

I Workshop sobre Citogenética e Genética Molecular Aplicadas ao Melhoramento de Forrageiras

Cynodon

Azevém

I P R
I 2 6

Brachiaria

Capim-elefante

Embrapa

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Leite
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 198

I Workshop sobre Citogenética e Genética Molecular Aplicadas ao Melhoramento de Forrageiras

Editores

Lisete Chamma Davide

Flávio Rodrigo Gandolfi Benites

Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco

36038-330 Juiz de Fora – MG

Fone: (32) 3311-7405

Fax: (32) 3311-7424

www.embrapa.br/gado-de-leite

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo

Embrapa Gado de Leite

Comitê Local de Publicações

Presidente *Pedro Braga Arcuri*

Secretária Executiva *Emili Barcellos Martins Santos*

Membros *Jackson Silva e Oliveira, Leônidas Paixão Passos, Alexander*

Machado Auad, Fernando César Ferraz Lopes, Francisco José da Silva Lédo,

Pérsio Sandir D'Oliveira, Fábio Homero Diniz, Frank Ângelo Tomita Bruneli,

Nivea Maria Vicentini, Leticia Caldas Mendonça, Rita de Cássia Bastos de

Souza

Supervisão editorial *Lisete Chamma Davide e Flávio Rodrigo Gandolfi Benites*

Tratamento de ilustrações e Editoração eletrônica *Carlos Alberto Medeiros de*

Moura

Capa *Nubia Sales Pinheiro Oliveira (estagiária)*

1ª edição

1ª impressão (2016): Online

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Leite

Workshop sobre Citogenética e Genética Molecular Aplicadas ao Melhoramento (1. : 2016 : Juiz de Fora, MG).

Anais do I Workshop sobre Citogenética e Genética Molecular Aplicadas ao Melhoramento / Editores, Lisete Chamma Davide e Flávio Rodrigo Gandolfi Benites. – Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 2016.

74 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 198.).

ISSN 1516-7453

1. Recursos genéticos. 2. Citogenética – genética molecular. 3. Melhoramento Genético. I. Davide, Lisete Chamma. II. Benites, Flávio Rodrigo Gandolfi. III. Título. IV. Série.

CDD 572.8

Autores

Andréa Mittelmann

Engenheira Agrônoma, pesquisadora da Embrapa Gado de Leite/Embrapa Clima Temperado, Juiz de Fora-MG/Pelotas-RS

Antonio Vander Pereira

Engenheiro Agrônomo, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

Fausto Souza Sobrinho

Engenheiro Agrônomo, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

Flávio Rodrigo Gandolfi Benites

Engenheiro Agrônomo, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

Francisco José da Silva Lédo

Engenheiro Agrônomo, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

Juarez Campolina Machado

Engenheiro Agrônomo, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

Lisete Chamma Davide

Coordenadora, Bióloga, professora da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG

Maurício Marini Köpp

Engenheiro Agrônomo, pesquisador da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, Rio Grande do Sul

Vânia Helena Techio

Bióloga, professora da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG

I Workshop sobre Citogenética e Genética Molecular Aplicadas ao Melhoramento de Forrageiras

Departamento de Biologia

Universidade Federal de Lavras

02 e 03 de outubro de 2014

Comissão Organizadora

Lisete Chamma Davide - UFLA (Coordenadora)

Membros da Comissão Organizadora

Giovana Augusta Torres - UFLA

Larissa Fonseca Andrade-Vieira - UFLA

Vânia Helena Techio - UFLA

Promotores

Universidade Federal de Lavras (UFLA)

Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas

Núcleo de Estudos em Genética (GEN)

Embrapa Gado de Leite

Embrapa Clima Temperado

Universidade Federal de Lavras

Lavras/MG
2015

Agradecimentos

Os autores agradecem:

- à Universidade Federal de Lavras (UFLA), Embrapa Gado de Leite e Embrapa Clima Temperado pela disponibilidade de infraestrutura e, juntamente com o Núcleo de Estudos em Genética da UFLA, pelo apoio durante o desenvolvimento das pesquisas e realização do Workshop;
- à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes) pelo financiamento das pesquisas e das bolsas de estudos dos estudantes de graduação e de pós-graduação que auxiliaram na condução das pesquisas envolvendo as espécies estudadas pelos autores;
- aos estudantes de graduação e de pós-graduação (Genética e Melhoramento de Plantas e Botânica Aplicada) da UFLA pelo auxílio na condução das pesquisas, sem os quais não teria sido possível realizá-las;
- à Doutoranda Gabriela Barreto dos Reis pela leitura cuidadosa e formatação do documento.

Apresentação

O Brasil é o maior produtor mundial de leite e carne a pasto, com um rebanho de aproximadamente 170 milhões de cabeças bovinas, explorando 180 milhões de hectares de pastagens. Cerca de 100 milhões de hectares são ocupados por forrageiras cultivadas e o restante constituído de pastagens naturais compostas por espécies nativas ou naturalizadas. Mesmo assim, o melhoramento de espécies forrageiras não se encontra no mesmo nível de conhecimento do melhoramento genético da maioria das outras culturas, tais como cereais, espécies florestais e hortaliças. Enquanto para essas culturas os incrementos proporcionados pelo melhoramento são inquestionáveis e reconhecidos por todos como de suma importância para o aumento de produtividade e qualidade das lavouras, sustentando o crescimento da população mundial, para as forrageiras a situação é diferente. No Brasil, especialmente, os investimentos em melhoramento de forrageiras são escassos e inversamente proporcionais a importância que essas espécies representam para o país. Considerando-se as principais culturas, incluindo oleaginosas, cereais, cana e algodão, são explorados anualmente no Brasil aproximadamente 55 milhões de hectares. Por outro lado, a área de pastagens do país é da ordem de 180 milhões de hectares. A obtenção e adoção de cultivares forrageiras melhoradas, com maior produtividade e qualidade da forragem apresentam, portanto, imenso potencial de contribuição na produção de alimentos e geração de renda e empregos para o país. Para que o melhoramento de forrageiras possa contribuir de forma mais efetiva e em menor espaço de tempo, todas as ferramentas utilizadas para o melhoramento das demais culturas podem e devem ser incorporadas aos programas de melhoramento das diferentes espécies trabalhadas. A citogenética, particularmente, tem grande potencial de contribuição para o melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil.

Neste contexto, o Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Lavras desenvolve uma parceria com unidades da Embrapa a mais de duas décadas, visando a aplicação das metodologias citogenéticas no melhoramento de espécies forrageiras, entre outras. Entre as espécies estudadas encontram-se aquelas pertencentes aos gêneros *Pennisetum*, *Brachiaria*, *Lolium* e *Cynodon*. Durante esse período foram caracterizados bancos de germoplasmas, desenvolvidos híbridos, obtidos poliploides sintéticos, indicado a afinidade genômica entre parentais e, mais recentemente, o comportamento cromossômico dos genótipos de interesse tem sido avaliado por meio de citogenética molecular.

O envolvimento de novos pesquisadores e estudantes, aliado ao número expressivo de publicações e informações geradas criaram o cenário ideal para a realização de um fórum de discussão, cujo objetivo foi avaliar o estado atual das pesquisas e formular novas propostas visando dar subsídios para a tomada de decisões que atendam a demanda tanto pelo desenvolvimento de novas cultivares forrageiras como pelo entendimento das relações genômicas e evolutivas existentes entre as espécies desses gêneros. Durante o Workshop reuniram-se os pesquisadores das instituições parceiras (UFLA, Embrapa Gado de Leite e Embrapa Clima Temperado) e estudantes que participam das equipes de pesquisa, além de professores e estudantes da UFLA.

Sumário

Apresentação.....	6
Capítulo 1. Recursos Genéticos de <i>Pennisetum</i>.....	9
1.1. Resumo.....	9
1.2. Introdução.....	9
1.2.1. Capim-elefante: origem, distribuição e variabilidade.....	11
1.2.2. Capim-elefante: importância econômica e melhoramento genético.....	11
1.3. Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante.....	11
1.4. Referências.....	12
Capítulo 2. Citogenética Aplicada ao Melhoramento Genético de <i>Pennisetum</i>.....	17
2.1. Resumo.....	17
2.2. Introdução.....	17
2.3. Caracterização do Banco de Germoplasma.....	18
2.4. Caracterização Citogenética e Conteúdo de DNA do Capim-elefante, Milheto e Híbridos.....	18
2.5. Homeologia Genômica e a Infertilidade do Híbrido Triploide entre Capim-elefante e Milheto.....	22
2.6. Mecanismos Citogenéticos e Epigenéticos Pós-hibridação Interespecífica e Poliploidização.....	22
2.7. Perspectivas.....	23
2.8. Referências.....	23
Capítulo 3. Melhoramento Genético de <i>Brachiaria ruziziensis</i>: Histórico e Estratégias.....	27
3.1. Resumo.....	27
3.2. Introdução.....	27
3.3. Melhoramento de <i>Brachiaria ruziziensis</i>	28
3.3.1. Histórico do programa de melhoramento de <i>B. ruziziensis</i>	28
3.3.2. Estratégias do melhoramento de <i>B. ruziziensis</i>	29
3.3.3. Principais Resultados do programa de melhoramento.....	29
3.5. Perspectivas.....	34
3.6. Conclusões.....	35
3.7. Referências.....	35
Capítulo 4. Citogenética Aplicada ao Melhoramento de <i>Brachiaria</i>.....	39
4.1. Resumo.....	39
4.2. Introdução.....	39
4.3. Indução de Poliploides em <i>B. ruziziensis</i> e Avaliação da Meiose e Viabilidade de Pólen.....	40
4.4. Meiose e Recombinação em Espécies Apomíticas e Sexuais de <i>Brachiaria</i> e Híbridos Interespecíficos.....	40
4.5. Perspectivas.....	41
4.6. Referências.....	41
Capítulo 5. Melhoramento Genético de <i>Lolium</i>: Histórico e Estratégias.....	45
5.1. Resumo.....	45
5.2. Introdução.....	45
5.3. <i>Lolium</i> no Brasil.....	46
5.4. Características Agronômicas.....	46
5.5. O Programa de Melhoramento.....	46
5.5.1. Histórico.....	46
5.5.2. Fase atual e perspectivas.....	48

5.6. Germoplasma Tetraploide.....	48
5.7. Fungos Endofíticos.....	49
5.8. Atividades Complementares.....	49
5.9. Referências.....	49
Capítulo 6. Citogenética Aplicada ao Melhoramento de <i>Lolium</i>.....	51
6.1. Resumo.....	51
6.2. Introdução.....	51
6.3. Citogenética e Conteúdo de DNA de <i>L. multiflorum</i>	51
6.4. Meiose e Viabilidade de Pólen.....	53
6.5. Variabilidade nos Sítios de rDNA 45S e Sítios Frágeis em Cromossomos de <i>L. perenne</i> e <i>L. multiflorum</i>	53
6.6. Indução de Poliploides em <i>L. multiflorum</i>	55
6.7. Perspectivas.....	55
6.8. Referências.....	55
Capítulo 7. Melhoramento Genético e Citogenética do Gênero <i>Cynodon</i>.....	61
7.1. Resumo.....	61
7.2. Introdução.....	61
7.3. Taxonomia, Origem e Introdução do Gênero <i>Cynodon</i> no Mundo.....	62
7.4. Gramas Estrelas e Gramas Bermudas.....	64
7.4.1. Gramas Bermudas.....	64
7.4.2. Gramas Estrelas.....	66
7.5. Programa de Melhoramento Genético do gênero <i>Cynodon</i>	68
7.6. Contagens Cromossômicas e Quantidade de DNA de Acessos de <i>Cynodon</i>	71
7.7. Referências.....	72

Recursos Genéticos de *Pennisetum*

Juarez Campolina Machado
Antonio Vander Pereira
Francisco José da Silva Lédo
Mauricio Marini Köpp

1.1. Resumo

O gênero *Pennisetum* é um dos mais importantes da família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae* e tribo *Paniceae*. Possui aproximadamente 140 espécies que são utilizadas para alimentação animal suplementar e/ou pastejo, produção de grãos, uso ornamental e atualmente estão sendo avaliadas para utilização como fonte de biomassa energética. O centro de diversidade das espécies dos *pools* gênicos primários e secundários do gênero é a África Sub-saariana, sendo que algumas espécies do *Pool* gênico terciário têm como centro de diversidade a América do Sul, Caribe, Sudeste Asiático e Oceania. A espécie de maior importância econômica do gênero é o milheto (*Pennisetum glaucum*), sendo o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) representado no *pool* gênico secundário. Pretende-se, apresentar resumidamente o estado da arte dos recursos genéticos do gênero *Pennisetum*, além da situação atual e os passos futuros do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante (BAGCE) da Embrapa, que vem sendo mantido com a finalidade de conservação, ampliação, valoração e uso da diversidade genética da espécie. O BAGCE possui 173 acessos, sendo: 101 acessos de *Pennisetum purpureum*, 40 acessos de *Pennisetum glaucum*, 19 acessos de espécies do *pool* gênico terciário do gênero (*Pennisetum* spp.) e 13 raças cromossômicas (híbridos interespecíficos de *P. purpureum* x *P. glaucum*). Destes, 114 acessos são conservados na forma *ex situ*, cultivados a campo. Os acessos de *P. glaucum* e os híbridos hexaplóides são conservados em câmara de conservação de sementes. A ampliação da variabilidade genética vem sendo realizada por meio de coletas, introdução de outras instituições, intercâmbio formalizado com instituições internacionais e obtenção de novos híbridos interespecíficos. Até o momento, foram realizadas caracterizações morfológica, agrônômica, e molecular dos acessos do BAGCE. As caracterizações realizadas foram eficientes em discriminar os acessos e promover sua separação em grupos de relativa similaridade. Pretende-se complementar as caracterizações e avaliações já realizadas com avaliações fisiológicas, respostas a estresses biótico e abiótico e potencial de utilização para produção de biomassa energética, de forma a aumentar a utilização dos recursos genéticos no programa de melhoramento.

1.2. Introdução

O gênero *Pennisetum* é um dos mais importantes gêneros da família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae* e tribo *Paniceae* (MARTEL et al., 2004). Possui aproximadamente 140 espécies (BRUNKEN, 1977) com números cromossômicos básicos de $x = 5, 7, 8$ ou 9 (JAUHAR, 1981) e níveis de ploidia variando de diplóide a octaplóide, hábito reprodutivo sexual ou apomítico e ciclo de vida anual, bianual e perene.

Baseado em características morfológicas, o gênero *Pennisetum* pode ser dividido em cinco seções: *Penicillaria*, *Brevivalvula*, *Gymnothrix*, *Heterostachya* e *Pennisetum*, contudo outras classificações intergenéricas foram também propostas por diferentes autores (BRUNKEN, 1977; CLAYTON e RENVOIZE, 1986).

A seção *Penicillaria* inclui o milheto (*Pennisetum glaucum* ssp. *glaucum*), espécie de maior importância econômica do gênero, seu parente silvestre *P. glaucum* ssp. *monodii*, e o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) (MARTEL et al., 1997; ROBERT et al., 2010).

A seção *Gymnothrix* apresenta ampla variabilidade. As espécies mais conhecidas desta seção são *P. macrourum*, *P. mezianum*, *P. ramosum* e *P. hohenackeri*. Na seção *Pennisetum*, *P. villosum*, *P. setaceum* e *P. clandestinum* (capim quicuio) são as mais comuns (SCHMELZER, 1997; ROBERT et al., 2010).

A seção *Heterostachya* compreende as espécies: *P. squamulatum*, *P. orientale* e *P. tetrastachyum* (syn. *P. schweinfurthii*), enquanto a seção *Brevivalvula* compreende as espécies, *P. pedicellatum*, *P. polystachion* e *P. hordeoides* (BRUNKEN, 1977; LEBRUN e STORK, 1995; SCHMELZER, 1997; ROBERT et al., 2010). As espécies citadas representam a distribuição da variabilidade do gênero considerando suas seções e *pools* gênicos.

A classificação de *Pennisetum* em *pools* gênicos baseia-se no nível de isolamento reprodutivo da espécie cultivada de maior importância econômica com os demais representantes do gênero e a capacidade de ocorrência de fluxo gênico. Harlan (1975) divide as espécies de *Pennisetum* em três conjuntos gênicos (Tabela 1). *Pennisetum glaucum* e suas subespécies são agrupadas em um conjunto gênico primário, apresentando $2n = 2x = 14$. O conjunto gênico secundário é composto pelas espécies *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum squamulatum*, com $2n = 4x = 28$. O conjunto gênico terciário é composto por espécies com números cromossômicos básicos variados e inclui todas as outras espécies do gênero.

No *pool* gênico primário, *Pennisetum glaucum* ssp. *glaucum* cruza facilmente com suas formas selvagens, produzindo sementes férteis. As duas espécies do *pool* gênico secundário também apresentam facilidade de cruzamento com o milho, porém os híbridos são inférteis. As espécies do *pool* gênico terciário tem forte barreira reprodutiva com as demais espécies, o que impede o fluxo gênico e a ocorrência de híbridos desse com os demais *pools* gênicos (ROBERT et al., 2010).

Tabela 1. Definição dos *Pools* gênicos no gênero *Pennisetum*.

<i>Pool</i> gênico primário	<i>Pool</i> gênico secundário	<i>Pool</i> gênico terciário
<i>P. glaucum</i>	<i>P. purpureum</i>	~ 140 outras espécies
<i>P. glaucum</i> subsp. <i>monodii</i>	<i>P. squamulatum</i>	
<i>P. glaucum</i> subsp. <i>stenostachyum</i>		

Adaptado de Harlan e De Wet, 1971; Robert, 2010.

Os centros de diversidade de *Pennisetum* são as regiões tropicais e sub-tropicais do planeta, sobretudo na África Sub-saariana, sendo que algumas espécies do *pool* gênico terciário têm como centro de diversidade a América do Sul, Caribe, Sudeste Asiático e Oceania.

O gênero é caracterizado principalmente por sua inflorescência: do tipo panícula, em formato de espiga, com espiguetas contraídas em eixos, com pedicelos persistentes, cercados por invólucros com cerdas. Os invólucros, livres na base, variam de glabro a plumoso, com espiguetas sésseis ou pediceladas. As espiguetas apresentam formato de lanceoladas a oblongo, agudo para obtuso; as glumas são hialinas ou membranosas e, muitas vezes desiguais (WATSON e DALLWITZ, 1992). O fruto é principalmente oblongo e dorsal comprimido, ou ovoide.

1.2.1. Capim-elefante: origem, distribuição e variabilidade

O capim-elefante é uma gramínea que ocorre naturalmente em uma extensa área do continente africano, sobretudo em condições tropicais com precipitação acima de 1000 mm anuais, ao longo de vales férteis (Figura 1), sendo este apontado como o centro de domesticação e de diversidade genética desta espécie (PEREIRA et al., 2010, LIRA et al. 2010).

É uma espécie alógama que apresenta ampla variabilidade genética para a maioria das características morfo-agronômicas, sendo esta variabilidade distribuída no germoplasma (CAVALCANTE e LIRA, 2010) (Figura 2). A variabilidade dentro do germoplasma pode ser classificada considerando um conjunto de caracteres diferenciadores, nos grupos Cameroon, Napier, Mercker e Anão. O grupo Cameroon apresenta porte ereto, colmos grossos, folhas largas e florescimento de intermediário a tardio. O grupo Napier possui touceiras abertas, folhas largas e época de florescimento precoce a intermediária. O grupo Mercker apresenta porte baixo, colmos

e folhas finas e época de florescimento precoce. O grupo Anão possui altura de até 1,5 m e elevada relação entre folhas e colmos (entrenós curtos) (PEREIRA, 1994).

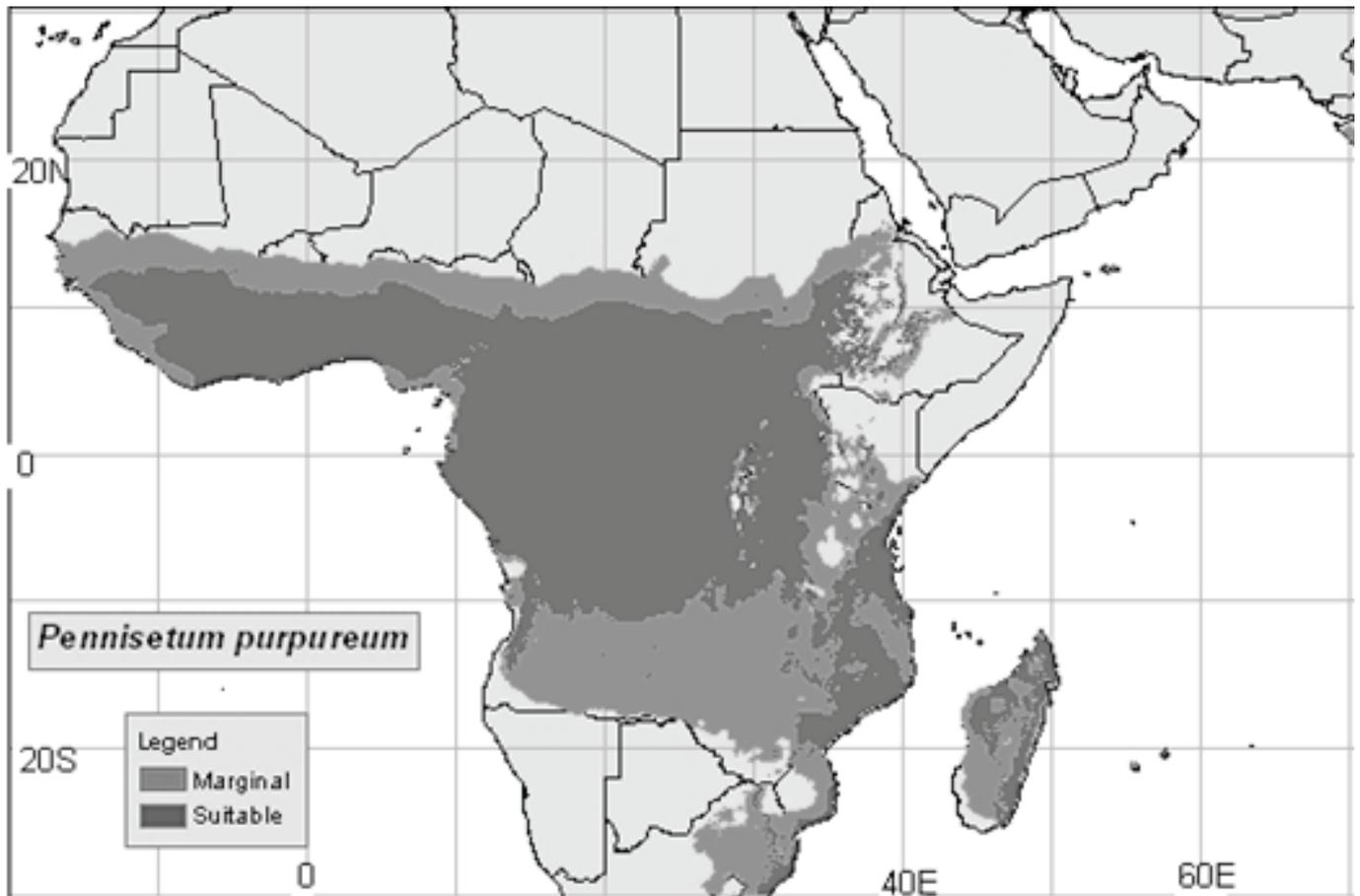


Figura 1. Área de adaptação do capim-elefante na África.
Fonte: Adaptado de Tropical Forages, 2015.



Figura 2. Variabilidade genética no germoplasma de capim-elefante.
Fotos: Francisco José da Silva Léo e Antônio Vander Pereira.

1.2.2. Capim-elefante: importância econômica e melhoramento genético

O capim-elefante se destaca como recurso forrageiro de grande potencial, devido à elevada produção de biomassa, qualidade nutricional superior e boa aceitação pelos animais. Pode ser utilizado sob as formas de capineira, pastejo, feno e silagem, e está entre as forrageiras mais utilizadas para intensificação dos sistemas de produção leite e carne, nas diferentes regiões e biomas brasileiros (PEREIRA et al., 2010). Ademais, o capim-elefante é uma espécie altamente capacitada para a produção de biomassa energética, devido à sua elevada eficiência fotossintética, grande capacidade de acumulação de matéria seca e de fixação biológica de nitrogênio; além de suas propriedades químicas (ANDERSON et al., 2008).

Em relação ao produtor, uma das principais demandas refere-se a cultivares melhoradas para corte e pastejo que possam atender as necessidades nutricionais dos rebanhos durante todo o ano, e em potencial para que possam ser utilizadas como fonte de bioenergia. Neste sentido, a partir da década de 1990, a Embrapa Gado de Leite iniciou um programa de melhoramento genético de capim-elefante com o objetivo de obter cultivares para os diferentes sistemas de produção. Para tanto, foram avaliados os acessos do Banco Ativo de Germoplasma e selecionados genótipos para uso como genitores em cruzamentos controlados (PEREIRA e LÉDO, 2008). As principais cultivares obtidas a partir deste trabalho são:

- Capim-elefante Pioneiro: A cultivar Pioneiro, lançada em 1996, foi a primeira cultivar de capim-elefante desenvolvida para uso sob pastejo e caracteriza-se por apresentar touceiras de formato aberto, grande número de brotações aéreas e basais, colmos finos e folhas eretas. Destaca-se, pela elevada capacidade de brotação das estacas, crescimento vigoroso e rápida expansão das touceiras.
- Capim-elefante BRS Kurumi: A cultivar BRS Kurumi caracteriza-se por apresentar touceiras de formato semiaberto, folha e colmo de cor verde e internódio curto. Apresenta crescimento vegetativo vigoroso com rápida expansão foliar, intenso perfilhamento e porte baixo. Devido ao seu elevado potencial de produção de forragem e características nutricionais positivas, a cultivar BRS Kurumi é uma excelente opção para produtores que almejam intensificar seu sistema de produção animal.
- Capim-elefante BRS Canará: A cultivar BRS Canará caracteriza-se por apresentar porte alto, touceiras de formato semi-aberto, folha de cor verde e bainha verde-amarelada, colmo de diâmetro médio com coloração do internódio amarelada. O uso da cultivar BRS Canará como capineira constitui uma alternativa de baixo custo para alimentação do gado durante a época chuvosa, com reflexos positivos na taxa de lotação.
- Capim-elefante BRS Capiaçú: A cultivar BRS Capiaçú apresenta potencial para produzir silagem e, por isso, inova na forma de uso da forrageira. Também pode ser oferecida aos bovinos, picada verde ou como componente de silagem com outros volumosos, como milho e sorgo. O potencial de produção da BRS Capiaçú supera o do milho e da cana-de-açúcar, atingindo média de 50 toneladas de matéria seca por hectare/ano, com menor custo. Além disso, tem boa tolerância ao estresse hídrico, o que a torna alternativa ao milho em regiões com alto risco de veranico.

1.3. Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante

O Banco Ativo de Germoplasma de Capim-Elefante (BAGCE) integra o Portfólio de Projetos de PD&I da Embrapa “Gestão Estratégica de Recursos Genéticos para a Alimentação, a Agricultura e a Bioindústria - REGEN” que é composto por três grandes redes ou vertentes:

- Vertente Vegetal;
- Vertente Animal;
- Vertente Microbiana.

As Vertentes abrigam os Projetos Componentes que visam manter de forma organizada, as Coleções de Germoplasma da Embrapa em todas as suas formas e reinos, com a maior variabilidade genética possível (Figura 3).

Assim, as atividades com recursos genéticos vegetais estão organizadas no âmbito do Portfólio REGEN, na Vertente de Recursos Genéticos Vegetais, a qual está estruturada em 20 projetos componentes.

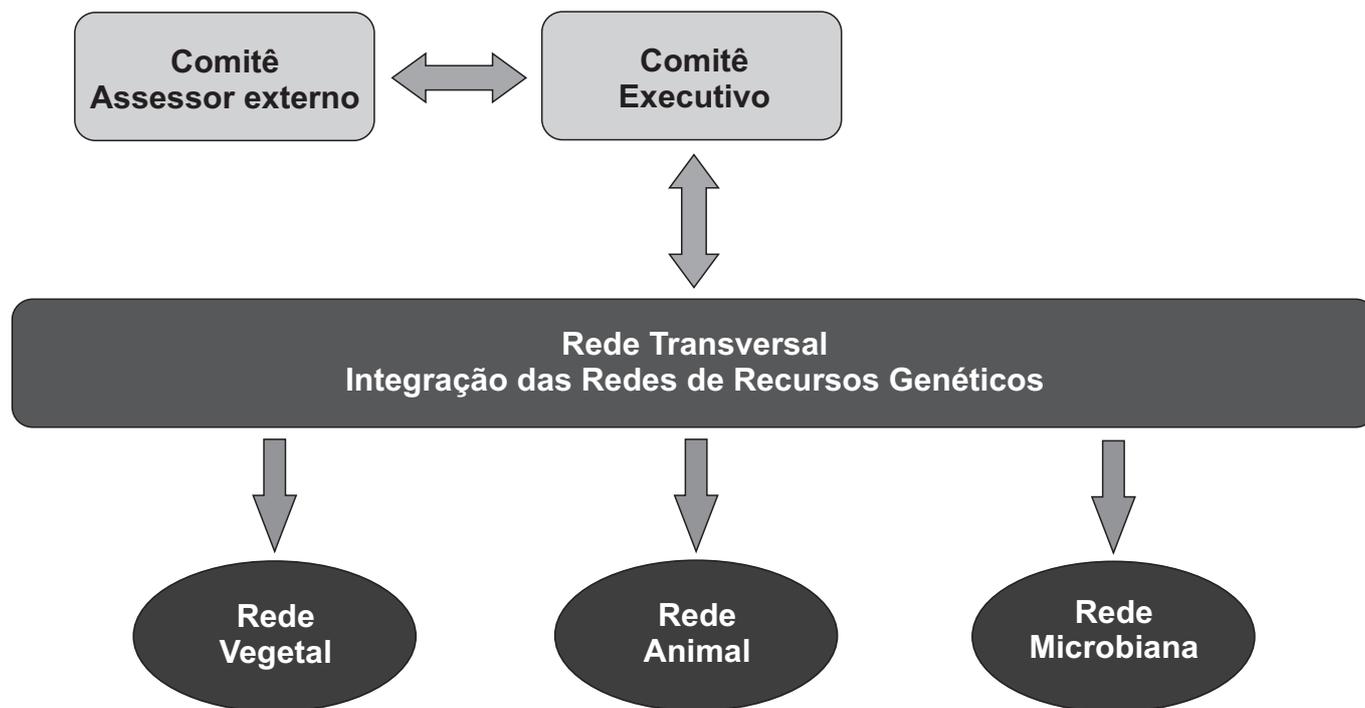


Figura 3. Gestão Integrada dos Recursos Genéticos em nível nacional.

