

PROSPEÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS À APOMIXIA EM *Panicum maximum* Jacq.

Débora Cristina Agnes¹; Liana Jank²; Gisele Olivas de Campos Leguizamón³; Doroty Mesquita Dourado⁴ Lucimara Chiari²

¹Curso de Ciências Biológicas, Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande/MS. deboraagnes@hotmail.com

²Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande/MS.

³Assistente de pesquisa da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande/MS.

⁴Laboratório de Toxinologia e Plantas Medicinais. Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande/MS.

RESUMO

Entre as principais forrageiras cultivadas no Brasil encontra-se a espécie *Panicum maximum*, gramínea africana que apresenta reprodução apomítica. A apomixia consiste num modo de reprodução assexual com produção de sementes clonais. Essa característica pode ser avaliada por meio de análises citoembriológicas de ovários coletados na planta durante seu florescimento. Diante da possibilidade de antecipação do resultado dessa análise, o objetivo com este trabalho foi buscar marcadores moleculares ligados à apomixia caracterizando-a de forma precoce. Para tanto foram avaliados os genitores: planta sexual S12 e a cultivar apomítica Tanzânia; e 20 híbridos desse cruzamento, caracterizados em apomíticos ou sexuais, pela metodologia citoembriológica. Foram utilizados 76 *primers* RAPD para amplificar o DNA dos genitores e de dois *bulks* contrastantes, um com DNA de 10 plantas apomíticas e outro com 10 plantas sexuais. Foram prospectados marcadores presentes no genitor e no *bulk* apomíticos e ausentes nos sexuais. Dos *primers* testados, sete não amplificaram (9,21%), 60 foram polimórficos entre os genitores (78,95%) e nove foram monomórficos (11,84%). Já nos *bulks*, quatro *primers* (OP1, OP16, OP50 e OP83) foram polimórficos. Os *primers* OP1, OP16 e OP50 amplificaram um marcador no *bulk* apomítico e genitor apomítico e ausente nos demais; e o *primer* OP83 amplificou dois marcadores com esse padrão. Avaliou-se esses marcadores, separadamente, em todos os indivíduos dos *bulks* e ocorreu segregação, ou seja, houve indivíduos apomíticos que não apresentaram a banda e indivíduos sexuais que apresentaram. Porém os resultados não descartam a utilização desses marcadores para selecionar os indivíduos apomíticos, pois a segregação foi menor que 50%. Pode-se concluir que existem cinco potenciais

marcadores RAPD ligados à apomixia em *P. maximum*. Entretanto, para confirmar a co-segregação e avaliar a distância entre esses marcadores e o *locus* da apomixia necessita-se de um maior número de indivíduos fenotipados para modo de reprodução testando-os com esses marcadores.

Palavras-chave: modo de reprodução; ligação gênica; marcadores RAPD; melhoramento genético.

ABSTRACT

Among the main cultivated forage grasses in Brazil is the species *Panicum maximum*, an African grass that presents apomictic reproduction. Apomixis consists of an asexual mode of reproduction with clonal seed production. This characteristic may be evaluated by cytoembriological analysis of the ovaries, collected from the plant during flowering. Due to the need to accelerate this analysis, the objective in this paper was to search for molecular markers linked to apomixis characterizing it precociously. For this, the progenitors sexual plant S12 and the apomictic cultivar Tanzânia and 20 hybrids from this cross were characterized as apomictic or sexual by the cytoembriological method. First, 76 RAPD *primers* were used to amplify the DNA of the progenitors and two contrasting bulks, one with the DNA of 10 apomictic hybrids and another with 10 sexual hybrids. Markers present in the male progenitor and the apomictic bulk and absent in the others were prospected. Of the tested *primers*, seven did not amplify (9,21%), 60 were polymorphic among the progenitors (78,95%) and nine were monomorphic (11,84%). In the *bulks*, four *primers* (OP1, OP16, OP50 and OP83) were polymorphic. The *primers* OP1, OP16 and OP50 amplified a marker in the apomictic *bulk* and the apomictic progenitor and was absent in the rest; the *primer* OP83 amplified two markers with this standard. These markers were separately evaluated in all individuals of the *bulks* and segregation occurred, in other words, there were apomictic individuals that did not present the band and sexual individuals that presented. However, the results do not discard the use of these markers to select apomictic individuals, since the segregation was lower than 50%. It may be concluded that there are five potential RAPD markers linked to apomixis in *P. maximum*. However, to confirm the co-segregation and evaluate the distance between these markers and the apomictic locus, it is necessary to phenotype a greater number of individuals for reproductive mode testing them with these markers.

