

Documentos

ISSN 1983-974X
Setembro, 2007 **168**

A Biotecnologia nos Programas de Melhoramento de Forrageiras Tropicais da Embrapa Gado de Corte



Embrapa

ISSN 1983-974X
Setembro, 2007

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

Documentos 168

A Biotecnologia nos Programas de Melhoramento de Forrageiras Tropicais da Embrapa Gado de Corte

*Lucimara Chiari
Rosângela Maria Simeão Resende
Liana Jank
Cacilda Borges do Valle
Letícia Jungmann*

Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Rodovia BR 262, Km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS
Caixa Postal 154
Fone: (67) 3368 2083
Fax: (67) 3368 2180
<http://www.cnpgc.embrapa.br>
E-mail: publicacoes@cnpgc.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Cleber Oliveira Soares*

Secretário-Executivo: *Wilson Werner Koller*

Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima, Geraldo Augusto de Melo Filho, Gracia Maria Soares Rosinha, Lúcia Gatto, Manuel Antônio Chagas Jacinto, Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra, Tênisson Waldow de Souza, Wilson Werner Koller*

Supervisão editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisão de texto: *Lúcia Helena Paula do Canto*

Normalização bibliográfica: *Elane de Souza Salles*

Editoração eletrônica e Tratamento de ilustrações: *Ecila Carolina N. Z. Lima*

Foto da capa: *Arquivo Embrapa Gado de Corte*

1^a edição

1^a impressão (2007): 500 exemplares

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 Corte.

A biotecnologia nos programas de melhoramento de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte / Lucimara Chiari... [et al.]. -- Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2007.

33 p. ; 21 cm. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X ; 168).

Autores: Lucimara Chiari; Rosângela Maria Simeão Resende; Liana Jank; Cacilda Borges do Valle; Letícia Jungmann.

1. Pastagem. 2. Melhoramento genético vegetal. 3. Biotecnologia. 4. Forrageira tropical. 5. Gramínea. 6. Leguminosa. 7. Híbrido. 8. Marcador molecular. 9. RAPD. I. Chiari, Lucimara. II. Resende, Rosângela Maria Simeão. III. Jank, Liana. IV. Valle, Cacilda Borges do. V. Jungmann, Letícia. VI. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). VII. Série.

CDD 633.2 (21.ed.)

© Embrapa Gado de Corte 2007

Autores

Lucimara Chiari

Bióloga, D.Sc. em Genética e Melhoramento Vegetal, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, lchiari@cnpgc.embrapa.br

Rosângela Maria Simeão Resende

Bióloga, D.Sc. em Genética, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, rosangela@cnpgc.embrapa.br

Liana Jank

Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Melhoramento Vegetal, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, liana@cnpgc.embrapa.br

Cacilda Borges do Valle

Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Genética e Melhoramento Vegetal, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, cacilda@cnpgc.embrapa.br

Letícia Jungmann

Bióloga, M.Sc. em Genética e Biologia Molecular,
pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo
Grande, MS, jungmann@cnpq.embrapa.br

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	9
Introdução	10
Biotecnologia aplicada ao melhoramento de forrageiras tropicais	12
Marcadores moleculares	12
Caracterização molecular de germoplasma	13
Identificação de acessos e cultivares	15
Estimação de taxas de cruzamento	16
Identificação precoce de híbridos	18
Seleção assistida por marcadores moleculares	20
Mapeamento genético	21
Prospecção de genes com características econômicas	24
Considerações finais	25
Referências	27

A Biotecnologia nos Programas de Melhoramento de Forrageiras Tropicais da Embrapa Gado de Corte

Lucimara Chiari¹

Rosângela Maria Simeão Resende²

Liana Jank³

Cacilda Borges do Valle⁴

Letícia Jungmann⁵

Resumo

Neste trabalho procurou-se apresentar e discutir, de forma ampla, o uso da biotecnologia e seu potencial para os programas de melhoramento de forrageiras tropicais realizados na Embrapa Gado de Corte. O uso da biotecnologia nesses programas é uma atividade recente, mas importantes resultados vêm sendo gerados a fim de auxiliar o processo de obtenção de novas cultivares forrageiras. A maioria dos trabalhos apresentados utiliza marcadores Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) para aplicações em curto prazo: estudos de diversidade em acessos de bancos de germoplasma, identificação de híbridos e estimativa da taxa de cruzamento. Aplicações em médio e longo prazos do uso de marcadores, como mapeamento genético e seleção auxiliada por marcadores moleculares (SAMM), ainda necessitam de maiores investimentos, tanto na busca de novos marcadores, quanto no desenvolvimento de populações adequadas para esses estudos. Em 2007, teve início uma nova linha de pesquisa nessa unidade, a prospecção de genes com características econômicas. Genes para a tolerância ao alumínio são o foco dessa pesquisa que pretende explorar a sintenia entre os genomas de gramíneas, visando ao desenvolvimento de cultivares de braquiária mais tolerantes ao alumínio. A Embrapa Gado de Corte vem investindo em pessoal e aquisição de equipamentos para avançar não só na produção de cultivares de forrageiras mais

adaptadas às necessidades de um mercado cada vez mais exigente, como também no crescimento institucional do setor de biotecnologia.