O Projeto Componente 5 (Bancos de Germoplasma de Espécies Forrageiras) é coordenado pela Embrapa Gado de Corte, em colaboração com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Em seu conjunto, os planos de ação abrangem duas matrizes interligadas, a dos recursos genéticos de forrageiras específicas e a dos recursos genéticos autóctones regionais, distintos em cada ecossistema e contando com inúmeras espécies silvestres aparentadas às domesticadas, ou cujo uso direto tem potencial de implementação. Os gêneros foco do projeto são *Panicum*, *Brachiaria*, *Pennisetum*, *Paspalum*, *Bromus*, *Stylosanthes*, *Desmanthus*, *Lolium* e *Cenchrus*.

Especificamente no BAGCE, a Embrapa Gado de Leite desde a sua criação vem conservando a variabilidade do gênero *Pennisetum*. Dentre as atividades desenvolvidas estão a conservação, ampliação, valoração e uso da diversidade genética.

O BAGCE possui 173 acessos, sendo: 101 acessos de *Pennisetum purpureum*, 40 acessos de *Pennisetum glaucum*, 19 acessos de espécies do *pool* gênico terciário do gênero (*Pennisetum* spp.) e 13 raças cromossômicas (híbridos interespecíficos de *P. purpureum* x *P. glaucum*). A ampliação da variabilidade genética vem sendo realizada por meio de coletas, introdução de outras instituições, intercâmbio formalizado com instituições internacionais e obtenção de novos híbridos interespecíficos. Até o momento foram realizadas caracterizações e avaliações morfológica (SHIMOYA et al., 2002), agrônômica (SHIMOYA et al., 2001), de respostas a estresses bióticos e abióticos (MACHADO et al., 2013), bem como a caracterização molecular (AZEVEDO et al., 2012) e citogenética (TECHIO et al., 2002) dos acessos.

As caracterizações realizadas foram eficientes em discriminar os acessos e promover sua separação em grupos de relativa homogeneidade, que variam de acordo com a caracterização realizada. Pretende-se complementar as caracterizações e avaliações já realizadas com avaliações fisiológicas, respostas a estresses e potencial de utilização para produção de biomassa energética, de forma a aumentar a utilização dos recursos genéticos no programa de melhoramento.

1.4. Referências

AZEVEDO, A. L. S.; COSTA, P. P.; MACHADO, J. C.; MACHADO, M. A.; PEREIRA, A. V.; LÉDO, F. J. S. Cross species amplification of *Pennisetum glaucum* microsatellite markers in *Pennisetum purpureum* and genetic diversity of napier grass accessions. **Crop Science**, v. 52, p. 1776-1785, 2012.

- BRUNKEN, J. N. A systematic study of *Pennisetum* sect *pennisetum* (Gramineae). **Am. J. Bot.**, v. 64, p. 161–176, 1977.
- BRUNKEN, J. N.; DE WET, J. M. J.; HARLAN, J. R. The morphology and domestication of pearl millet. **Econ. Bot.**, v. 31, p. 163–174, 1977.
- CAVALCANTE, M.; LIRA, M. A. Variabilidade genética em *Pennisetum purpureum* Schumacher. **Revista Caa-tinga**, v. 23, n. 2, p.153-163, 2010.
- CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. **Genera Graminum**: grasses of the world. London, UK: HMSO Book, 1986. 389 p.
- HARLAN, J. R. **Crops and man**. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, 1975.
- HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, v. 20, p. 509–517, 1971.
- JAUHAR, P. P. **Cytogenetics and breeding of pearl millet and related species**. New York, USA: Alan R Liss, 1981. 289 p.
- LEBRUN, J. P.; STORK, L. Enumération des plantes à fleurs d’Afrique tropicale. Monocotyledones: Limnocharitaceae à Poaceae. **Conserv. & Jard. Bot. Genève**, v. 3, p. 1-341, 1995.
- LIRA, M. L.; SANTOS, M. V. F.; DUBAUX JUNIOR, J. C. B. et al. (Ed.). **Capim-elefante: fundamentos e perspectivas**. Recife: IPA-UFRPE, 2010.
- MACHADO, J. C.; MARTINS, C. E.; AUAD, A. M.; ROCHA, W. S. D. da; LEDO, F. J. da S.; PEREIRA, A. V.; SOUZA SOBRINHO, F. de; BENITES, F. R. G. **Banco ativo de germoplasma de capim-elefante: avaliação da resistência à cigarrinha das pastagens e tolerância à toxidez por alumínio**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012. 27 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 159).
- MARTEL, E.; DE NAY, D.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S.; SARR, A. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **J. Hered.**, v. 88, p. 139–143, 1997.
- MARTEL, E.; PONCET, V.; LAMY, F.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; LEJEUNE, B.; SARR, A. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implication of ITS phylogeny. **Plant Syst. Evol.**, v. 249, p. 139–149, 2004.
- PEREIRA, A. V.; AUAD, A. M.; LÉDO, F. J. S.; BARBOSA, S. *Pennisetum purpureum*. In: FONSECA, D. M.; MARTUSCELLO, J. A. (Ed) **Plantas Forrageiras**. Viçosa: UFV, 2010. cap. 6, p. 197-219.
- PEREIRA, A. V. Germoplasma e diversidade genética do capim-elefante In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM-ELEFANTE, 2., 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1994. p. 1-11.
- ROBERT, T.; KHALFALLAH, N.; MARTEL, E.; LAMY, F.; PONCET, V.; ALLINNE, C.; REMIGEREAU, M. S.; REKIMA, S.; LEVEUGLE, M.; LAKIS, G.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; SARRET, A. *Pennisetum*. In: KOLE, C. (Ed). **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Millets and Grasses**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. p. 217-255.
- SCHMELZER, G. H.; RENNO, J. F. Genotypic variation in progeny of the agamic grass complex *Pennisetum* section Brevivalvula in West Africa. **Plant Syst. Evol.**, v. 215, p. 71–83, 1999.

SHIMOYA, A.; CRUZ, C. D.; FERREIRA, R. P.; PEREIRA, A. V.; CARNEIRO, P. C. S. Divergência genética entre acessos de um banco de germoplasma de capim-elefante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 971-980, 2002.

SHIMOYA, A.; FERREIRA, R. P.; PEREIRA, A. V.; CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. Comportamento morfo-agronômico de genótipos de capim-elefante. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 276, p. 1-19, 2001.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. D.; PEREIRA, A. V.; BEARZOTI, E. Cytotaxonomy of some species and of interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 203-209, 2002.

PENNISETUM purpureum. In: Tropical Forages: an interactive selection tool. Brisbane, Australia: CSIRO, DPI&F(Qld), CIAT and ILRI, 2005. Disponível em: <http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Pennisetum_purpureum.htm>. Acesso em 5 maio 2015.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The grass genera of the world**. Cambridge: C.A.B; International, University Press, 1992.

Citogenética Aplicada ao Melhoramento Genético de *Pennisetum*

Lisete Chamma Davide

2.1. Resumo

Os estudos de citogenética relativos ao gênero *Pennisetum* têm sido realizados em parceria com a Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora/MG, onde o programa de melhoramento desta forrageira é conduzido. Os trabalhos iniciaram-se com a caracterização citogenética de vários acessos de espécies e híbridos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa Gado de Leite (BAGCE). Os estudos avançaram com análises detalhadas sobre os cromossomos do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach. – $2n = 4x = 28$), do milheto (*Pennisetum glaucum* L. – $2n = 2x = 14$), dos híbridos resultantes desse cruzamento, bem como daqueles gerados a partir de indução de duplicação cromossômica. Por meio de análises mitóticas, meióticas e de conteúdo de DNA verificou-se que o híbrido interespecífico triploide ($2n = 3x = 21$) e estéril, é somaticamente estável, apesar de apresentar anormalidades em suas células somáticas e germinativas, produzir polens inviáveis e conteúdo de DNA normalmente inferior ao esperado em relação ao dos parentais. Os híbridos hexaploides sintéticos são caracterizados como mixoploides, por apresentarem número cromossômico que varia de 12 a 42 em células de um mesmo tecido. Esses híbridos apresentam redução no conteúdo de DNA em relação ao parental triploide e anormalidades no ciclo celular e meiose. A mixoploidia é devida à eliminação de cromossomos de ambos os parentais de forma aleatória. Apesar disso, os mais estáveis apresentam frequência de pólen viável que permite seu uso em cruzamentos. Atualmente os estudos estão sendo conduzidos no sentido de caracterizar os cromossomos dos parentais nos híbridos e compreender os fatores que favorecem a eliminação de cromossomos nos híbridos hexaploides parciais.

2.2. Introdução

A citogenética tem dado grande contribuição para o avanço dos programas de melhoramento, especialmente no que diz respeito ao conhecimento do germoplasma disponível. Através das técnicas citogenéticas é possível conhecer ou confirmar o número cromossômico, a ploidia e o comportamento meiótico da espécie de interesse, características importantes que orientam o melhorista na escolha do método de melhoramento a ser utilizado, bem como nas possibilidades de realizar hibridação intra ou interespecífica.

Além dessa informação básica, a associação de técnicas citogenéticas, de biologia celular e de biologia molecular permite a localização de diferentes sequências de DNA nos cromossomos, facilitando a identificação de cromossomos individuais e de diferentes genomas em uma célula.

As técnicas da citogenética molecular também dão suporte para o estudo das mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional que não podem ser explicadas por mudanças na sequência do DNA, denominadas alterações epigenéticas. Os mecanismos epigenéticos causam modificações na organização da cromatina que alteram a expressão gênica e podem explicar, por exemplo, as alterações nos ciclos celulares mitótico e meiótico, que podem afetar a fertilidade dos organismos.

No que diz respeito à aplicação de técnicas citogenéticas no melhoramento genético do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), a ocorrência de espécies do mesmo gênero, morfologicamente seme-

lhantes, diferentes ploídias e a possibilidade de realização de cruzamentos interespecíficos, tornam os dados citogenéticos muito interessantes tanto do ponto de vista da citotaxonomia, filogenia e evolução, quanto para a condução dos programas de melhoramento.

No melhoramento genético do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.) busca-se explorar a variação intraespecífica e a do germoplasma de espécies próximas, como o milheto (*Pennisetum glaucum* L.). No cruzamento interespecífico tem-se como objetivo combinar as características mais favoráveis do milheto, como vigor, resistência à seca, tolerância a doenças, qualidade forrageira e tamanho da semente com a rusticidade, agressividade e elevada produção de matéria seca do capim-elefante (PEREIRA et al., 2003). A citogenética segue paralela à condução do programa de melhoramento, contribuindo para a identificação correta de acessos do banco de germoplasma e dos genótipos híbridos obtidos nos cruzamentos interespecíficos. Além disso, procura-se compreender os mecanismos citogenéticos e epigenéticos relacionados com os processos de hibridação e poliploidização.

Nos tópicos seguintes serão apresentados alguns dos resultados obtidos pela equipe de citogeneticistas da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, em parceria com pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG.

2.3. Caracterização do Banco de Germoplasma

A parceria entre o Laboratório de Citogenética de UFLA com a Embrapa Gado de Leite iniciou-se com trabalhos sobre a caracterização citogenética de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa Gado de Leite (BAGCE), aonde se encontra uma das maiores coleções de *Pennisetum* sp. do Brasil. O BAGCE possui acessos de *Pennisetum purpureum*, *Pennisetum glaucum*, raças cromossômicas (híbridos interespecíficos de *P. purpureum* x *P. glaucum*) e espécies selvagens de *Pennisetum*.

Contagens cromossômicas e avaliações de características reprodutivas e morfológicas possibilitaram reclassificar 30% dos acessos avaliados, certificar a efetividade de hibridações realizadas entre *P. purpureum* e *P. glaucum*, e constatar a ocorrência de acessos de espécies silvestres no banco de germoplasma (TECHIO et al.; 2002). Esses resultados evidenciam que, principalmente no caso dos acessos de *Pennisetum*, em função da diversidade de número cromossômico e de ploídia e a origem híbrida de genótipos, a certificação do número cromossômico deve ser realizada nas várias etapas do programa de melhoramento.

2.4. Caracterização Citogenética e Conteúdo de DNA do Capim-elefante, Milheto e Híbridos

O capim-elefante é uma espécie alotetraploide com $2n = 4x = 28$ cromossomos (Figura 1), genomas A'A'BB e conteúdo 2 C de DNA em torno de 4,55 pg. O milheto é uma espécie diploide com $2n = 2x = 14$ cromossomos (Figuras 1), genoma AA, apresentando em torno de 4,75 pg de conteúdo 2 C de DNA (MARTEL et al., 1997). Por serem estritamente relacionados, o capim-elefante e o milheto apresentam boa capacidade de combinação genética e o cruzamento entre essas espécies resulta na obtenção de híbridos triploides estéreis com $2n = 3x = 21$ cromossomos (genomas AA'B). Apesar da estabilidade no número cromossômico somático (BARBOSA et al., 2003), o híbrido triploide apresenta reduções na quantidade de DNA. Leão et al. (2011) encontraram valores entre 0 e 2,16% de redução no conteúdo de DNA em células de folhas jovens de híbridos triploides. As perdas de DNA iniciam-se já na fase embrionária e ocorrem de forma progressiva, podendo chegar a aproximadamente 8% em relação ao total da quantidade de DNA esperada (NUNES et al., 2013).

Os híbridos triploides são propagados vegetativamente e apresentam grande potencial forrageiro, tendo em vista ser tão produtivos e mais palatáveis quanto o próprio capim-elefante (POWELL, HANNA E BURTON, 1975; BRUNKEN, 1977; JAUHAR, 1981; DUJARDIN E HANNA, 1985; LEÃO et al. (2011); MARTEL et al., 1997; CAMPOS (2007); TECHIO et al. 2005). No entanto, para que uma planta seja considerada estável, ela deve apresentar alto índice meiótico, o qual foi estabelecido por Love (1951) como uma forma de seleção de genótipos para cruzamentos, sendo que plantas com índices acima de 90% são consideradas estáveis. Baixas frequências de tétrades normais são relacionadas à ocorrência de irregularidades meióticas

e inviabilidade polínica. Para plantas de capim-elefante e milheto, o índice meiótico observado foi acima de 95%, enquanto que nos híbridos triploides analisados a porcentagem de tétrades normais não atingiu 42% (TECHIO et al., 2006). O resultado apresentado pelos híbridos é reflexo da alta frequência de irregularidades meióticas (Figura 2) que também explicam a esterilidade desses híbridos, onde os autores observaram que 100% dos polens eram inviáveis e com tamanhos diferentes em função da segregação irregular dos cromossomos (Figura 2). Nos parentais capim-elefante e milheto, aproximadamente 100% dos polens são viáveis, quando avaliados por técnica de coloração (TECHIO et al., 2006).

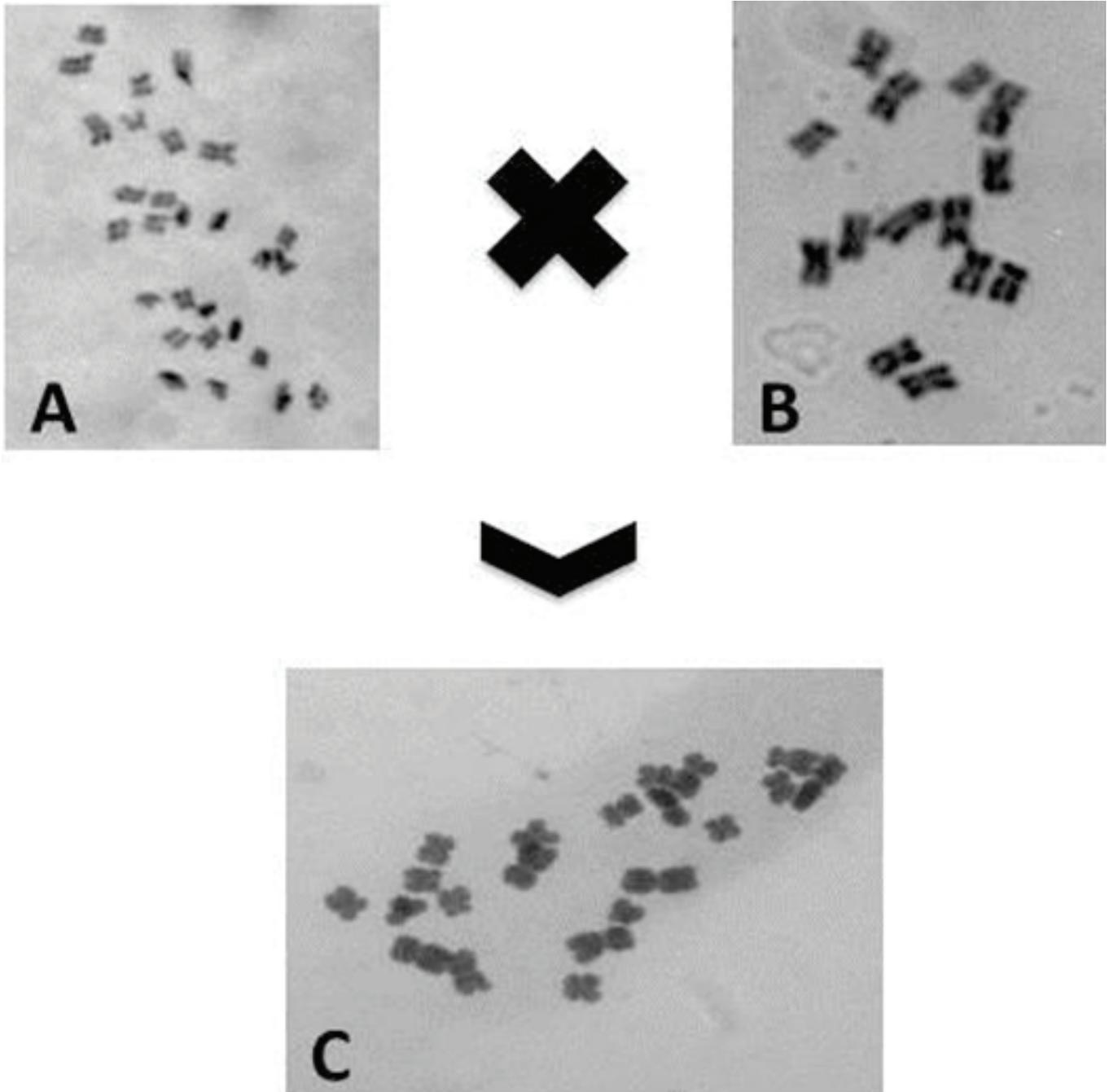


Figura 1. Metáfases mitóticas de *Pennisetum* spp. A - Capim-elefante ($2n=4x=28$); B - Milheto ($2n=2x=14$); C - Híbrido interspecífico ($2n=3x=21$) (BARBOSA et al., 2003).

As plantas com ploidias ímpares, sejam elas auto- ou aloploiploides, normalmente apresentam segregações irregulares devido ao pareamento irregular dos cromossomos na meiose, o que reflete na produção de gametas aneuploides e inviáveis. No caso dos híbridos alotriploides de capim-elefante e milheto são observadas configurações univalentes, bivalentes e multivalentes nas diacineses (Figura 2), como consequência do pareamento homeólogo entre os genomas A, A' e B (JAUHAR, 1968; 1981; PANTULU, 1967; SREE RANGASAMY, 1972; TECHIO et al., 2005; 2006). O pareamento homeólogo é interessante do ponto de vista do melhoramento genético, pois tanto recombinação quanto introgressão de genes de

um genoma para outro poderá ocorrer. No entanto, essas irregularidades limitam o emprego do híbrido nos programas de melhoramento, pois impossibilitam a produção de sementes para a produção de pastagens economicamente viáveis.

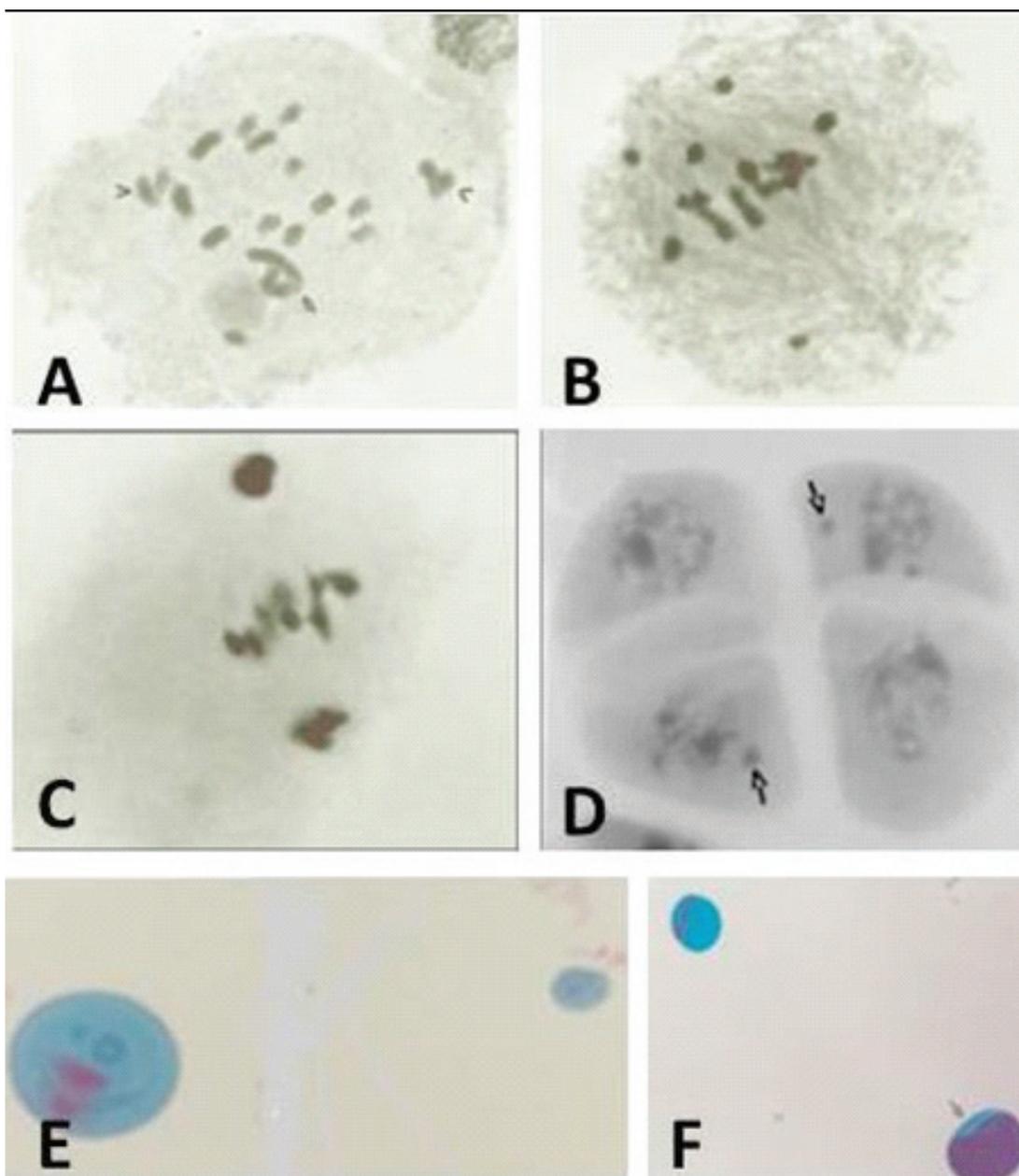


Figura 2. Irregularidades meióticas em acessos híbridos de capim-elefante e milho. A – Diacinese com multivalente e univalente (seta) e bivalente heteromórfico (ponta de seta) sugerindo pareamento entre cromossomos de genomas distintos com diferentes tamanhos. B – Metáfase I com migração precoce de cromossomos. C – Telófase I com cromossomos metafásicos. D – Tétrade com micronúcleos (setas). E – Grãos de pólen inviáveis e com tamanhos diferentes. F – Grãos de pólen viável (seta) e inviável – coloração com Alexander (TECHIO et al., 2006).

A fertilidade do híbrido triploide pode ser resgatada por meio da duplicação cromossômica para a obtenção de hexaploides férteis com $2n = 6x = 42$ cromossomos e genomas AAA'A'BB. No entanto, após a duplicação cromossômica, plantas mixoploides, com células apresentando entre 14 e 42 cromossomos, são frequentemente obtidas (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009), independentemente do tempo em que esses híbridos foram submetidos à duplicação (Figura 3). Híbridos americanos de capim-elefante e milho, poliploidizados a mais de 25 anos em relação a híbridos nacionais mais recentes, mantêm o mesmo padrão de variação no número cromossômico, isto é, apresentam células com 14 a 42 cromossomos (BUSTAMANTE, 2009).

Além das contagens cromossômicas, a confirmação da eficiência dos protocolos de duplicação cromossômica também pode ser aferida por avaliação do conteúdo de DNA e análise da frequência e tamanho dos estômatos em epidermes foliares. O conteúdo de DNA varia entre os diferentes híbridos poliploidizados sinteticamente.

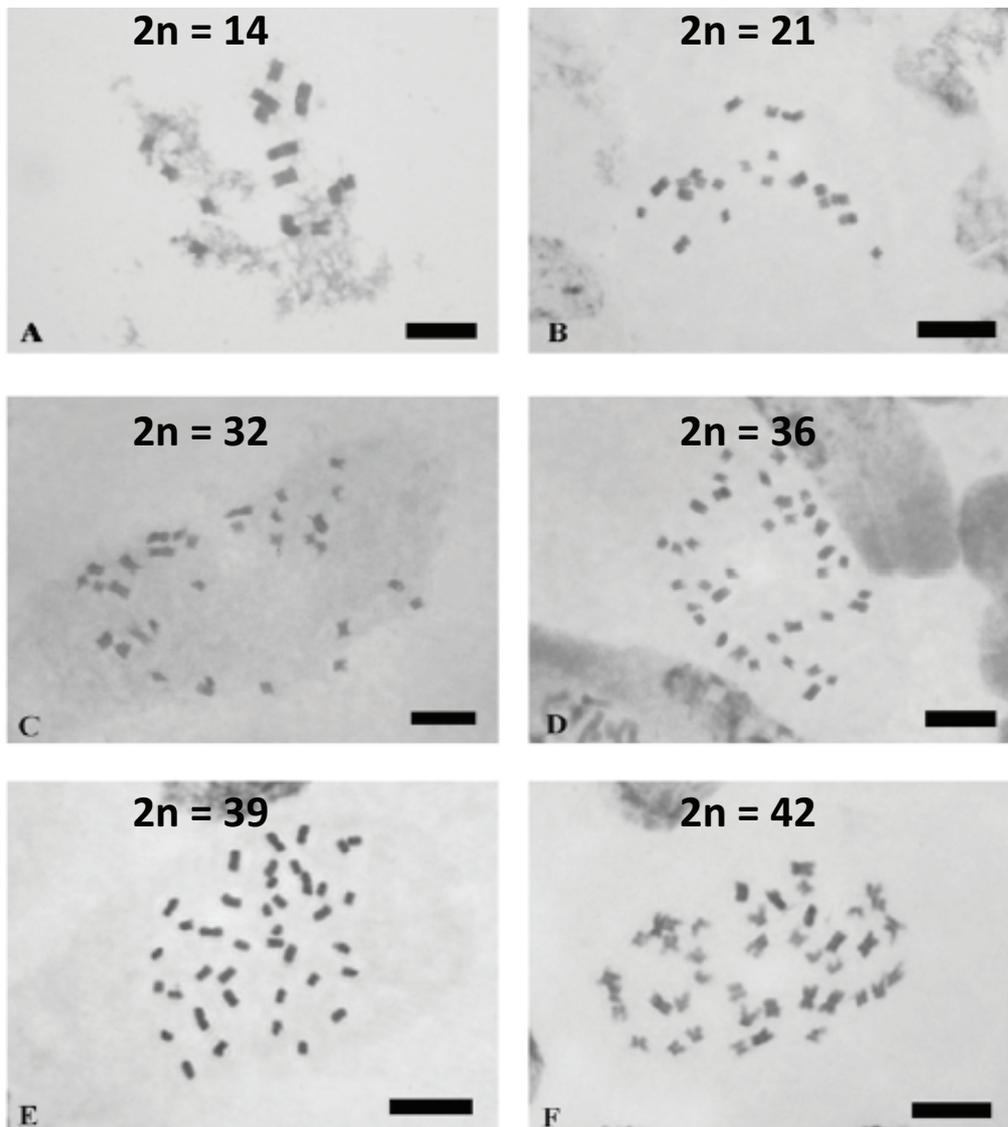


Figura 3. Metáfases mitóticas de híbridos hexaploides parciais sintéticos obtidos do cruzamento entre capim-elefante e milho. Note a variação no número cromossômico em células de um mesmo tecido (BUSTAMANTE, 2009).

Normalmente há redução da quantidade de DNA esperada em relação à observada, tendo sido relatadas perdas entre 2,80% a 28% de DNA (LEÃO et al., 2011).

De acordo com Campos et al. (2009), as características de tamanho dos estômatos diferem marcadamente entre plantas triploides e hexaploides. Os autores fizeram medições dos comprimentos polar e equatorial das epidermes abaxial e adaxial e verificaram que os estômatos das plantas hexaploides são 1,52 vezes maiores que os das plantas triploides.

Os híbridos poliploidizados apresentam baixa frequência de anormalidades nas células meristemáticas de raiz, sendo que a maior porcentagem já registrada foi de 2,8% (BUSTAMANTE, 2009). Apesar das altas frequências de anormalidades meióticas (65% em média), os híbridos poliploidizados produzem polens viáveis, em porcentagens que podem variar entre 9 e 86%, aferidas por coloração e germinação *in vitro* (PAIVA et al., 2012).

A fertilidade de híbridos hexaploides parciais foi certificada também em retrocruzamentos com os parentais capim-elefante e milho, tendo sido obtidos híbridos tetraploides e pentaploides parciais, isto é, também mixoploides, com número cromossômico variando entre 20 a 34 e entre 16 a 28, respectivamente (LEÃO et al., 2011 e 2012).

As irregularidades encontradas em células somáticas e germinativas dos híbridos poliploidizados, bem como as reduções na quantidade de DNA, demonstram que o processo de indução de poliploidia nos híbridos de

capim-elefante e milheto tem como consequência a eliminação tanto de sequências de DNA quanto de cromossomos inteiros.