Keywords: reproductive mode; gene linkage; RAPD markers; breeding.

INTRODUÇÃO

Na pecuária bovina brasileira a produção de carne se faz quase que exclusivamente a pasto, onde as pastagens tropicais são as principais fontes de alimento para os ruminantes (STABILE *et al.*, 2010), resultando no que é denominado “boi verde”. Além disso, a produção a pasto tem grande vantagem competitiva para o mercado brasileiro por viabilizar os custos de produção, tornando o País o maior produtor mundial de carne bovina (CHIARI *et al.*, 2007).

O Brasil explora, atualmente, cerca de 120 milhões de hectares com pastagens cultivadas, que alimentam um rebanho de aproximadamente 170 milhões de bovinos. Segundo Macedo (2005) a região Centro-Oeste é considerada uma das grandes produtoras nacionais de bovinos de corte, com 34% do rebanho brasileiro mantidos em cerca de 50 milhões de hectares de pastagens cultivadas. Grande destaque deve ser dado ao Estado de Mato Grosso do Sul, que possui o segundo maior rebanho bovino do País (19 milhões de cabeças) e uma área de aproximadamente 16 milhões de hectares de pastagens cultivadas (ANUALPEC, 2008).

Apesar de sua importância para o Brasil, a produção pecuária é normalmente feita em solos de fertilidade moderada a baixa e sob ampla gama de condições climáticas. Devido a isto, testes extensivos de um conjunto de recursos genéticos devem ser feitos, a fim de determinar as forrageiras mais adaptadas à sustentabilidade desta cadeia (VALLE, 2002).

Embora a diversidade de gêneros e espécies de forrageiras tropicais seja muito grande, o número de cultivares liberadas e disponíveis no mercado é bastante restrito. Essas poucas cultivares ocupam extensas áreas, o que torna as pastagens brasileiras bastante vulneráveis à ocorrência de pragas, doenças e às mudanças climáticas, colocando em risco todo o sistema de produção animal baseado em pastagem (CHIARI *et al.*, 2007).

Devido à necessidade de novos lançamentos que promovam a diversificação dessas pastagens e garantam a sustentabilidade da cadeia produtiva da carne, a Embrapa Gado de Corte realiza um dinâmico trabalho de melhoramento de forrageiras tropicais. Entre as principais espécies desse programa está *Panicum maximum*, conhecida vulgarmente pelos nomes capim-colômbio, capim-guiné, capim-da-colômbia, entre outros (PESSIM, 2007) que é a espécie forrageira propagada por sementes mais produtiva do mercado brasileiro (JANK *et al.*, 2008). Provavelmente, isso se deve ao seu grande potencial de produção de matéria seca por unidade de área, ampla adaptabilidade, boa qualidade de forragem e facilidade de estabelecimento. Nesse sentido, grande parte da engorda de bovinos no Brasil, até a década de 1980 foi baseada em capim-colômbio (MARTUSCELLO *et al.*, 2007).

A Embrapa Gado de Corte detém o banco de germoplasma de *Panicum maximum*, que é constituído de 426 acessos apomíticos e 417 sexuais (VALLE; JANK; RESENDE, 2009). Esta espécie possui tanto o modo de reprodução apomítico como o sexual.

