uso) e mantidas a 4°C e o restante foi estocado a -20°C.

### **3.4. Reação de RAPD e eletroforese dos produtos amplificados**

As reações de amplificação foram feitas em volume final de 25 µL, contendo 0,4 µM primer; 0,2 mM dNTPs (Invitrogen); 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 1x tampão da Taq DNA polimerase (Invitrogen); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) e 30 ng de DNA.

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research), programado para uma desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos,

seguida por 40 ciclos de 94°C por um minuto (desnaturação), 35°C por um minuto (pareamento dos primers) e 72°C por dois minutos (extensão); e uma extensão final a 72°C por sete minutos.

Foram utilizados 217 primers decâmeros randômicos (Quadro 1) e para cada análise foi feito um controle negativo, que é uma reação contendo todos os reagentes, exceto o DNA, para verificar se não há contaminação dos reagentes com DNA e, assim, dar maior confiabilidade aos resultados.

Após a amplificação, foram adicionados a cada amostra 3 µL de tampão de corrida 6x. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese foi realizada a 100 V por cerca de três horas.

O tampão utilizado para o preparo do gel e na cuba de eletroforese foi o TBE 1x (0,89M Tris; 0,89M Borato e 0,08M EDTA).

Terminada a eletroforese, os géis foram visualizados em luz ultravioleta e suas imagens foram capturadas por sistema de fotodocumentação digital L.Pix Image (Loccus Biotecnologia).

Quadro1 - Seqüência dos 217 primers decâmeros randômicos utilizados para a análise de RAPD

Primer	Seqüência de nucleotídeos	Primer	Seqüência de nucleotídeos
A-01	CAG GCC CTT C	C-13	AAG CCT CGT C
A-02	TGC CGA GCT G	C-14	TGC GTG CTT G
A-03	AGT CAG CCA C	C-15	GAC GGA TCAG
A-04	AAT CGG GCT G	C-16	CAC ACT CCA G
A-05	AGG GGT CTT G	C-17	TTC CCC CCA G
A-06	GGT CCC TGA C	C-18	TGA GTG GGT G
A-07	GAA ACG GGT G	C-19	GTT GCC AGC C
A-08	GTG ACG TAG G	C-20	ACT TCG CCA C
A-09	GGG TAA CGC C	D-03	GTC GCC GTC A
A-10	GTG ATC GCA G	D-18	GAG AGC CAA C
A-11	CAA TCG CCG T	D-12	CAC CGT ATC C
A-12	TCG GCG ATA G	E-01	CCC AAG GTC C
A-13	CAG CAC CCA C	E-02	GGT GCG GGA A

Quadro1, Cont.

A-14	TCT GTG CTG G	E-03	CCA GAT GCA C
A-15	TTC CGA ACC C	E-11	GAG TCT CAG G
A-16	AGC CAG CGA A	F-08	GGG ATA TCG G
A-17	GAC CGC TTG T	F-12	ACG GTA CCA G
A-18	AGG TGA CCG T	F-13	GGCTGCAGAA
A-19	CAA ACG TCG G	G-03	GAG CCC TCC A
A-20	GTT GCG ATC C	G-05	CTG AGA CGG A
AB-01	CCG TCG GTA G	G-19	GTC AGG GCA A
AB-02	GGA AAC CCC T	H-01	GGT CGG AGA A
AB-03	TGG CGC ACA C	H-05	AGT CGT CCC C
AC-17	CCT GGA GCT T	H-06	ACG CAT CGC A
AD-01	CAA AGG CCG G	H-09	TGT AGC TGG G
AD-02	CTG AAC CGC T	H-12	ACG CGC ATG T
AD-03	TCT CGC CTA C	H-18	GAA TCG GCC A
AF-01	CCT ACA CGG T	I-14	TGA CGG CGG T
AF-02	CAG CCG AGA A	I-16	TCT CCG CCC T
AJ-06	GTC GGA GTG G	J-14	CAC CCG GAT G
AJ-09	ACG GCA CGC A	J-16	CTG CTT AGG G
AK-04	AGG GTC GGT C	K-02	GTC TCC GCA A
AK-09	AGG TCG GCG T	K-05	GAA CAC TGG G
AK-19	TCG CAG CGA G	K-10	GTG CAA CGT G
AL-01	TGT GAC GAG G	K-18	CCTAGTCGAG
AL-02	ACC CTG TGG G	K-19	CAC AGG CGG A
AL-03	CCC ACC CTT G	K-20	GTG TCG CGA G
AN-10	CTG TGT GCT C	L-07	AGG CGG GAA C
AN-11	GTC CAT GCA G	L-07	AGG CGG GAA C
B-14	TGC CGA GTC G	L-19	GAG TGG TGAC
BA-01	TTC CCC ACC C	M-02	ACA ACG CCT C
BA-02	TGC TCG GCT C	N-01	CTC ACG TTG G
BA-03	GTG CGA GAA C	N-02	ACC AGG GGC A
BB-01	ACA CTG GCT G	N-03	GGT ACT CCC C
BB-02	CCC CCG TTA G	N-15	CAG CGA CTG T
BB-03	TCA CGT GGC T	O-7	CAGCACTGAC
C-01	TTC GAG CCA G	P-14	CCA GCC GAA C
C-02	GTG AGG CGT C	P-16	CCA AGC TGC C

Quadro 1, Cont.

C-03	GGG GGT CTT T	Q-06	GAG CGC CTT G
C-04	CCG CAT CTA C	Q-16	AGT GCA GCC A
C-05	GAT GAC CGC C	Q-20	TCG CCC AGT C
C-06	GAA CGG ACT C	R-13	GGA CGA CAA G
C-07	GTC CCG ACG A	U-12	TCA CCA GCC A
C-08	TGG ACC GGT G	V-4	CCC CTC ACG A
C-09	CTC ACC GTC C	W-10	TCG CAT CCC T
C-10	TGT CTG GGT G	X-18	GAC TAG GTG G
C-11	AAA GCT GCG G	Z-10	CCG ACA AAC C
C-12	TGT CAT CCC C	Z-14	TCG GAG GTT C
1	ACA ACG CCT C	51	CCC GTT GCC T
2	GGG AAC GTG T	52	AAG TGC ACG G
3	CAA ACG TGG G	53	CCC TAC TGG T
4	GGC TGC AAT G	54	TGA AGC CCC T
5	TCT GCT ACG G	55	TGC CAT GCT G
6	CCA TCG GAG G	56	CTG AAG CTG G
7	CCA TGC GGA G	57	ACT TGC CTG G
8	AGG AGC GAC A	58	GAT ACC TCG G
9	CCT TGA CGC A	59	CTG GGT GAG T
10	CCA CAG CAG T	60	CCA GCA CTT C
11	GGT ACT CCC C	61	GTG TCA GTG G
12	ACA ACT GGG G	62	TGC GAT GCG A
13	TCG GAG GTT C	63	CCC GGA AGA G
14	CCT TCC CAC T	64	TTT TGC CCC C
15	ACC CTG TGG G	65	CCT CCA CCA G
16	CCG TCC ATC C	66	GAA TCG GCC A
17	AGT ATG GCG G	67	CTG ACC AGC C
18	CCC TGT CGC A	68	GGG TTT GGC A
19	TTC GAG CCA G	69	GGG TGT GTA G
20	ACT TCG CCA C	70	CCT ACA CGG T
21	CCC AGT CAC T	71	CAG CCG AGA A
22	TCA GAG CGC C	72	GTG AAT GCG G
23	ACC CGA CCT G	73	CCT TGC GCC T
24	TGG TCC AGC C	74	CCT CCC CAA G
25	CTC GGG ATG T	75	CCA CGG TCA G

Quadro1, Cont.