Termos para indexação: diversidade genética, identificação de híbridos, marcadores moleculares, RAPD, taxa de cruzamento, busca de genes.

Biotechnology in the Tropical Forage Breeding Programs at Embrapa Beef Cattle

Abstract

Biotechnology and its potential use in tropical forage breeding programs developed at Embrapa Beef Cattle are widely presented and discussed in this paper. The use of biotechnology in these programs is a recent activity, but important results are being generated in order to speed up the process of developing new forage cultivars. Most studies presented, use Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) markers for short-term applications: diversity studies in accessions of the germplasm banks, identification of hybrids and to estimate crossing rates. Mid- or long-term applications of markers, as genetic mapping and molecular marker assisted selection (SAMM), still need larger investments, both in the search for new markers, as in the development of adequate populations for these studies. In 2007, a new research line began in the Center, the search for genes of economical characteristics. Genes for aluminum tolerance are the focus of this research, which intends to explore the synteny among grass genomes, aiming at the development of more aluminum tolerant Brachiaria cultivars. Embrapa Beef Cattle has been investing in the acquisition of personnel and equipment, to advance not only in the development of forage cultivars adapted to the needs of a more demanding market, as well as in the institutional growth of the biotechnology sector.

Index terms: genetic diversity, hybrid identification, molecular markers, RAPD, crossing rate, gene search.

Introdução

No Brasil, os sistemas de produção de carne e leite bovinos caracterizam-se pela dependência quase que exclusiva de pastagens. Esse fato resulta em vantagem comparativa para o mercado brasileiro por viabilizar custos de produção relativamente baixos, tornando o país o maior produtor mundial de carne bovina.

À exceção da região Sul, ou seja, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e sul do Paraná, as forrageiras predominantemente utilizadas são tropicais, destacando-se as cultivares dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum*.

Segundo Alves et al. (2007) existem no Brasil mais de 40 milhões de hectares de pastagens plantadas com gramíneas do gênero *Brachiaria*, dos quais aproximadamente 85% são ocupados por *B. brizantha* cv. Marandu e *B. decumbens* cv. Basilisk. Na região dos Cerrados, as pastagens ocupam aproximadamente 50 milhões de hectares, dos quais 65% são cultivados, e a maior parte é composta das espécies *B. decumbens*, *B. brizantha* e *B. humidicola* (SANO et al., 2000). Em regiões úmidas do Nordeste, da Amazônia e do Brasil Central, a pecuária tem utilizado principalmente pastagens de *B. humidicola*, seguidas da *B. decumbens* e *B. brizantha* (DIAS-FILHO, 2005). Nos solos férteis da região de Mata Atlântica, observa-se ainda a predominância de *P. maximum*, enquanto que nos solos menos férteis a maioria das pastagens cultivadas é formada por *B. humidicola*, *B. decumbens* e *B. brizantha* (PEREIRA et al., 1992).

Embora a diversidade de gêneros e espécies de forrageiras tropicais seja muito grande, o número de cultivares utilizadas nas pastagens é bastante restrito; poucas cultivares ocupam extensas áreas, o que torna as pastagens brasileiras bastante vulneráveis à ocorrência de pragas, doenças e mudanças climáticas, colocando em risco todo o sistema de produção de carne e leite bovinos. Como exemplo disso, cita-se a síndrome da morte de *B. brizantha* cv. Marandu na Amazônia Legal em 2006. Portanto, é imprescindível o desenvolvimento de novas cultivares de forrageiras visando, além do aumento de produtividade, a diversificação de pastagens.

Essa demanda por novas cultivares exige ações de pesquisa relacionadas à: potencialização do uso do germoplasma, ampliação da base genética por meio de cruzamentos e avaliação do potencial agronômico dos novos genótipos obtidos; as quais devem ser conduzidas para a sustentação e otimização do sistema produtivo.