A apomixia é caracterizada pelo desenvolvimento do embrião a partir de uma célula não-fertilizada, ou seja, a formação do embrião ocorre sem fecundação do gameta feminino pelo masculino (ARAUJO, 2003). Este modo de reprodução possui a vantagem de proporcionar a perpetuação de genótipos superiores com grande precisão, o que se denomina de propagação clonal (MARTUSCELLO *et al.*, 2007). Assim, a descendência contém exatamente a constituição genética da planta-mãe. Não apresentando, portanto, variabilidade genética (VALLE, BITENCOURT, ARCE, 2007). Apesar da não fecundação do embrião, a formação deste depende da fecundação dos núcleos polares pelo grão de pólen (pseudogamia). Essa união dará origem ao endosperma, fundamental para a viabilidade da semente.

O programa de melhoramento da Embrapa baseia-se na hibridização entre genótipos apomíticos, doadores de pólen, e plantas sexuais tetraploidizadas para intercâmbio gênico (MARTUSCELLO *et al.*, 2007). O cruzamento de plantas sexuais e apomíticas de *Panicum maximum* apresenta-se como uma alternativa viável para obtenção de plantas forrageiras superiores no que diz respeito à produção vegetal e consequentemente a produção animal (MARTUSCELLO *et al.*, 2007).

Sendo a apomixia uma característica de herança monogênica, obtendo-se uma proporção de 1:1 para o modo de reprodução na descendência desses cruzamentos, é possível que, a cada geração sejam selecionados os indivíduos para compor as populações recombinantes, até que seja atingido o objetivo do programa de melhoramento (RESENDE *et al.*, 2004). Dessa forma, a determinação do modo de reprodução na progênie F1 é essencial para a continuidade de todo o processo que levará ao desenvolvimento de novas cultivares.

Atualmente a determinação do modo de reprodução de *P. maximum* é realizada por meio de análises citoembriológicas de ovários clarificados, que é um método muito laborioso e só pode ser realizado na planta adulta, pois necessita de inflorescência em antese. Sendo assim, é de extrema relevância que a apomixia seja acessada e quantificada de maneira fácil e precoce, por meio de marcadores moleculares estreitamente ligados a essa característica.

Nesse contexto, uma das estratégias mais eficientes para identificação de marcadores ligados é a combinação do uso de marcadores moleculares e da estratégia de BSA (Bulked Segregant Analysis, em português, Análise de *Bulks* Segregantes), proposta por Michelmore *et al.* (1991).

Esta estratégia consiste na comparação de pelo menos dois *bulks* de DNA, constituídos pela mistura equimolar de amostras de DNA de indivíduos contrastantes para determinada característica como apomixia e sexualidade

resultantes de um único cruzamento. Dentro de cada *bulk*, os indivíduos são identificados para características de interesse, mas são arbitrárias para todos os outros genes. Dois *bulks* contrastantes para uma característica são analisados para identificar marcadores (bandas) que os distinguem (BRAMMER, 2000).

Marcadores polimórficos entre os *bulks* são analisados em todos os indivíduos da população para verificar se há ligação desses marcadores com a característica em questão. O uso de *bulks* segregantes confere velocidade à análise.

Dentre os marcadores moleculares, destaca-se o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), que são baseados na amplificação do DNA pela PCR, utiliza primers de dez nucleotídeos e de sequência arbitrária, não requerendo conhecimento prévio da sequência de DNA a ser amplificada. É um marcador de baixo custo, com menor número de etapas e tempo para obter resultados e necessita de pequenas quantidades de DNA (BITENCOURT *et al.*, 2008).