26	CAC GGC ACA A	76	AAT GCG GGA G
27	TTT CCG GGA G	77	AAA GTG CGG G
28	AAG GCT CGA C	78	ACG GAC GTC A
29	CTG GGG ACT T	79	TGG GTC CCT C
30	TCG GCA CGC A	80	TGC GGG AGT G
31	AAG GGC GAG T	81	GGA GCG TAC T
32	GGC ACG CGT T	82	GTC CTC GTG T
33	TCG CAT CCA G	83	TCG CAG CGT T
34	GGG TGC AGT T	84	CTC CAC GAC T
35	GGG AAC CCG T	85	GGG AAA AGC C
36	TCG CTC GTA G	86	TCG TTC CGC A
37	ACT CTG GGG A	87	TGG TCG CAG A
38	ACG CAC AAC C	88	GAA CCT GCT G
39	GGT AGAC TGT G	89	CTC GAC AGA G
40	TCT GTC GGT C	90	CTC CCC AGA C
41	GGT CAC CTC A	91	TTG CAG GCA G
42	AGC AGC GAG G	92	CCG TCC CTG A
43	ACG GAA GTG G	93	GTG CCG CAC T
44	AGT CGG CCC A	94	GAC ACA CTC C
45	TGG AAG CAC C	95	GTG ACC AGA G
46	GGA ACT CCA C	96	CCT AGT CGA G
47	CCA CCT TCAG	97	GTG TCG CGA G
48	TCC CCG GGT T	98	CAG AAG CGG A
49	GGT CTA GAG G	99	CAG CCT ACC A
50	CCC GTA GCA C	100	GACGCG AACC
UBC-259	GGT ACG TAC T		

### 3.5. Marcadores microssatélites e condições de amplificação

Foram utilizados dez pares de primers microssatélites (H05 e H06; H07 e H08; H09 e H10; H11 e H12; H15 e H16; H17 e H18; H29 e H30; H35 e H36; H43 e H44; H45 e H46), todos eles desenvolvidos pelo Laboratório de Análise Genética e Molecular do CBMEG da UNICAMP e inicialmente caracterizados quanto ao seu polimorfismo nos 58 acessos de *B. humidicola* do Banco de Germoplasma dessa

espécie. Devido ao fato das sequências desses primers ainda não terem sido publicadas, elas não podem ser descritas neste trabalho.

As reações de amplificação foram feitas em volume final de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 2  $\mu\text{L}$  primer *forward*; 2  $\mu\text{L}$  primer *reverse*, 1,5  $\mu\text{L}$  dNTPs (Invitrogen); 2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase; 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10x; 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (produzida no CBMEG da UNICAMP) e 10 ng de DNA.

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research), programado para uma desnaturação inicial a 94°C por um minuto, seguida por 40 ciclos de 94°C por um minuto (desnaturação), 48°C por um minuto (pareamento dos primers H15 e H16), 55°C (pareamento dos primers H35 e H36), 57°C (pareamento dos primers H17 e H18; H29 e H30; H45 e H46), 60°C (pareamento dos primers H05 e H06; H07 e H08; H09 e H10; H43 e H44) e 62°C (pareamento dos primers H11 e H12) e 72°C por um minutos (extensão); e uma extensão final a 72°C por cinco minutos.

Após a amplificação, amostras dessas reações foram aplicadas em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), para verificar a amplificação dos microssatélites. A eletroforese foi realizada a 170 V por cerca de uma hora e meia. O tampão utilizado para o preparo do gel e na cuba de eletroforese foi o TBE 1x.

Terminada a eletroforese, os géis foram visualizados em luz ultravioleta e suas imagens foram capturadas por sistema de fotodocumentação digital L.Pix Image (Loccus Biotecnologia).

Depois de confirmada a amplificação dos microssatélites em gel de agarose, os fragmentos foram visualizados em géis desnaturantes de poliacrilamida 6% e corados com prata de acordo com Creste et al. (2001), descrito a seguir:

O gel de poliacrilamida a 6% foi preparado com 420 g de uréia, 150 mL de acrilamida 40% (190 g de acrilamida, 10 g n.n'-Methylendiacrilamida em um volume de 500 mL com água destilada) e 200 mL de TBE 5x em um volume de um litro. Utiliza-se 120 mL da solução estoque de acrilamida 6%, 960  $\mu\text{L}$  de APS e 50  $\mu\text{L}$  de Temed.

As corridas foram realizadas em placas de 20 cm de altura, a 300 V e durava cerca de 2 horas. O tampão utilizado para o preparo do gel e na cuba foi o TBE 1x.

A coloração com prata foi feita seguindo nove etapas:

1. Fixação (20 mL ácido acético glacial, 200 mL de álcool etílico 96% e 1780 mL água destilada) – 10 minutos.
2. Enxágue (2000 mL de água destilada) – 1 minuto.
3. Pré-tratamento (30 mL de ácido nítrico e 1970 mL de água destilada) – 3 minutos.
4. Enxágue (2000 mL de água destilada) – 1 minuto.
5. Impregnação (4 g de nitrato de prata e 2000 mL de água destilada) – 20 minutos.
6. Enxágue (2000 mL de água destilada) – 1 minuto.
7. Revelação (45 g de carbonato de sódio e 1500 mL de água destilada e 810 µl de formaldeído 37%) – 4 a 7 minutos.
8. Stop (100 mL de ácido acético glacial e 1900 mL de água destilada) – 5 minutos.
9. Enxágue (2000 mL de água destilada) – 1 minuto

Depois da coloração, os géis foram fotodocumentados em sistema digital L.Pix Image (Loccus Biotecnologia).

### **3.6. Análise de bulks segregantes**

A técnica de análise de bulks segregantes proposta por Michelmore et al. (1991) foi usada juntamente com os marcadores moleculares RAPD e SSR para identificar uma marca ligada ao gene da apomixia.

Primeiramente, todos os primers de RAPD e de SSR foram testados nos genitores e apenas os polimórficos entre eles foram testados nos bulks contrastantes.

Os bulks contrastantes foram construídos com base nos resultados obtidos pelas análises citoembriológicas do modo de reprodução de 107 híbridos (Bitencourt et al., 2007). Cinco bulks apomíticos e cinco bulks sexuais foram

montados com quantidades equimolares de DNA (5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) de híbridos apomíticos e sexuais, respectivamente.

Os marcadores que foram polimórficos entre os bulks podem estar geneticamente ligados ao loco que determina a característica usada para construir os bulks, a apomixia, e foram testados nos híbridos individualmente.

### **3.7. Análise de ligação**

A análise de ligação foi conduzida pelo software GQMOL (Cruz e Schuster, 2004) e um mapa de ligação foi gerado. O valor de LOD usado foi três e a função de Kosambi foi usada para converter unidades de recombinação em distância genética.