O melhoramento genético de forrageiras tropicais realizado pela Embrapa Gado de Corte é relativamente recente, tendo início na década de 1980. No entanto, significativos progressos foram alcançados, a exemplo das cultivares lançadas de capim-marandu (1984), capim-tanzânia (1990), capim-mombaça (1993), capim-massai (2000), capim-xaraés (2003), capim-piatã (2006) e a leguminosa forrageira estilosantes-campo-grande (2000). Todas são produtos de seleção de acessos e/ou híbridos naturais mantidos em bancos de germoplasma.

Apesar desse imenso sucesso, a necessidade de se adequar a um mercado cada vez mais exigente e atender a demanda para diversificação das pastagens no Brasil, a biotecnologia está sendo incluída nos programas de melhoramento de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte como ferramentas auxiliares. Essas técnicas possibilitam, entre outras coisas, a caracterização genética dos germoplasmas disponíveis; a identificação precisa e precoce de híbridos; a micropropagação; o mapeamento genético; o seqüenciamento de genomas; a identificação e a caracterização de genes e/ou marcadores moleculares relacionados com características de importância agronômica; a geração de plantas geneticamente modificadas e outros (KUMAR, 1999).

O passo inicial da inclusão dessas técnicas foi o diagnóstico das principais limitações encontradas nas diferentes linhas de pesquisa desenvolvidas nos programas de melhoramento da Embrapa Gado de Corte. Posteriormente, metodologias apropriadas foram identificadas e novos investimentos têm sido feitos no desenvolvimento das estratégias de pesquisas consideradas prioritárias. Os principais avanços obtidos com essas novas tecnologias, bem como as demandas para o contínuo progresso desses programas, estão descritos nesta publicação.

Biotecnologia aplicada ao melhoramento de forrageiras tropicais

Marcadores moleculares

Marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular que pode ser oriundo de um gene expresso (marcadores bioquímicos), como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico do ácido desoxirribonucléico (DNA) (marcadores de DNA) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores bioquímicos foram bastante utilizados na década de 1970 para a caracterização da variabilidade genética de populações selvagens e cultivadas. No entanto, o reduzido número de locos acessados e a influência do tempo de desenvolvimento da planta para sua detecção limitam bastante a utilização de isoenzimas como marcadores. Os marcadores de DNA, por sua vez, apresentam uma gama ampla de locos e que são estáveis, isto é, não sofrem influências do meio ambiente (MALUF et al., 2001).

Os tipos mais comuns de marcadores de DNA são: Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) e microssatélites ou Simple Sequence Repeat (SSR). Todas essas metodologias são simples e envolvem reações de polimerização em cadeia (PCRs), o que permite uma amplificação rápida dos marcadores, facilitando sua identificação. As principais diferenças entre elas estão na capacidade de revelar polimorfismos e no custo de sua obtenção.

Nos programas de melhoramento de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte, o uso de alguns desses marcadores vem sendo implementado em um trabalho conjunto com a Universidade de Campinas (UNICAMP). Inicialmente, visando à caracterização molecular dos bancos de germoplasma, estimativa de taxas de cruzamento, identificação de híbridos e outros. Em uma segunda fase, pretendem-se avaliar as progêniens desenvolvidas pelos programas a fim de identificar marcadores específicos para características de interesse econômico, como resistência a insetos e fungos, digestibilidade e tolerância a solos ácidos.

Caracterização molecular de germoplasma

As gramíneas forrageiras tropicais dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum* pertencem à família Poaceae, originárias da África. Em geral, compreendem espécies apomíticas e poliplóides. Já as leguminosas forrageiras do gênero *Stylosanthes* pertencem à família Leguminosae, tendo como principal centro de origem as Américas Central e do Sul. Compreendem espécies diplóides e poliplóides que, em geral, possuem modo de reprodução misto.

A existência de um banco de germoplasma, ou seja, de uma coleção de genótipos de diferentes procedências, é fundamental para o estabelecimento de um programa de melhoramento (OLIVEIRA, 2006). A Embrapa Gado de Corte é detentora dos bancos ativos de germoplasma (BAGs) das principais forrageiras tropicais, *Brachiaria* spp., *Panicum maximum* e *Stylosanthes* spp., existentes no Brasil.