O objetivo com este trabalho foi buscar marcadores moleculares ligados à apomixia em *P. maximum*, utilizando a técnica de RAPD associada a metodologia BSA, visando a seleção assistida nos programas de melhoramento da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foi avaliada uma progênie composta por 20 híbridos e seus genitores, a cultivar *Panicum maximum* cv. Tanzânia-1 (apomítica e tetraplóide) e a planta S12 (sexual e tetraplóide), mantidos no campo experimental da Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande - MS.

Esses híbridos foram previamente avaliados para modo de reprodução (sexual e apomítico) pela análise citoembriológica de ovários clarificados, visualizados por microscopia de contraste de interferência.

Extraiu-se o DNA dos híbridos e dos genitores, segundo o método descrito por Bonato *et al.* (2002), utilizando-se folhas jovens que foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas para rompimento das paredes celulares. O material resultante foi ressuspendido em tampão de extração contendo detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) visando à solubilização das membranas lipoprotéicas e proteção do DNA da ação de enzimas. Após foram realizadas etapas de purificação para eliminação de proteínas, polissacarídeos e RNA. O DNA resultante foi ressuspendido em tampão TE (Tris-EDTA) e armazenado à -20°C.

Após a extração, foi realizada a quantificação do DNA em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo) a 260nm, tendo a qualidade avaliada pela razão de leitura nos comprimentos de onda de 260/280nm. Sua integridade pode ser observada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (5 µg/mL), por comparação com padrões de DNA de concentrações conhecidas (100 e 300 ng/µL). Após a quantificação, parte do DNA das amostras foi diluída numa concentração de 5 ng/µL para uso nas reações de PCR e o restante mantido a -20°C.

Para a análise de BSA foram formados dois *bulks*, sendo um *bulk* apomítico (BA) formado pela mistura de DNAs extraídos de 10 híbridos apomíticos, em quantidades equimolares (5 ng/μL). Da mesma forma, o *bulk* sexual, foi formado pela mistura de DNAs extraídos de 10 híbridos sexuais.

O DNA dos genitores e *bulks* foram utilizados para seleção de primers polimórficos. Aqueles primers polimórficos entre os genitores e que também apresentaram polimorfismo entre os *bulks* foram testados em todos os indivíduos dos *bulks*.

As reações de amplificação com primers de RAPD foram realizadas em volume final de 15 μL contendo 1x tampão da Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,4 μM de primer (Operon Thecnologies - OP), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1 unit de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 30 ng de DNA. Utilizou-se um termociclador PTC-100 (MJ Research) programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos; seguida por 35 ciclos de 94°C por 40 segundos (desnaturação), 40°C por 1,5 minutos (pareamento dos primers) e 72°C por 2 minutos (extensão das fitas); para finalizar uma extensão de 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (0,5 μg/mL).

Foram utilizados 76 primers (Tabela 1) e para cada um foi feita uma reação de controle negativo (branco) com todos os reagentes e substituindo o DNA por água mili-Q, para verificar uma possível contaminação dos reagentes e dar maior confiabilidade aos resultados.

Os produtos amplificados, submetidos à eletroforese, foram visualizados em luz ultravioleta (UV), fotodocumentados em sistema digital L-Pix Image – Versão 1.21 (Loccus Biotecnologia) e analisados pela presença e ausência de bandas. Foram prospectadas bandas (marcadores) presentes nos genitores apomíticos e *bulks* apomíticos e ausentes nos demais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos genitores foram testados 76 primers randômicos, sendo que sete não amplificaram (9,21%), 60 foram polimórficos entre os genitores (78,95%) e nove foram monomórficos (11,84%), totalizando 647 bandas amplificadas, perfazendo uma média de 8,51 bandas/primer.

Resultados semelhantes foram descritos para outras espécies de gramíneas forrageiras em estudos de variabilidade genética utilizando marcadores RADP. Chiari *et al.* (2008), utilizando 47 primers em 14 genótipos de quatro espécies de *Brachiaria* (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidícola* e *B. ruziziensis*) obtiveram 396 bandas amplificadas (considerando todas as espécies estudadas) totalizando uma média de 8,4 bandas/primer.