Entretanto, apesar dos rearranjos genômicos observados, entre esses híbridos poliploidizados artificialmente encontram-se genótipos tendendo à estabilidade e genótipos com tendência a eliminar maior número de cromossomos. Nos genótipos mais estáveis, as células com 38 cromossomos são as mais frequentes (ANDRADE-VIEIRA et al., 2013; BUSTAMANTE, 2009) e são de grande interesse para o melhoramento do capim-elefante. Andrade-Vieira et al. (2013) também verificaram por hibridização *in situ* do DNA total (GISH) de milheto, que o híbrido poliploidizado elimina cromossomos de ambos os parentais e que essa eliminação é casual, apesar de que nos híbridos que tendem a apresentar 28 cromossomos, a eliminação de cromossomos dos genomas A'B de capim-elefante é mais drástica.

2.5. Homeologia Genômica e a Infertilidade do Híbrido Triploide entre Capim-elefante e Milheto

Apesar das diferenças no número cromossômico e ploidia, o capim-elefante e milheto são espécies filogeneticamente relacionadas, possuindo genomas próximos e constituindo um grupo monofilético que divergiu recentemente (MARTEL et al., 2004). Essa proximidade genética é evidenciada pela produção de híbridos naturais. No entanto, a compatibilidade sexual é parcial, uma vez que os híbridos produzidos são triploides e estéreis ($2n = 3x = 21$, genomas AA'B) (MARTEL et al., 2004; ROBERT et al., 2011; TECHIO et al., 2006).

Avaliações da meiose do híbrido triploide mostraram que na diacinese e metáfase I há frequentemente a formação de sete bivalentes resultantes do pareamento entre os genomas A do milheto e A' do capim-elefante, bem como sete univalentes do genoma B do capim-elefante. Com baixa frequência, no entanto, há também a formação de trivalentes e de bivalentes em número superior a sete, o que sugere tanto pareamento alquanto autosindético entre os genomas A, A' e B (JAUHAR, 1968; SREE RANGASAMY, 1972; TECHIO et al., 2005; 2006).

A homeologia entre os genomas A de milheto e A'B de capim-elefante foi confirmada por meio de hibridização *in situ* genômica (GISH) por Reis et al. (2014). A utilização do DNA genômico do milheto como sonda permitiu separar os genomas A' e B nas metáfases mitóticas de capim-elefante e confirmar o alto grau de homeologia entre os cromossomos do genoma A e A'. Os 14 cromossomos do genoma A' foram quase que totalmente marcados com a sonda genômica do milheto, enquanto os cromossomos do genoma B apresentaram pequenas marcas dispersas ao longo do comprimento dos cromossomos.

2.6. Mecanismos Citogenéticos e Epigenéticos Pós-hibridação Interespecífica e Poliploidização

As alterações após hibridação e poliploidização são relacionadas a vários mecanismos. Sabe-se que a combinação de genomas de diferentes espécies em um mesmo núcleo gera conflitos intergenômicos (JONES EPASAKINSKIENÉ, 2005), podendo induzir a eliminação de sequências de DNA e/ou de cromossomos.

Jones and Hegarty (2009) propõem que a origem desses conflitos está nas diferenças de tamanho dos genomas, composição genômica, mecanismos regulatórios, duração do ciclo celular e modificações genéticas e epigenéticas. Essas alterações ocorrem rapidamente em neopoliploides, como demonstrado por Feldman et al. (1997). Exemplos de eliminação parcial ou completa de cromossomos não são raros em Poaceae. Do cruzamento entre *Hordeum vulgare* L. e *H. bulbosum* L., são produzidos embriões haploides após eliminação dos cromossomos de *H. bulbosum* (KASHA E KAO, 1970) e no cruzamento entre milheto e trigo (*Triticum aestivum* L.), ocorre eliminação gradual dos cromossomos de milheto (GERNAND et al., 2005).

Mas o que leva à eliminação de sequências de DNA nos híbridos de capim-elefante e milheto?

Considerando o alto grau de homeologia entre os genomas A e A', além da homeologia em menor grau entre esses genomas e o genoma B (JAUHAR, 1981; TECHIO et al., 2005; 2006; REIS et al., 2014), é de se esperar

que após hibridação e poliploidização haja necessidade de uma reorganização no núcleo para que a célula atinja a homeostase. Desta forma, o material genético que se encontra em múltiplas doses, é eliminado. A eliminação de sequências depende da ocorrência de quebras no DNA, que geram rearranjos estruturais, como observados em células somáticas quanto germinativas para esses híbridos. E o pareamento irregular dos cromossomos na meiose, em função da homologia entre os três genomas, leva à segregação irregular e perda de cromossomos inteiros.

Estudos também associam a eliminação de cromossomos com alteração epigenética, envolvendo a atividade centromérica e que afetam a orientação e a segregação de cromossomas (GERMAND et al., 2003; MOCHIDA, 2004; ISHII et al., 2010). A fosforilação da histona H3 na serina 10 (H3S10f), por exemplo, é um tipo de modificação pós-traducional que tem um papel importante na condensação cromossômica e coesão entre cromátides irmãs, detectada principalmente na região pericentromérica (PAULA et al., 2013; FEITOZA e GUERRA, 2011; KASZÁS e CONDE, 2000). A coesão das cromátides na região pericentromérica é essencial para a orientação correta dos cromossomos (PAULA et al., 2013). Nos híbridos triploides e hexaploides parciais de capim-elefante e milheto, Resende et al. (2015) observaram sinais de fosforilação da H3S10 em pontes nas anáfases e telófases mitóticas que os levaram a sugerir perda de fragmentos cromossômicos como consequência dos processos de hibridação e poliploidização. Os autores também verificaram que nos híbridos hexaploides parciais havia cromossomos em processo de eliminação com e sem o sinal da H3S10f, sugerindo que mesmo cromossomos com centrômero funcional estavam sendo eliminados.

Tanto os rearranjos cromossômicos estruturais, quanto o alto grau de homologia entre os genomas parentais e as alterações epigenéticas podem, isoladamente ou em conjunto, contribuir para a ocorrência de alterações decorrentes dos processos de hibridação interespecífica quanto de poliploidização. Assim, outros eventos epigenéticos devem ser avaliados para verificar seus efeitos nos processos de hibridação e poliploidização envolvendo o capim-elefante e o milheto, entre eles, a organização das fibras do fuso nos processos de divisão celular, o silenciamento gênico e a ativação de genes, bem como a ativação de retroelementos que alteram a expressão de genes adjacentes.

2.7. Perspectivas

As plantas mais estáveis dos híbridos hexaploides parciais de capim-elefante e milheto, com números cromossômicos em torno de 38 e produção relativamente alta de polens viáveis, podem, após algumas gerações de intercruzamento, manter em seus núcleos a composição gênica desejável para a obtenção de cultivares de interesse comercial. Desta forma, os estudos estão sendo conduzidos com o intuito de utilizar o maior número possível de marcadores citogenéticos para distinguir os cromossomos dos parentais nos híbridos e assim, identificar aqueles que sempre permanecem nas combinações híbridas de interesse. Além disso, marcas epigenéticas estão sendo empregadas para melhor entender o comportamento das fibras do fuso e dos centrômeros durante o processo de eliminação cromossômica e nos processos de silenciamento e ativação gênica após hibridação e poliploidização.

2.8. Referências

- ABREU, J. C.; DAVIDE L. C.; PEREIRA A. V.; BARBOSA S. Mixoploidy in napiergrass x pearl millet hybrids treated with antimetabolic agents. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, 2006.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F.; REIS, G. B.; TORRES, G. A.; OLIVEIRA, A. R.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; PEREIRA, A. V.; DAVIDE, L. C. Biparental chromosome elimination in artificial interspecific hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Crop Science**, v. 53, n. 5, p. 1917-1924, 2013.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* (Schumack) x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 26-35, 2003.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; ABREU, J. C. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milheto. **Bragantia**, v. 66, p. 365-372, 2007.

BRUNKEN, J. N.; DE WET, J. M. J.; HARLAN, J. R. The morphology and domestication of pearl millet. **Econ. Bot.**, v. 31, p. 163–174, 1977.

BUSTAMANTE, F. O. **Variações cromossômicas associadas a poliploidização em híbridos de *Pennisetum spp.***: Um estudo temporal e tecido específico. 2009. Dissertação (Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAMPOS, J. M. S. **Obtenção de híbridos hexaplóides e análise genômica de *Pennisetum sp.* por citometria de fluxo.** 2007. Tese (Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C.; SALGADO, C. C.; SANTOS, F. C.; COSTA, P. N.; SILVA, O. S.; ALVES, C. C. S.; VICCINI, L. F.; PEREIRA, A. V. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, v. 128, n. 1, p. 101-104. 2009.

DUJARDIN, M.; HANNA, W. W. Cytology and reproductive behavior of pearl millet-napiergrass hexaploids x *Pennisetum squamulatum* trispecific hybrids. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 76, n. 5, p. 382-384, 1985.

FEITOZA, L.; GUERRA, M. Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. **Genética**, v. 139, p. 305- 314, 2011.

FELDMAN, M.; LIU, B.; SEGAL, G.; ABBO, S.; LEVY, A. A.; VEGA, J. M. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosome. **Genetics**, v. 147, p. 1381-1387, 1997.

GERNAND, D.; DEMIDOV, D.; HOUBEN, A. The temporal and spatial pattern of histone H3 phosphorylation at serine 28 and serine 10 is similar in plants but differs between mono- and polycentric chromosomes. **Cytogenet Genome Res.**, v. 101, p. 172–176, 2003.

GERNAND, D.; RUTTEN, T.; VARSHNEY, A.; RUBTSOVA, M.; PRODANOVIC, S.; BRUS, C.; KUMLEHN, J.; MATZK, F.; HOUBEN, A. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. **Plant Cell**, v. 17, n. 9, p. 2431-2438, 2005.

ISHII, T., UEDA, T., TANAKA, H., TSUJIMOTO, H. Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. **Chromosome Research**, v. 18, n. 7, p. 821-831, 2010.

JAUHAR, P. P. Inter- and intra-genomal chromosome pairing in an interspecific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. **Genetica**, v. 39, n. 3-4, p. 360-370, 1968.

JAUHAR, P. P. Cytogenetics of pearl millet. **Advances in Agronomy**, v. 34, p. 407-479, 1981.

JONES, N.; PASAKINSKIENÉ, I. Genome conflict in the gramineae. **New Phytol.** v. 165, p. 391-409, 2005.

JONES, R. N.; HEGARTY M. Order out of chaos in the hybrid plant nucleus. **Cytogenet Genome Res.**, v. 126, p. 376-389, 2009.

KASHA, K. J.; KAO, K. N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Nature**, v. 225, p. 874–876, 1970.

KASZÁS, E.; CANDE, W. Z. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 18, p. 3217–3226. 2000.

LEÃO, F. F.; DAVIDE, L. C.; CAMPOS, J. M. S.; PEREIRA, A. V.; BUSTAMANTE, F. O. Genomic behavior of hybrid combinations between elephant grass and pearl millet. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 712-719, 2011.

LEÃO, F. F.; CANCELLIER, F. F.; PEREIRA, A. V.; LEDO, F. J. S.; AFFÉRI, F. S. Produção forrageira e composição bromatológica de combinações genômicas de capim-elefante e milheto. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 368-375, 2012.

LOVE, R. M. Varietal differences in meiotic chromosome behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**, Madison, v. 43, n. 1, p. 2-6, 1951.

MARTEL, E. et al. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **Journal of Heredity**, v. 88, n. 2, p. 139-143, Mar.-Apr. 1997.

MARTEL, E. et al. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 249, n. 3-4, p. 139-149, Nov. 2004.

MOCHIDA, K.; TSUJIMOTO, H.; SASAKUMA, T. Confocal analysis of chromosome behaviour in wheat x maize zygotes. **Genome**, v. 47, p. 199-205, 2004.

NUNES, J. D.; AZEVEDO, A. L. S.; PEREIRA, A. V.; PAULA, C. M. P.; CAMPOS, J. M. S.; LÉDO, F. J. S.; SANTOS, V. B. DNA elimination in embryogenic development of *Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum* (Poaceae) hybrids. **Genet Mol Res.**, v. 12, n. 4, p. 4817-4826, 2013.

PAIVA, E. A. A.; BUSTAMANTE, F. O.; BARBOSA, S.; PEREIRA, A. V.; DAVIDE, L. C. Meiotic behavior in early and recent duplicated hexaploid hybrids of napier grass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Caryologia**, v. 65, p. 114-120, 2012.

PANTULU, J. V. Pachytene pairing and meiosis in the F1 hybrid of *Pennisetum typhoides* and *P. purpureum*. **Cytologia**, Tokyo, v. 32, n. 3/4, p. 532-541, 1967.

PAULA, C. M. P.; TECHIO, V. H.; SOUZA SOBRINHO, F.; FREITAS, A. S. Distribution pattern of histone H3 phosphorylation at serine 10 during mitosis and meiosis in *Brachiaria* species. **J. Genet.**, v. 92, n. 2, p. 259-266, 2013.

PEREIRA, A. V.; S. SOUZA SOBRINHO, F.; SOUZA, F. H. D.; LÉDO, F. J. S. Tendências do melhoramento genético e produção de sementes forrageiras no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2003, Lavras. Melhoramento de plantas e produção de sementes no Brasil: **Anais...** Lavras: editora, 2003. p. 36-63.

POWELL, J. B.; HANNA, W. W.; BURTON, G. W. Origin, cytology and reproductive behaviour of haploids in pearl millet. **Crop Science**, Madison, v. 15, n. 2, p. 389-392, 1975.

REIS, G. B.; MESQUITA, A. T.; TORRES, G. A.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; PEREIRA, A. V.; DAVIDE, L. C. Genomic homeology between *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* (Poaceae). **Comparative Cytogenetics**, v. 8, n. 3, p. 31-41, 2014.

RESENDE, K. F. M.; SANTOS, F. M. C.; PAULA, C. M. P.; TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C. Effects of hybridization and polyploidy on the histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10ph) in *Pennisetum* spp. Rich. (Poaceae). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 5, p. 453-457, 2015.

ROBERT, T.; KHALFALLAH, N.; MARTEL, E.; LAMY, F.; PONCET, V.; ALLINNE, C.; REMIGEREAU, M.; REKIMA, S.; LEVEUGLE, M.; LAKIS, G.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; SARR, A. Structure and Evolutionary

Relationships Within *Pennisetum* Complex of Species. In: KOLE, C. (ed.). **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Millets and Grasses**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. p. 217-255.

SREE RANGASWAMY, S. R. Cytological studies on diploid and polyploid taxa of the genus *Pennisetum* Rich. **Genetica**, v. 43, p. 257-273, 1972.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. D.; PEREIRA, A. V.; BEARZOTI, E. Cytotaxonomy of some species and of interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 203-209, 2002.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. P. Genomic analysis in *Pennisetum purpureum* and *P. glaucum* hybrids. **Caryologia**, v. 8, p. 28-33, 2005.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 353-362, 2006.

Melhoramento Genético de *Brachiaria ruziziensis*: Histórico e Estratégias

Fausto Souza Sobrinho
Flávio Rodrigo Gandolfi Benites

3.1. Resumo

A pecuária leiteira brasileira apresentou grande incremento na produção nos últimos anos, passando, inclusive, a exportar o leite excedente. A melhoria do potencial genético dos rebanhos, associado com a redução dos custos e adoção de técnicas de manejo mais adequadas contribuíram favoravelmente com o aumento da produção nacional. Entretanto, para que os animais possam expressar todo o seu potencial produtivo, é necessária uma alimentação adequada, exigindo-se a disponibilização de forragem de qualidade durante todo o ano. Nesse sentido, o melhoramento genético de forrageiras assume grande importância, visando o lançamento de cultivares mais adaptadas às diferentes condições ambientais brasileiras. Os gêneros *Panicum* e *Brachiaria* se destacam como os mais cultivados, sendo que cultivares deste último ocupam cerca de 85% das áreas de pastagens do país. Dentre as espécies do gênero *Brachiaria* as mais utilizadas são *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. A *B. ruziziensis* é a única espécie cultivada no Brasil que é totalmente sexual e diploide, facilitando a geração e exploração de variabilidade genética. A Embrapa Gado de Leite tem conduzido um programa de melhoramento genético de *B. ruziziensis* e neste capítulo serão comentados alguns aspectos deste programa, com a apresentação sucinta dos resultados obtidos até o momento.

3.2. Introdução

A maior disponibilidade e rapidez das informações e a abertura dos mercados, tanto internos quanto externos, forçaram o desenvolvimento e incremento das atividades econômicas brasileiras. No caso da pecuária leiteira, a resposta ao aumento da competitividade dos mercados foi dada basicamente por meio da melhoria do potencial genético dos rebanhos e da redução de custos de produção. Entretanto, para que os animais possam expressar todo o seu potencial produtivo, é necessária uma alimentação adequada. Exige-se, portanto, a disponibilização de forragem de qualidade durante todo o ano (SOUZA SOBRINHO et al., 2009).

Embora o número de espécies forrageiras disponíveis no Brasil seja elevado, os gêneros *Brachiaria* e *Panicum* apresentam maior importância, expressa pela maior área cultivada e pelo grande valor agregado ao comércio de suas sementes. Estima-se que mais de 80% da área de pastagens cultivadas no Brasil utilizem cultivares destes dois gêneros (FERNANDES et al., 2000).

Pelo exposto, há necessidade de maior atenção à alimentação animal, especialmente as espécies forrageiras utilizadas, com ênfase em produtividade de matéria seca, qualidade da forragem e adaptação regional. Nesse sentido, o melhoramento genético de forrageiras surge como boa alternativa, com grande potencial de incrementos na pecuária brasileira e, conseqüente aumento de renda dos produtores (SOUZA SOBRINHO, 2005; SOUZA SOBRINHO et al., 2009).

Dentro do gênero *Brachiaria*, as espécies mais cultivadas no Brasil são *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*, sendo as duas primeiras aquelas de maior importância econômica (VALLE et al., 2012; SOUZA SOBRINHO et al., 2009). Entretanto, em função da *B. ruziziensis* ser a única espécie cultivada no Brasil que se apresenta diploide e totalmente sexual, permitindo a geração e aproveitamento da variabilidade

genética por meio da seleção, a Embrapa Gado de Leite iniciou um programa de melhoramento genético desta espécie (SOUZA SOBRINHO et al., 2013). Além disso, é importante mencionar que esta espécie também é utilizada nos programas de melhoramento de *B. brizantha* e *B. decumbens*, que são apomíticas e necessitam de uma ponte para a geração de variabilidade (SOUZA SOBRINHO et al., 2009).

A seguir serão comentados alguns aspectos particulares do melhoramento de *Brachiaria ruziziensis* realizado na Embrapa Gado de Leite.

3.3. Melhoramento de *Brachiaria ruziziensis*

O gênero *Brachiaria* apresenta em torno de 100 espécies de origem essencialmente africana, sendo que as de maior importância forrageira no Brasil são *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. ruziziensis* e *B. humidicola* (RENVOIZE et al., 1996). A boa adaptabilidade a solos de baixa fertilidade natural, plasticidade na adaptação a diferentes climas e latitudes, agressividade na competição com invasoras e bom desempenho animal das variedades introduzidas explicam a rápida expansão das *Brachiaris* nos trópicos (BOGDAN, 1977; WENZL et al., 2001 e 2003; RAO et al., 2006).

Das espécies cultivadas no Brasil, a única que é totalmente diploide e sexual é a *B. ruziziensis*, possibilitando a geração de variabilidade para atuação da seleção dos melhores genótipos (SOUZA SOBRINHO et al., 2010). As demais espécies, embora apresentem alguns acessos diploides e sexuais, são basicamente poliploides e apomíticas.

Embora não seja a espécie com maior área cultivada, a demanda por sementes de *B. ruziziensis* vêm aumentando com o incremento da integração entre agricultura, pecuária e floresta (ILPF). Esta espécie tem sido muito utilizada nos sistemas ILPF principalmente por apresentar uma melhor adaptação à sobressemeadura que as demais espécies do gênero e demandar menos herbicida na dessecação para estabelecer a cultura seguinte. Outra vantagem da *B. ruziziensis* na ILPF é que a produção de sementes é uniforme, pois só floresce uma vez, tornando o seu controle mais fácil.

Embora na ILPF seja utilizada principalmente como cobertura de solo para o plantio direto, não são poucos os produtores que a cultivam especificamente para alimentação animal. A obtenção de cultivares melhoradas de *B. ruziziensis*, quer seja para produção de palhada ou de forragem, torna-se, portanto, exigência dos produtores agrícolas brasileiros (SOUZA SOBRINHO et al., 2009).

3.3.1. Histórico do programa de melhoramento de *B. ruziziensis*

Em 2004 a Embrapa Gado de Leite iniciou um programa de melhoramento de *B. ruziziensis*. Esta espécie é a única do gênero cultivada no Brasil que é totalmente diploide e sexual, possibilitando a geração e exploração da variabilidade genética, por meio da seleção. Além disso, apresenta boa qualidade da forragem e palatabilidade, podendo se tornar boa alternativa para a pecuária leiteira. Contudo, há que se conseguir cultivares com maior produtividade de forragem, mais tolerantes a solos de baixa fertilidade e resistentes a cigarrinhas (SOUZA SOBRINHO, 2005).

Até o momento foram realizados três ciclos de seleção recorrente intrapopulacional e os resultados obtidos nas primeiras avaliações do programa de melhoramento evidenciaram a existência de grande variabilidade genética para todas as características avaliadas, permitindo a seleção e acenando com a possibilidade de obtenção de cultivares melhoradas desta forrageira. Para a produtividade e qualidade da forragem, foram identificados materiais superiores não só à cultivar de *B. ruziziensis* disponível no mercado (cultivar Kennedy ou Comum), mas também às principais cultivares de braquiárias (*B. brizantha*, cv. Marandu; e *B. decumbens*, cv Basilisk) utilizadas no Brasil.

Quanto à resistência às cigarrinhas, principal praga do gênero e maior responsável pela restrição à expansão da área cultivada com esta espécie, foram detectadas diferenças entre os materiais avaliados. Alguns clones apresentaram resultados similares às testemunhas, incluindo a cultivar Marandu, padrão de resistência a estes insetos, com baixas sobrevivências das ninfas de *Deois schach* e *Mahanarva spectabilis* (SOUZA

SOBRINHO et al., 2010). A possibilidade de obtenção de cultivares de *B. ruziziensis* resistentes às cigarrinhas torna esta espécie ainda mais atrativa para os produtores, em função de sua boa qualidade e palatabilidade da forragem.

3.3.2. Estratégias do melhoramento de *B. ruziziensis*

O programa de melhoramento genético de *B. ruziziensis* teve início com a coleta de plantas em pastagens antigas. Estabeleceu-se como critério que a forrageira estivesse implantada a pelo menos 10 anos nas áreas a serem coletadas. As plantas foram coletadas com base na avaliação visual (fenotípica) realizada no final da estação seca do ano. Assim, no final de setembro do ano de 2004 foram identificadas e coletadas cerca de 160 plantas, as quais foram transplantadas para área isolada, onde permaneceram até o florescimento, que ocorreu entre abril e junho do ano seguinte. Foram colhidas sementes de todas as plantas individualmente, obtendo-se progênies de meio-irmãos. Novas coletas de plantas em pastagens foram realizadas em diferentes anos visando incorporar variabilidade dentro do germoplasma trabalhado.

Paralelamente foram obtidas sementes de 17 acessos do banco de germoplasma de *Brachiaria* mantido na Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS), e obtidas sementes da cultivar Kennedy (única cultivar comercial de *B. ruziziensis*) de diferentes empresas produtoras, sediadas em diferentes estados brasileiros, visando obter o máximo de variabilidade dentro da espécie. Embora a cultivar Kennedy seja a mesma, a obtenção de sementes multiplicadas em diferentes condições ambientais (estados brasileiros) objetivou captar possíveis efeitos da seleção natural que possa ter atuado ao longo do tempo.

3.3.3. Principais resultados do programa de melhoramento

Inicialmente, com o objetivo de conhecer o comportamento produtivo das diferentes cultivares de *Brachiaria* disponíveis no mercado, foi realizado um experimento para avaliação da produtividade e qualidade da forragem destes materiais. Foram avaliadas as cultivares Xaraes, Marandu (*B. brizantha*), Trulli (*B. humidicola*), Basilisk (*B. decumbens*), Kennedy (*B. ruziziensis*), Llanero (*B. dictyoneura*), Mulato (híbrido) e um acesso de *Brachiaria* spp.. Após dois anos de avaliações, com a realização de dez cortes, observou-se que as cultivares Xaraes e Mulato, ao lado do acesso de *Brachiaria* spp., apresentaram as maiores produtividades de forragem. As cultivares Basilisk e Marandu, que são aquelas que ocupam as maiores áreas de pastagens no Brasil, apresentaram produtividades intermediárias de forragem. A cultivar Kennedy (*B. ruziziensis*) foi classificada no grupo inferior, com produtividade de forragem cerca de 30% inferior à média das cultivares Basilisk e Marandu (SOUZA SOBRINHO et al., 2009) (Figura 1).

No início dos trabalhos, partindo-se da coleta das plantas e do seu inter cruzamento foram obtidas 115 progênies de meio-irmãos com sementes suficientes para implantação de experimento de campo. Após a coleta procedeu-se o beneficiamento e a quebra de dormência das sementes, empregando-se ácido sulfúrico PA por 15 min. Foram obtidas mudas das diferentes progênies em bandejas de tubetes contendo substrato comercial à base de casca de Pinus em casa de vegetação. Essas mudas foram empregadas para avaliações de produtividade e qualidade da forragem em experimentos de campo, bem como para tolerância ao alumínio e resistência às cigarrinhas das pastagens em casa de vegetação.

Os resultados obtidos evidenciaram a existência de grande variabilidade genética para a produtividade e qualidade da forragem. Foram identificados materiais superiores não só à cultivar de *B. ruziziensis* disponível no mercado (cultivar Kennedy), mas também às principais cultivares utilizadas no Brasil (SOUZA, 2007) (Figura 2). Em todos os cortes houve progênies com produtividade de matéria seca estatisticamente igual ou superior às melhores testemunhas.

Verificou-se que as progênies de *B. ruziziensis* eram muito afetadas pelo período seco do ano, onde, além da falta de água, as temperaturas médias eram mais baixas. Nesse período, a produtividade média de forragem foi reduzida, comparativamente às cultivares de *B. brizantha* e *B. decumbens* (Figura 3). Em função da importância de produção de forragem nessa época, e como houve progênies que se destacaram, a seleção de materiais com boa produtividade na seca foi priorizada.

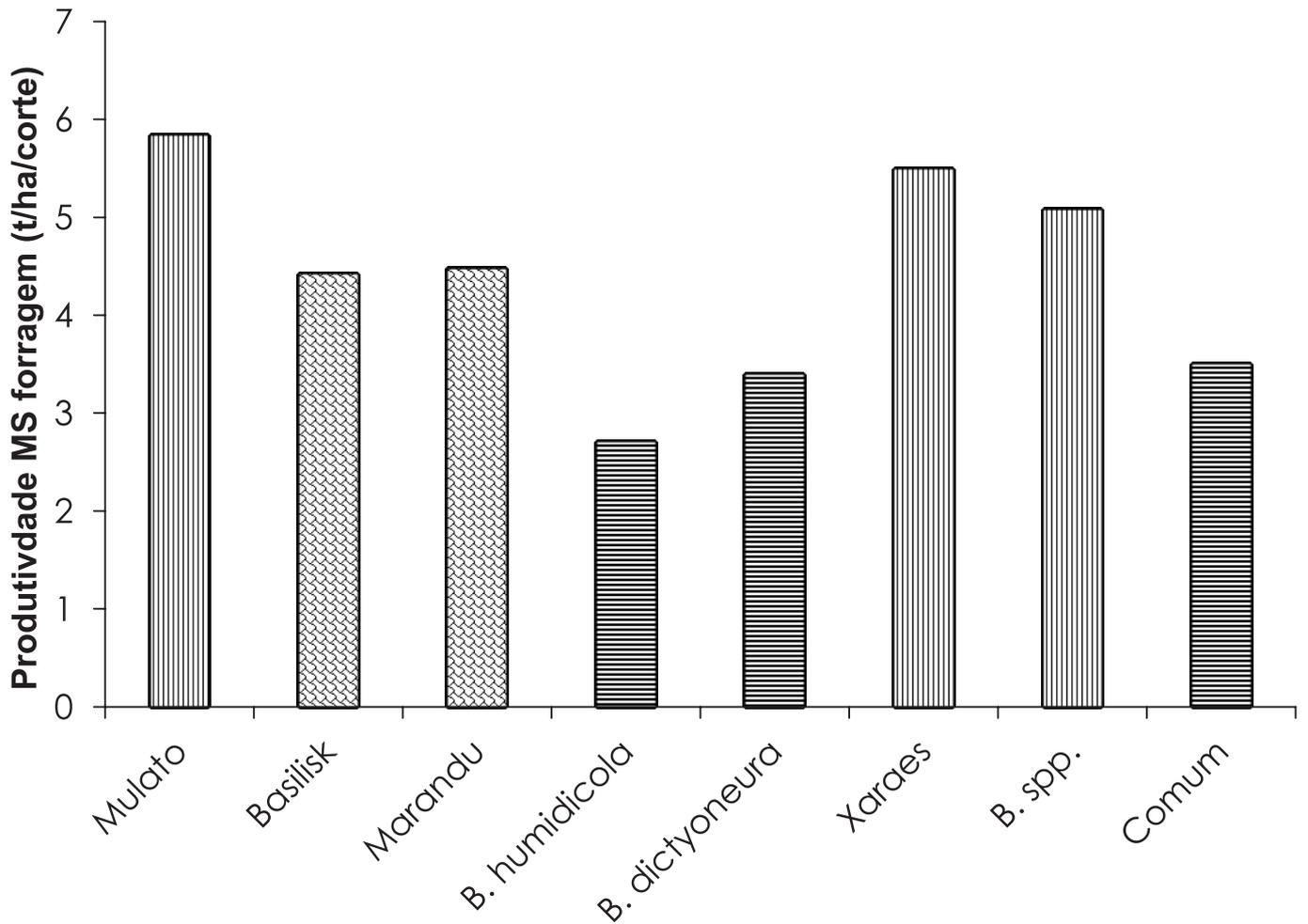


Figura 1. Produtividade de forragem seca (t/ha/corte) de cultivares comerciais de *Brachiaria*.