Um teste de qui-quadrado foi utilizado para testar a hipótese de segregação 1:1 da marca encontrada, utilizando a fórmula:  $\chi^2 = \sum (O - E)^2 / E$ , em que O é o número de eventos observado e E é o número de eventos esperado. Para este teste, foi estabelecido o nível de significância  $\alpha = 5\%$ . Assim, foi rejeitada a hipótese de nulidade quando observou a probabilidade de significância (valor p) menor que  $\alpha = 5\%$ .

### **3.8. Eficiência de seleção**

A eficiência de seleção (ES) da marca ligada ao locus da apomixia foi calculada com base na comparação entre o fenótipo e o genótipo (marcador), conforme descrito por Silva et al. (2007). Somente indivíduos não segregantes foram considerados para a estimativa da eficiência de seleção, que foi calculada pela fórmula:  $ES = 100[(MFMF + mfmf) / (MM + mm)]$ , em que MFMF é o número de indivíduos selecionados corretamente para a apomixia, baseado na avaliação do marcador e do fenótipo; mfmf é o número de indivíduos selecionados corretamente para a sexualidade, baseado na avaliação do marcador e do fenótipo; MM + mm é o número total de indivíduos selecionados, baseado somente no marcador, apomixia e sexualidade, respectivamente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Marcadores RAPD

Foram testados 217 primers RAPD nos genitores, totalizando 651 reações, isso porque, para cada primer testado, foi feita uma reação adicional de controle negativo, como já mencionado. Os resultados observados nos genitores estão resumidos no Quadro 2.

Os 176 primers polimórficos entre os genitores foram testados nos 10 bulks contrastantes (cinco bulks apomíticos e cinco bulks sexuais) e, novamente, nos genitores para verificar a reprodutibilidade das bandas amplificadas totalizando 2.288 reações, pois foram incluídos, também, os controles negativos. Caso a estratégia de BSA não tivesse sido adotada neste trabalho, seriam necessárias 19.360 reações para testar esse mesmo número de primers nos 107 indivíduos da progênie, dois genitores e controle negativo.

A seleção assistida por marcadores tem sido prioridade em programas de melhoramento de diversas culturas. Estes marcadores moleculares estão muitas vezes associados à técnica da análise de bulk segregante, visto que, além da economia de reagentes e de géis necessários, há também uma economia de tempo nas análises. Esta combinação tem sido utilizada na busca de marcas ligadas a características de interesse, tal como genes de resistências a pragas (Kim et al., 2008) e determinação de sexo (George et al., 2007).

Muitos trabalhos que utilizam BSA podem ser citados: Paran e Michelmore (1993), que identificaram marcadores RAPD e RFLP ligados a genes de resistência ao míldio em alface; Schuster et al. (2001), que encontraram seis marcadores moleculares associados à resistência da soja ao nematóide de cisto da soja e Ozias-Askins et al. (1992), que identificaram a região genômica apomítica após retrocruzamentos entre espécies apomíticas de *Pennisetum squamulatum* e espécies cultivadas sexuais de milho (*P. glaucum*).

Quadro 2 - Número de primers RAPD polimórficos e monomórficos entre os genitores (H16 e H31) e suas respectivas porcentagens

	Número de primers	Porcentagem
Primers polimórficos entre H16 e H31	176	81,10%
Primers monomórficos entre H16 e H31	9	4,15%
Primers não amplificados	32	14,75%
Total	217	100%

Para a montagem dos bulks é muito importante uma análise fenotípica precisa, uma vez que qualquer erro na fenotipagem das plantas acarreta erros nas análises moleculares. Assim, todos os híbridos selecionados para esse experimento, tiveram pelo menos 60 ovários analisados para a determinação de seu modo de reprodução. Essas análises foram realizadas por Bitencourt et al. (2007).

A presença de um marcador molecular no genitor masculino (apomítico) e nos bulks apomíticos e sua ausência no genitor feminino (sexual) e nos bulks sexuais seria um indicativo de ligação desse marcador com a característica apomixia. Somente sete primers de RAPD (3,98%) apresentaram um marcador cada com esse perfil. Foram eles:

1. primer 10 (5'-CCA CAG CAG T-3')
2. primer 28 (5'-AAG GCT CGA C-3')
3. primer 43 (5'-ACG CAA GTG G-3')
4. primer 64 (5'-TTT TGC CCC C-3')
5. primer 78 (5'-ACG GAC GTC A-3')
6. primer 99 (5'- CAG CCT ACC A-3')
7. primer E-03 (5'CCA GAT GCA C-3').

A Figura 8 exemplifica o perfil obtido com o primer 64 e o marcador amplificado apenas no genitor masculino e nos bulks apomíticos.

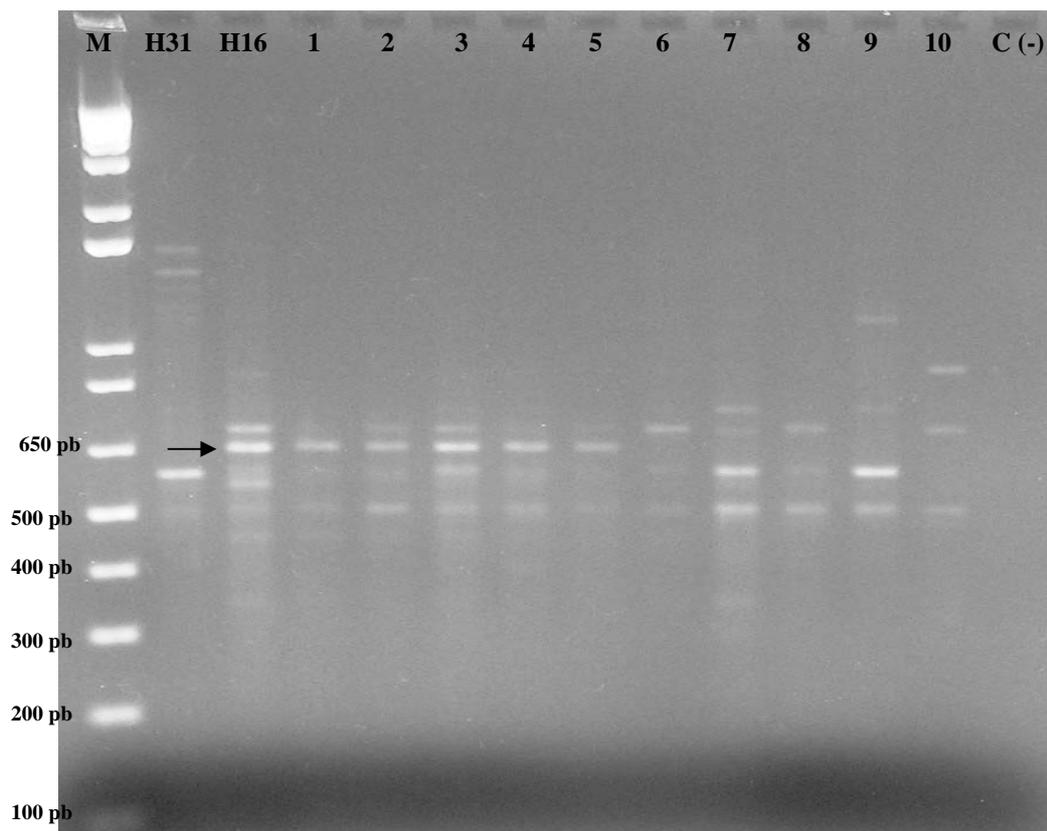


Foto: Cristiane Zorzatto

Figura 8 - Perfil de RAPD obtido com o primer 64 para os genitores H31(genitor feminino) e H16 (genitor masculino), e bulks contrastantes, de 1 a 5 (bulks apomíticos) e 6 a 10 (bulks sexuais). M é o marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen) e C(-) é o controle negativo. Na seta a marca molecular presente no H16 e nos bulks apomíticos.