Chiari *et al.* (2007) encontraram uma média de 10 bandas/*primers* analisando 58 acessos de *B. humidicola*, amplificadas com 10 *primers*, os quais geraram um total de 100 bandas. Todavia Daher *et al.* (2002) encontraram uma média significativamente menor de bandas por *primer* (4,51) estudando a variabilidade genética em *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) por RAPD, mas esta espécie não se reproduz por apomixia e a variabilidade genética pode ser menor entre os genótipos testados, já que eles podem trocar alelos entre si.

Das 647 bandas analisadas neste trabalho, 328 (50,69%) foram polimórficas entre os genitores, com média de 4,21 bandas polimórficas/*primer*. O *primer* 73 apresentou o maior número de bandas polimórficas (18 bandas) e os *primers* 88 e 94 o menor número (uma banda cada) (Tabela 1). Nesta mesma tabela, pode-se observar que dos *primers* polimórficos entre os genitores apenas quatro *primers* foram polimórficos entre os *bulks*.

Dos *primers* que foram polimórficos entre os *bulks* os OP1, OP16 e OP50 amplificaram uma banda cada e o *primer* OP83 duas (Figura 1). Segundo Brammer (2000), marcadores que são polimórficos entre os *bulks* podem ser geneticamente ligados ao *loco* que determina a característica usada para construí-los.

Tabela 1- Lista com os 76 *primers* de RAPD utilizados com suas respectivas sequência de nucleotídeos, número de bandas amplificadas, número de bandas polimórficas entre os genitores e *bulks*.

Primer	Sequência de Nucleotídeos	Bandas Amplificadas entre Genitores	Bandas Polimórficas entre Genitores	Primers Polimórficos entre Bulks
OP 1	ACA ACG CCT C	11	7	1
OP 2	GGG AAC GTG T	11	10	0
OP 4	GGC TGC AAT G	13	7	0
OP 6	CCA TCG GAG G	7	5	0
OP 8	AGG AGC GAC A	8	4	0
OP 9	CCT TGA CGC A	17	5	0
OP 10	CCA CAG CAG T	16	7	0
OP 11	GGT ACT CCC C	14	5	0
OP 12	ACA ACT GGG G	10	8	0
OP 13	TCG GAG GTT C	10	6	0
OP 14	CCT TCC CAC T	5	1	0
OP 16	CCG TCC ATC C	13	7	1
OP 17	AGT ATG GCG G	13	4	0
OP 18	CCC TGT CGC A	9	5	0

Tabela 1 - Continuação

Primer	Sequência de Nucleotídeos	Bandas Amplificadas entre Genitores	Bandas Polimórficas entre Genitores	Primers Polimórficos entre <i>Bulks</i>
OP 19	TTC GAG CCA G	9	5	0
OP 20	ACT TCG CCA C	3	1	0
OP 21	CCC AGT CAC T	9	8	0
OP 22	TCA GAG CGC C	5	3	0
OP 23	ACC CGA CCT G	11	1	0
OP 26	CAC GGC ACA A	10	5	0
OP 28	AAG GCT CGA C	6	5	0
OP 29	CTG GGG ACT T	14	7	0
OP 30	TCG GCA CGC A	6	2	0
OP 31	AAG GGC GAG T	8	6	0
OP 32	GGC ACG CGT T	9	5	0
OP 33	TCG CAT CCA G	5	2	0
OP 34	GGG TGC AGT T	15	10	0
OP 35	GGG AAC CCG T	16	8	0
OP 36	TCG CTC GTA G	6	4	0
OP 38	ACG CAC AAC C	7	1	0
OP 39	GGT AGAC TGT G	2	0	0
OP 40	TCT GTC GGT C	8	3	0
OP 41	GGT CAC CTC A	11	7	0
OP 42	AGC AGC GAG G	10	9	0
OP 43	ACG GAA GTG G	6	2	0
OP 44	AGT CGG CCC A	6	2	0
OP 45	TGG AAG CAC C	9	2	0
OP 46	GGA ACT CCA C	12	5	0
OP 50	CCC GTA GCA C	12	8	1
OP 51	CCC GTT GCC T	14	10	0
OP 56	CTG AAG CTG G	11	7	0
OP 57	ACT TGC CTG G	12	5	0
OP 58	GAT ACC TCG G	9	5	0
OP 68	GGG TTT GGC A	7	3	0