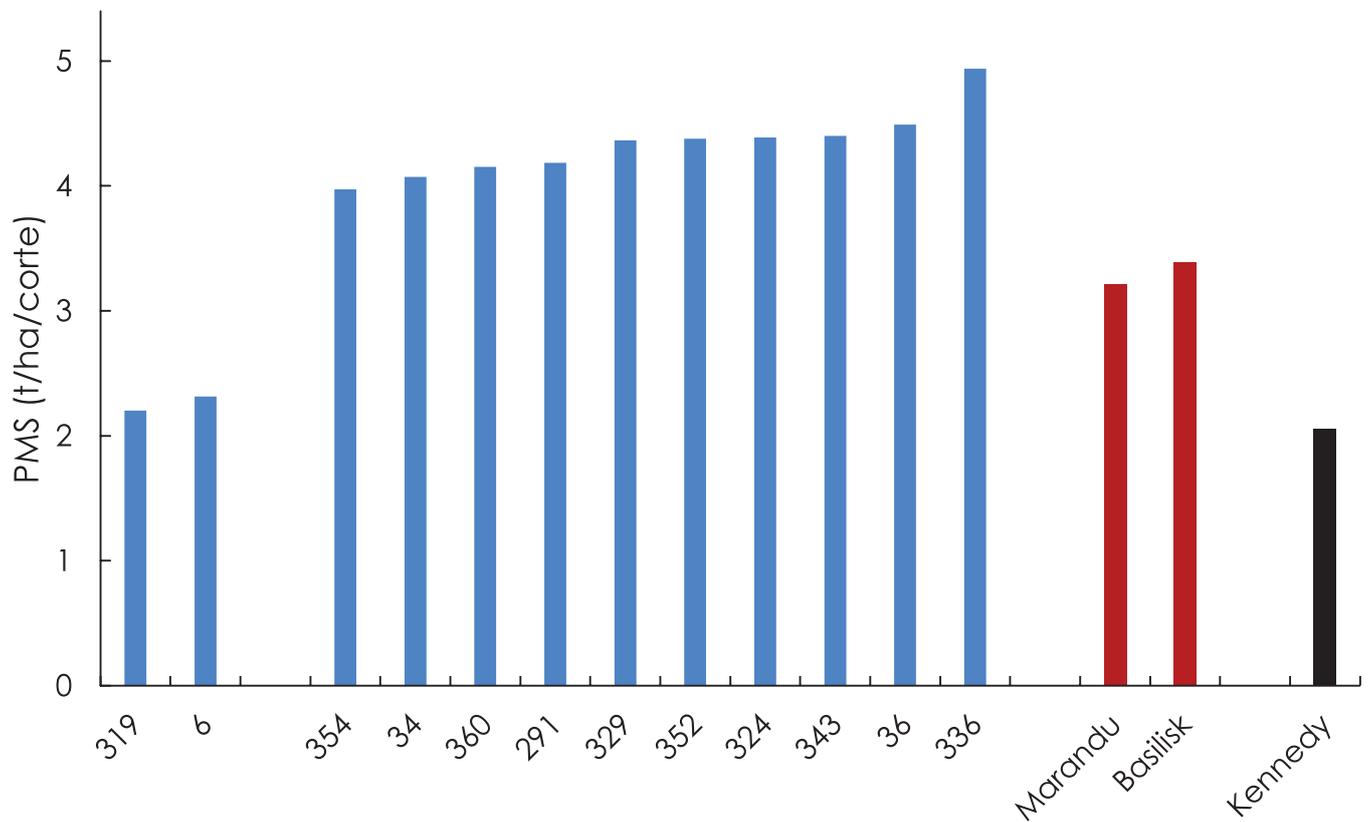


Figura 2. Produtividade média de matéria seca de forragem (5 cortes) de progênies de meio-irmãos de *B. ruziziensis* obtida em Coronel Pacheco (MG).

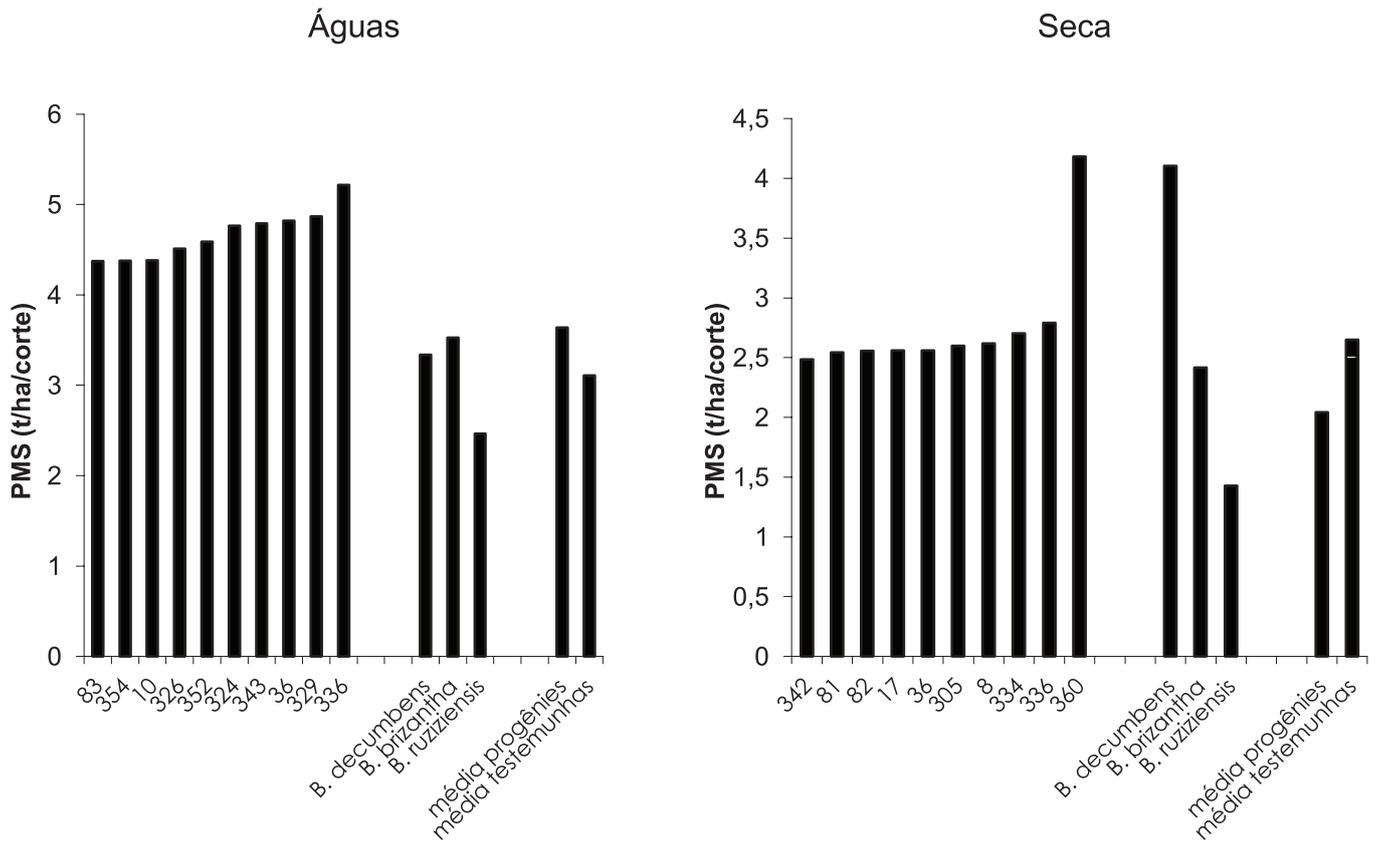


Figura 3. Produtividade de massa seca de forragem de progênies de *B. ruziziensis* e das cultivares comerciais Marandu, Basilisk e Kennedy (*B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*, respectivamente) na época das águas e da seca.

Até mesmo para as cigarrinhas das pastagens, principal praga que ataca a maioria das espécies forrageiras tropicais e para a qual a *B. ruziziensis* é considerada como padrão de suscetibilidade (MILES et al., 2006), também foi verificada variabilidade entre as progênies avaliadas. Embora a maioria das progênies tenha se mostrado boas hospedeiras, algumas apresentaram sobrevivência de ninfas e danos nas plantas intermediárias (Figura 4) (SOUZA SOBRINHO et al., 2010).

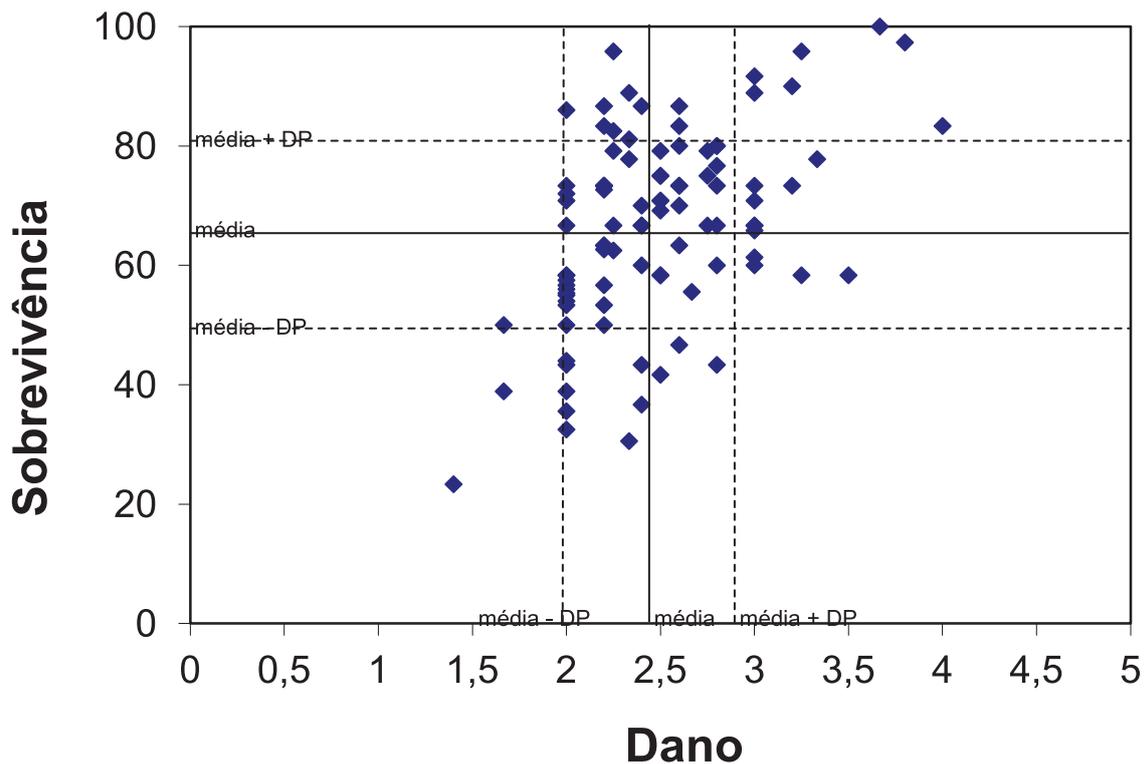


Figura 4. Ilustração da variabilidade para resistência a ninfas de cigarrinhas das pastagens nas progênies de meio-irmãos.

O primeiro ciclo de seleção recorrente foi finalizado com o intercruzamento das melhores progênies e obtenção de uma população melhorada, que seria utilizada como base para a continuidade do programa de melhoramento. A partir de sementes dessa população foram obtidas cerca de 1.000 plantas que foram avaliadas em solução nutritiva completa contendo 30 g/L de Al. As melhores plantas, que apresentaram maior desenvolvimento tanto de parte aérea como de raízes, foram selecionadas e clonadas para obtenção de mudas para avaliações a campo e também em casa de vegetação. Neste segundo ciclo, então, o teste de progênies foi substituído pelo teste clonal. As características avaliadas foram semelhantes e os resultados confirmaram a existência de variabilidade genética dentro da espécie, como pode ser ilustrado pelos resultados obtidos para a qualidade da forragem dos clones de *B. ruziziensis* (Figura 5).

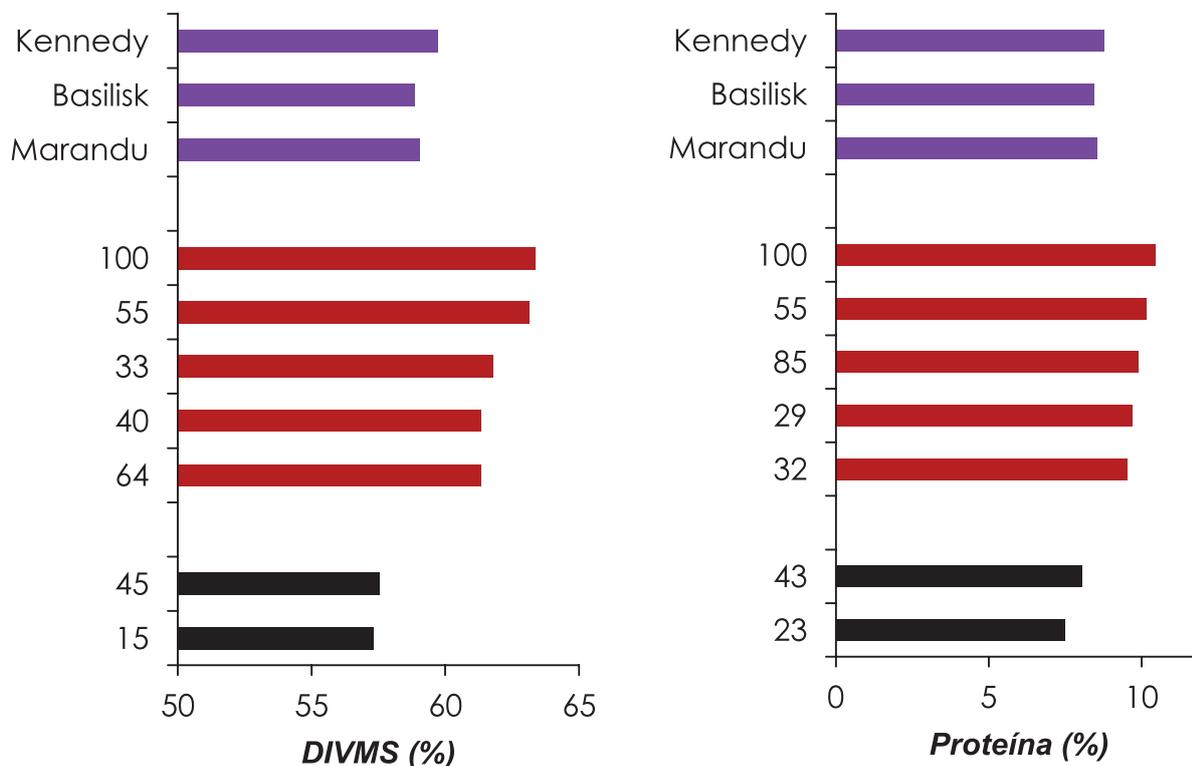


Figura 5. Estimativas médias dos cinco melhores clones de *B. ruziziensis* e dois piores, além das cultivares Kennedy (ou Comum), Basilisk e Marandu (*B. ruziziensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha*, respectivamente) para a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e proteína bruta (PB).

Como nos sistemas produtivos de ILPF normalmente as forrageiras são submetidas, em algum momento do seu desenvolvimento, a restrições de luminosidade, é importante identificar materiais genéticos mais adaptados a essas condições. Avaliando-se clones de *B. ruziziensis* em vasos (3 plantas/vaso), em casa-de-vegetação coberta com sombrite (restrição de luminosidade de 40%), foram detectadas diferenças significativas para as produtividades de matéria verde e seca de forragem. A amplitude de variação para o peso verde de forragem foi de 240 g/vaso, representando 181% da média de todos os clones avaliados. Dos 65 clones avaliados, 32 materiais apresentaram médias semelhantes à melhor testemunha (cultivar Kennedy – *B. ruziziensis*). Esses materiais (32 clones) mostraram superioridade média de 193% em relação às cultivares Basilisk (*B. decumbens*) e Marandu (*B. brizantha*), que são os materiais de *Brachiaria* mais difundidos no Brasil (Figura 6). Resultados semelhantes foram observados para o peso seco de forragem, evidenciando-se, além da grande variabilidade existente dentro de *B. ruziziensis* para a tolerância ao sombreamento, o potencial da espécie para a seleção de materiais adaptados ao cultivo em ambientes com restrição de luz (SOUZA SOBRINHO et al., 2009).

A seleção dos melhores clones para intercruzamento e obtenção de população melhorada, finalizando o segundo ciclo de seleção recorrente, levou em consideração todas as características avaliadas, com ênfase na resistência às cigarrinhas das pastagens e na produtividade de forragem.

Assim como nos ciclos anteriores de melhoramento, as avaliações dos clones de *B. ruziziensis* evidenciaram a existência de variabilidade genética para todas as características avaliadas. Esta variabilidade pode ser

ilustrada na Figura 7 onde se observa a superioridade das médias de produtividade de forragem dos melhores clones de *B. ruzizensis* em relação àquela obtida para a cultivar Kennedy (*B. ruzizensis*) e também para as cultivares Basilisk (*B. decumbens*) e Marandu (*B. brizantha*), reforçando o potencial produtivo e as possibilidades de sucesso com a seleção dentro da espécie.

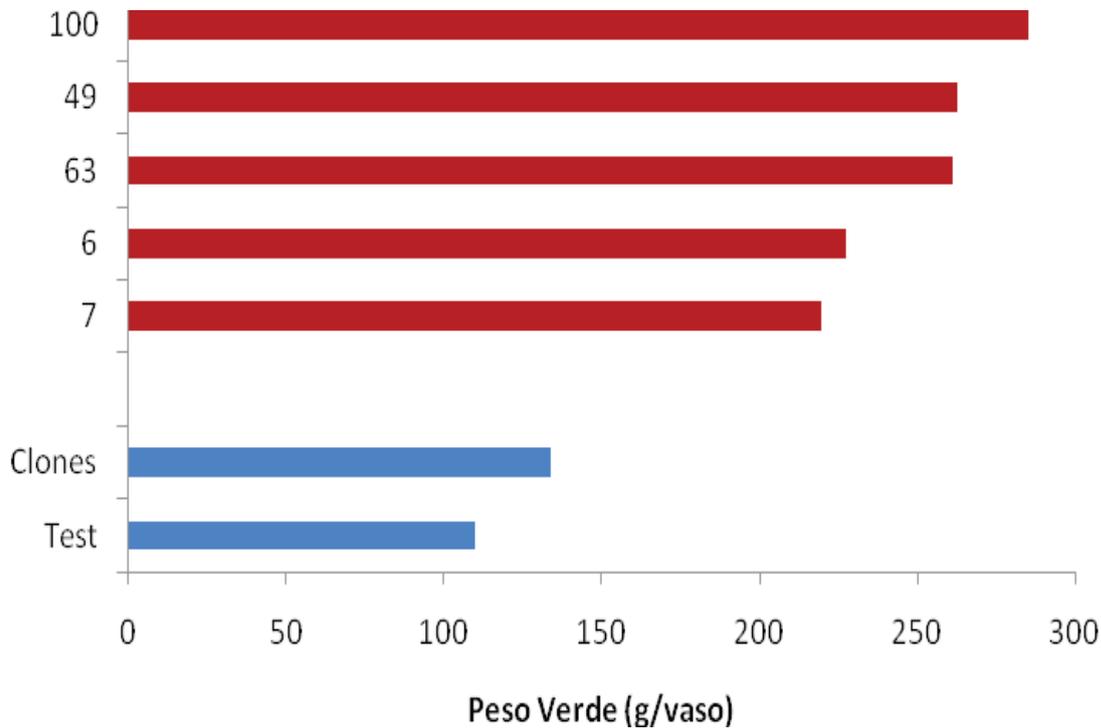


Figura 6. Média de peso verde (PV – g/vaso) dos cinco melhores clones de *B. ruzizensis*, das médias de todos os clones avaliados e das testemunhas (cultivares Kennedy, Basilisk e Marandu de *B. ruzizensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha*, respectivamente) avaliados sob condições de sombreamento em casa-de-vegetação.

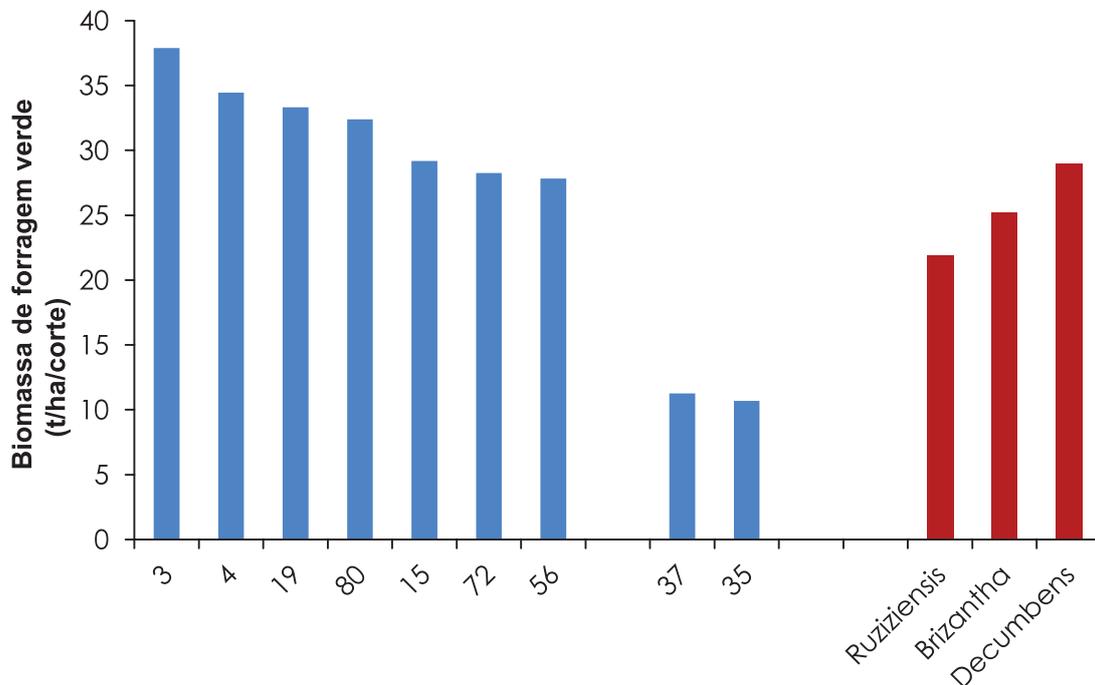


Figura 7. Produtividade média de biomassa de forragem verde (t/ha/corte) dos 7 melhores clones, dos dois piores e das testemunhas (*B. ruzizensis* – cv. Kennedy, *B. brizantha* – cv. Marandu e *B. decumbens* – cv. Basilisk). Dados de 6 cortes em cada experimento, conduzido em dois locais (Coronel Pacheco/MG e Valença/RJ).

Ao final do terceiro ciclo de seleção recorrente, além da população melhorada (C_2) obtida pela identificação, seleção e inter cruzamento dos melhores materiais genéticos, foram obtidas populações com intensidades de seleção mais acentuadas, pelo inter cruzamento de 2 a 5 clones. O objetivo dessas seleções foi a obtenção de

populações mais homogêneas que pudessem, caso confirmassem o potencial produtivo, atender às exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) para um eventual lançamento como novas cultivares. No caso da *B. ruziziensis* são exigidas avaliações sob corte e sob pastejo. Essas populações, então, estão sendo avaliadas em experimentos para comprovação do valor de cultivo e uso (VCU). Inicialmente estão sendo conduzidos experimentos sob corte e os resultados do primeiro ano de avaliações confirmam o potencial produtivo de algumas populações (Figura 8).

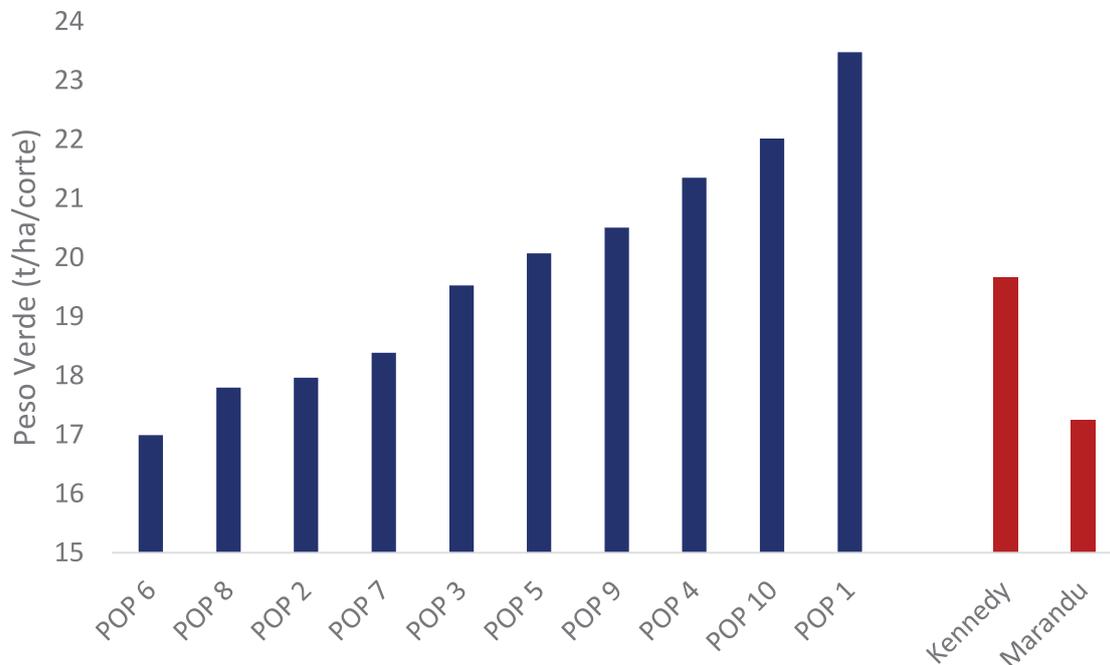


Figura 8. Produtividade média (sete cortes) de forragem (t/ha/corte) de populações melhoradas de *B. ruziziensis* comparada com as cultivares Kennedy (*B. ruziziensis*) e Marandu (*B. brizantha*). Coronel Pacheco, MG.

Os resultados obtidos nos experimentos de VCU evidenciam o sucesso obtido com a seleção recorrente. A melhor população produziu, na média dos sete primeiros cortes, cerca de 20% mais forragem verde que a cultivar Kennedy.

A eficiência do programa de melhoramento pode ser evidenciada também para outras características individualmente. No caso da resistência às cigarrinhas os ganhos observados foram acentuados. Inicialmente mais de 80% das plantas avaliadas apresentaram sobrevivência de ninfas superior à 50%. Após dois ciclos de seleção, cerca de 40% das plantas avaliadas apresentaram sobrevivência de ninfas do inseto inferiores à 40%. Ou seja, houve aumento da frequência de alelos favoráveis para a resistência ao inseto praga, facilitando a identificação e seleção de genótipos favoráveis dentro da população melhorada (Figura 9).

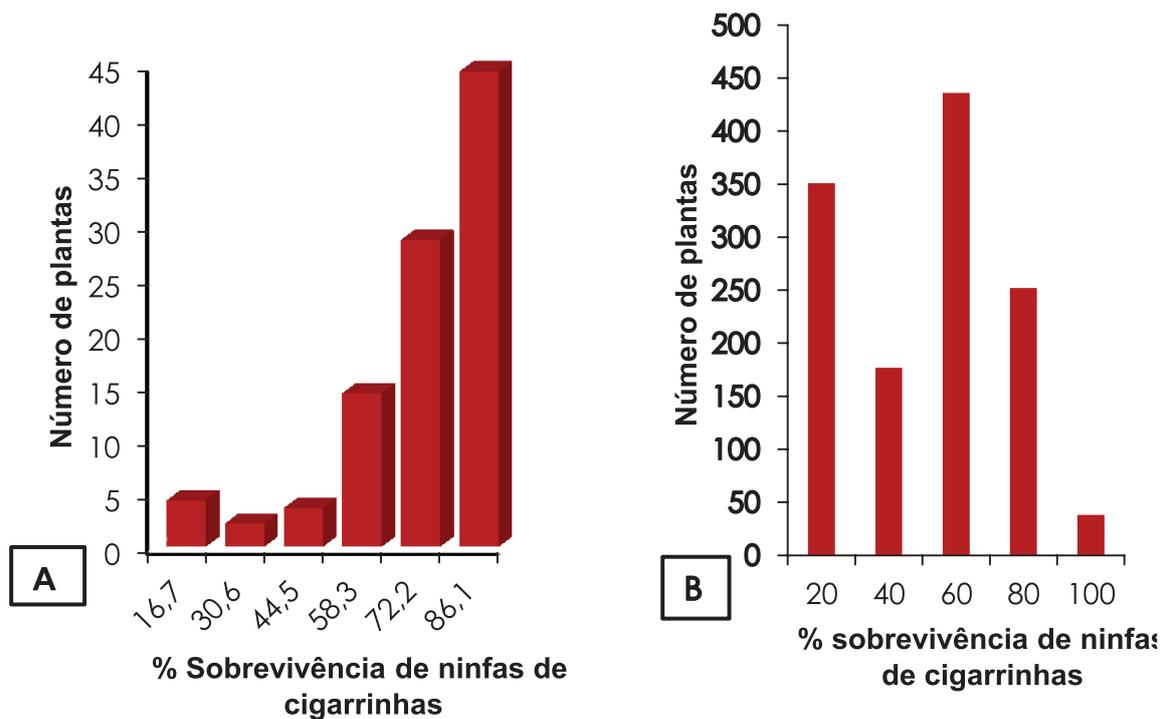


Figura 9. Distribuição de frequências de plantas de *B. ruziziensis* avaliadas para resistência às cigarrinhas das pastagens. A – Plantas oriundas do primeiro ciclo de seleção recorrente; B – Plantas oriundas do terceiro ciclo de seleção recorrente.

3.4. Perspectivas

Como os resultados obtidos nos primeiros ciclos de seleção foram bastante significativos, a continuidade do programa de melhoramento genético de *B. ruziziensis* parece ser um bom caminho visando-se a obtenção de cultivares forrageiras que proporcionem alternativas aos agricultores, com boa produção e qualidade da forragem.

Paralelamente à continuidade das avaliações normalmente realizadas nos diferentes ciclos de seleção, as populações melhoradas deverão ter seu mérito avaliado visando a confirmação do potencial produtivo para futuros lançamentos como novas cultivares forrageiras no mercado de sementes.

3.5. Conclusões

- Existe grande variabilidade genética dentro de *Brachiaria ruziziensis* para a maioria das características de interesse.
- Foram selecionados muitos clones superiores às melhores testemunhas para características de produção e qualidade de forragem, bem como para tolerância a estresses bióticos e abióticos.
- A seleção recorrente intraespecífica poderá ser eficiente no melhoramento genético de *B. ruziziensis*, permitindo a obtenção de novas cultivares no médio prazo.