Visando confirmar se esses marcadores presentes no genitor e nos bulks apomíticos estariam ligados à apomixia, foram feitas reações de RAPD com esses sete primers em todos os 107 indivíduos da progênie e nos genitores. Também foi incluído um controle negativo para cada primer num total de 770 reações.

As marcas obtidas pelos primers 10, 28, 78, 99 e E-03 não segregaram na razão esperada. Somente uma marca molecular amplificada pelo primer 64 segregou na razão esperada de 1:1 na progênie de *B. humidicola*. A Figura 9A e 9B exemplificam parte dos 107 híbridos testados com o *primer* 64. Essa segregação foi confirmada pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2_{0.05}=0.46$ ) (Quadro 3). A marca apresentou aproximadamente 650 pb, e foi denominada de 64\_650.

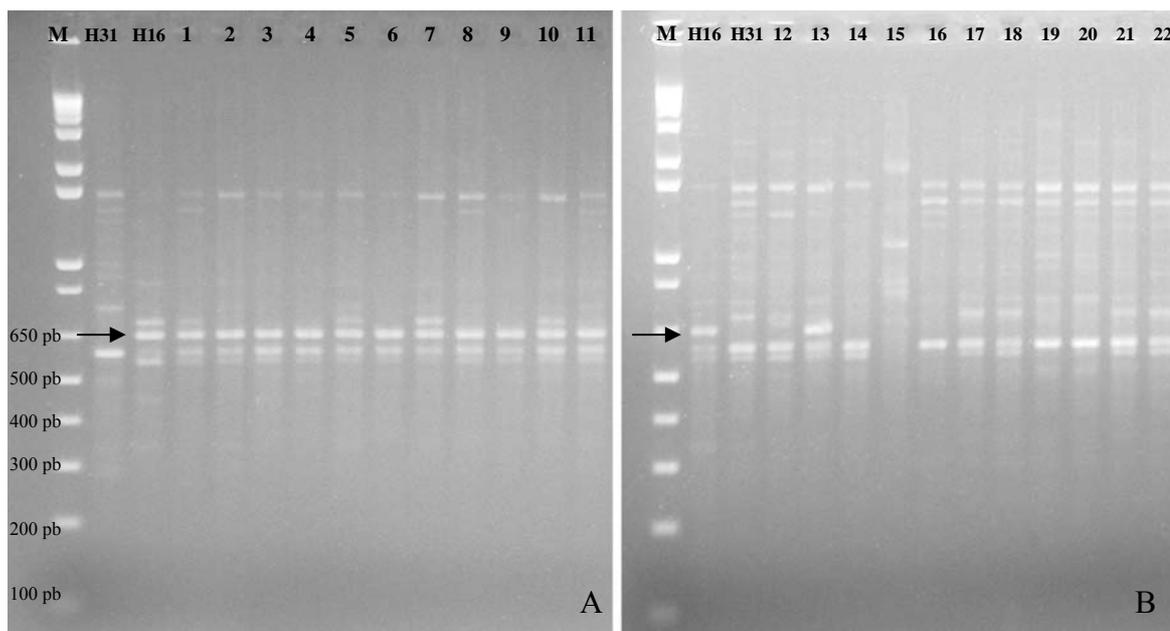


Foto: Cristiane Zorzatto.

Figura 9A e 9B - Perfil de RAPD obtido com o primer 64 para os genitores H31(genitor feminino) H16 (genitor masculino), 1 a 11 (híbridos apomíticos), 12 a 22 (híbridos sexuais) e M (marcador de peso molecular 1 kb *plus DNA ladder*). A seta indica a marca molecular 64\_650 presente no H16 e nos bulks apomíticos.

Meios de determinar o modo de reprodução em progênes híbridas são, Segundo Hanna (1995), essenciais para programas de melhoramento genético. Isoenzimas, marcadores RFLP e, mais recentemente, os RAPD, AFLP e SSR têm sido utilizados para a identificação de regiões do genoma associadas às características de herança simples (monogênicas ou oligogênicas) de importância econômica, uma vez que as variações fenotípicas são de difícil mensuração ou análise (Chiari e Cañado, 2008). Este é o caso da apomixia em gramíneas do gênero *Brachiaria* que aponta para uma herança monogênica e dominante sobre a sexualidade (Valle et al., 1994).

Os marcadores RAPD são bastante estudados e apresentam inúmeras aplicações nos setores agrônomicos e florestais, tais como: análise de estrutura e diversidade genética em populações naturais, de melhoramento e de bancos de germoplasma; construção de mapas genéticos e mapeamento de locus de características quantitativas.

Inúmeros trabalhos podem ser citados mostrando a eficiência do marcador RAPD na seleção de genes ligados a características de interesse, como exemplo, o

marcador OPK17, usado no programa de incorporação do gene de resistência à brusone em cultivares de arroz (Araújo e Prabhu, 2004). Domingues et al. (2006) testaram 81 primers e apenas o primer OPG-16 apresentou uma banda polimórfica entre indivíduos de uma progênie de *Eucalyptus grandis* que florescem em tempo normal e precocemente.

Em *Brachiaria*, Pessino et al. (1997), usando RAPD, identificaram um marca molecular amplificada pelo primer OPC4 que co-segregou com a apomixia em uma população resultante do cruzamento entre *B. ruziziensis* (R44, sexual) e *B. brizantha* cv. Marandu (apomítica).

Quadro 3 - Análise de Qui-quadrado da marca molecular 64\_650

Modo de reprodução	Número de plantas		Cálculo do Qui-quadrado ( $\chi^2$ )	
	Apo	Sex	Razão esperada	$\chi^2$
	52	55	1:1	0,084 <sup>ns</sup>
Marca RAPD	“1”	“0”	Razão esperada	$\chi^2$
64_650 RAPD	57	50	1:1	0,46 <sup>ns</sup>

Apo = plantas apomíticas

Sex = plantas sexuais

“1” = presença da marca molecular 64\_650 RAPD

“0” = ausência da marca molecular 64\_650 RAPD

ns = valor não significativo para o teste de Qui-quadrado ( $P = 0.05$ )

A análise de ligação foi feita pelo programa GQMOL e revelou que essa marca 64\_650 co-segrega com a apomixia em *B. humidicola*. O mapa de ligação construído usando a função de Kosambi mostrou uma distância de 4.61 cM entre a marca e o *locus* da apomixia (*apo-locus*) (Figura 10).