Tabela 1 - Continuação

Primer	Sequência de Nucleotídeos	Bandas Amplificadas entre Genitores	Bandas Polimórficas entre Genitores	Primers Polimórficos entre <i>Bulks</i>
OP 72	GTG AAT GCG G	5	2	0
OP 73	CCT TGC GCC T	18	9	0
OP 74	CCT CCC CAA G	11	8	0
OP 75	CCA CGG TCA G	7	5	0
OP 76	AAT GCG GGA G	6	2	0
OP 79	TGG GTC CCT C	10	6	0
OP 80	TGC GGG AGT G	14	10	0
OP 81	GGA GCG TAC T	13	6	0
OP 82	GTC CTC GTG T	10	7	0
OP 83	TCG CAG CGT T	10	7	2
OP 84	CTC CAC GAC T	13	9	0
OP 85	GGG AAA AGC C	10	5	0
OP 86	TCG TTC CGC A	8	4	0
OP 87	TGG TCG CAG A	15	10	0
OP 88	GAA CCT GCT G	1	0	0
OP 90	CTC CCC AGA C	13	10	0
OP 91	TTG CAG GCA G	3	0	0
OP 92	CCG TCC CTG A	10	3	0
OP 93	GTG CCG CAC T	8	3	0
OP 94	GAC ACA CTC C	1	0	0
OP 95	GTG ACC AGA G	5	0	0
OP 97	GTG TCG CGA G	7	0	0
OP 98	CAG AAG CGG A	7	0	0
OP 99	CAG CCT ACC A	3	0	0
OP 100	GAC GCG AAC C	7	0	0

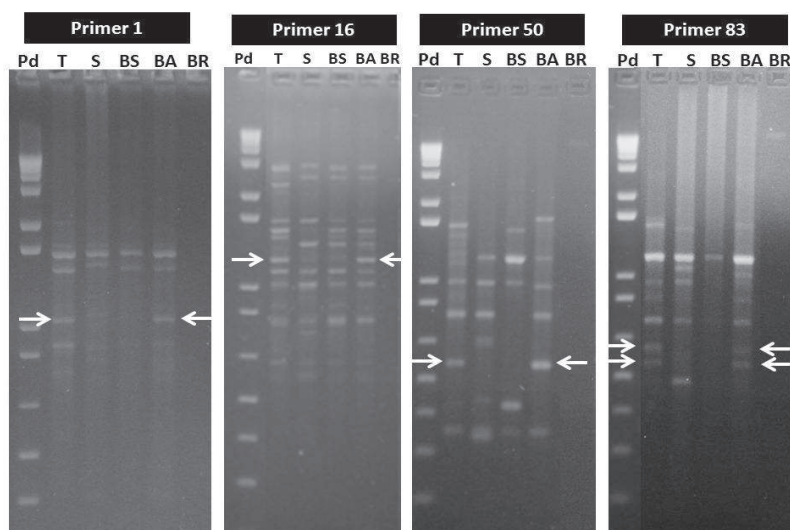


Figura 1 – Perfis de RAPD obtidos com os primers OP 1, OP 16, OP 50 e OP 83. Pd é o padrão de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen), T e S correspondem, respectivamente, aos genitores apomítico (cultivar Tanzânia) e sexual (planta S12), BS é o *bulk* sexual, BA é o *bulk* apomítico e BR é o controle negativo da reação (branco). As setas indicam as bandas polimórficas encontradas entre os genitores e *bulks*, possivelmente ligadas à apomixia.