3.6. Referências

BOGDAN, A. V. **Tropical pasture and fodder plants**. New York: Longman, 1977. 455 p.

BUENO, L.C.S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: UFLA, 2001. 282 p.

DUSI, D. M. de A. **Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf**. 2001. 167 f. Thesis (Ph.D.) – Wageningen University, Wageningen.

FERNANDES, C. D.; VALÉRIO, J. R.; FERNANDES, A. T. F. Ameaças apresentadas pelo atual sistema de produção de sementes à agropecuária na transmissão de doenças e pragas. In: WORKSHOP SOBRE SEMENTES DE

FORRAGEIRAS, 1., 1999, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa Negócios Tecnológicos, 2000. p. 55-68.

GOULART, J. C. **Caracterização citogenética e anatômica de acessos e progênes de *Brachiaria***. 2007. Dissertação (Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

KLUTHCOUSKI, J.; AIDAIR, H.; COBUCCI, T. Opções e vantagens da Integração Lavoura-Pecuária e a produção de forragens na entressafra. **Informe Agropecuário**, v. 28, p. 16-29, 2007.

MARTHA JÚNIOR, G. B.; CORSI, M. Pastagens no Brasil: Situação atual e perspectivas. **Preços agrícolas: Pastagens**, n 171, p. 3-6 Jan./Fev. 2001.

MILES, J. W.; CARDONA, C.; SOTELO, G. Recurrent Selection in a Synthetic Brachiariagrass Population Improves Resistance to Three Spittlebug Species. **Crop Science**, v. 46, n. 3, p. 1088, 2006.

MINGOTTE, F. L. C.; CUNHA, T. P. L.; CARMEIS FILHO, A. C. A.; YADA, M. M.; LEMOS, L. B.; FORNASIERI FILHO, D. Efeito do Nitrogênio Residual em Sistemas de Cultivo contendo Milho e Braquiária na Formação e Manutenção de Palhada sob Plantio Direto. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29., 2012, Águas de Lindóia. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônomo; Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2012.

PEREIRA, A. V. Melhoramento genético de plantas forrageiras. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., Lavras, 1998. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. p.135-162.

PEREIRA, A. V.; VALLE, C. B. do; FERREIRA, R. de P.; MILES, J. W. Melhoramento de Forrageiras Tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.

PEREIRA, A. V.; SOUZA SOBRINHO, F.; VALLE, C. B.; LÉDO, F. J. S.; BOTREL, M. A.; OLIVEIRA, J. S.; XAVIER, D. F. Selection of interespecific *Brachiaria* hybrids to intensify milk production on pastures. **Crop breeding and applied biotechnology**, v. 5, p. 99-104, 2005.

RAO, I. M.; MILES, J. W.; GARCIA, R.; RICAURTE, J. Selección de híbridos de *Brachiaria* con resistencia a aluminio. **Pasturas Tropicales**, v. 28, n. 1, 2006.

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. do (Ed.). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Cali: CIAT/Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 1-15. CIAT Publication, 259.

RISSOPASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 7-10, 2006.

SANTOS, V. B.; SOUZA SOBRINHO, F.; LÉDO, F. J. S.; KOPP, M. M. Associação entre caracteres e análises de trilha na seleção de progênes de meios-irmãos de *Brachiaria ruziziensis*. **Revista Ceres**, v. 58, p. 765-772, 2011.

SOUZA SOBRINHO, F.; AUAD, A. M. Genetic Improvement of *Brachiaria ruziziensis* at Embrapa Dairy Cattle. In: JANK, L.; CHIARI, L.; VALLE, C. B.; SIMEÃO, R. M. (Org.). **Forage Breeding and Biotechnology**. Brasília: Embrapa, 2013. v. 1, p. 59-75.

SOUZA SOBRINHO, F. **Melhoramento de forrageiras no Brasil**. In: Forragicultura e Pastagens: Temas em evidência. Lavras: Editora UFLA, 2005. v. 1, p. 65-120.

- SOUZA SOBRINHO, F.; AUAD, A. M.; LÉDO, F. J. S. Genetic variability in *Brachiaria ruziziensis* for resistance to spittlebugs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, p. 89-94, 2010.
- SOUZA SOBRINHO, F.; CARNEIRO, H.; LÉDO, F. J. S.; SOUZA, F. F. Produtividade e qualidade da forragem de *Brachiaria* na Região Norte Fluminense. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, p. 7-19, 2009.
- SOUZA SOBRINHO, F.; LÉDO, F. J. S.; KOPP, M. M.; PEREIRA, A. V.; SOUZA, F. F. Melhoramento de gramíneas forrageiras na Embrapa Gado de Leite. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGEM, 7., 2009, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: UFLA, 2009. p. 98-111.
- SOUZA SOBRINHO, F.; PACIULLO, D. S. C.; KOPP, M. M.; LÉDO, F. J. S.; CASTRO, B. B. A.; OLIVEIRA, L. P.; CAMPOS, F. P. Produtividade de clones de *Brachiaria ruziziensis* em ambientes sombreados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2009, Guarapari. **O melhoramento e os novos cenários da agricultura: anais**. Guarapari: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2009. v. 5.
- SOUZA SOBRINHO, F.; PEREIRA, A. V.; LÉDO, F. J. S.; BOTREL, M. A.; OLIVEIRA, J. S.; XAVIER, D. F. Avaliação agrônômica de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milheto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 873-880, 2005.
- SOUZA, F. F. **Produção e qualidade de forragem de progênies de *Brachiaria ruziziensis***. 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado em zootecnia – forragicultura e pastagem) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- VALE, C. B. do; SAVIDAN, Y. H. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.). ***Brachiaria*: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; EMBRAPA, 1996. p.147-163.
- VALLE, C. B.; JANK, L.; BARRIOS, S. C. L.; ALVES, G. F.; RESENDE, R. M. S. Melhoramento de Gramíneas Forrageiras Tropicais: Avanços e Perspectivas. In: SIMFOR - SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 6., 2012, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: Suprema Gráfica e Editora Ltda, 2012. p. 347-375.
- WENZL, P.; MANCILLA, L. I.; MAYER, J. E.; ALBERT, R.; RAO, I. M. Simulating infertile acid soils with nutrient solutions: The effects on *Brachiaria* species. **Soil Science Society of America Journal**, v. 67, n.5, p. 1457-1469, Set-Out. 2003.
- WENZL, P.; PATINO, G. M.; CHAVES, A. L.; MAYER, J. E.; RAO, I. M. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. **Plant Physiology**, v. 125, p.1473-1484, 2001.

4.1. Resumo

Os estudos citogenéticos em *Brachiaria* tem se concentrado em contribuir para a certificação de cruzamentos e identificação precisa dos híbridos obtidos pelos programas de melhoramento; obter genótipos tetraploides de *B. ruziziensis* e identificar anormalidades meióticas nos híbridos e seus genitores, a fim de detectar se há comprometimento para a viabilidade dos gametas. Estudos meióticos em seis plantas de *B. ruziziensis* tetraploidizadas sinteticamente no Laboratório de Citogenética da UFLA indicaram a ocorrência de baixa taxa de anormalidades e alta viabilidade polínica, mostrando que estas plantas são potencialmente adequadas para uso no melhoramento genético. Análises de recombinação meiótica em genótipos diploides e tetraploides de *B. ruziziensis* em poliploides e apomíticos de *B. brizantha* e *B. decumbens* e respectivos híbridos interespecíficos mostraram que a média de sinais de recombinação foi maior nas espécies apomíticas de *Brachiaria* quando comparadas com *B. ruziziensis* e com os híbridos. *B. ruziziensis* tetraploidizada artificialmente apresentou média de sinais de recombinação semelhante à diploide.

4.2. Introdução

Brachiaria (Trinius) Grisebach [(syn. *Urochloa* Hochst. ex A. Rich.) R. D. Webster] consiste de um grande e diverso gênero composto por aproximadamente 100 espécies nativas da África tropical (RENVOIZE et al., 1996) com grande importância econômica na agropecuária brasileira, por viabilizar a pecuária em solos ácidos e fracos (SOUZA SOBRINHO, 2005; ARAÚJO et al., 2008; VALLE et al., 2009).

O gênero é caracterizado por uma maioria de espécies poliploides e apomíticas com número básico de cromossomos $x = 6, 7$ e 9 , mas predominância de $x = 9$ (DARLINGTON; WYLIE, 1955; DUJARDIN 1979; MORRONE; ZULOAGA, 1992; RISSO-PASCOTTO et al., 2006; VALLE; SAVIDAN, 1996). *Brachiaria brizantha* (A. Rich) Stapf ($2n = 4x = 36$), *Brachiaria decumbens* Stapf ($2n = 4x = 36$), *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. ($2n = 6x = 36$; $7x = 42$ e $9x = 54$) e *Brachiaria ruziziensis* Germain and Evrard ($2n = 2x = 18$) (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001), são as espécies forrageiras mais exploradas comercialmente.

O melhoramento genético das espécies de *Brachiaria* tem por objetivo avaliar e selecionar genótipos promissores e obter híbridos que reúnam características desejáveis dos genitores, tais como alta produtividade, adaptações a solos ácidos, bom valor nutritivo e resistência à cigarrinha das pastagens (PEREIRA et al., 2001; VALLE et al., 2004). Uma das limitações do melhoramento é a diferença de ploidia entre as plantas sexuais e apomíticas, o que dificulta os cruzamentos, gerando um baixo número de híbridos e com alto grau de esterilidade (VALLE et al., 2004). Sendo assim, uma estratégia interessante tem sido a tetraploidização artificial da espécie diploide e sexual *B. ruziziensis*, para possibilitar a realização de hibridações interespecíficas com genótipos tetraploides e apomíticos de *B. brizantha* e *B. decumbens* (ISHIGAKI et al., 2009) e assim explorar a variabilidade genética para a seleção de materiais superiores (PEREIRA et al., 2001; SOUZA SOBRINHO, 2005).

Dentre os estudos básicos necessários em programas de melhoramento, como os de *Brachiaria*, a citogenética mostra-se crucial não apenas para auxiliar na seleção de genitores compatíveis através da determinação

do nível de ploidia, como também nas etapas pós-hibridação. Sendo assim, os estudos citogenéticos tem se concentrado em contribuir para a certificação de cruzamentos e identificação precisa dos híbridos obtidos pelos programas de melhoramento; obter genótipos tetraploides de *B. ruziziensis* e identificar anormalidades meióticas nos híbridos, bem como em seus genitores que comprometam a viabilidade dos gametas.

4.3. Indução de Poliploides em *B. ruziziensis* e Avaliação da Meiose e Viabilidade de Pólen

A indução da duplicação cromossômica em plantas forrageiras tornou-se uma estratégia importante para ser explorada pelos programas de melhoramento genético, pois permite a ampliação da expressão de características agrônomicas de interesse, e, em alguns casos, a restauração da fertilidade. Este procedimento tem sido muito importante para os programas de melhoramento de várias gramíneas, tais como: *Pennisetum* (BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009); *Lolium* (NAIR, 2004; PEREIRA et al., 2014) e a própria *Brachiaria* (ISHIGAKI et al., 2009; TIMBO et al., 2014).

As tentativas para obtenção de poliploides em *Brachiaria* têm por objetivo expandir o seu potencial de utilização como forrageira e, sobretudo, possibilitar o nivelamento da ploidia de *B. ruziziensis*, sexual, com as tetraploides e apomíticas *B. decumbens* e *B. brizantha*.

Embora algumas plantas de *B. ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente tenham sido usadas para o melhoramento genético, os trabalhos de duplicação cromossômica não foram realizados com genótipos previamente selecionados para características de interesse forrageiro. Dessa forma, em geral, as plantas geradas não exibem características favoráveis no que diz respeito às condições ambientais brasileiras. Neste sentido, o uso de genótipos brasileiros selecionados provavelmente aumentaria a probabilidade de gerar plantas tetraploides com características favoráveis para a forragicultura, o que poderia levar à obtenção de híbridos interespecíficos superiores (TIMBÓ et al., 2014).

Nos trabalhos realizados por Timbó et al. (2014) com sementes de uma população de *B. ruziziensis* originada do segundo ciclo de seleção recorrente intrapopulacional na Embrapa Gado de Leite – MG, foi observada taxa de sobrevivência das plantas de 8%, das quais 11,45% eram tetraploides. A média viabilidade de grãos de pólen das plantas tetraploides avaliadas variou cerca de 52 a 55%, mostrando potencial de uso em cruzamentos.

Para que as plantas tetraploides artificiais sejam incorporadas ao programa de melhoramento e utilizadas em hibridações, é importante que apresentem meiose normal e grãos de pólen viáveis, favorecendo a obtenção de progênes férteis. A análise do comportamento meiótico de seis genótipos de plantas tetraploidizadas mostrou variação de 2,8 a 10,37% para taxa média de anormalidades. A viabilidade polínica também foi considerada alta.

4.4. Meiose e Recombinação em Espécies Apomíticas e Sexuais de *Brachiaria* e Híbridos Interespecíficos

Nas etapas iniciais de um programa de melhoramento genético, a exploração da recombinação é uma estratégia fundamental para a ampliação da variabilidade existente, quando as diferentes características dos genitores são combinadas em novas cultivares (WIJNKER; JONG, 2008). A recombinação genética é um processo que possibilita gerar novas combinações alélicas com importante consequência para evolução do genoma (MASSY, 2013; SCHUERMAN et al., 2005). Esses motivos justificam o interesse dos geneticistas e melhoristas de plantas no entendimento dos mecanismos que regulam a recombinação e na determinação da sua frequência.

Em algumas espécies, a frequência de recombinação tem sido obtida por meio da contagem de quiasmas em análises meióticas convencionais. No entanto, para espécies de *Brachiaria*, esse procedimento se torna inviável, tendo em vista o tamanho reduzido dos cromossomos. Uma alternativa é realizar as contagens e estimar os sítios de recombinação por meio da imunolocalização de proteínas recombinases.

Várias proteínas que integram o arcabouço do complexo sinaptonêmico (CS) estão direta ou indiretamente relacionadas à efetivação do pareamento e da recombinação (OSMAN et al., 2011).

Durante a recombinação, após a quebra da dupla fita de DNA (DSBs) pela proteína SPO11, atua um complexo proteico que visa removê-la. Posteriormente, o processo de reparo das DSBs é facilitado por duas recombinases, a *RAD51* e *Disrupted Meiotic cDNA1* (DMC1) que promovem a etapa de invasão na dupla fita homóloga (OSMAN et al., 2011). A marcação dos sítios onde estas proteínas se encontram podem dar uma ideia dos locais propensos à recombinação.

Estudos tem demonstrado que a recombinação meiótica, ocorre em regiões chamadas *hotspots* de recombinação e sua distribuição não é aleatória. Esses locais podem se expressar na forma de nódulos precoces e tardios que aparecem, respectivamente, no zigóteno e paquíteno e são ricos em proteínas recombinases (RAD51, DMC1, entre outras) (PAWLOWSKI; CANDE, 2005; OSMAN et al., 2011;).

A proteína RAD51 é altamente conservada entre os eucariotos e seu papel está bem estabelecido na recombinação meiótica e em auxiliar na identificação/detecção da homologia cromossômica. Assim, por meio da quantificação do número de sinais da proteína RAD51 no paquíteno é possível identificar os genótipos com maior frequência de sinais de homologia e recombinação.

A análise da proteína RAD51 nos meiócitos das espécies e híbridos de *Brachiaria* revelou sinais difusos no núcleo durante o leptóteno, quando os cromossomos estão iniciando a condensação e o pareamento. No zigóteno, foram identificados sinais individuais da RAD51 em cromossomos não pareados ou parcialmente pareados e sinais adjacentes da RAD51 em cromossomos pareados, confirmando o seu estreito envolvimento com a busca pela homologia cromossômica. Durante o paquíteno, foram observados sinais da RAD51 localizados entre os eixos cromossômicos em *hotspots* de recombinação. A média de sinais de recombinação foi maior nas espécies apomíticas de *Brachiaria* (*B. decumbens*, 85.80 e *B. brizantha*, 83.87) quando comparadas com os híbridos e com a espécie sexual, *B. ruziziensis*. Essa maior frequência de sinais pode estar relacionada com o modo de reprodução da espécie. A espécie *B. ruziziensis* tetraploidizada artificialmente apresentou média de sinais da RAD51 semelhante à espécie *B. ruziziensis* diploide como consequência do efeito da poliploidização. As plantas híbridas apresentaram sobreposição da média de sinais de RAD51 em relação às plantas diploide e tetraploide de *B. ruziziensis*. Essa não aditividade dos genomas pode representar uma adaptação ao estresse genômico causado pela hibridação e poliploidização (PAULA et al., 2015).

4.5. Perspectivas

Contagens cromossômicas e análises do comportamento meiótico, via citogenética convencional, já estão bem estabelecidos em espécies de *Brachiaria*. Os novos estudos deverão contemplar análises que permitam discriminar e identificar cromossomos e genomas, com maior grau de detalhamento dos cariótipos, similaridades/dissimilaridades cromossômicas que permitam um maior grau de aprofundamento e entendimento da história evolutiva do gênero.

4.6. Referências

- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Arch. Zootec**, v. 57, pag. 61-76, 2008.
- BARBOSA, S. et al. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim elefante e milheto. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 365-372, 2007.
- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios**, v. 104, n. 407, p. 157-171, 2001.
- CAMPOS, J. M. S. et al. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, v. 128, n. 1, p. 101-104, 2009.

- DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas of flowering plants**. London: Allen & Unwin, 1955. 519 p.
- DUJARDIN, M. Additional chromosome numbers and meiotic behavior in tropical African grasses from western Zaire. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 864-876, 1979.
- ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicines treatment of in vitro multiple-shoot clumps and seedlings. **Japanese Society of Grassland Science**, v. 55, n. 3, p. 164-170, 2009.
- MASSY, B. Initiation of meiotic recombination: how and where? conservation and specificities among eukaryotes. **Annual Review of Genetics**, v. 47, p. 563-599, 2013.
- MORRONE, O.; ZULOAGA, F. O. Revision de las especies sudamericanas nativas e introducidas de los géneros *Brachiaria* e *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Darwiniana**, v. 1-4, p. 43-109, 1992.
- NAIR, R. M. Developing tetraploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 47, n. 1, p. 45-49, 2004.
- OSMAN, K.; HIGGINS, J. D.; SANCHEZ-MORAN, E.; ARMSTRONG, S. J.; FRANKLIN, C. H. Pathways to meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana*. **NewPhytologist**, v. 190, p. 523-544, 2011.
- PAULA, C. M. P.; LIMA, D. C.; SOUZA SOBRINHO, F.; TECHIO, V. H. Frequency of the RAD51 (radiation sensitive 51) recombinase in species and hybrids of *Brachiaria* and relationship with genetic variability. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 12, p. 1271-1277, 2015.
- PAWLOWSKI, W. P.; CANDE, W. Z. Coordinating the events of the meiotic prophase. **Trends in Cell Biology**, v. 15, p. 674-681, 2005.
- PEREIRA, A. V.; VALLE, C. B. do; FERREIRA, R. de P.; MILES, J. W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L. et al. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Cuiabá: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.
- PEREIRA, R. C.; FERREIRA, M. T. M.; DAVIDE, L. C.; PASQUAL, M.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H. Chromosome duplication in *Lolium multiflorum* Lam. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 251-255, 2014.
- 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. do (Org). **Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement**. Colombia: CIAT, 1996. p. 1-15.
- RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetics Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 7-10, 2006.
- SCHUERMAN, D.; MOLINIER, J.; FRITSCH, O.; HOHN, B. The dual nature of homologous recombination in plants. **Trends in Genetics**, v. 21, p. 172-181, 2005.
- SIMIONI, C.; VALLE, C. B. Chromosome duplication in *Brachiaria* (A. Rich.) Stapf allows intraspecific crosses. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 328-333, 2009.
- SOUZA SOBRINHO, F. Melhoramento de forrageiras no Brasil. In: EVANGELISTA, A. R.; AMARAL, P. N. C. do; PADOVANI, R. F.; TAVARES, V. B.; SALVADOR, F. M.; PERÓN, A. J. (Ed.). **Forragicultura e Pastagens: Temas em evidência**. Lavras: UFLA, 2005. p. 65-120.

SOUZA SOBRINHO, F.; LEDO, F. J. S.; KOPP, M. M.; PEREIRA, A. V.; SOUZA, F. F. Melhoramento de gramíneas forrageiras na Embrapa Gado de Leite. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 7., 2009, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: UFLA, 2009. p.98-111.

TIMBÓ, A. L. et al. Obtaining tetraploid plants of ruzigras (*Brachiaria ruziziensis*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 3, p. 127-131, 2014.

VALLE, C. B. do; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do; KUMBLE, V. (Ed). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT/Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1996. 288 p. (CIAT. Publication, 259).

VALLE, C. B.; BONATO, A. L. V.; PAGLIARINI, S.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 47-65.

VALLE, C. B.; PAGLIARINI, M. S. MENDES-BONATO, A. B.; RISSO-PASCOTTO, C. Analysis of genomic affinity between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* through meiotic behavior. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONFERENCE, 20., 2005, Dublin. [**Proceedings...**] Dublin: University College Dublin, 2005.

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

WIJNKER, E.; DE JONG, H. Managing meiotic recombination in plant breeding. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 640-646, 2009.

Melhoramento Genético de *Lolium*: Histórico e Estratégias

Andréa Mittelman

5.1. Resumo

O gênero *Lolium* contém algumas das principais forrageiras de clima temperado. No Brasil cultiva-se o *Lolium multiflorum*, espécie anual, alógama e diploide, com $2n = 14$ cromossomos. A região de adaptação do azevém no Brasil abrange o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e a maior parte do Paraná. Em parte da Região Sudeste do Brasil pode ser cultivado, como no sul do estado de São Paulo e em climas de altitude, condicionado à disponibilidade de água no período de inverno. O Programa de Melhoramento de Azevém da Embrapa foi estabelecido no ano de 2002 e encontra-se hoje em sua terceira fase, empregando predominantemente a seleção com teste de progênies. Entre os resultados obtidos até o momento destacam-se o lançamento da cultivar BRS Ponteio e o registro de mais duas cultivares, com alta produtividade e diferente duração do ciclo vegetativo.

5.2. Introdução

O gênero *Lolium* pertence à família Poaceae, tribo Festucae e é formado por nove espécies, todas diploides e com número de cromossomos $2n = 2x = 14$. Este gênero é bastante próximo do gênero *Festuca*, o qual possui espécies diploides e poliploides (BORRIL, 1976).

As espécies que compõem o gênero formam um grupo de autógamias anuais (*L. temulentum*, *L. persicum*, *L. remotum*, *L. canariense* e *L. loliaceum*) e um grupo de alógamas, as quais variam quanto ao ciclo de vida [*L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. rigidum* e *L. x boucheanum* (= *L. hybridum*)]. As espécies de importância econômica pertencem todas ao segundo grupo (HUMPREYS, 2010).

A origem do gênero *Lolium* é mediterrânea. Supõe-se que a domesticação ocorreu no Oriente Médio, junto com os cereais graníferos como o trigo e a aveia. A partir daí, houve migração em direção ao Oeste, iniciando o cultivo na Europa e então para o restante das regiões temperadas do planeta.

O gênero *Lolium* contém algumas das principais gramíneas forrageiras cultivadas. Somente na Europa, estas espécies constituem cerca de 12 milhões de hectares de pastagens (HUMPHREYS, 2010). Nas regiões mais frias, como no Norte da Europa, Estados Unidos e Nova Zelândia a espécie predominante é *L. perenne*. Na Austrália é cultivado *L. rigidum*, uma espécie de ciclo muito curto, com o nome comum de "*Wimmera ryegrass*" ou "*annual ryegrass*".

Na América do Sul, cultiva-se o azevém na Argentina, Brasil, Chile e Uruguai. Na Argentina, são mais utilizadas festucas e o azevém perene, assim como no Chile. Já no Brasil e no Uruguai predomina *L. multiflorum*, espécie anual cujo nome comum em inglês é "*Italian ryegrass*".

Além de sua importância como forrageira, o azevém é cultivado também como cobertura verde, para controle de erosão e recuperação de áreas degradadas, bem como para formação de gramados, tanto ornamentais como esportivos.

5.3. *Lolium* no Brasil

No Brasil, o azevém cultivado é *Lolium multiflorum*, espécie que foi introduzida por imigrantes europeus e adaptou-se a ponto de se tornar espontânea.

Esta espécie é subdividida por muitos autores em um grupo perene (*Italian*) e os azevém chamados *Westerwolths*, estritamente anuais, que teriam evoluído na região de mesmo nome. As populações aqui existentes tem comportamento estritamente anual. As plantas florescem abundantemente no primeiro ano de cultivo e morrem após a maturação das sementes. Mas não parece haver relação de origem entre estas e os chamados *Westerwolths*, sendo mais provável que este comportamento tenha sido selecionado de forma independente (HUMPHREYS et al., 2010).

A região de adaptação do azevém no Brasil abrange o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e a maior parte do Paraná. Em parte da Região Sudeste do Brasil pode ser cultivado, como no sul do estado de São Paulo e em climas de altitude, condicionado à disponibilidade de água no período de inverno.

5.4. Características Agronômicas

O azevém apresenta uma série de características que o tornam uma das mais importantes forrageiras de inverno. Possui uma alta produtividade entre as espécies de clima temperado, atingindo de 8 a 10 t/ha de matéria seca de forragem em nossas condições. Possui qualidade superior à das demais forrageiras devido, principalmente, a uma alta digestibilidade da matéria seca (HUMPHREYS et al., 2010).

A espécie com que trabalhamos possui características de adaptação e rusticidade que são responsáveis por sua ampla distribuição atual. Adapta-se a diferentes tipos de solo e é pouco exigente em relação ao pH mas é, por outro lado, muito responsiva à adubação. Desenvolve-se em uma grande amplitude de temperaturas e tolera bem o sombreamento. Uma vez estabelecida, tolera tanto períodos de seca como excesso hídrico. A estrutura genética das populações, com alta variabilidade e alta heterozigosidade, determinada por uma combinação de aspectos como a domesticação recente da espécie, o modo de reprodução pela alogamia e a existência de genes de incompatibilidade, contribui para esta grande adaptabilidade.

Além disso, a espécie possui alta produção de sementes, de até 1.000 kg/ha, para uma densidade de semeadura de 20 kg/ha, e apresenta dormência de sementes por um período de três a quatro meses, o que permite o escape de condições do tempo inadequadas e ajuda a garantir a ressemeadura natural das áreas.

5.5. O Programa de Melhoramento

O Banco Ativo de Germoplasma de Azevém da Embrapa foi estabelecido no ano de 2002, com predominância de populações locais entre os acessos. Desde as primeiras avaliações, ficou evidenciada a grande variabilidade fenotípica existente entre essas populações. Assim, foi iniciado também o Programa de Melhoramento de Azevém da Embrapa.

5.5.1. Histórico

A primeira fase do Programa de Melhoramento consistiu na avaliação de acessos do Banco de Germoplasma em diferentes ambientes. A demanda existente era por uma cultivar de azevém com bom desenvolvimento inicial e ciclo longo.

No ano de 2004 as primeiras 28 populações foram avaliadas. Foram realizados experimentos de caracterização agronômica a campo, em sete locais: Bagé, Capão do Leão, Eldorado do Sul, Ijuí e Passo Fundo (RS), Ponta Grossa (PR) e Coronel Pacheco (MG), conduzidos pela Embrapa Pecuária Sul, Embrapa Clima Temperado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Fepagro, Embrapa Trigo, Universidade Estadual de Ponta Grossa e Embrapa Gado de Leite, respectivamente. Os experimentos contavam com quatro repetições, em delineamento de blocos casualizados. As parcelas eram constituídas de uma linha de três metros de comprimento e a produtividade foi avaliada com base em cortes mecânicos, realizados sempre que as plantas

atingiam cerca de 20 cm de altura. Foram utilizadas como testemunhas amostras da cultivar comum e da cultivar uruguaia LE 284. Os resultados dessa avaliação inicial mostraram grandes diferenças entre populações, principalmente na distribuição da produção de forragem e na duração do ciclo vegetativo. Com base nessas diferenças, decidiu-se iniciar já em 2005 ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU), avaliando quatro das melhores populações.

Esta primeira fase resultou no lançamento da cultivar BRS Ponteio, que apresentou produtividade 7% acima da cultivar comum, utilizada como testemunha, além de ciclo 25 dias mais longo e de uma maior proporção de folhas em relação a colmos na forragem produzida (MITTELMANN, 2007). Devido à forma de seleção utilizada, a cultivar BRS Ponteio é apenas registrada, não sendo passível de proteção junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa).

A cultivar chegou ao mercado em 2011, com 21 toneladas de semente básica disponibilizada aos produtores de sementes e, em 2012, cerca de 400 toneladas de semente foram colocadas no comércio, o suficiente para semear 20 mil hectares de azevém. Desde então, vem tendo crescente produção e utilização.

Unidades de observação realizadas em propriedades rurais do Rio Grande do Sul mostraram produtividade de até 11 t/ha de matéria seca de forragem (Tabela 1) para a cultivar.

Tabela 1. Produtividade de matéria seca (kg/ha) em unidades de observação da cultivar BRS Ponteio.

Município	Semeadura	Corte				Produção acumulada
		1	2	3	4	
Capão do Leão	11/05	996	1.680	5.140	3.174*	10.990*
Arroio do Padre	8/06	645	2.592	1.924		5.161
Arroio do Padre	4/07	924	979	3.524		5.427

*Foi realizada amostragem representando o quarto corte. Para os três primeiros cortes, a produção acumulada foi de 7.816 kg/ha.

A produtividade foi bastante influenciada pela data de semeadura e adubação utilizada, correspondendo a maior produtividade à propriedade que realizou adubação conforme recomendação, inclusive aplicação de nitrogênio em cobertura (135 kg N/ha, parcelado em três aplicações). Além de utilizar o azevém para pastoreio, nesta propriedade o terceiro corte foi usado para a produção de feno. Em todas as propriedades, após três cortes, o rebrote foi deixado com o propósito de se obter uma ressemeadura natural, diminuindo o custo de implantação da pastagem de inverno no próximo ano. Na percepção dos produtores o uso da cultivar BRS Ponteio aumentou significativamente a produção leiteira e o período de uso da pastagem, diminuindo o custo de produção (PINHEIRO et al., 2012).

O início da seleção dentro de populações caracteriza a segunda fase deste Programa de Melhoramento. O método utilizado foi a seleção massal. Os objetivos a serem atendidos passaram a ser o aumento da produtividade em populações de diferentes ciclos, uma vez que os produtores que utilizam a integração lavoura-pecuária, semeando uma lavoura de verão, têm preferência por azevém de ciclo precoce.