A utilização de marcadores moleculares para a caracterização desses BAGs é recente e se restringe aos marcadores do tipo RAPD, principalmente, por não necessitarem de conhecimento prévio do genoma que se deseja amplificar (WILLIAMS et al., 1990). Além disso, são de fácil execução, não necessitam de muitos equipamentos, apresentam elevado polimorfismo, necessidade de pequena quantidade de DNA, baixo custo quando comparado a outros marcadores moleculares, ausência de hibridação e de utilização de radioisótopos e o polimorfismo pode ser visualizado na forma de banda amplificada de DNA visível em gel de agarose corado com brometo de etídio (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Estudos utilizando marcadores RAPD para caracterização do BAG de *B. humidicola* (CHIARI et al., 2006a) e *B. dictyoneura* (ZORZATTO et al. 2007) evidenciaram o elevado número de locos, média de 10 e 7,9 por oligonucleotídeo iniciador, respectivamente. Dos locos amplificados 100% foram polimórficos em *B. humidicola* e 87% em *B. dictyoneura*. Em ambos os casos foram observados acessos muito similares entre si ($S > 0,9$) e acessos muito divergentes ($S < 0,25$), onde S é o valor de similaridade

genética calculado pelo coeficiente de Jaccard. E, os agrupamentos obtidos pelos métodos Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) e Tocher não mostraram relação com a origem desses acessos na África. Esses trabalhos demonstraram que existe diversidade genética nos BAGs dessas espécies, a qual pode ser explorada no programa de melhoramento genético do gênero.

Em *Stylosanthes*, estudos de variabilidade genética foram realizados em 19 acessos de *S. capitata* (PATRIARCHA-GRACIOLLI et al., 2005) e 20 acessos de *S. guianensis* (CHIARI et al., 2006b) utilizando a técnica de RAPD. A porcentagem de locos polimórficos detectada para essas espécies foi de 70,8% e 39,5%, respectivamente. Em ambas as espécies, a similaridade genética interacessos foi alta, variando de 0,69 a 0,88 em *S. capitata* e 0,75 a 0,96 em *S. guianensis*. Baixa variabilidade genética intraespecífica também foi relatada por Kazan et al. (1993) em *S. guianensis*, *S. scabra*, *S. hamata* e *S. humilis*, utilizando essa mesma técnica. Apesar da baixa diversidade observada nesses acessos de *S. guianensis* e *S. capitata* do BAG da Embrapa Gado de Corte, as análises de agrupamento dividiram esses acessos em quatro e dois grupos, respectivamente. Esse resultado pode orientar o melhorista na escolha dos acessos para realização de cruzamentos e seleção.

Com esse mesmo propósito, uma equipe da UNICAMP vem desenvolvendo bibliotecas de microssatélites para as principais espécies forrageiras dos programas de melhoramento da Embrapa Gado de Corte (JUNGMANN et al., 2005; SANTOS et al., 2006, SASSAKI et al., 2006; SANTOS et al., 2007; VIGNA et al., 2007), em um trabalho pioneiro que conta com financiamento do governo federal (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq) e dos governos dos Estados de São Paulo (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp) e de Mato Grosso do Sul (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência, e Tecnologia de Mato Grosso do Sul - Fundect).

Identificação de acessos e cultivares

Os marcadores moleculares, isoladamente ou em conjunto, podem ser utilizados para caracterizar e distinguir um genótipo de outro. Para tanto, diferentes genótipos devem apresentar padrões de bandas distintos, mantidos quando o procedimento for repetido ou quando o genótipo for cultivado em diferentes ambientes.

Nesse sentido, marcadores SSR e RAPD foram utilizados com o objetivo de confirmar a identidade de quatro genótipos (T46, T62, T72 e Milênio) de *P. maximum* provenientes do campo de multiplicação de sementes da Embrapa Gado de Corte, comparando seus perfis moleculares com os acessos de referências do campo de germoplasma. Os SSRs utilizados foram desenvolvidos pelo Japan International Research Center for Agricultural Sciences (Jircas) e gentilmente cedidos ao laboratório de biotecnologia vegetal da Embrapa Gado de Corte.

Os resultados mostraram que o acesso T72 do campo de germoplasma não correspondeu a nenhum dos genótipos do campo de multiplicação, enquanto os demais tiveram seu correspondente identificado. A similaridade genética entre o acesso T72 e seu correspondente foi 0,53, pela análise com RAPD e 0,32 pela análise com SSR. Esse fato demonstra uma possível contaminação no campo de multiplicação de sementes, uma planta invasora pode ter se desenvolvido no lugar do acesso T72.

Marcadores RAPD também foram utilizados para caracterização de quatro acessos que compõem a cultivar *S. guianensis* cv. BRS Bela e para estabelecer suas inter-relações com outros acessos de *S. guianensis* de variedades botânicas conhecidas (14 acessos da variedade *pauciflora*, 11 de *guianensis*, quatro de *canescens*, três de *microcephala*). A cultivar BRS Bela foi registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) (MAPA, 2007) e tem lançamento previsto para 2009.