Os *primers* OP1, OP16, OP50 e OP83 foram utilizados para amplificar o DNA de todos os indivíduos dos *bulks*, separadamente, e houve segregação entre os marcadores amplificados e a característica apomixia, ou seja, há indivíduos apomíticos que não tem o marcador amplificado e indivíduos sexuais que o possuem. Apesar disso, os resultados não descartam que esses marcadores possam estar ligados à apomixia, pois a segregação foi inferior a 50%.

Entretanto, um número bem maior de indivíduos fenotipados para modo de reprodução é necessário para confirmar essa hipótese e verificar se os marcadores co-segregam com a apomixia e quais são as frequências de recombinação entre os marcadores e o locus da apomixia (*apo-locus*) e dessa forma estimar a distância dos marcadores para esse *locus*.

Em *Brachiaria* spp., outro gênero de gramíneas forrageiras, já foram identificados marcadores moleculares ligados à apomixia em populações segregantes de *B. decumbens* x *B. ruziziensis* (PESSINO *et al.*, 1997) e *B. humidicola* x *B. humidicola* (ZORZATTO *et al.*, 2010). Esses trabalhos utilizaram diferentes marcadores moleculares associados à estratégia de BSA. Essa estratégia constitui-se ferramenta importante para identificar um potencial marcador molecular quando

a característica tem caráter monogênico e dominante (MICHELMORE *et al.*, 2001). Como é o caso da herança da apomítica em *Panicum maximum* (SAVIDAN, 1975, 1983) e outras gramíneas forrageiras como *Brachiaria* (PESSINO *et al.*, 1997, ZORZATTO *et al.*, 2010).

A importância de se encontrar marcadores moleculares ligados a características de difícil e/ou tardia avaliação, como é o caso da apomixia, é a realização de seleção assistida. A seleção assistida por marcadores moleculares visa selecionar os indivíduos com base na presença do marcador molecular, sem que haja a necessidade de avaliar o fenótipo da característica. Para isso, é preciso identificar de marcadores ligados às características de interesse, sendo de grande importância quando estas são de difícil e morosa avaliação.

CONCLUSÃO

Existem cinco potenciais marcadores RAPD ligados à apomixia em *P. maximum*. Entretanto, para confirmar a co-segregação e avaliar a distância entre esses marcadores e o *locus* da apomixia (*apo-locus*) necessita-se avaliar um maior número de indivíduos fenotipados para modo de reprodução.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Gado de Corte pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho, à Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras (UNIPASTO) pelo auxílio financeiro e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa PIBIC concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: IFNP, 2008, 380 p.

ARAUJO, A. C. G. **Múltiplos sacos embrionários em ovários do acesso sexual de *Brachiaria brizantha* (Poaceae)**. Brasília, DF: EMBRAPA, jun./2003. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 40).

BITENCOURT, G. A.; CHIARI, L.; VALLE, C. B.; SALGADO, L. R.; LEGUIZAMÓN, G. O. C. **Uso de marcadores RADP na identificação de híbridos de *Brachiaria humidicola***. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, set./2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 23).

BONATO, A. L. V.; VALLE, C. B. do; JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; LEGUIZAMON, G. O. C. **Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum maximum***. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 79).

BRAMMER, S.P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 7p. (Embrapa Trigo. Documentos online, 3). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.htm>. Acesso em: 22 set. 2010.

CHIARI, L.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L.; VALLE, C. B.; JUNGSMANN, L. **A biotecnologia nos programas de melhoramento de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte**. Campo Grande, MS: EMBRAPA-CNPGC, 2007. p.12. (Documentos 168).