Como resultado desta segunda fase, selecionou-se a cultivar BRS Integração, ainda mais produtiva que BRS Ponteio, com ciclo mais curto e hábito de crescimento semi-ereto, a qual encontra-se registrada e protegida junto ao Mapa. Outra cultivar desenvolvida, de ciclo mais longo que o BRS Ponteio, é a BRS Estações, a qual encontra-se registrada e com pedido de proteção encaminhado.

A cultivar BRS Integração, na média dos experimentos realizados em 2006, mostrou-se 4,5% superior à cultivar BRS Ponteio, superando também as testemunhas Comum e LE 284 (Tabela 2).

A alta produtividade da cultivar tem sido confirmada em experimentos realizados no Rio Grande do Sul e no Paraná. Em Pato Branco, foram obtidas 9,3 t/ha de matéria seca forragem e em Palma – PR foram obtidas 14,3 t/ha, das quais 8,3 t/ha apenas de folhas (MIOTO et al., 2014; AIOLFI et al., 2014).

Tabela 2. Produtividade (matéria seca, kg/ha) da cultivar BRS Integração em comparação com testemunhas, inverno, 2006.

Local	BRS Integração	BRS Ponteio	Comum	LE 284
Capão do Leão	4.225,71	3.764,36	3.648,37	3.518,15
Bagé	5.571,45	5.971,65	6.203,25	6.233,25
Ponta Grossa	7.326,40	6.731,55	6.907,85	6.382,55
Passo Fundo	9.568,20	9.068,84	7.960,60	7.451,20
Média	6.672,94	6.384,10	6.180,02	5.896,29
%		104,52	107,98	113,17

5.5.2. Fase atual e perspectivas

A terceira fase do Programa de Melhoramento teve início em 2008 e consiste na seleção com teste de progênes. Como o azevém é uma espécie alógama, são utilizadas famílias de meio-irmãos. Como resultado deste processo de seleção, três populações ingressaram em VCU em 2014 e três novas populações encontram-se em processo de seleção.

Avaliações da capacidade geral de combinação das populações foram iniciadas, por meio de *topcross*, visando a formação de compostos como base para novos ciclos de seleção.

Em relação ao Banco de Germoplasma, a caracterização citogenética e molecular vem avançando, com importante colaboração da Universidade Federal de Lavras e Universidade Federal de Juiz de Fora. Estas atividades serão mais detalhadas em capítulos específicos.

5.6. Germoplasma Tetraploide

Azevêns tetraploides tendem a ter folhas e perfilhos maiores e produzem forragem com menor conteúdo de matéria seca e estandes mais abertos (HUMPHREYS et al., 2010). A produtividade varia grandemente entre cultivares tetraploides, e cultivares melhoradas diploides podem ser tão produtivas quanto as tetraploides, como tem sido observado em diversos experimentos (Tabela 3, adaptada de MITTELMANN et al., dados não publicados; AIOLFI et al., 2014; MIOTO et al., 2014). Entretanto, existe um forte apelo comercial sobre a questão da poliploidia, com a recente introdução e registro no Brasil de um grande número de cultivares tetraploides importadas.

Tabela 3. Produtividade de forragem (matéria seca, kg/ha) de populações diploides (2x) e tetraploides (4x) de azevém em três ambientes.

População	Capão do Leão, RS, 2012	Palma, PR, 2013	Pato Branco, PR, 2013
BRS Estações (2x)	4.607,4a	15.977a	10.346,4a
LOL 135 (2x)	4.517,0ab	-	-
BRS Integração (2x)	4.253,8abc	14.351ab	9.332,6b
BRS Ponteio (2x)	4.101,9c	-	8.813,4b
Comum (2x)	-	13.930b	9.079,1b
LE 284 (2x)	-	-	8.161,6b
INIA Bakarat (2x)	-	-	9.118,3b
INIA Titán (4x)	-	15.444a	10.534,9a
INIA Escópio (4x)	-	-	10.401,8a
Barjumbo (4x)	4.147,1bc	12.727c	10.321,7a

Foi realizado o teste de Tukey, com probabilidade de 5% (alfa = 0,05).

A fim de melhor estudar os efeitos da poliploidização em populações de azevém adaptadas ao Sul do Brasil, uma linha de desenvolvimento de germoplasma tetraploide foi iniciada, em colaboração com a Universidade Federal de Lavras. As primeiras plantas foram obtidas em 2011 (PEREIRA et al., 2014) e a primeira avaliação a campo ocorreu em 2014.

Em outra linha de trabalho, foram formados compostos utilizando o germoplasma tetraploide internacional, visando explorá-lo por meio de recombinação e seleção.

5.7. Fungos Endofíticos

Muitas espécies de gramíneas de clima temperado estabelecem associações simbióticas com fungos endofíticos do gênero *Neotyphodium*. Os efeitos destes endófitos sobre o crescimento e tolerância a estresses das plantas tem sido amplamente estudados em espécies como festuca alta (*Festuca arundinacea*) e azevém perene (*Lolium perenne*).

Resultados preliminares na Argentina indicam que populações locais de azevém (*L. multiflorum*) e outras gramíneas apresentam altas frequências e níveis de infecção endofítica (MEDVESCIGH et al., 2004; IANNONE et al., 2009), sugerindo uma possível vantagem adaptativa conferida pelos simbiontes fúngicos. Por outro lado, estudos realizados com azevém infectado indicam que estas associações não produzem ergocalcólides nem lolitrem e, portanto, não gerariam toxicidade para o gado, mas seriam capazes de produzir peramina e/ou lolinas, metabólitos responsáveis pela tolerância/repelência a insetos herbívoros (SUGAWARA et al., 2006). Assim, iniciou-se a caracterização das populações locais de azevém existentes no Banco de Germoplasma quanto ao nível de infecção por fungos do gênero *Neotyphodium*.

5.8. Atividades Complementares

De forma complementar ao trabalho de desenvolvimento de cultivares, tem sido realizados experimentos de manejo destas cultivares, em colaboração com pesquisadores da Embrapa Clima Temperado e da Universidade Federal de Pelotas, visando tanto a produção de forragem como a de sementes. Teses e dissertações envolvendo altura e frequência de cortes, níveis de adubação e metodologia para confecção de silagem pré-secada estão em andamento. Foi estabelecida, por exemplo, para a cultivar BRS Ponteio a recomendação de se realizar até dois cortes da forragem em áreas destinadas a produção de sementes (CUNHA, 2012). Foram realizados ainda, estudos sobre a dormência e a persistência no solo das sementes de azevém (SOUZA et al., 2009; COSTA et al., 2013).

5.9. Referências

AIOLFI, R. B.; PITTA, C. S. R.; ADAMI, P. F.; SOARES, A. B.; MITTELMANN, A.; SANTOS, R.; FERREIRA, K. G.; DALLASEN, S. B. Produção de forragem de espécies hibernais submetidas ao regime de cortes no município de Palmas/PR In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 24., 2014, Vitória. **Anais...** Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

BORRIL, M. Temperate grasses. In: SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1976.

COSTA, C. J.; MITTELMANN, A.; SILVA, M. G.; RIBEIRO, P. R. G.; VAZ, C. F.; FRANCO, D. F. **Superação da dormência em sementes de azevém da cultivar BRS Ponteio**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2013. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 196).

CUNHA, R. P. **Manejo da desfolha na ecofisiologia da produção de forragem e sementes de azevém anual**. 2012. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

HUMPHREYS, M.; FEUERSTEIN, U.; VANDEWALLE, M.; BAERT, J. Ryegrasses. In: BOLLER, B.; POSSELT, U. K.; VERONESI, F. **Fodder crops and amenity grasses**. New York: Springer, 2010. (Handbook of Plant Breeding, 5)

IANNONE, L. J.; CABRAL, D.; SCHARDL, C. L.; ROSSI, M. S. Phylogenetic divergence, morphological and physiological differences distinguish a new *Neotyphodium endophyte* species in the grass *Bromus auleticus* from South America. **Mycologia**, v. 101, p. 336-347, 2009.

MEDVESCIGH, J.; MAIDANA, R.; DE BATTISTA, J. P.; SABATINI, E.; COSTA, M. Incidence and infection level of endophyte infection on *Lolium multiflorum* Lam. naturalized populations in Entre Rios Province, Argentina. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NEOTYPHODIUM, 5., 2009, Fayetteville, Arkansas. **Proceedings...** Fayetteville, 2009. Session II, Biology of Neotyphodium.

MIOTO, D. F.; AIOLFI, R. B.; SOARES, A. B.; MITTELMANN, A.; MATTOS, R. D.; SEMLER, T.; PITTA, C. S. R.; ADAMI, P. F. Produção de forragem de cultivares de azevém anual diploides e tetraploides submetidos ao regime de cortes no município de Pato Branco/PR In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 24., 2014, Vitória. **Anais...** Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

MITTELMANN, A. BRS Ponteio: nova cultivar de azevém da Embrapa. In: FERNANDES, E. N.; MARTINS, P. C.; MOREIRA, M. S. P.; ARCURI, P. B. **Novos desafios para o leite no Brasil**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007.

PEREIRA, R. C.; FERREIRA, M. T. M.; DAVIDE, L. C.; PASQUAL, M.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H. Chromosome duplication in *Lolium multiflorum* Lam. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, p. 251-255, 2014.

PINHEIRO, E. C., PIRES, E. S., BARBOZA, K. S., MITTELMANN, A., BENDER, S., BORTOLINI, F. Produtividade do azevém BRS Ponteio em unidades de observação no interior do Rio Grande do Sul In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 4., 2012, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012. 1 CD-ROM.

SOUZA, P. O.; BRAGA, M.; MITTELMANN, A.; GARCIA, E. N. Banco de sementes do solo de *Lolium multiflorum* Lam. (azevém) In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18., ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 11., MOSTRA CIENTÍFICA, 1., 2009, Pelotas. **Anais...** Pelotas: UFPel, 2009.

SUGAWARA K.; INOUE, T.; YAMASHITA, M.; OHKUBO, H. Distribution of the endophytic fungus, *Neotyphodium occultans* in naturalized Italian ryegrass in western Japan and its production of bioactive alkaloids known to repel insect pests. **Grassland Science**, v. 52, p. 147-154, 2006.

6.1. Resumo

Espécies de *Lolium* constituem um excelente modelo para estudos da organização e estrutura da cromatina, pois apresentam cromossomos grandes e em número reduzido. Os estudos com híbridos de *Lolium* e *Festuca* foram pioneiros na demonstração do potencial de uso das técnicas de hibridização *in situ* genômica para separação dos genomas. No Brasil, as pesquisas na área de citogenética e melhoramento com esse grupo de plantas têm sido realizadas em parceria com a Universidade Federal de Lavras e as unidades da Embrapa Clima Temperado e Gado de Leite. Como resultado desses estudos foram obtidas informações para caracterização do banco de germoplasma, análises de meiose e viabilidade de pólen, indução e obtenção de plantas tetraploides e análises citomoleculares, os quais se encontram sumarizados abaixo.

6.2. Introdução

Lolium é constituído por oito espécies diploides ($2n = 2x = 14$) e algumas cultivares poliploides obtidas por indução da duplicação cromossômica (POLOK, 2007). As espécies são distribuídas em duas seções estabelecidas de acordo com o modo de reprodução (TERREL, 1968). A primeira seção inclui quatro espécies autógamas (*L. loliaceum*, *L. persicum*, *L. remotum* e *L. temulentum*) e a segunda é composta por três espécies alógamas (*L. perenne*, *L. rigidum*, *L. multiflorum*) (JENKIN, 1959; LOSS, 1993; BENNETT et al., 2002; INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM, 2010). A exceção é *Lolium canariense*, endêmica das Ilhas Canárias, que apresenta modo de reprodução intermediário (POLOK, 2007).

A caracterização citogenética das espécies de *Lolium* está bem estabelecida (MALIK; THOMAS, 1966; THOMAS, 1981; JAUHAR, 1993; CARNIDE et al., 1986; THOMAS et al., 1996). O grupo constitui um excelente modelo para estudos da organização e estrutura da cromatina, pois apresenta cromossomos grandes e em número reduzido. Os estudos com híbridos de *Lolium* e *Festuca* foram pioneiros na demonstração do potencial de uso das técnicas de hibridização *in situ* genômica para separação dos genomas (PASAKINKIENE; JONES, 2005). No Brasil, as pesquisas na área de citogenética e melhoramento com esse grupo de plantas tem sido realizados em parceria entre a Universidade Federal de Lavras (Departamento de Biologia)-Lavras-MG e as unidades da Embrapa Clima Temperado-Pelotas-RS e Gado de Leite-Juiz de Fora-MG. Como resultado desses estudos foram obtidas informações para caracterização do banco de germoplasma, análises de meiose e viabilidade de pólen, indução e obtenção de plantas tetraploides e análises citomoleculares.

6.3. Citogenética e Conteúdo de DNA de *L. multiflorum*

Para a implantação do programa de melhoramento genético de azevém anual no Brasil, assim como ocorre para outras espécies, foi necessário estabelecer uma coleção de trabalho, a partir da coleta de um grande número de plantas oriundas de diferentes ambientes. Inerente a esse processo é fundamental conhecer variabilidade genética disponível, a qual inclui a caracterização citogenética. Entre as informações geradas pelas análises citogenéticas podem ser citadas a determinação do número cromossômico e a ploidia, ambos caracteres que possibilitam discriminar os genótipos, identificar similaridades e dissimilaridades e auxiliar no

planejamento acerca dos cruzamentos mais compatíveis. Essas informações constituem o elo entre o uso adequado dos recursos genéticos e os programas de melhoramento (DAVIDE et al., 2009).

Dentre as várias técnicas para *screening* do material genético durante a etapa de planejamento e coleta do germoplasma, a determinação da quantidade de DNA nuclear via citometria de fluxo constitui um método rápido e prático para estimar o nível de ploidia das plantas (DOLEZEL, 1997). A citometria de fluxo pode se mostrar útil também durante os testes e pré-seleções de genótipos e nas etapas de hibridizações e recombinações. Em situações, por exemplo, onde parentais diferem no conteúdo de DNA (BENNET; LEITCH, 1995), esse procedimento pode ser empregado, em larga escala, para confirmar a ploidia dos genótipos envolvidos nos cruzamentos e, sobretudo, certificar a ocorrência desses cruzamentos por meio da comparação dos dados entre parentais e progênies em plantas ainda jovens. Assim, a quantificação do DNA nuclear mostra-se como uma alternativa importante para uma triagem inicial dos inúmeros genótipos que compõem as coleções de trabalho dos melhoristas. Posteriormente, os resultados obtidos com a citometria de fluxo podem ser aferidos pelas contagens cromossômicas, que fornecerão uma caracterização precisa da ploidia das plantas, sendo, especialmente, úteis na identificação de materiais duplicados presentes na coleção.

A partir da quantificação de DNA de 12 genótipos de *L. multiflorum* (04 parentais e 08 progênies) foi possível separá-los nas categorias diploide, triploide e tetraploide (Tabela 1). O conteúdo médio de DNA nos diploides variou de 5,42 pg a 5,85 pg. O único indivíduo triploide (ABARP) apresentou 8,30 pg. Nos tetraploides, o conteúdo médio de DNA variou de 10,21 pg a 10,95 pg. Os resultados do *screening* para a quantidade de DNA mostraram que somente uma cultivar diploide (genótipo Comum) e uma tetraploide (Bar Jumbo) apresentaram os valores esperados em todas as plantas avaliadas. Para os demais genótipos avaliados foram encontradas plantas diploides e tetraploides, sendo que para uma progênie (genótipo ABARP) foram confirmadas plantas com três ploidias diferentes (Tabela 1) (BUSTAMANTE et. al., 2015).

Tabela 1. Média do conteúdo de DNA nuclear (2C em picogramas, pg), nível de ploidia e número de cromossomos de genótipos de *Lolium multiflorum*.

Genótipos	2C (pg)	Nível de ploidia	Número cromossômico
Comum	5.42a ¹	2x	14
Avance	5.64a	2x	. ²
	10.91d	4x	28
Barjumbo	10.87d	4x	28
INIA Titan	5.65a	2x	14
	10.37c	4x	28
A41	5.76a	2x	14
	10.21c	4x	-
A42	5.82a	2x	14
	10.57c	4x	-
A43	5.74a	2x	14
	10.45c	4x	28
A44	5.71a	2x	14
A45	5.64a	2x	14
	10.93d	4x	28
A46	5.85a	2x	14
	10.89d	4x	28
A47	10.95d	4x	28
ABARP	5.50a	2x	14
	8.30b	3x	21
	10.93d	4x	28

*¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. ²Não determinado. (BUSTAMANTE et al., 2015).

A ocorrência de progênies diploides e tetraploides em um mesmo grupo de plantas avaliadas pode ser devido à mistura de sementes que pode ter ocorrido na multiplicação de sementes dos parentais em nível comercial, uma vez que é extremamente difícil separar visualmente plantas com diferentes ploidias. Esse fato é o que provavelmente pode ter ocorrido com as sementes de dois parentais que apresentaram indivíduos com diferentes ploidias (BUSTAMANTE et al., 2015). Além disso, apesar de *L. multiflorum* ser uma espécie alógama (FEARON; HAYWARD; LAWRENCE, 1983), em uma pequena quantidade das plantas pode ter ocorrido autopolinização, justificando, assim, a ocorrência de progênies com diferentes ploidias. Essas informações ratificam a importância do uso da técnica de citometria de fluxo para seleção e certificação dos genótipos e na detecção de cruzamentos em *L. multiflorum* em larga escala.

A vantagem observada para o uso da citometria de fluxo está na possibilidade de realizar avaliações em diferentes tipos de tecidos jovens e em pequenas frações, caracterizando-se por ser um método rápido e não destrutivo (PEREIRA et al., 2012). Entretanto, a limitação no seu uso é que as informações geradas são em nível de população de células, não sendo possível avaliar o comportamento individual das mesmas. Nessas circunstâncias, a opção mais confiável é a análise citogenética em metáfases mitóticas. Esse procedimento possibilita determinar com exatidão o número de cromossomos em células individuais.

As análises suplementares para o número cromossômico confirmaram a ploidia determinada por citometria de fluxo para todos os genótipos analisados (Tabela 1) (BUSTAMANTE et al., 2015). Ambas as técnicas comprovaram a ocorrência de três níveis de ploidia. A combinação das análises por quantificação de DNA e contagem cromossômica mostrou ser eficiente para *screening* e diagnóstico de nível de ploidia em parentais e pós-cruzamentos dentro do gênero *Lolium*.

6.4. Meiose e Viabilidade de Pólen

A análise da microsporogênese em 12 genótipos de *L. multiflorum* mostrou meiose regular com a formação de sete bivalentes em forma de anel e com quiasmas terminalizados. Houve variação para o número de cromossomos ligados ao nucléolo, com um, dois ou três, demonstrando ocorrer variação em relação à ocorrência de regiões organizadoras do nucléolo (RONs) entre os acessos analisados (FREITAS et al., 2013).

Três genótipos apresentaram anormalidades meióticas, tais como cromossomos não orientados na placa durante a metáfase I, pontes na anáfase I, cromossomos atrasados na telófase I e a presença de até dois micronúcleos na telófase I (FREITAS et al., 2013). As anormalidades observadas podem resultar em eliminações de fragmentos ou cromossomos inteiros e formação de grãos de pólen com número não balanceado de cromossomos e inférteis, tornando os genótipos inadequados para emprego em cruzamentos.

Em relação ao grão de pólen, os genótipos de *L. multiflorum* avaliados apresentaram alta taxa de viabilidade (> 89%), mas houve diferença para os caracteres quantitativos eixo polar, diâmetro equatorial na vista equatorial, exina, endoexina, ectoexina e razão P/E. Os grãos de pólen foram caracterizados como monoaperturados, com abertura não proeminente e com âmbito circular. As diferenças morfológicas entre os grãos de pólen podem auxiliar na distinção entre os mesmos e, posteriormente, serem utilizadas para comparação entre os níveis de ploidia (NUNES et al., 2012).

6.5. Variabilidade nos Sítios de rDNA 45S e Sítios Frágeis em Cromossomos de *L. perenne* e *L. multiflorum*

Os sítios de DNAs ribossomais (rDNAs) representam cerca de 10% do genoma de plantas e são tradicionalmente empregados como marcadores citogenéticos importantes em estudos filogenéticos e taxonômicos, pois constituem unidades repetitivas altamente conservadas, cuja posição e distribuição nos cromossomos tem sido usadas para correlacionar com a especiação e com a definição de tendências evolutivas em grupos vegetais (CASTILHO; HESLOP-HARRISON, 1995; HESLOP-HARRISON, 2000; HUGHES; HAWLEY, 2009).

Os genes de rDNA 5S ocorrem como repetições em tandem e estão localizados em um ou mais sítios por conjunto cromossômico. O sítio de rDNA 45S, por sua vez, corresponde a centenas ou milhares de cópias,

em tandem, dos genes de rRNA 18S, 5.8S e 26S, separados por espaçadores intergênicos não transcritos. No entanto, apenas poucos genes de rDNA 45S são transcricionalmente ativos (CONCONI et al., 1989; HESLOP-HARRISSON, 2000).

Estudos em várias espécies de diferentes grupos, tais como *Allium* (SCHUBERT; WOBUS, 1985), *Triticeae* (ALTINKUT et al., 2006; DUBCOVSKY; DVORAK, 1995), *Nemesia* (DATSON; MURRAY, 2006), *Crotalaria* (MORALES; AGUIAR-PERECIN; MONDIN, 2012), *Passiflora* (CUCO et al., 2005), *Aegilops* (RASKINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a, 2004b) e *Rice* (SHISHIDO; SANO; FUKUI, 2000) tem demonstrado a variabilidade no número e posição dos sítios de rDNA 45S.

Recentemente, variações intraespecíficas para a posição e número desses sítios vem sendo vastamente descritas em *Lolium* (HUANG et al., 2008, 2009; KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010; LIDEIKYTE et al., 2008; THOMAS; HARPER; MORGAN, 2001). Em cultivares de *L. perenne* L., por exemplo, a variação intraespecífica no número e localização de *locos* de rDNA 45S e 5S indicam que variações intracromossômicas podem ter ocorrido durante sua especiação (KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010). A análise de espaçadores intergênicos e regiões transcritas de *Sinapis alba* L. em sete taxa de *Lolium*, permitiu prever que o rDNA das espécies autógamas é mais homogêneo do que o das espécies alógamas, uma clara diferença na variação ribossômica entre espécies autógamas e alógamas de *Lolium* (WARPEHA; GILLILAND; CAPESIUS, 1998).

Além dessas variações, estudos realizados também em *L. perenne* por Huang et al. (2008) mostraram que em algumas células meristemáticas havia maior número de cromossomos que o esperado para a espécie e sinais 45S na região terminal em número variável. Os autores demonstraram que estes sinais terminais eram provenientes da expressão de sítios frágeis, fenômeno já descrito em cromossomos humanos (GLOVER, 2006; RICHARDS, 2001). Essa expressão causava a ruptura total ou parcial exclusivamente nos sítios rDNA 45S dos cromossomos de *L. perenne*, gerando fragmentos que resultaram na contagem equivocada do número cromossômico.

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na variação do número e posição dos sítios de rDNA 45S tanto interespecífica quanto intraespecífica, tais como: diferentes rearranjos cromossômicos; permuta genética desigual; conversão, transposição gênica e a expressão dos sítios frágeis (BROWN; O'NEILL, 2010; DATSON; MURRAY, 2006; DUBCOVSKY; DVORAK, 1995; RASKINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a, 2004b; SCHUBERT; WOBUS, 1985; THOMAS; HARPER; MORGAN, 2001). Em *Lolium*, além de ser um mecanismo potencial para variabilidade no número e posição dos blocos de rDNA 45S, a ocorrência dos sítios frágeis pode levar a alterações no genoma que podem estar relacionadas a evolução e surgimento de novas espécies (BROWN; O'NEILL, 2010; RUIZ-HERRERA; ROBINSON, 2007).

As análises realizadas pelo nosso grupo de pesquisa se dedicaram a descrever as características dos sítios frágeis na região 45S dos cromossomos de genótipos diploides e poliploides de *L. multiflorum* e *L. perenne*, assim como os efeitos transcricionais.

Nos cromossomos dessas espécies, os sítios de rDNA foram observados em três situações: em cromossomos intactos, em cromossomos com lesão e em cromossomos com quebras. Os cromossomos intactos apresentaram apenas um sinal de rDNA 45S proximal. Nos cromossomos que apresentaram lesões, os sinais ocorreram em apenas um dos lados da lesão ou nos dois lados, ocorrendo variação quanto ao tamanho e a intensidade de fluorescência entre os sinais separados pela lesão. Em alguns casos, uma fina fibra de cromatina ligava o fragmento lesionado ao cromossomo. Nos cromossomos que apresentaram quebras, os sinais foram observados nas extremidades do fragmento ou do cromossomo ou em ambos, também com variação de tamanho e intensidade de fluorescência entre os dois sinais separados pela quebra (BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015)

O padrão de quebras e lesões foi altamente heterogêneo, com variação inclusive entre metáfases do mesmo meristema. Algumas metáfases apresentaram cromossomos intactos enquanto outras apresentaram simultaneamente quebra e lesão em diferentes frequências. Não foram detectadas sequências teloméricas

na extremidade dos fragmentos cromossômicos correspondentes ao local de quebras no sítio 45S (BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015).

Sítios de rDNA 45S sintênicos foram observados tanto em cromossomos intactos quanto em cromossomos com lesões ou quebras. Nos cromossomos com quebras ou lesões, os sítios 45S foram observados no cromossomo e em seu respectivo fragmento. Os sinais detectados em sítios sintênicos apresentaram intensidade e tamanhos iguais ou diferentes. A comparação entre os sinais de rDNA 45S e as RONS marcadas pela coloração com prata mostraram não haver correspondência entre ambas nos genótipos avaliados BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015).

Variação no número de nucléolos no núcleo interfásico foi detectada para os genótipos de *L. multiflorum* e de *L. perenne*. Além da variação numérica foi observado também considerável heteromorfismo e a ocorrência de fusão nucleolar (BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015).

6.6. Indução de Poliploides em *L. multiflorum*

A obtenção de plantas poliploidizadas tem sido um dos alvos dos programas de melhoramento genético visando obter genótipos diferenciados para maximizar características de interesse agrônomico. Dentre as vantagens, a poliploidização possibilita ampliar a base genética, restaurar a fertilidade de híbridos interespecíficos, obter linhagens em curto espaço de tempo e viabilizar cruzamentos quando estão envolvidos genótipos com diferenças na ploidia (BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009; ISHIGAKI et al., 2009; SOUZA-KANESHIMA, 2010).

Em espécies forrageiras, assim como para outras espécies, a substância antimitótica mais empregada para indução da poliploidia tem sido a colchicina (ISHIGAKI et al., 2009; SOUZA-KANESHIMA et al., 2010; QUESENBERRY et al., 2010; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009). A colchicina foi empregada para obtenção de poliploides de *L. perenne*, de híbridos de *L. perenne* x *Festuca arundinacea* e *L. perenne* x *L. multiflorum* (THOMAS & HUMPHREYS, 1991; JONES & HUMPHREYS, 1993; PASAKINSKIENE, 2000 e NAIR, 2004).

As tentativas para obtenção de poliploides empregando genótipos nacionais de *L. multiflorum*, realizadas até o momento, possibilitaram gerar poliploides em diferentes frequências. As concentrações de colchicina de 0, 1% e 0,25% com DMSO 1% foram as mais eficientes na obtenção de poliploides, os quais geraram grãos de pólen viáveis. A partir dessas plantas foram obtidas 164 progênies, das quais 66% (109) apresentaram estabilidade com relação ao nível de ploidia, quando avaliadas após o estabelecimento das plantas em casa de vegetação. Esse monitoramento dos poliploides nas gerações subsequentes é importante para observar possíveis efeitos tardios da colchicina, em especial sobre a estabilidade genética e fenotípica dos indivíduos (PEREIRA et al., 2014).

6.7. Perspectivas

Com o estabelecimento da linha de pesquisa, os trabalhos passaram a avaliar o Complexo *Lolium-Festuca*, incorporando a análise das espécies de *Festuca* os híbridos interespecíficos – Festulolium. Para o aprofundamento dos estudos sobre a expressão dos sítios frágeis estão sendo realizadas análises sobre os mecanismos epigenéticos.

6.8. Referências

ALTINKUT, A. et al. Ac-like transposons in populations of wild diploid Triticeae species: comparative analysis of chromosomal distribution. **Chromosome Research**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 307-317, Apr. 2006.

ARAÚJO, A. A. **FORAGEIRAS PARA CEIFA**: capineiras, fenação e ensilagem. Porto Alegre: Sulina, 1978. 196 p.

BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; ABREU, J. C. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milheto. **Bragantia**, v. 66, p. 365-372, 2007.

- BENNET, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Ann Bot.**, v. 76, p. 113-176, 1995.
- BENNETT, S. J.; HAYWARD, M. D.; MARSHALL, D. F. Electrophoretic variation as a measure of species differentiation between four species of the genus *Lolium*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 49, p. 59-66, 2002.
- BROWN, J. D.; O'NEILL, R. J. Chromosomes, conflict, and epigenetics: chromosomal speciation revisited. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 11, p. 291-316, 2010.
- BUSTAMANTE, F. O.; ROCHA, L. C.; TORRES, G. A.; DAVIDE, L. C.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H. Distribution of rDNA in diploid and polyploidy *Lolium multiflorum* Lam. and fragile sites in rDNA regions. **Crop Science**, v. 54, p. 1-9, 2014.
- BUSTAMANTE, F. O.; ROCHA, L. C.; SANTOS, N. S.; SILVEIRA, R. A. D.; NUNES, R. C.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H. Analysis of nuclear DNA content and chromosome number for screening genotypes and crosses in *Lolium multiflorum* Lam. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, p. 666-670, 2015.
- CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C.; SALGADO, C. C.; SANTOS, F. C.; COSTA, P. N.; SILVA, P. S.; ALVES, C. C. S.; VICCINI, L. F.; PEREIRA, A. V. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, v. 128, p. 101-104, 2009.
- CARNIDE, V.; ORELLANA, J.; RIBEIRO, M. A. M. V. Nucleolar organizer activity in *Lolium* and *Festuca*. 1. *Lolium multiflorum*, *Festuca arundinaceae* and *Lolium-Festuca* Hybrids. **Heredity**, v. 56, p. 311-317, 1986.
- CARNIDE, V.; ORELLANA, J. Analysis of nucleolar organizer regions by silver staining in two *Lolium* species. **Euphytica**, Netherlands, v. 35, n. 2, p. 503-507, 1986.
- CASTILHO, A.; HESLOP-HARRISON, J. S. Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. **Genome**, v. 38, p. 91-96, 1995.
- CONCONI, A. et al. Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. **Cell**, Cambridge, v. 57, n. 5, p. 753-761, June 1989.
- CUCO, S. M. et al. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, Firenze, v. 58, n. 3, p. 220-228, 2005.
- DATSON, P. M.; MURRAY, B. G. Ribosomal DNA *locus* evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? **Chromosome Research**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 845-857, 2006.
- DAVIDE, L. C.; TECHIO, V. H.; PEREIRA, R. C.; FONTES, B. P. D.; TORRES, G. A. Citogenética e suas aplicações no melhoramento de plantas. **Informe Agropecuário**, v. 30, p. 53-63, 2009.
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plants genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 38, p. 285-302, 1997.
- DUBCOVSKY, J.; DVORAK, J. Ribosomal-RNA multigene loci-nomads of the Triticeae genomes. **Genetics**, Austin, v. 140, n. 4, p. 1367-1377, Aug. 1995.
- FEARON C. H.; HAYWARD, M. D.; LAWRENCE, M. J. Self-incompatibility in ryegrass: V. Genetic control, linkage and seed-set in diploid *Lolium multiflorum* Lam. **Heredity**, v. 50, p. 35-45, 1983.
- FREITAS, A. S.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H. Meiotic behavior of genotypes of *Lolium multiflorum* Lam. of Brazil. **Chromosome Science**, v. 16, p. 23-27, 2013.