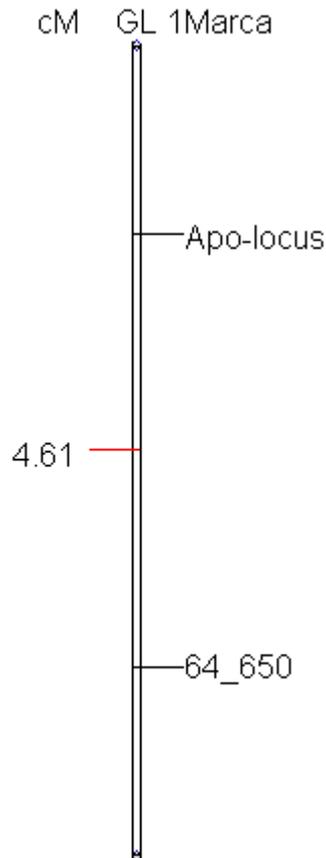


Figura 10 - Mapa de ligação mostrando a posição da marca molecular 64\_650 e o loco da apomixia em *B. humidicola*. À direita encontram-se as denominações para os locos e a esquerda a distância estimada.

Dos 52 híbridos apomíticos, todos apresentaram a marca molecular 64\_650, e dos 55 híbridos sexuais apenas cinco apresentaram a mesma, indicando uma frequência de recombinação entre a marca molecular 64\_650 com o *locus* da apomixia de 4,6%. O valor do LOD score foi de 23,44.

Estes cinco híbridos sexuais que apresentaram a banda podem ser entendidos como indivíduos recombinantes, ou seja, na formação destes, houve uma permuta genética ou crossing over, que é a troca de material genético entre cromossomos homólogos. A frequência de permuta é influenciada pela distância do gene e da marca. Existe, portanto, correlação positiva entre a distância e a frequência de recombinação entre eles. É importante frisar que um gene e uma marca distante a 50 cM ou mais apresentam segregação semelhante à distribuição independente e podem estar em cromossomos diferentes. Ao contrário, se a distância foi menor que 50 cM, a marca e o gene estão em um mesmo cromossomo

e constituem um grupo de ligação. Assim, a marca molecular 64\_650 e o gene da apomixia estão em um mesmo grupo de ligação, porém com ligação parcial, uma vez que existe uma frequência de recombinação entre os mesmos.

O mapeamento da região que contém o gene da apomixia em *Brachiaria* foi realizado por Pessino et al. (1997, 1998) em uma população híbrida derivada de um cruzamento entre *Brachiaria brizantha* (apomítica) e *Brachiaria ruziziensis* (sexual). Esta população F1 com 43 híbridos segregantes para modo reprodutivo foi estudada usando BSA e marcadores moleculares RFLP (um conjunto de clones de milho), AFLP e RAPD. Um mapa genético foi construído e foram encontradas marcas moleculares a uma distância de 1,2 e 5,7 cM a partir de ambos os lados do apo-locus. Verificaram que um grupo de genes ligados, derivados do cromossomo 5 do milho, estava relacionado com o locus apospórico em *Brachiaria*, evidenciando alta homologia com áreas cromossômicas em arroz e milho.

Embora os marcadores RAPD sejam ferramentas úteis em virtude de sua facilidade de utilização, eles são dominantes e sensíveis a pequenas alterações das condições de amplificação, tendo, assim, baixa reprodutibilidade, além de outras desvantagens, como ambiguidade na interpretação das bandas e co-migração de fragmentos de igual tamanho (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Para aumentar a confiabilidade desses marcadores, Paran e Michelmore (1993) desenvolveram os marcadores SCAR, que amplificam regiões específicas do DNA genômico.

Portanto, o próximo passo deste trabalho é converter esse marcador 64\_500 em um marcador SCAR e testar sua transferibilidade dentro da espécie *B. humidicola* e em outras espécies do gênero *Brachiaria* de importância econômica, tais como: *B. brizantha*, *B. ruziziensis*, *B. dictyoneura* e *B. decumbens*. A transferibilidade desse marcador será de extrema relevância para o programa de melhoramento de *Brachiaria*, uma vez que a identificação da apomixia será muito mais rápida.

A eficiência de seleção do marcador 64\_650 ao locus da apomixia foi calculada e mostrou-se alta (95,6%). A presença de outras marcas poderia ampliar essa eficiência de seleção. Por isso, partiu-se então para a busca de marcadores do tipo SSR.

## 4.2. Marcadores microsatélites

Os 10 primers de SSR polimórficos para *B. humidicola* foram testados nos genitores (H31 e H16), totalizando 20 reações de SSR. Essas reações foram primeiramente aplicadas em gel de agarose 3%, para verificar a amplificação das bandas, pois o preparo e coloração do gel de poliacrilamida é muito trabalhoso.

Todos os primers testados no gel de agarose apresentaram polimorfismo entre os genitores. Dessa maneira, todos foram utilizados para amplificação nos 10 bulks contrastantes em gel de poliacrilamida 6%, incluindo também os genitores, totalizando 120 reações. Caso a estratégia de BSA não tivesse sido adotada neste trabalho seriam necessárias 1.090 reações para testar esse mesmo número de primers nos 107 indivíduos da progênie e nos dois genitores.

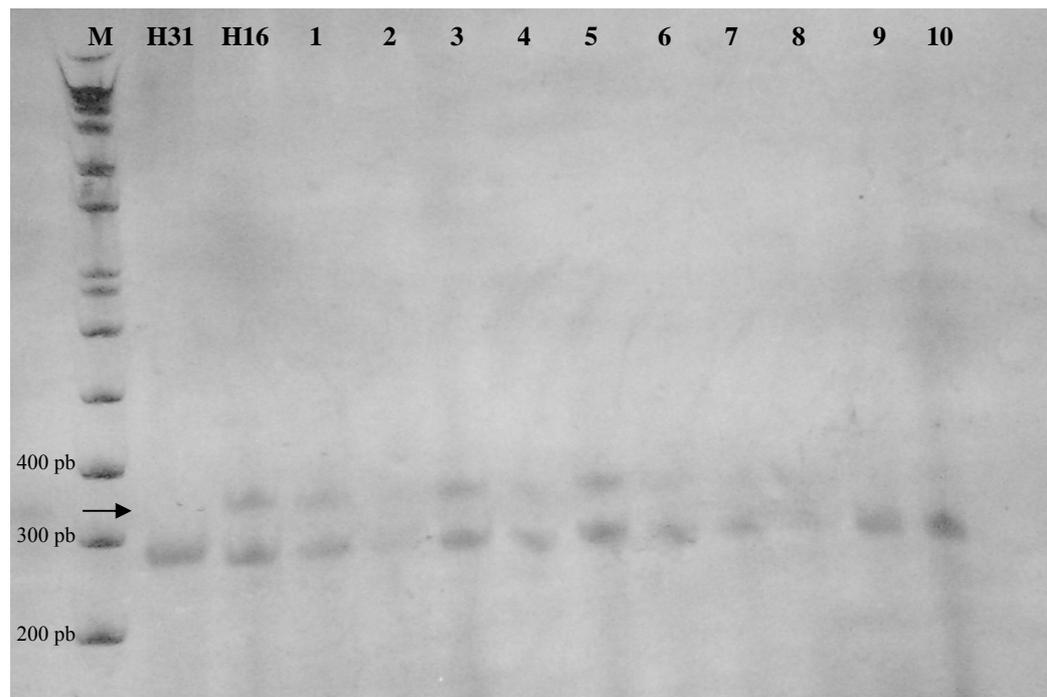


Foto: Cristiane Zorzatto

Figura 11 - Perfil de SSR em gel de poliacrilamida 6% obtido com o par de primers H11 e H12 para os genitores H31 (genitor feminino) e H16 (genitor masculino), e para os bulks 1 a 5 (bulks apomíticos) e 6 a 10 (bulks sexuais). M é o marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). Na seta a marca molecular presente no H16 e nos bulks apomíticos.