CHIARI, L.; ROCHA, M.; VALLE, C. B.; SALGADO, L. R. **Variabilidade genética em acessos e cultivares de quatro espécies de *Brachiaria* estimada por marcadores RADP**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, set./2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 24).

CHIARI, L.; SALGADO, L. R.; VALLE, C. B.; CANÇADO, L. J.; VALLE, J. V. R.; LEGUIZAMÓN, G. O. C. **Estimativa da variabilidade genética em acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando marcadores RADP**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, nov./2007. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 22).

DAHER, R. F.; PEREIRA, M. G.; PEREIRA, A. V.; AMARAL JÚNIOR., A. T. Genetic divergence among elephantgrass cultivars assessed by RAPD markers in composit samples. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 4, p. 623-627. 2002.

JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do et al. **Melhoramento genético de *Panicum maximum***. In: RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do; JANK, L. (Ed.) Melhoramento de forrageiras tropicais. 1.ed. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2008. p.55-87.

MACEDO, M. C. M. Pastagens no ecossistema Cerrado: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia, A produção animal e o foco no agronegócio. **Anais...** Goiânia: UFG, 2005. p. 56-84.

MARTUSCELLO, J. A.; JANK, L.; FONSECA, D. M.; CRUZ, C. D.; CUNHA, D. N. F. V. Repetibilidade de caracteres agrônômicos em *Panicum maximum* Jacq. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1975-1981, 2007.

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**, v.88, p.9828-9832, 1991.

PESSIM, C.; PAGLIARINI, M. S.; JANK, L. **Anormalidades meióticas em híbridos de *Panicum maximum* Jacq.** In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS, 2007, Campo Grande, MS. Palestras_resumos [do]... Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2007. 3 p. 1 CD-ROM. CNPQC.

PESSINO, S.C.; ORTIZ, J.P.A.; LEBLANC, O.; VALLE, C.B.do.; HAYWARD, M.D. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.439-444, 1997.

RESENDE, R. M. S.; JANK, L.; VALLE, C. B. do; BONATO, A. L. V. **Obtenção de híbridos intra-específicos de forrageiras Apomíticas tropicais: estratégia de melhoramento genético para *Panicum maximum*.** Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2004. 5 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado técnico, 87).

STABILE, S. S.; SALAZAR, R. D.; JANK, L.; RENNÓ, P.F.; SILVA, L.F.P. Características de produção e qualidade nutricional de genótipos de capim-colonião colhidos em três estádios de maturidade. In: **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, n.7, p.1418-1428, jun./2010.

VALLE, C. B.; BITENCOURT, G. A.; ARCE, A. **Estudos citoembriológicos do modo de reprodução em *Brachiaria humidicola*.** Disponível em: < <http://simf.cnpqc.embrapa.br/simf1/anais/resumos/melhoramento/11.pdf> >. Acesso em: ago./2010.

VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v.56, n.4, p.460-472, jul./ago. 2009.

VALLE, C.B. **Recursos genéticos de forrageiras para áreas tropicais.** In: CONFERÊNCIA VIRTUAL GLOBAL SOBRE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BOVINOS DE CORTE, 1, 2002, Campo Grande, Embrapa Gado de Corte.

SAVIDAN, Y.H. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). In: International Grassland Congress, 14. 1981. Lexington. **Proceedings...** Boulder: Westview Press. P. 182-184. 1983.

SAVIDAN, Y. H. Hérité de l'apomixie. Contribution à l'étude de l'hérité de l'apomixie sur *Panicum maximum* Jacq. (analyse des sacs embryonnaires). **Cahiers ORSTOM**, sér. Biol., Paris, v.10, n.2, p.91-95, 1975.

ZORZATTO, C.; CHIARI, L.; BITENCOURT, G. A.; VALLE, C. B.; LEGUIZAMÓN, G. O. C.; SCHUSTER, I.; PAGLIARINI, M. S. Identification of a molecular marker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola*. **Plant Breeding**, v.129, p.734-736, 2010.