GLOVER, T. W. Common fragile sites. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 232, n. 1, p. 4-12, Jan. 2006.

ISHIGAKI, G.; GONDO, T.; SUENAGA, K.; AKASHI, R. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. **Grassland Science**, v. 55, p. 164-170, 2009.

JAUHAR, P. P. Alien gene transfer and genetic enrichment of bread wheat. In: DAMANIA, A. B. (Ed.). **Biodiversity and wheat improvement**. Ciudad del Mexico: A. Wiley-Sayce, 1993. p. 103-104.

HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The plant cell**, Waterbury, v. 12, p. 617-635, 2000.

HUGHES, S. E.; HAWLEY, R. S. Heterochromatin: a rapidly evolving species barrier. **Plos Biology**, v. 7, p. 1-4, 2009.

HUANG, J.; MA, L.; YANG, F.; FEI, S.; LI, L. 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps *in vitro* on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 5, p. 1-7, 2008.

HUANG, J.; MA, L.; SUNDARARAJAN, S.; FEI, S.; LI, L. Visualization by atomic force microscopy and FISH of the 45S rDNA gaps in mitotic chromosomes of *Lolium perenne*. **Protoplasma**, Karlsruhe, v. 236, n. 1/4, p. 59-65, July 2009.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM [database on the internet]. Disponível em: <<http://www.itis.gov>>. Acesso em: 30 jun. 2010.

JAUHAR, P. P. Alien gene transfer and genetic enrichment of bread wheat. In: DAMANIA, A. B. (Ed.). **Biodiversity and wheat improvement**. Mexico: A Wiley-Sayce, 1993. p. 103-104.

JENKIN, T. J. The ryegrasses (*Lolium* L.). In: ROEMER, T. H.; RUDORF, W. (Eds.). **Handbuch der Pflanzenzuchtung**. Berlin, Hamburg: Paul Parey, 1959. p. 435-452.

JONES, M. L.; HUMPHREYS, M. O. Progress in breeding interspecific hybrid ryegrasses. **Grass and Forage Science**, v. 48, p. 18-25, 1993.

KSIAZCZYK, T.; TACIAK, M.; ZWIERZYKOWSKI, Z. Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 51, n. 4, p. 449-460, 2010.

LIDEIKYTĖ, L. et al. FISH assessment of ribosomal DNA sites in the chromosome sets of *Lolium*, *Festuca* and *Festulolium*. **Agriculture**, London, v. 95, p. 116-124, 2008.

LOOS, B. P. Allozyme variation within and between populations in *Lolium* (Poaceae). **Plant Systematic and Evolution**. v. 188, p. 101-113, 1993.

MALIK, C. P.; THOMAS, P. T. Karyotypic studies in some *Lolium* and *Festuca* species. **Caryologia**, v. 19, n. 2, p. 167-196, 1966.

MORALES, A. G.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Karyotype characterization reveals an up and down of 45S and 5S rDNA sites in *Crotalaria* (Leguminosae Papilionoideae) species of the section Hedriocarpae sub-section Macrostachyae. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, n. 2, p. 277-288, Feb. 2012.

NAIR, R. M. Developing tetraploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 47, p. 45-49, 2004.

- NUNES, R. de C.; BUSTAMANTE, F. O.; TECHIO, V. H.; MITTELMANN, A. Morphology and pollen viability of *Lolium multiflorum* Lam. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, p. 180-188, 2012.
- PASAKINSKIENE, I. Culture of embryos and shoot tips for chromosome doubling in *Lolium perenne* and sterile hybrids between *Lolium* and *Festuca*. **Plant Breeding**, v. 119, p. 185-187, 2000.
- PASAKINSKIENÉ, I.; JONES, N. A decade of "chromosome painting" in *Lolium* and *Festuca*. **Cytogenetic and genome research**, v. 109, n. 1-5, p. 393-399, 2005.
- PEREIRA, A. V.; MITTELMAN, A.; LEDO, F. J. S.; SOBRINHO, F. S.; AUAD, A. M.; SILVA e OLIVEIRA, S. Comportamento agrônômico de populações de azevém anual (*Lolium multiflorum* L.) para cultivo invernal na região sudeste. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 567-572, 2008.
- PEREIRA, R. C.; DAVIDE, L. C.; TECHIO, V. H.; TIMBÓ, A. L. O. Duplicação cromossômica em gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, v. 42, p. 1278-1285, 2012.
- PEREIRA, R. C.; FERREIRA, M. T. M.; DAVIDE, L. C.; PASQUAL, M.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H. Chromosome duplication in *Lolium multiflorum* Lam. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, p. 251-255, 2014.
- POLOK, K. **Molecular evolution of the genus *Lolium* sp.** Olsztyn: Studio Poligrafii Komputerowej, 2007.
- QUESENBERRY, K. H.; DAMPIER, J. M.; LEE, Y. Y.; SMITH, R. L.; AEUÑA, C. A. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. **Euphytica**, v. 175, p. 43-50, 2010.
- RASKINA, O.; BELYAYEV, A.; NEVO, E. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. **Chromosome Research**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 153-161, 2004a.
- RASKINA, O.; BELYAYEV, A.; NEVO, E. Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 41, p. 14818-14823, Oct. 2004b.
- RICHARDS, R. I. Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. **Trends in Genetics**, London, v. 17, n. 6, p. 339-345, June 2001.
- ROCHA, L. C.; BUSTAMANTE, F. O.; SILVEIRA, R. A. D.; TORRES, G. A.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H. Functional repetitive sequences and fragile sites in chromosomes of *Lolium perenne* L. **Protoplasma**, v. 252, p. 451-460.
- RUIZ-HERRERA, A.; ROBINSON, T. J. Afrotherian fragile sites, evolutionary breakpoints and phylogenetic inference from genomic assemblies. **BMC Evolutionary Biology**, New York, v. 7, n. 199, p. 1-15, 2007.
- SCHUBERT, I.; WOBUS, U. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. **Chromosoma**, Berlin, v. 92, p. 143-148, 1985.
- SHISHIDO, R.; SANO, Y.; FUKUI, K. Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 263, n. 2, p. 586-591, May 2000.
- SOUZA-KANESHIMA, A. M.; RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; DO VALLE, C. B. Meiotic behaviour in the first interspecific hybrids between *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria decumbens*. **Plant Breeding**, v. 129, p.186-191, 2010.

TERREL, E. E. A taxonomic revision of the genus *Lolium*. **USDA Techn Bull**, v. 1392, p. 1-65, 1968.

THOMAS, H. M. The Giemsa C-band karyotypes of six *Lolium* species. **Heredity**, Great Britain, v. 46, p. 263-267, 1981.

THOMAS, H.; HUMPREYS, M. O. Progress and potential of interspecific hybrids of *Lolium* and *Festuca*. **Journal of Agriculture Science**, v. 117, p. 1-8, 1991.

THOMAS, H. M.; HARPER, J. A.; MORGAN, W. G. Gross chromosome rearrangements are occurring in an accession of the grass *Lolium rigidum*. **Chromosome Research**, Oxford, v. 9, n. 7, p. 585-590, 2001.

THOMAS, H. M.; HARPER, J. A.; MEREDITH, M. R.; MORGAN, W. G.; THOMAS, I. D.; TIMMS, E.; KING, I. P. Comparasion of ribosomal DNA sites in *Lolium* species by fluorecence in situ bybridization. **Chromossome Research**, v. 4, p. 486-490, 1996.

WARPEHA, K. M. F.; GILLILAND, T. J.; CAPESIUS, I. An Evaluation of rDNA variation in species (Ryegrass). **Genome**, v. 41, p. 307-311, 1998.

Melhoramento Genético e Citogenética do Gênero *Cynodon*

Flávio Rodrigo Gandolfi Benites

Fausto de Souza Sobrinho

Vânia Helena Techio

7.1. Resumo

A Embrapa criou recentemente um programa de melhoramento do gênero *Cynodon* para as condições edafoclimáticas nacionais. O programa conta com diferentes estratégias para criação e exploração de variabilidade genética. Apesar de ser um programa recente, alguns resultados já mostram ganhos com a seleção de plantas mais produtivas e com resistência a cigarrinha das pastagens. É proposto também uma nova classificação em relação ao número de espécies dentro do gênero. Os estudos iniciais sobre a citogenética dos clones superiores dão suporte para ações futuras para realização de cruzamentos de interesse que permitirão a seleção de clones com maior número de caracteres. Desta forma, no presente texto estão descritas as pesquisas iniciais com o gênero *Cynodon* realizado pela Embrapa.

7.2. Introdução

Dentre as gramíneas existentes como alternativas para exploração a pasto, o gênero *Cynodon* (Gramas Estrelas e Bermudas) apresentam vantagens como a elevada produtividade e qualidade da forragem, capacidade de resposta a adubação, resistência ao pisoteio, boa adaptação a diferentes tipos de solos e clima, boa tolerância a solos úmidos e a baixas temperaturas. Esses fatores distinguem o gênero *Cynodon* de outros que predominam em condições tropicais e justificam como alternativa promissora para produtores que buscam eficiência na atividade leiteira por meio da intensificação sustentada da atividade (VILELA, 2005).

A Tabela 1, mostra a produtividade média da cultivar Tifton 85 comparadas à outras forrageiras. A Fundação ABC conduziu experimentos comparando o híbrido interespecífico de *Brachiaria* - Convert HD 364 (Mulato II) durante os anos de 2007 à 2011, em Castro – PR. As médias de matéria seca apresentados na Tabela 1 são resultado das avaliações ocorridas durante os cinco anos de avaliações.

Tabela 1. Comparação entre espécies e cultivares de forrageiras.

Gênero	Espécie	Cultivar	Média (MS ha ⁻¹)
<i>Brachiaria</i>	<i>briz. x ruziz. x decumbens</i>	Convert HD 365	14.562
<i>Cynodon</i>	<i>dactylon x nlemfuensis</i>	Tifton 85	14.371
<i>Panicum</i>	<i>maximum</i>	Tanzânia	13.649
<i>Brachiaria</i>	<i>brizantha</i>	Marandu	9.784
<i>Brachiaria</i>	<i>decumbens</i>	Basilisk	10.694
<i>Brachiaria</i>	<i>brizantha</i>	MG-5	12.213

Fonte: Adaptado do folder de comercialização da cultivar Convert HD 364, promovido pela Fundação ABC, 2012.

A cultivar Tifton 85 apresentou durante as avaliações média de produção de matéria seca semelhante a única cultivar híbrida de *Brachiaria* lançada no Brasil. A cultivar de *Cynodon* apresentou superioridade na produção de massa seca em relação as demais cultivares de outros gêneros avaliadas, superando a cultivar de *Brachiaria* Marandu, que é a cultivar forrageira mais plantada no Brasil. Os dados apresentados mostram o potencial de produção do Tifton 85. O principal fator pela não adoção em áreas maiores é a dificuldade e gasto na implantação da pastagem. Por ser de reprodução assexuada, exige mão de obra

que hoje é escassa e de elevado valor, além de um grande número de mudas. Tais fatores influenciam na escolha da cultivar forrageira a ser implantada.

O gênero *Cynodon* passou a ter importância na pecuária brasileira na década de 1990, sendo conhecidos como “capins da moda”. Houve várias introduções de material americano, desenvolvido principalmente pela estação de Tifton, no estado da Geórgia. Apesar da ocorrência das introduções das variedades americanas, não houve nenhuma avaliação ou estudo realizado nas cultivares por institutos de pesquisa nacionais antes de sua implantação como pastagens. Na época a cultivar Coastcross foi a mais plantada. Com o lançamento e disseminação do Tifton 85, ele passou a ser preferido em relação ao Coastcross.

Os estudos sobre o gênero *Cynodon* são escassos quando comparados a outras forrageiras. Em relação ao melhoramento genético para as condições nacionais os estudos são praticamente inexistentes.

O potencial forrageiro do *Cynodon* foi avaliado em um Simpósio realizado em Juiz de Fora – MG (ALVIM et al., 1996) e uma das conclusões obtidas no simpósio foi que o melhoramento das espécies e híbridos de *Cynodon* nas condições ambientais brasileiras poderia produzir nova linha de cultivares, com boas características de adaptação.

No âmbito da citogenética, a maioria das informações é escassa, antiga e se restringe às contagens cromossômicas, tais como os trabalhos de Avdulow (1931), Burton (1947), Darlington e Wyie (1956), Forbes e Burton (1963), Harlan e de Wet (1969), Clayton e Harlan (1970), Silva e Snaydon (1995), Hunter (1934), Hurcombe (1947), Moffett e Hurcombe (1947) e Rochecouste (1962). Há poucos trabalhos recentes como o de comportamento meiótico (AKSHITA et al., 2011) e de distribuição dos sítios de rDNA (ZHI-YUN et al., 2013). Também não foram encontradas, na literatura, informações sobre os genomas das espécies de *Cynodon*.

Assim, torna-se premente a realização de estudos a partir de análises de citogenética convencional e citomoleculares, a fim de comparar acessos diploides e poliploides de *Cynodon* visando à compreensão da organização genômica e cromossômica do gênero e gerar informações para estudos taxonômicos, evolutivos e de melhoramento genético. Os resultados obtidos também poderão dar suporte a possíveis reenquadramentos taxonômicos, além de gerar informações importantes para os programas de melhoramento, intercâmbios e programas de conservação de recursos genéticos.

7.3. Taxonomia, Origem e Introdução do Gênero *Cynodon* no Mundo

As poucas compilações nacionais que abordam a taxonomia, origem, e introdução do gênero *Cynodon*, Alvim et al., (1996), Vilela (2005) e Pedreira (2010), apresentam a abordagem realizada por Harlan (1970b) na classificação das espécies, centro de origem e distribuição.

Harlan, (1970b), citado por Pedreira (2010), comenta que o gênero *Cynodon* representa um grupo de gramíneas pequeno e sistematicamente distinto dentro da família Chloridoideae, sendo agrupado em nove espécies e 10 variedades de acordo com sua distribuição geográfica. As espécies estudadas, incluindo *C. dactylon*, *C. nlemfuensis*, *C. plectostachyus* e *C. aethiopicus*, são na sua maioria, encontradas na grande parte da porção tropical e às vezes subtropical do leste da África. *C. incompletus* e *C. transvaalensis* são encontrados na África do Sul, enquanto *C. arcuatus* e *C. barbieri* ocorrem predominantemente no sul da Ásia e Ilhas do Pacífico Sul.

A classificação para as nove espécies e dez variedades de *Cynodon* de origem africana apresentadas por Harlan & De Wet (1969) e Harlan et al., (1970b) e Wu & Taliaferro (2009), são apresentadas a seguir (Tabela 2).

E as espécies de origem no sul da Ásia e ilhas do Pacífico Sul (Tabela 3).

Os autores citados anteriormente apenas consideram as espécies e variedades encontradas na sua maioria no continente Africano e Asiático, porém há trabalhos realizados por Caro e Sanchez (1969) e (1972) que descrevem espécies originárias do continente Americano. Os autores fizeram a classificação botânica de cada

uma delas, reclassificando-as algumas como novas espécies, contando com auxílio do Instituto Smithsonian em Washington D.C.

Tabela 2. Espécies de *Cynodon* de origem africana.

Espécies	Ploidia
<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	$2n = 4x = 36$
<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>elegans</i>	$2n = 4x = 36$
<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>aridus</i>	$2n = 2x = 18$
<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>Afghanicus</i>	$2n = 2x = 18$ e $2n = 4x = 36$
<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>coursii</i>	$2n = 4x = 36$
<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>polevansii</i>	$2n = 2x = 18$ e $2n = 4x = 36$
<i>Cynodon nlenfuensis</i> var. <i>nlenfuensis</i>	$2n = 2x = 18$ e $2n = 4x = 36$
<i>Cynodon nlenfuensis</i> var. <i>robustus</i>	$2n = 2x = 18$ e $2n = 4x = 36$
<i>Cynodon plectostachyus</i>	$2n = 2x = 18$
<i>Cynodon aethiopicus</i>	$2n = 2x = 18$ e $2n = 4x = 36$
<i>Cynodon incompletes</i> var. <i>incompletus</i>	$2n = 2x = 18$
<i>Cynodon incompletes</i> var. <i>hirsutus</i>	$2n = 2x = 18$ e $2n = 4x = 36$
<i>Cynodon transvaalensis</i>	$2n = 2x = 18$
<i>Cynodon x magennisii</i>	

Tabela 3. Espécies de *Cynodon* de origem asiática e das ilhas do pacífico.

Espécies	Ploidia
<i>Cynodon arcuatus</i>	$2n = 4x = 36$
<i>Cynodon barberi</i>	$2n = 2x = 18$

As espécies de *Cynodon* descrita por Caro e Sanches (1969) e (1972), são apresentadas como novas espécies, que eram confundidas com *C. dactylon*. Nos trabalhos realizados pelos dois autores portenhos, são apresentadas chaves descritivas de cada espécie, com desenhos de cada uma, morfologia e as diferenças entre as espécies. Houve avaliações de espécies em herbários da América do Sul, Estados Unidos, África e *in locu* no campo. As espécies descritas pelos dois autores estão apresentadas na Tabela 4.

Caro e Sanchez, consideram que o gênero *Cynodon* apresenta 20 espécies e nove variedades, número de espécies bem diferentes das consideradas por Harlan & De Wet (1969), Harlan et al., (1970b) e Wu & Taliaferro (2009), que apenas consideram espécies de origem africana.

Ainda hoje há divergência na literatura quanto ao número de espécies e variedades do gênero *Cynodon*. Atualmente, no "The Plant List" (2015) foram catalogadas 13 espécies, 4 subespécies, 25 variedades, 96 sinônimos e 5 espécies sem definição. Essas classificações geram complicações quanto a correta taxonomia deste gênero, havendo a necessidade de trabalhos utilizando dados moleculares, bioquímicos, citogenéticos e botânicos para agrupar essas espécies.

Tabela 4. Espécies descrita por Caro & Sanchez provenientes da América.

Espécie	Origem (Material Examinado)
<i>Cynodon nitidus</i>	Endêmica no Chile com ocorrência no Peru
<i>Cynodon aristulato</i>	Peru, Bolívia, Brasil (estados: SC e SP), Chile, Colômbia, Equador, EUA, Guatemala, Guiana, Havaí, México e Panamá
<i>Cynodon erectus</i>	México e Peru
<i>Cynodon pascuus</i>	Brasil (PI, PA, RS e SC), Paraguai, Guiana, Chile, Suriname, Haiti, México e EUA
<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	Argentina
<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>longiglumis</i>	Argentina, Uruguai, EUA e Paraguai
<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>pilosus</i>	Argentina, Paraguai e EUA
<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>biflorus</i>	Argentina e Brasil (RS)
<i>Cynodon plectostachyus</i>	Argentina e África
<i>Cynodon laeviglumis</i>	Argentina
<i>Cynodon hirsutissimus</i>	Argentina
<i>Cynodon affinis</i>	Argentina, Uruguai, França e Bulgária
<i>Cynodon maritimus</i>	Argentina
<i>Cynodon maritimus</i> var. <i>maritimus</i>	Argentina
<i>Cynodon maritimus</i> var. <i>breviglumis</i>	Argentina
<i>Cynodon maritimus</i> var. <i>grandispiculus</i>	Argentina
<i>Cynodon aristiglumis</i>	Argentina
<i>Cynodon mucronatus</i>	Argentina e Brasil (RS)
<i>Cynodon hirsutus</i>	
<i>Cynodon hirsutus</i> var. <i>hirsutus</i>	Argentina
<i>Cynodon hirsutus</i> var. <i>sesquiflorus</i>	
<i>Cynodon distichloides</i>	Uruguai
<i>Cynodon grandispiculus</i>	Uruguai
<i>Cynodon decipiens</i>	África
<i>Cynodon iraquensis</i>	Iraque
<i>Cynodon pedicellatus</i>	Uruguai
<i>Cynodon scabrifolius</i>	Brasil (arredores de Brasília)
<i>Cynodon umbellatus</i>	Brasil (BA e RJ), Chile, Costa Rica, Grécia, Guatemala, Guiana Francesa, Inglaterra e Itália.
<i>Cynodon dactylon</i>	Endêmica

7.4. Gramas Estrelas e Gramas Bermudas

O gênero *Cynodon* foi classificado por Clayton e Harlan (1970) para diferenciar as espécies africanas, utilizando-se a presença de rizomas.

As Gramas Bermudas (*C. dactylon*) apresentam rizomas e estolons, enquanto as Gramas Estrelas (*C. nlemfuensis*, *C. plectostachyus* e *C. aethiopicus*) apresentam apenas estolons. As Figuras 1 e 2 ilustram a diferença entre as espécies rizomatosas e estoloníferas.

7.4.1. Gramas Bermudas

Representada pela espécie *C. dactylon*, sendo considerada a espécie mais importante, cosmopolita e de maior diversidade genética. A espécie *C. dactylon* apresenta o maior valor econômico, pois envolve uso como forragem, grama para relvados, feno e pastejo, além de possuir uma distribuição cosmopolita.

Vários estudos realizados por Harlan (1970b), Harlan et al., (1970) Harlan et al., (1970a), de Wet & Harlan (1970) e Harlan & de Wet (1969) descrevem a distribuição geográfica das espécies do gênero *Cynodon* e seus níveis de ploidia. É sabido que a distribuição de *Cynodon* diploide ocorre em áreas longas na Índia, Afeganistão e Oeste da Ásia, estendendo-se até o Sul do continente africano. As ploidias maiores que $2n = 2x = 18$ em *Cynodon*, incluindo triploides, tetraploides, pentaploides e hexaploides, provavelmente evoluíram das formas diploides. Com isso os trabalhos concluem que o centro de origem das Gramas Bermudas envolvem áreas do Sul da Ásia e Oeste da África ao longo do Oceano Índico. Plantas pentaploides e hexaploides ocorrem raramente, porem são relatados por Wu et al. (2006).

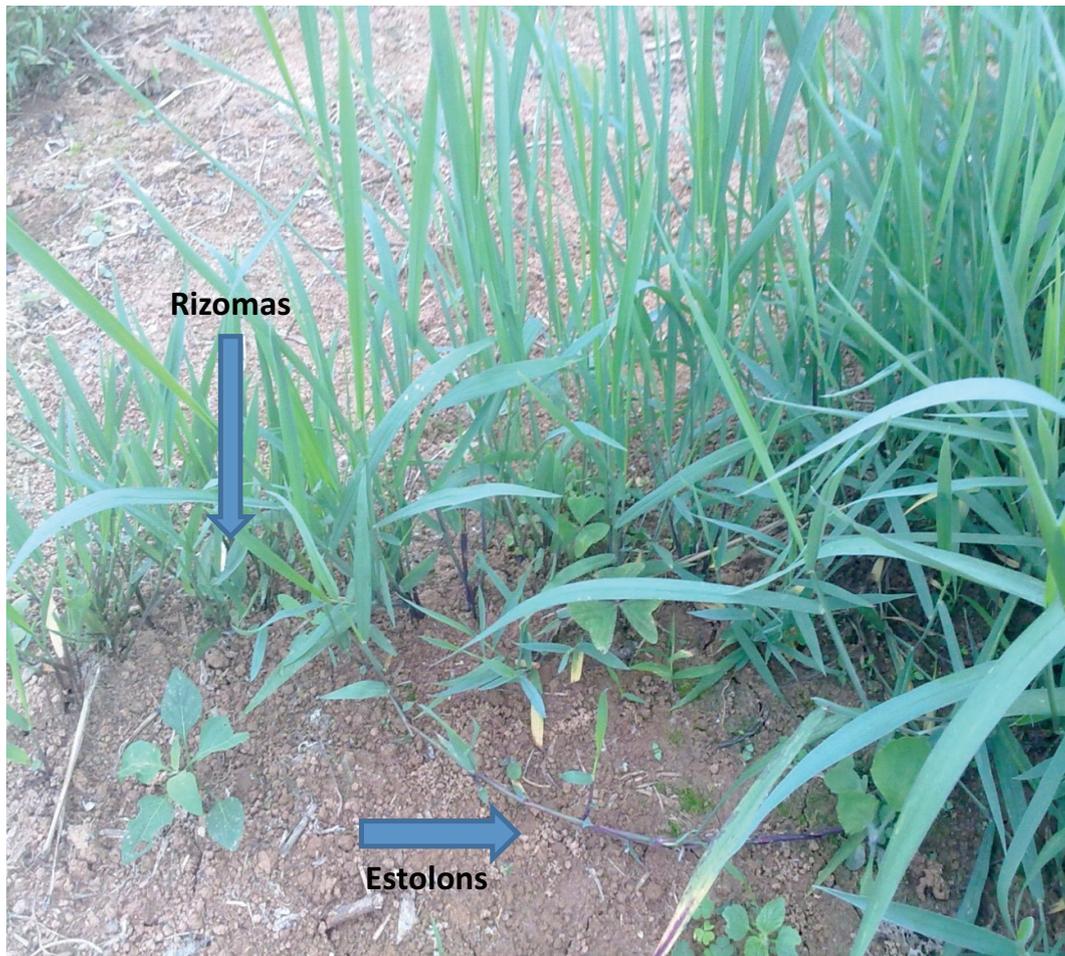


Figura 1. Grama Bermuda: Presença de rizomas e estolons.



Figura 2. Grama Estrela: apenas presença de estolons.

Entretanto a enorme variabilidade encontrada dentro do gênero é devido a reprodução sexual. A capacidade de reprodução sexual das plantas varia de nenhuma a elevada. Em geral, a capacidade reprodutiva via sementes é

baixa, mas várias plantas tem a capacidade de produção de sementes permitindo a recombinação e segregação genética (WU e TALIAFERRO, 2009).

Nas Gramas Bermudas há vários relatos na literatura de auto-incompatibilidade reprodutiva, o que favorece o cruzamento entre plantas diferentes (TALIAFERRO e LAMLE, 1997). A autofecundação das sementes variam de 0.5 à 3.0% (TALIAFERRO et al., 2004). A polinização cruzada apresenta elevada variação nas Gramas Bermudas, variando de extremamente baixa até aquelas com elevada produção de sementes (WU et al., 2006). A produção de sementes nas Gramas Bermudas é um caráter quantitativo muito afetado pelas condições do ambiente e pela interação genótipos por ambientes (WU e TALIAFERRO, 2009).

7.4.2. Gramas Estrelas

As Gramas Estrelas são constituídas pelas espécies *C. nlemfuensis*, *C. aethiopicus* e *C. plectostachyus* e são caracterizadas por apresentarem apenas estolons. As Gramas Estrelas apresentam como o centro de origem o Leste e o Centro da África, Clayton e Harlan (1970). As Gramas Estrelas apresentam menor importância do que as Gramas Bermudas nos EUA. É uma espécie tropical e subtropical, talvez devido a esse fato sua importância seja menor nos EUA do que em países tropicais.

As plantas do grupo das Gramas Estrelas são geralmente mais robustas e com folhas maiores que as das Bermudas. Na média, são plantas maiores e, em crescimento livre, podem chegar a 2 m de altura em condições extremas Taliaferro et al., (2004). As Gramas Estrelas normalmente produzem estolons vigorosos que podem atingir mais de 10 m de comprimento Harlan (1970), citado por Pedreira (2010).

Pedreira (2010) comenta que diversos cultivares comerciais de Grama Estrela têm sido descrito na literatura. Não raramente, a mesma planta é descrita sob denominações diversas, fenômeno que pode ser atribuído, entre outras causas, à coordenação menos que perfeita de esforços de pesquisa de equipes diferentes atuando em localidades distintas, além da frequente incerteza sobre qual o genótipo que realmente se tem na no campo ou na estação experimental. Esta situação faz com que um novo nome comercial seja atribuído a uma forrageira previamente "batizada" e já sendo até comercializada com outro nome.

Andrade et al. (2009) realizaram um estudo no Acre para diferenciar os três tipos de Gramas Estrelas utilizadas no estado. Foram avaliados caracteres morfológicos e realizadas avaliações multivariadas para distingui-las. Os autores observaram que a Grama Estrela Branca é facilmente distinguível das outras duas, porém as análises multivariadas não conseguiram separar a Grama Estrela Roxa da Grama Estrela Porto Rico, sugerindo que as duas cultivares possam ser o mesmo genótipo com nomes diferentes.

Essa hipótese ganha força se considerarmos que a Grama Estrela foi introduzida de Porto Rico entre as décadas de 1960 e 1970 por fazendeiros e não passaram por avaliações de institutos de pesquisas, podendo ter sido introduzidas em regiões diferentes recebendo nomes distintos e depois sendo disseminadas para outras regiões.

O Estado do Acre, através de trabalhos realizados pela Embrapa em parceria com produtores, vem desenvolvendo pesquisas na implantação de pastagens para bovinos, como alternativa para a "morte" do Capim Braquiarião. Há propriedades que possuem cerca de 2.000 ha de Grama Estrela Roxa e os resultados mostram que essa espécie é uma alternativa em relação a outras forrageiras, mesmo com sua susceptibilidade a cigarrinha das pastagens (ANDRADE et al., 2009). A Grama Estrela Roxa foi avaliada com outras forrageiras, como alternativa de pastagem e apresentando resultados que satisfizeram os produtores (VALENTIM et al., 2004).