Nove primers SSR não apresentaram polimorfismo entre os bulks apomíticos e sexuais. Um único par de primers, H11 e H12, apresentou uma marca

molecular apenas no genitor masculino e nos bulks apomíticos, como pode ser observado na Figura 11.

Para confirmar se essa marca polimórfica estaria ligada à apomixia em *B. humidicola*, foram feitas reações com esse par de primers em todos os 107 indivíduos da progênie e nos genitores, totalizando 109 reações.

Com a análise dessa marca obtida pelo par de primers H11 e H12 em todas as plantas não se observou segregação 1:1 na mesma.

Os microssatélites já estão sendo utilizados em larga escala para as principais espécies de importância agrícola e nas espécies modelos. Em breve, eles se tornarão os marcadores mais comuns nos laboratórios. Muitos mapas genéticos são construídos com a utilização de marcadores moleculares dos tipos RAPD, RFLP, SCAR e isoenzimas, ligados a genes de características de interesse agrícola. Contudo, é fundamental a incorporação de marcadores microssatélites (SSR) nestes mapas, por se tratarem de marcadores âncoras dentro de uma espécie, ou seja, podem ser utilizados em várias populações e, muitas vezes, entre espécies de um mesmo gênero.

Baseado nesses resultados, sugere-se a continuidade das análises, aumentando o número de primers SSR, tão logo eles sejam disponibilizados para essa espécie.

A disponibilidade de um mapa molecular da apo-região em *Brachiaria humidicola* tem implicações para o desenvolvimento futuro do melhoramento genético desta gramínea, muito importante comercialmente, fornecendo uma ferramenta eficaz para a rápida, viável e precoce determinação do modo de reprodução das progênies. Poderá também ser utilizados para o isolamento do gene que determina a apomixia nesta espécie.

Por último, a identificação e caracterização das regiões genômicas envolvidas no fenômeno da apomixia nas diferentes espécies é um passo inicial e fundamental no processo de introdução dessa característica em plantas cultivadas de grande interesse comercial. Assim, a apomixia poderá ser incorporada como uma ferramenta na produção agrícola e aumentar a produção de alimentos.

## 5. CONCLUSÕES

a) Marcadores moleculares RAPD mostraram-se eficientes na construção de mapa de ligação devido à sua alta cobertura genômica e poderão contribuir na localização e isolamento do gene da apomixia em *Brachiaria humidicola*.

1. b) A marca molecular 64\_650 está ligada à apomixia a uma distância de 4,61 cM na progênie F1 segregante de *B. humidicola*.

2. c) A eficiência de seleção dessa marca (64\_650) para a apomixia foi alta (95,6%) e, portanto, é de extrema importância para garantir a eficiência na seleção precoce de híbridos apomíticos em progênies de *B. humidicola* derivadas desse mesmo cruzamento.

3. d) Nenhuma marca SSR foi encontrada ligada à apomixia na progênie de *B. humidicola*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, P.B.; BUFARAH, G. **Plantas forrageiras: gramíneas e leguminosas**. São Paulo: Nobel, 1992. 162p.
- ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, 30:333-342, 2005.
- ANTONIUS, K.; NYBOM, H. Discrimination between sexual recombination and apomixis in a *Rubus* plant-breeding programme. **Hereditas**, 123:205-213, 1995.
- ARAÚJO, A.C.G.; NÓBREGA, J.M.; POZZOBON, M.T.; CARNEIRO, V.T.C. Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, 144:39-50, 2005.
- ARAÚJO, L.G.; PRABHU, A.S. Eficiência do marcador RAPD OPK17 para seleção do gene PI-AR de resistência à brusone em arroz. **Revista Anhangüera**, 5:97-10, 2004.
- ARAÚJO, S.A.C.; DEMINICIS, B.B.; CAMPOS, P.R.S.S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Archivos de Zootecnia**, 5:61-76, 2008.
- ASKER, S.E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC, 1992. 298p.
- BARCACCIA, G.A.; MAZZUCATO, E.; ALBERTINI, J.; ZETHOF, M.; PEZZOTTI, A.; GERATS.; M. FALCINELLI. Inheritance of parthenogenesis in *Poa pratensis* L.: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. **Theoretical and Applied Genetics**, 97:74-82, 1998.
- BASHAW, E.C.; HOVIN, A.W.; HOLT, E.C. Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: 11 INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, Queensland, 1970. **Proceedings...** Queensland: Surfers Paradise, 1970. p. 245-247.

- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M.A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (*Poaceae*) species. **Cytobios**, 104:157-171, 2001.
- BEYERMANN, B.; NURNBERG, P.; WEIHE, A.; MEIXNER, M.; EPPLER, J.T. Fingerprint plant genomes with oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. **Theoretical and Applied Genetics**, 83:691-694, 1992.
- BITENCOURT, G.A.; CHIARI, L.; VALLE, C.B.; LEGUIZÁMON, G.O.C. **Uso de marcadores RAPD na identificação de híbridos e análise citoembriológica do modo de reprodução em *Brachiaria humidicola***. Campo Grande: Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da região do Pantanal, 2007, 19p. Monografia (Curso de graduação em Ciências Biológicas).
- BOGDAN, A.V. **Tropical pastures and fodder crops**. New York: Longman, 1977. 475p.
- BONATO, A.L.V.; VALLE, C.B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S.; LEGUIZAMON, G.O.C. **Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum maximum***. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte-CNPGC, 2002. 4p. (Comunicado Técnico, 79).
- BURTON, G.W.; FORBES, I. The genetics and manipulation of obligate apomixis in common Bahia grass (*Paspalum notatum* Flugge). In: 7º INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, Palmerston North, 1960. **Proceedings...** Palmerston North, 1960. p. 66-71.
- CARMAN, J.G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. **Biological Journal of the Linnean Society**, 61:51-94, 1997.
- CARNEIRO, V.T.C.; DUSI, D.M.A. Apomixia: em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 25:36-42, 2002.
- CARNEIRO, V.T.C.; DUSI, D.M.A.; ORTIZ, J.P.A. Apomixis: occurrence, applications and improvements. In: SILVA, J.A.T. (ed.). **Floriculture, ornamental and plant biotechnology**. Brasília: Global Science Books, 2006. p. 564-571.

CHIARI, L.; BITENCOURT, G.A.; SALGADO, L.R.; VALLE, C.B.; LEGUIZAMÓN, G.O.C. Identificação precoce de híbridos de *Brachiaria humidicola* por marcadores moleculares. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO DE FORRAGEIRA, Campo Grande, 2007. **Anais...** Campo Grande: EMBRAPA CNPGC, 2007. p.1-3.

CHIARI, L.; CANÇADO, L.J. Marcadores genéticos no melhoramento de forrageiras. In: RESENDE, R.M.S.; VALLE, C.B.; JANK, L. (eds.). **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008. p. 163-193.

CRANE, C.F.; CARMAN, J.G.; Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from eastern Australia and New Zealand. **American Journal of Botany**, 74:477-496, 1987.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver satining. **Plant Molecular Biology Reporter**, 19:299-306, 2001.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 2.1. Viçosa: UFV, 2004.

DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, 11:127-133, 2005.

DOMINGUES, D.S.; FARRO, A.P.C.; COSCRATO, V.E.; MELLO, E.J.; ODA, S.; MARINO, C.L. Identificação de marcador RAPD e SCAR relacionados ao caractere florescimento precoce em *Eucalyptus grandis*. **Ciência Florestal**, 16:251-260, 2006.

FALEIRO, G.F. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

FELISMINO, M.F.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; RESENDE, R.S. Avaliação da viabilidade polínica em acessos e híbridos de *Brachiaria* (Poacea: paniceae). In:

52º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. Foz do Iguaçu, 2006. , 2006. **Resumos CD-ROM...** Ribeirão Preto/Foz do Iguaçu: SBG, 2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220p.

FERREIRA, R.P.; PEREIRA, A.V. Melhoramento de forrageiras. In: BORÉM A. (ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 781-812.

GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Apomixia: um método alternativo para a produção de sementes em plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, 6:157-170, 2000.

GEORGE, J.; KARUM, A.; MANIMEKALAI, R.; RAJESH, M.K.; REMYA, P. Identification of RAPD markers linked to sex determination in palmyrah (*Borassus flabellifer* L.). **Scientific Correspondence**, 93:1075-1077, 2007.

GOBBE, J.; SWENNE, A.; LOUANT, B.P. Diploides naturels et autotétraploïdes induits chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard: critères d'identification. **Agronomie Tropicale**, 36:339-346, 1981.

GRIMANELLI, D.; HERNANDEZ, M.; PEROTTI, E. Dosage effects in the endosperm of diplosporous apomictic *Tripsacum* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, 10:279-282, 1997.

GRIMANELLI, D.; LEBLANC, O.; ESPINOSA, E. Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes? **Heredity**, 80:33-39, 1998a.

- GRIMANELLI, D.; LEBLANC, O.; ESPINOSA, E. Nonmendelian transmission of apomixis in maize-*Tripsacum* hybrids caused by a transmission rate distortion. **Heredity**, 80:40-47, 1998b.
- GRISEBACH, A. Gramineae. In: LEDEBOUR, C.F. (ed.). **Flora rossica**. Stuttgart: Librariae E. Schwizerbart, 1853. p. 447-469.
- GUSTINE, D.L.; SHERWOOD, R.T.; HUFF, D.R. Apospory-linked molecular markers in buffelgrass. **Crop Science**, 37:947-951, 1997.
- HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA**, 79:6465-6469, 1982.
- HANNA, W.W. Use of apomixis in cultivar development. In: SAPRKS, D.L. (ed). **Advances in Agronomy**. New York: Academic Press, 1995. p. 333-350.
- HANNA, W.W.; BASHAW, E.C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, 27:1136-1139, 1987.
- HERR, J.M. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. **American Journal of Botany**, 58:785-790, 1971.
- KELEMU, S.; THOMAS, R.J.; MORENO, C.X.; OCAMPOS, G.I. Strains of *Bradyrhizobium* from tropical forage legumes inhibit *Rhizoctonia solani* AG-1 in vitro. **Australasian Plant Pathology**, 24:168-172, 1995.
- KELLER-GREIN, G.; MAASS, B.L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germoplasm collections. In: MILES, J.W.; MASS, B.L.; VALLE, C.B. Do. (ed.) **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 16-42.
- KIM, G.H.; YUN, H.K.; CHOI, C.S.; PARK, J.H.; JUNG, Y.J.; PARK, K.S.; DANE, F.; KANG, K.K. Identification of AFLP and RAPD markers linked to

anthracnose resistance in grapes and their conversion to SCAR markers. **Plant Breeding**, 127:418-423, 2008.

KOLTUNOW, A.M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell**, 5:1425-1437, 1993.

KOLTUNOW, A.M.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis: a developmental perspective. **The Annual Review of Genetics**, 54:547-74, 2003.

KOLTUNOW, A.M.; JOHNSON, S.D.; BICKNELL, R.A. Apomixis is not developmentally conserved in related, genetically characterized *Hieracium* plants of varying ploidy. **Sexual Plant Reproduction**, 12:253-266, 2000.

LEBLANC, O.; GRIMANELLI, D.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D. Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 90:1198-1203, 1995.

LEBLANC, O.; MAZZUCATO, A. Screening procedures to identify and quantify apomixis. In: SAVIDAN, Y.; CARMAN, J.G.; DRESSELHAUS, T. (eds.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. El Batán: CIMMYT, 2001. p. 121-136.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Journal of Human Genetics**, 44:398-491, 1989.

LUTTS, S.; NDIKUMANA, J.; LOUANT, B.P. Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F<sub>1</sub> hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. **Euphytica**, 78:19-25, 1984.

MACEDO, M.C.M. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: BARBOSA, R.A. (ed.). **Morte de Pastos de Braquiárias**. Campo Grande: Embrapa, 2006. p. 35-63.

MARTÍNEZ, E.J.; URBANI, M.H.; QUARIN, C.L. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. **Hereditas**, 135:19-25, 2001.

- MENDES-BONATO, A.B.; JUNQUEIRA FILHO, R.G.; PAGLIARINI, M.S.; DO VALLE, C.B. Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. **Cell Biology International**, 26: 641-646, 2002.
- MENDES-BONATO, A.B.; RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Chromosome number and meiotic behavior in *Brachiaria jubata* (Gramineae). **Journal of Genetics**, 85:83-87, 2006.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I.; KESSELLI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 88:9828-9832, 1991.
- MILES, J.W.; VALLE, C.B. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In: MILES, J.W., MASS, B.L.; VALLE, C.B. (eds.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Colombia: CIAT, 1996. p. 164-177.
- MORO, G.V. **Seleção assistida por marcadores moleculares**. Disponível em: <http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/GVMoro-200801-Resumo.pdf>. Acesso em: 15, setembro, 2008.
- MORRONE, O.; ZULOAGA, F.O. Revisión de las especies sudamericanas nativas y introducidas de los Géneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Darwiniana**, 31:43-109, 1992.
- NELSON, S.C.H.; FERNÁNDEZ, C.F.J. De flora hondurensi notulae, praecipue nomenclaturales. **Fontqueria**, 51:3-4, 1998.
- NETO, N.E. **Estudo da reprodução vegetativa, aspectos fenológicos e marcadores moleculares para a leguminosa *Discolobium Benth*, nativa do Pantanal Mato-grossense**. Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso, 2004. 99p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical).
- NGENDAHOYO, M. **Mécanismes de la reproduction dans le genre *Brachiaria* Gris. et stratégies d'amélioration et de sélection**. Louvain: Université Catholique de Louvain, 1988. 165p. Tese (Doutorado em Fitotecnia).