Harlan e de Wet (1969), citados por Pedreira (2010), Wu & Taliaferro (2009), Taliaferro et al. (2004) descrevem três raças na variedade *dactylon*. A primeira raça é descrita como Tropical e possuindo distribuição pan-tropical. As plantas apresentam estatura baixa (menor que 20 cm). A raça tropical é adaptada a solos ácidos, lixiviados e pobres, comuns nas áreas tropicais. Nos períodos da estação chuvosa e seca apresentam potencial produtivo em áreas de encharcamento e de seca.

A segunda raça é a Temperada, sendo similar em aparência com a Tropical, diferindo mais drasticamente em características de adaptabilidade. A raça temperada é tolerante as baixas temperaturas e é encontrada em

áreas de clima frio. As plantas temperadas apresentam um desenvolvimento maior que a raça tropical, porém são menos tolerantes as condições de encharcamento e de solos com baixo pH e fertilidade (WU E TALIAFERRO, 2009; TALIAFERRO et al., 2004).

A terceira raça é chamada de raça Selêucida. Apresenta esse nome devido seu centro de origem compreender desde o Paquistão até a Turquia, coincidindo com as fronteiras do Império Selêucida. As plantas são tolerantes a períodos frios, altas e frequentemente bem produtivas em solos férteis. As plantas selêucidas apresentam coloração azulada, vigorosas, com alguma pilosidade. (HARLAN et al., 1970) (Figuras 3 e 4).



Figura 3. Planta selêucida (Embrapa Gado de Leite).



Figura 4. Planta selêucida: rizomas "galopantes" (Embrapa Gado de Leite).

Pedreira (2010) comenta que os melhores exemplos da raça Selêucida são provenientes do Afeganistão, Irã, Iraque e Turquia. O vigor, a tolerância ao frio e a produtividade dessas plantas conferem melhores qualidades agrônômicas (pastejo e produção de feno) quando comparadas às raças Tropicais e Temperadas.

7.5. Programa de Melhoramento Genético do Gênero *Cynodon*

Recentemente, a Embrapa Gado de Leite, iniciou um programa de melhoramento genético do gênero *Cynodon*, buscando diversificar a opção de forrageiras para os produtores e desenvolvendo espécies adaptadas às condições edafoclimáticas nacionais.

O programa de melhoramento iniciado pela Embrapa Gado de Leite utiliza como estratégia de exploração da variabilidade existente utilizando a coleta de sementes de Grama Estrela Roxa (*C. nlemfuensis*) em pastagens e sementes de meios irmãos introduzidas no ILRI (*International Livestock Research Institute*) - Etiópia, além de acessos introduzidos do *United States Department of Agriculture* (USDA), com o objetivo de desenvolvimento de cultivares adaptadas as condições edafoclimáticas nacionais.

Quanto à produção de sementes de *C. nlemfuensis* os relatos na literatura mostram que a produção de sementes é baixa. Strickland (1976-1977) conseguiu obter sementes de apenas três acessos (SKERMAN e RIVEROS, 1990). Botrel (1983) comenta que apesar de florescer a produção de sementes viáveis é baixa. Andrade et al. (2009), comentam que embora haja produção de sementes viáveis nas Gramas Estrelas, a quantidade produzida é geralmente muito baixa, inviabilizando essa forma de propagação.

Porém nos trabalhos de melhoramento realizados na Embrapa Gado de Leite mostram que a germinação das sementes de *C. nlemfuensis* é bastante elevada, não corroborando com os autores citados anteriormente. Foram obtidos mais de 1.000 genótipos provenientes de coletas de sementes em pastagens de Grama Estrela Roxa para dar início ao programa de melhoramento. Essas plantas foram levadas para o campo e apresentavam variabilidade onde o melhoramento atuou. Alguns estudos iniciais permitiram que o programa iniciado pela Embrapa obtivesse resultados que norteassem as estratégias a serem utilizadas no programa.

As cigarrinhas das pastagens são insetos sugadores e constituem a principal praga das gramíneas forrageiras em toda a América Tropical. Este inseto-praga é representado por diferentes gêneros e espécies e no Brasil as espécies de cigarrinhas das pastagens de maior importância econômica são: *Deois flavopicta* (Stal), *Deois incompleta* (Walke), *Deois schach* (Fabricius), *Notozulia entreriana* (Berg) recentemente *Mahanarva* sp. (VALÉRIO, 2009).

Avalia-se que em média as cigarrinhas ocorrem em cerca de 10 milhões de hectares de gramíneas, provocando prejuízos variáveis entre 10 e 100 % (OLIVEIRA, 1997). Tem havido um grande esforço no sentido de se identificar gramíneas resistentes às cigarrinhas pelo mecanismo de antibiose.

Auad et al., (2012) avaliaram a resistência de 9 cultivares de *Cynodon* plantadas no Brasil quanto a resistência à cigarrinha das pastagens (*Notozulia entreliana*). Os melhores cultivares (Florona e Jiggs) na avaliação apresentaram 50% de sobrevivência de ninfas de cigarrinha e o pior (Gramma Estrela Branca) apresentou 76% de sobrevivência, porém, segundo padrão estabelecido por Cardona (1999), a porcentagem de ninfas para planta ser considerada resistente é abaixo de 30%. (Figura 5).

Dias (2015), avaliando a resistência a cigarrinha das pastagens (*M. spectabilis*) em 212 genótipos de *Cynodon* provenientes do ILRI-Etiópia utilizando o mecanismo de antibiose observou variação de 0 a 100% de sobrevivência de ninfas nos genótipos avaliados (Figura 6).

Outro problema que ocorre não só para cultivo de forrageiras, é a baixa fertilidade, acidez elevada e altas concentrações de alumínio tóxico, fatores que limitam o crescimento das plantas nos solos brasileiros.

Benites et al. (2013b), estimando alguns parâmetros genéticos de clones de *C. nlemfluensis* relacionadas à tolerância ao alumínio tóxico avaliaram 36 clones de *Cynodon* provenientes da introdução de progênies de meios irmãos do ILRI. Juntamente com os clones foram avaliadas as cultivares Tifton 85 e Grama Estrela

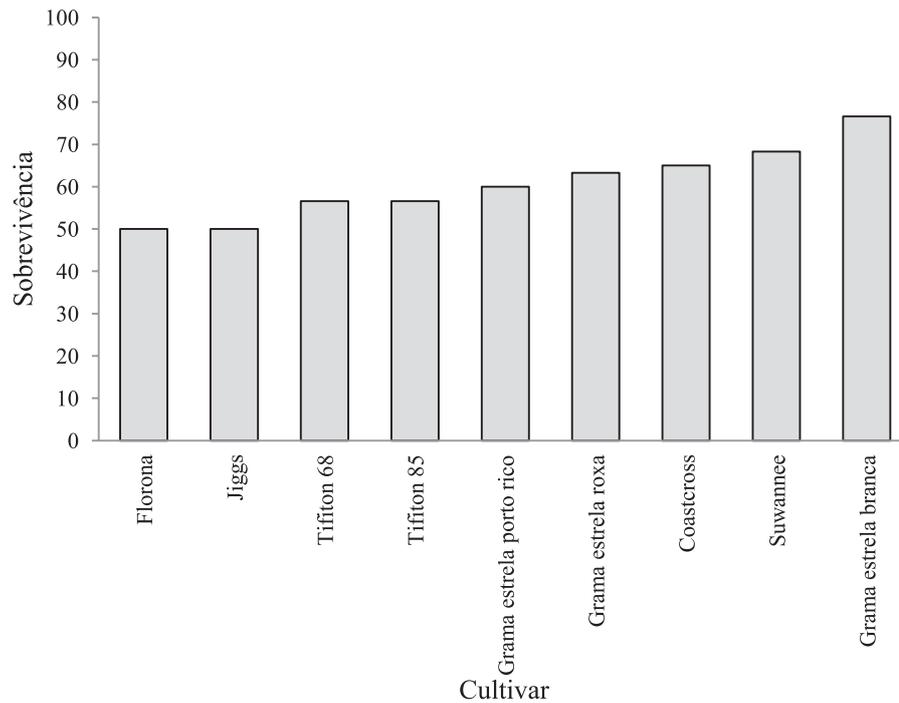


Figura 5. Avaliação de nove cultivares de *Cynodon* quanto à resistência a cigarrinha das pastagens *N. entripiana*.

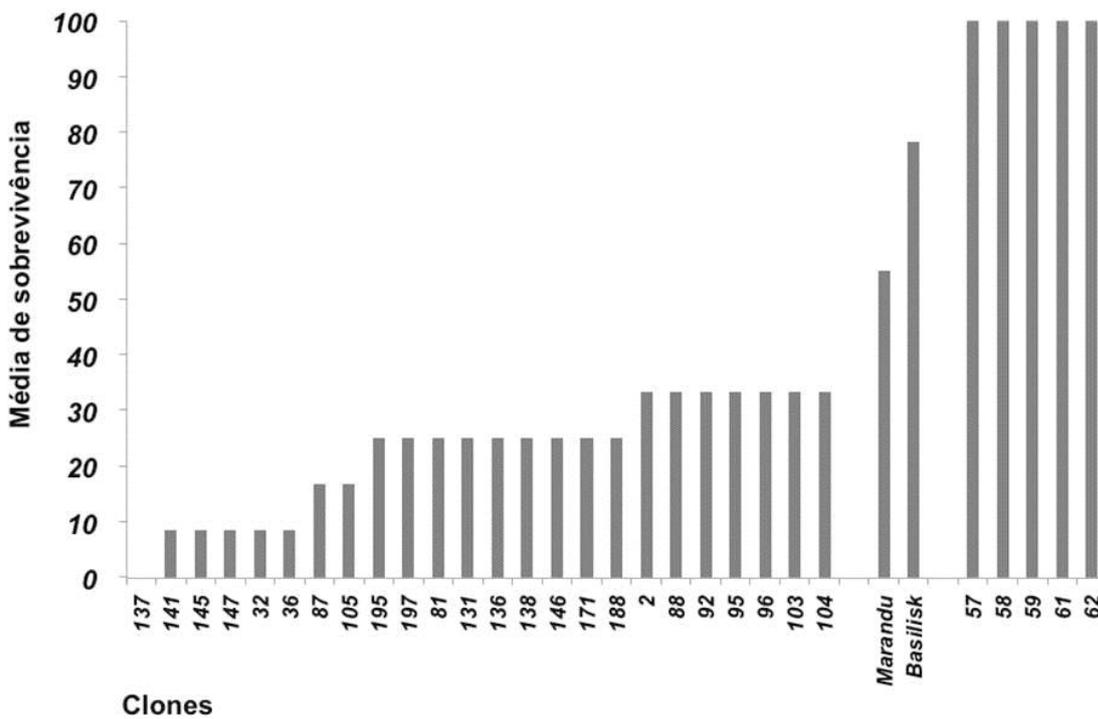


Figura 6. Média ajustada dos 17 clones selecionados, de sete clones com sobrevivência intermediária, das testemunhas resistente e susceptível e de cinco clones susceptível a *Mahanarva spectabilis*.

Roxa, em solução nutritiva contendo alumínio (30 mg/L). A análise de variância mostrou haver variabilidade genética para todas as características avaliadas. As estimativas de herdabilidade das cinco características avaliadas foram maiores que 86,71%.

Os valores elevados de alguns parâmetros genéticos encontrados no presente estudo mostram grande possibilidade de sucesso na seleção de clones tolerantes ao alumínio em solução nutritiva.

Rocha et al. (2013), analisando o comportamento de clones de *Cynodon nlemfluensis* cultivados em solução nutritiva contendo alumínio tóxico, avaliaram 36 clones. As características avaliadas foram a produção de biomassa do sistema radicular (g), o volume da raiz (cm³) e a mensuração do comprimento inicial e final

das raízes. Para as três características avaliadas, mostraram presença de variabilidade genética dentro desta espécie forrageira para a tolerância ao alumínio (Tabela 5).

Tabela 5. Dez melhores clones e cinco piores clones selecionados para as características massa verde de raiz (Massa Raiz- PV) cm, incremento de raiz (Iraiz) – cm e Volume de raiz (Vol) – mL, a média geral do experimento, a média dos 10 melhores clones e proporção CV_g/CV_e das características relacionadas a raiz.

Clone	Massa Raiz (g) PV	SK	Clone	Iraiz (cm)	SK	Clone	Vol (mL)	SK
10 Melhores clones em relação à tolerância ao alumínio								
28	42,23	a	16	42,50	a	17	27,07	a
17	26,60	b	17	40,00	a	38	24,17	a
7	25,76	b	14	35,77	a	7	18,40	b
38	19,12	c	11	34,33	a	21	17,87	b
31	17,77	c	20	29,50	b	26	17,37	b
18	15,81	c	26	28,33	b	30	17,33	b
30	15,67	c	31	27,67	b	23	16,97	b
21	15,57	c	4	27,33	b	31	16,70	b
32	15,29	c	17	25,67	b	10	16,60	b
1	15,21	c	8	24,00	b	27	14,63	c
Média Geral	12,34			18,49			11,35	
Média 10 melhores	20,90			31,51			18,17	
Média 10 piores	3,24			6,40			4,21	
CVg/Cve	1,61			1,81			1,87	

Em relação à produtividade de forragem, Benites et al. (2013a), avaliaram 29 clones de *C. nlemfuensis* no inverno. Houve diferença significativa entre a produção de matéria verde entre os clones. O clone 21 apresentou produtividade superior 46,23% e 13,81% em relação às cultivares Grama Estrela Roxa e o Tifton 85, respectivamente (Figura 7).

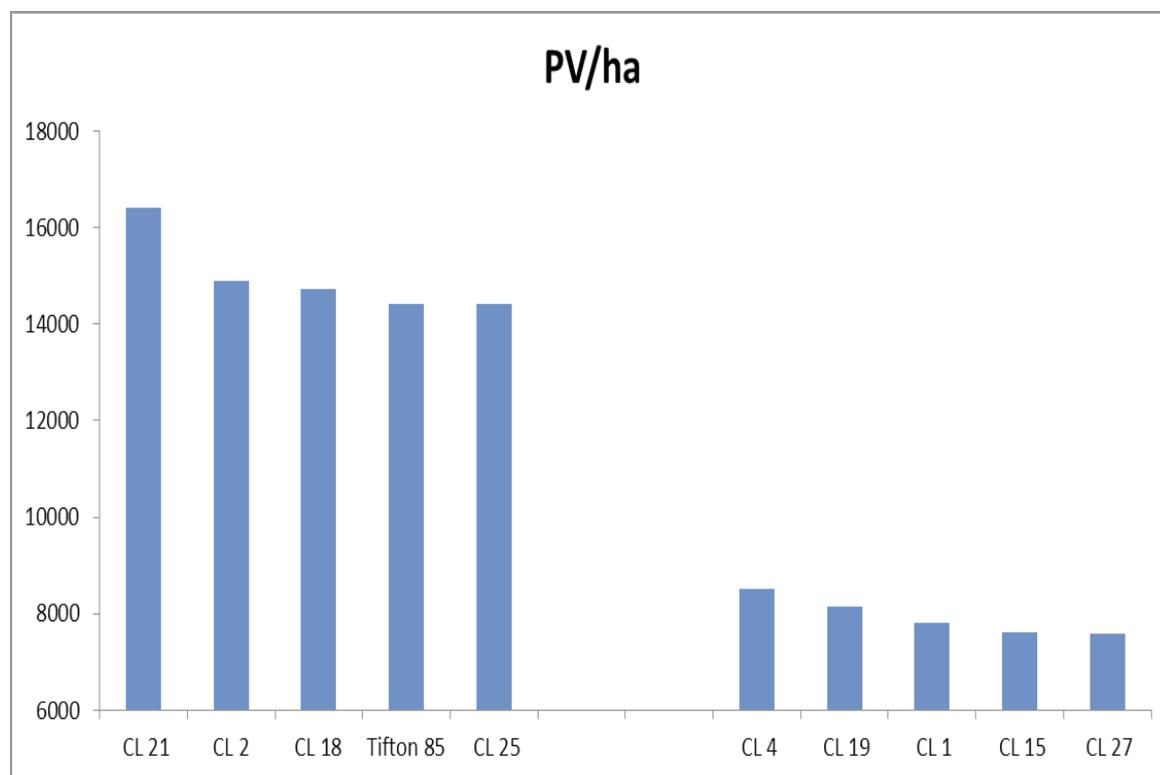


Figura 7. Resultado do primeiro corte que apresenta os cinco melhores e os cinco piores clones em relação a produção de matéria verde/ha em corte realizado no inverno, CESM, 2013.

Benites et al. (2015), avaliaram o potencial produtivo de 19 clones pertencentes a raça Selêucida em relação a Grama Estrela Roxa (Figura 8). Os clones da raça Selêucida mostraram-se superiores em relação à produtividade de matéria verde, demonstrando que essa raça tem um potencial muito grande para ser explorado

no programa de melhoramento. O que chama a atenção dessa raça é a relação folha colmo, que superou a cultivar Grama Estrela Roxa em mais de duas vezes essa relação.

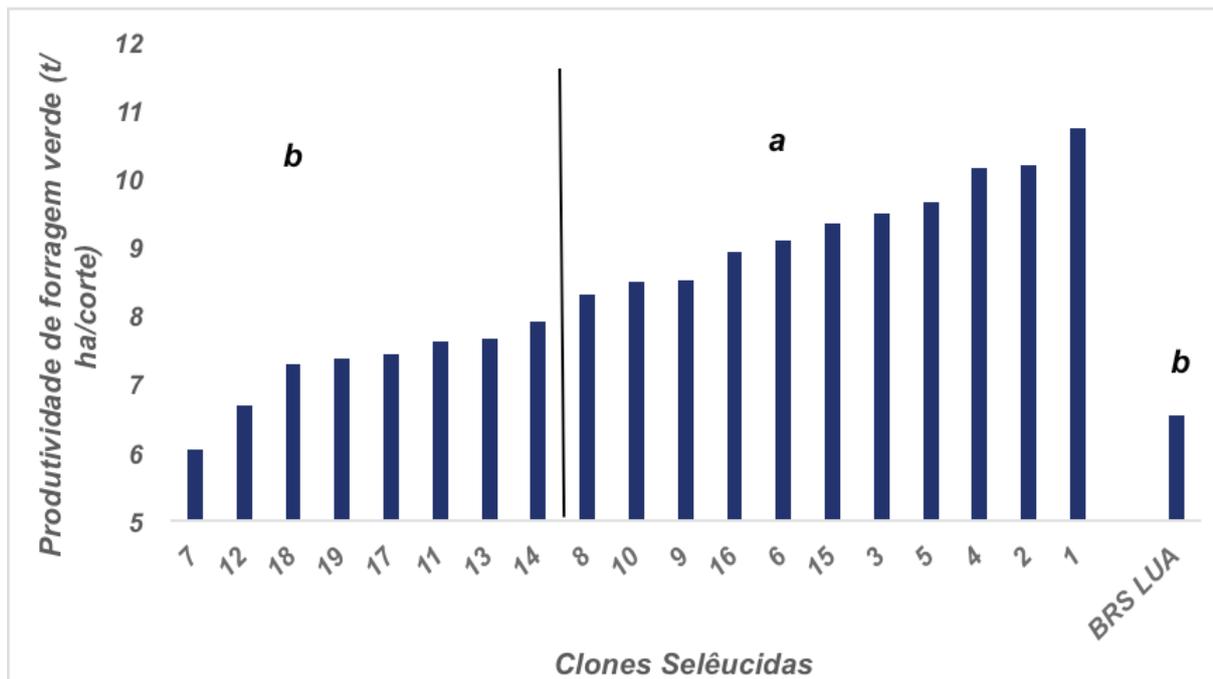


Figura 8. Produtividade de forragem de 19 clones da raça Selêucida. BRS Lúa (Gramma Estrela Roxa). Letras diferentes nas colunas evidenciam diferenças significativas ($F < 0,05$) entre as médias pelo teste de Scott-Knott (SK).

7.6. Contagens Cromossômicas e Quantidade de DNA de Acessos de *Cynodon*

Por meio da contagem cromossômica, da quantificação do DNA nuclear e da informação sobre o número básico de cromossomos do gênero ($x=9$) foi possível determinar a ploidia de oito acessos de *Cynodon* estudados (Tabela 4). O acesso EGL 6 (*Cynodon incompletus* var. *hirsutus*) apresentou $2n=2x=18$ e 1,17 pg de DNA nuclear, sendo a menor quantidade de DNA dentre os acessos avaliados. Um dos acessos, EGL 7 (*Cynodon* sp.), foi confirmado como triploide, com $2n=27$ e 1,63 pg de DNA. Os acessos EGL 1 (*Cynodon dactylon* var. *dactylon*), EGL 3 (*Cynodon transvaalensis*) EGL 4, EGL 14 e EGL 18 (*Cynodon* sp.) são tetraploides ($2n=4x=36$) com quantidade de DNA nuclear variando de 1,88 - 2,10 pg. Enquanto o acesso EGL 5 (*Cynodon dactylon* var. *polevansii*) apresenta o maior conteúdo de DNA nuclear ($2,55 \pm 0,098$ pg), sendo um acesso pentaploide ($2n=5x=54$).

Para os demais acessos, a partir da determinação do conteúdo de DNA, foram feitas inferências da ploidia, separando-os em três grupos: diploides: quatro acessos, todos *C. dactylon* var. *dactylon*; triploides: cinco acessos, todos *C. dactylon* var. *dactylon*; tetraploides: quatro tetraploides, também *C. dactylon* var. *dactylon* (Tabela 6) Entretanto, para certificação, essas informações serão confrontadas com as contagens cromossômicas.

Tabela 6. Número cromossômico, quantidade de DNA e ploidia proposta para acessos de *Cynodon*.

Código EGL	Espécie	Número cromossômico	Quantidade de DNA	Ploidia
EGL 1	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	36	1,88pg	Tetraploide
EGL 2	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,76pg	Triploide
EGL 3	<i>Cynodon transvaalensis</i>	36	1,95pg	Tetraploide
EGL 4	<i>Cynodon</i> sp.	36	1,90pg	Tetraploide
EGL 5	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>polevansii</i>	45	2,55pg	Pentaploide
EGL 6	<i>Cynodon incompletus</i> var. <i>hirsutus</i>	18	1,17pg	Diploide
EGL 7	<i>Cynodon</i> sp.	27	1,63pg	Triploide
EGL 8	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,4pg	Diploide
EGL 9	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,89pg	Tetraploide
EGL 10	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,82pg	Tetraploide
EGL 11	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,75pg	Triploide
EGL 12	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,82pg	Tetraploide
EGL 13	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,67pg	Triploide
EGL 14	<i>Cynodon</i> sp.	36	2,10pg	Tetraploide
EGL 15	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,66pg	Triploide
EGL 16	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,05pg	Diploide
EGL 17	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,72pg	Triploide
EGL 18	<i>Cynodon</i> sp.	36	2,02pg	Tetraploide
EGL 19	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,96pg	Tetraploide
EGL 20	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,46pg	Diploide
EGL 21	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	ND	1,57pg	Diploide

*ND – não determinado.

7.7. Referências

- AKSHITA DHALIWAL, R. S.; GUPTA, R. C. Cytological study on three cytotypes of bermuda grass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) from haryana and shivalik hills. **Journal of Basic and Applied Biology**, v. 5, p. 7-12, 2011.
- ALVIM, M. J., VILELA, D., CÓSER, A. C. I. Efeitos de dois níveis de concentrado sobre a produção de leite de vacas da raça holandesa em pastagem de coast-cross. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, 1996, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: SBZ, 1996. p. 172-173.
- ANDRADE, C. M. S.; ASSIS, G. M. L.; FAZOLIN, M.; GONÇALVES, R. C.; SALES, M. F. L.; VALENTIM, J. F.; ESTRELA, J. L. V. **Gramma Estrela Roxa: Gramínea forrageira para diversificação no Acre**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2009. 83 p.,
- AUAD, A. M. et al. Seleção de *Cynodon* spp. e *Brachiaria ruziziensis* resistentes a cigarrinha das pastagens. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., 2012, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: SBZ, 2012.
- AVDULOW, N. P. Karyosystematische unteruching der familie gramineen. **Bulletin of Applied Botany**, Genetics Supplement, 1931.
- BENITES, F. R. G.; SOUZA SOBRINHO, F.; ROCHA, W. S. D.; MARTINS, C. E.; FURTADO, L. S.; DIAS, B. P.; PINTO, L. M.; OLIVEIRA, F. R. Estimativa de alguns parâmetros genéticos para tolerância ao alumínio tóxico em *Cynodon nlemfuensis*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 12.; WORKSHOP DE POLÍTICAS PÚBLICAS, 12.; SIMPÓSIO DE SUSTENTABILIDADE DA ATIVIDADE LEITEIRA, 13., 2013, Porto Velho. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2013b. 4 p. 1 CD.
- BENITES, F. R. G.; SOUZA SOBRINHO, F.; ROCHA, W. S. D.; MARTINS, C. E.; LÉDO, F. J. S. Seleção de clones de *Cynodon* da raça Selêucida. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 13., 2015, Porto Alegre. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2015. 4 p. 1 CD.

- BOTREL, M. A. **Algumas considerações sobre gramíneas forrageiras e leguminosas**. Coronel Pacheco: Embrapa–CNPGL, 1983. 59 p. (Embrapa–CNPGL. Documentos, 9).
- BURTON, G. W. Breeding bermudagrass for the Southeast United States. **Agronomy Journal**, v. 24, p. 185–189, 1970.
- CARO, J. A.; SANCHEZ, E. Las especies de *Cynodon* (Gramineae) de la Republica Argentina. **Kurtziana**, v. 5, p. 191-252, 1969.
- CARO, J. A.; SANCHEZ, E. New American *Cynodon* spp. Gramineae. **Darwiniana**, v. 17, p. 510-526, 1972.
- CLAYTON, W. D.; HARLAN, J. R. The genus *Cynodon* L.C. Rich. in tropical Africa. **Kew Bull**, v. 24, p. 185–189, 1970.
- DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas of flowering plants**. New York: Macmillan, 1956.
- DIAS, B. P. **Avaliação de clones de *Cynodon* spp. quanto a resistência a cigarrinha das pastagens, *Mahanarva spectabilis***. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) – Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.
- FORBES, I. BURTON, G. W. Chromosome numbers and meiosis in some *Cynodon* species and hybrids. **Crop Sci**, v. 3, p. 75–79, 1963.
- HARLAN, J. *Cynodon* species and their value for grazing and hay. **Herbage Abstract**, v. 40, p. 233-238, 1970.
- HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. Sources of variation in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. **Crop Sci.**, v. 9, p. 774-778, 1969.
- HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J.; and RAWAL, K. M. Geographic distribution of the species of *Cynodon* L. C. Rich (Gramineae). **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 36, p. 220–226, 1970b.
- HARLAN, J.R.; DE WET, J.M.J.; HUFFINE, W.W; DEAKIN, J.R. A guide to the species of *Cynodon* (Gramineae). **Oklahoma Agricultural Experiment Station Bulletin B-673**. 1970a.
- HUNTER, W. S. A karyosystematic investigation in the Gramineae. **Canadian Journal of Research**, v. 11, p. 213-241, 1934.
- HURCOMBE, R. A cytological and morphological study of cultivated *Cynodon* species. **Journal of South African Botany**, v. 13, p. 107-116, 1947.
- MOFFETT, A. A.; HURCOMBE, R. Chromosome number of South African grasses. **Heredity**, v. 3, p. 369–373, 1949.
- OLIVEIRA, M. C. de. Pragas das pastagens: uma análise crítica. 1997. Disponível em: <http://forragicultura.com.br/arquivos/Pragas_de_pastagens.PDF>. Acesso em: 10 maio 2015.
- PEDREIRA, C. G. S. Gênero *Cynodon*. In: FONSECA, D. M.; MARTUSCELLO, J. A. **Plantas forrageiras**. Viçosa: UFV, 2010. p. 78-130.
- ROCHA, W. S. D.; BENITES, F. R. G.; MARTINS, C. E.; SOUZA SOBRINHO, F.; FERREIRA, R. A.; CARLOS, P. H. Q.; MOLITERNO, A. A. C.; GOMES, F. T. Avaliação de clones de *Cynodon nlemfluensis* quanto a tolerância ao alumínio tóxico em solução nutritiva. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 12.; WORKSHOP DE POLÍTICAS PÚBLICAS, 12.; SIMPÓSIO DE SUSTENTABILIDADE DA ATIVIDADE LEITEIRA, 13., 2013, Porto Velho. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2013, 4 p. 1 CD.

ROCHECOUSTE, E. Studies on the biotypes of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. I botanical investigations. **Weed Research**, v. 2, p. 1–23, 1962.

SILVA, P. H. A. U. de; SNAYDON, R. W. Chromosome number in *Cynodon dactylon* in relation to ecological conditions. **Annals of Botany**, v. 76, p. 535–537, 1995.

SKERMAN, P. J.; RIVEROS, F. **Tropical grasses**. Rome: FAO, 1990.

TALIAFERRO, C. M., ROUQUETTE, F. M. JR.; MISLEVY, P. Bermudagrass and stargrass. In: MOSER, L.; SOLLENBERGER, L.; BURSON, B. (Eds.). **Warm-Season (C4) Grasses**. Monograph No. 45, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, USA. 2004. p. 417-475.

TALIAFERRO, C. M.; Lamle, J. T. Cytological analysis of self-incompatibility in *Cynodon dactylon* (L.). Pers. Int. **Turfgrass Society Res J**, v. 8, p. 393–400, 1997.

THE PLANT LIST. 2015. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Cynodon>>. Acesso em: 28 maio 2015.

VALÉRIO, J. R. **Cigarrinhas das pastagens**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2009. 51 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 179).

VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S.; AMARAL, E. F. Soluções tecnológicas para o problema da morte de pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu na Amazônia. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE NEGÓCIOS DA PECUÁRIA, 2004, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: FAMATO, 2004. 1 CD-ROM.

VILELA, D. Potencial das pastagens de *Cynodon* na pecuária de leite. In: VILELA, D.; RESENDE, J. C.; LIMA, J (Ed.). **Cynodon: forrageiras que estão revolucionando a pecuária brasileira**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. p.165-176.

WU, Y. Q.; TALIAFERRO, C. M. Bermudagrass. In: SINGH, R. J. (Ed.). **Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Forage Crops**. CRC Press, 2009. v. 5., p. 229-273.

ZHI-YUN, G.; CHAO, X.; MING-LIANG, Z.; MIAO, W. Distribution of rDNA loci and genome differentiation in tetraploid *Cynodon*. **Indian J. Genet.**, v. 73, n. 4, p. 459-461, 2013.

Apoio