- NOGLER, G.A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, B.M (ed.). **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 475-518.
- NOGLER, G.A. How to obtain diploid apomictic *Ranunculus auricomus* plants not found in the wild state. **Botanica Helvetica**, 92:13-22, 1982.
- ORTIZ, J.P.A.; PESSINO, S.C.; LEBLANC, O.; HAYWARD, M.D.; QUARIN, C.L. Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. **Theoretical and Applied Genetics**, 95:850-856, 1997.
- OZIAS-AKINS, P.; DIJK, P.J.V. Mendelian genetics of apomixis in plants. **The Annual Review of Genetics**, 41:509-37, 2007.
- OZIAS-AKINS, P.; LUBBERS, E.L.; HANNA, W.; MCNAY, J.W. Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:632-638, 1993.
- OZIAS-AKINS, P.; ROCHE, D.; HANNA, W.W. Tight clustering and hemizigosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent *locus* that may have no allelic form in sexual genotypes. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, 95:5127-5132, 1998.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:985-993, 1993.
- PARSONS, J. Spread of African pasture grasses to the American tropics. **Journal of Range Management**, 25:12-17, 1972.
- PENTEADO, M.I.O.; SANTOS, A.C.M.; RODRIGUES, I.F.; VALLE, C.B.; SEIXAS, M.A.C.; ESTEVES, A. **Determinação do nível de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria***. Campo Grande – MS. Boletim de Pesquisa Embrapa Gado de Corte, 2000, 89p. (Documentos, 154).

- PEREIRA, A.V.; VALLE, C.B.; FERREIRA, R.P.; MILES, J.W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L.L.; VALOIS.; A.C.C.; MELLO, I.S.; VALADARES-INGIS, M.C. (eds.). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 550-601.
- PESSINO, S.C.; EVANS, C.; ORTIZ, J.P.A.; ARMSTEAD, I.; VALLE, C.B.; HAYWARD, M.D. A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. **Hereditas**, 128:153-58, 1998.
- PESSINO, S.C.; ORTIZ, J.P.A.; LEBLANC, O.; VALLE, C.B.; HAYWARD, M.D. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. **Theoretical and Applied Genetics**, 94:439-444, 1997.
- PUPO, N.I.H. **Manual de pastagens e forrageiras**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1980. 344p.
- RENVOIZE, S.A.; CLAYTON, W.D.; KABUYE, C.H.S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. (eds.). ***Brachiaria: biology, agronomy and improvement***. Cali: CIAT, 1996. p.147-163.
- RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems**. Londres: Chapman e Hall, 1997. 529p.
- RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARIANI, M.S.; VALLE, C.B. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetics Research Crop Evolution**, 53:7-10, 2006.
- SALERNO, A.R.; VETTERLE, C.P.; DESCHAMPS, F.C.; FREITAS, E.A.G. **Gramíneas forrageiras estivais perenes no baixo vale do Itajaí**. Florianópolis-SC:Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina, Florianópolis. 1990. (Boletim Técnico, 49.)

- SANTOS FILHO, L.S. Seed production: perspectivas from the Brazilian private sector. In: MILES, J.W.; MASS, B.L.; VALLE, C.B. (eds.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 141-146.
- SAVIDAN, Y. **Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq.** Paris: ORSTOM, 1982. 159p.
- SCHUSTER, I.; ABDELNOOR, R.V.; MARIN, S.R.R.; CARVALHO, V.P.; KIHIL, R.A.S.; SILVA, J.F.V.; SEDIYAMA, C.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theoretical and Applied Genetics**, 102:91-96, 2001.
- SENDULSKY, T. *Brachiaria*: taxonomy of cultivated and native species in Brazil. **Hoehna**, 7:99-139, 1978.
- SHERWOOD, R.T. Genetic analysis of apomixis. In: SAVIDAN, Y.; CARMAN, J.G.; DRESSELHAUS, T. **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. El Batan: CIMMYT, 2001. p. 64-82.
- SHERWOOD, R.T.; BERG, C.C.; YOUNG, B.A. Inheritance of apospory in buffelgrass. **Crop Science**, 34:1490-1494, 1994.
- SILVA, M.F.; SCHUSTER, I.; SILVA, J.F.V.; FERREIRA, A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Validation of microsatellite markers for assisted selection of soybean resistance to cyst nematode races 3 and 14. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42:1143-1150, 2007.
- SMITH, L.B.; WASSHAUSEN, D.C.; KLEIN, R.M. **Gramíneas. Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1982. 504p.
- SWENNE, A.; LOUANT, B.P.; DUJARDIN, M. Induction par la colchicines de formes autotétraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). **Agronomie Tropicale**, 36:134-141, 1981.

- TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukariotic genomes. **Nucleic Acids Research**, 12:4127-4138, 1984.
- TORRES, J.A.M; ROSA, F.R.T; NOGUEIRA, M.P. Mais boi em menos pasto. **Revista de Agronegócios da FGV**, 24:37-39, 2004.
- TRINIUS, C.B. **Panicearum genera**. Saint Petersburg: Mémoires de la Académie Scientifique, 1834. 194p.
- UTSUNOMIYA, S.K.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Microsporogenesis in tetraploid accessions of *Brachiaria nigropedata* (Ficalho & Hiern) Stapf (Gramineae). **Biocell**, 29:295-301, 2005.
- VALLE, C.B. **Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1990. 33p. (Boletim de Pesquisa, 46).
- VALLE, C.B. A citogenética e o melhoramento de *Brachiaria*. In: 11º SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO E MELHORAMENTO DE PLANTAS. Lavras, 2007. **Anais...** Lavras: UFLA, 2007, p.84-103.
- VALLE, C.B. **Citologia, modo de reprodução e melhoramento de *Brachiaria***. Disponível em: <http://www.inta.gov.ar/mercedes/grupocampos/IX/Tema%201recoleccion%20evaluacion%20y%20mejoramiento.pdf>. Acesso em: 20, setembro, 2008.
- VALLE, C.B.; BONATO, A.L.V.; PAGLIARINI, M.S.; RESENDE, R.M.S.; JANK, L. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V.T.C.; DUSI, D. M. A. (eds.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília: Embrapa, 2004. p. 47-65.
- VALLE, C.B.; GLIENKE, C. New sexual accessions in *Brachiaria*. **Apomixis Newsletter**, 3:11-13, 1991.
- VALLE, C.B.; GLIENKE, C.; LEGUIZAMON, G.O.C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. **Apomixis Newsletter**, 7:42-43, 1994.

- VALLE, C.B.; SAVIDAN, Y.H. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Miles, J.W.; Maass, B.L.; Valle, C.B. do (eds.). ***Brachiaria: biology, agronomy and improvement***. Colombia: CIAT, 1996. p.47-163.
- VALLE, C.B.; SIMIONI, C.; RESENDE, R.M.S.; JANK, L. Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: RESENDE, R.M.S.; VALLE, C.B.do.; JANK, L. (eds.). **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008. p. 13-53.
- VIGNA, B.; PAIVA, J.; JUNGSMANN, L.; SOUSA, A.C.D.; VALLE, C.B.; SOUZA, A.P. Desenvolvimento e caracterização de microssatélites para *Brachiaria humidicola*, uma gramínea forrageira tropical. In: 53º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. Águas de Lindóia, 2007. **Resumos CD-ROM-GP75...** Ribeirão Preto:SBG, 2007.
- WALTON, P.D. **Production and management of cultivated forages**. Reston: Reston Publishing, 1983. 336p.
- WEISING, K.; WEINGAND, F.; RIESEL, A.J.; KAHL, G.; ZISCHLER, H.; EPPLEN, J.T. Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plants genomes. **Nucleic Acids Research**, 17:120-128, 1989.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.L.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990.
- YOUNG, B.A.; SHERWOOD, R.T.; BASHAW, E.C. Cleared-pistyl and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. **Canadian Journal of Botany**, 57:1668-1672, 1979.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)