Para esclarecimento, essa cultivar é composta de uma mistura física de sementes de quatro acessos de *S. guianensis* (GC1; GC2; GC3 e GC4). Os acessos GC1 e GC3 foram reintroduzidos das Filipinas e, possivelmente,

são híbridos artificiais, entretanto, sem dados completos de passaporte. O acesso GC4 foi selecionado a partir do acesso GC3 e o acesso GC2 (germplasma CIAT 2340) é originário da Colômbia, cidade de Casamare (CIAT, 2007). Esses acessos apresentam características morfológicas de mais de uma variedade botânica. *Stylosanthes guianensis* divide-se em quatro variedades botânicas: *guianensis*, *canescens*, *microcephala* e *pauciflora*.

Os resultados obtidos pela análise de dez oligonucleotídeos iniciadores indicaram que os acessos da cv. BRS Bela estão mais próximos taxonomicamente dos acessos da variedade botânica *guianensis*. Outro importante resultado é que entre os acessos estudados existe maior variabilidade genética entre os acessos da variedade botânica *guianensis*, em que a média de similaridade genética interacessos foi 0,46, seguida por *canensis* (0,62), depois *microcephala* (0,63) e por fim *pauciflora* (0,72). A técnica de RAPD mostrou-se um poderoso ferramental para auxiliar melhoristas na classificação de acessos de *S. guianensis* em variedades botânicas. O artigo completo está em fase de elaboração para publicação.

Estimação de taxas de cruzamento

A taxa de cruzamento, ou taxa de fecundação cruzada, de diferentes espécies vegetais varia de 0% a 100%. Aquelas que se reproduzem predominantemente por autofecundação (acima de 95%) são classificadas como autógamas e as que realizam autofecundação em freqüência abaixo de 5% são denominadas alógamas. As demais espécies são classificadas como mistas ou intermediárias. Seu conhecimento é determinante para a definição de estratégias de manutenção de seu germoplasma, produção de sementes e de melhoramento, nas estimativas de parâmetros genéticos, predição de valores genéticos dos indivíduos candidatos à seleção e dos tipos de cultivares a serem obtidas (VENCovsky et al., 2001).

Dentre os gêneros melhorados pela Embrapa Gado de Corte, essa informação é altamente relevante para espécies de *Stylosanthes*. Estudos realizados na Austrália com *S. scabra* (STACE, 1982) e na Colômbia com *S. capitata* e *S. guianensis* (MILES, 1983, 1985) indicam um sistema

reprodutivo misto nessas espécies. No entanto, ainda há poucas informações a respeito do modo de reprodução das espécies desse gênero no Brasil, onde essas espécies são nativas.

Nesse sentido, visando a estimar a taxa de cruzamento em *S. capitata* e *S. guianensis* para as condições do Brasil, onde essas espécies são nativas, 20 progênies foram colhidas em um experimento de avaliação de 35 acessos, com 1.260 plantas. Dez plantas de cada progénie tiveram seus DNAs extraídos e analisados com nove oligonucleotídeos iniciadores polimórficos de RAPD previamente selecionados nos genitores.

As taxas de cruzamento obtidas para essas duas espécies (68,1% para *S. capitata* e 38,6% *S. guianensis*) indicam um sistema misto de reprodução com maior taxa de fecundação cruzada do que a encontrada por Miles (1983, 1985), que avaliou duas épocas de plantio e encontrou uma média de 20% de alogamia em *S. capitata* e 13,8% em *S. guianensis*. As alterações nas taxas de cruzamento em diferentes populações de uma espécie podem ser explicadas por fatores como: alterações no comportamento e/ou na densidade de animais polinizadores e o marcador genético utilizado (MURAWSKI, 1995). Os marcadores RAPDs derivam, geralmente, de regiões não-codificantes do DNA e são neutros, enquanto os marcadores morfológicos, usados por Miles (1983, 1985), são derivados de regiões codificantes do DNA e, em geral, sofrem influência do ambiente e conferem algum valor adaptativo (SOUZA et al., 2003).

Diante desses resultados, foi identificada a necessidade de se explorar a variabilidade genética dentro de progênies e dentro de acessos dessas duas espécies para obter maiores ganhos com seleção em curto prazo e definir estratégias mais indicadas para o melhoramento dessas espécies; particularmente, na estimativa de parâmetros genéticos e na predição dos valores genéticos dos indivíduos candidatos à seleção. Além disso, a taxa de cruzamento deverá ser orientadora na conservação de germoplasma e em novas coletas, pois, espécies com sistema reprodutivo misto devem apresentar diversidade genética tanto entre populações quanto dentro de populações. Nesse sentido, é importante saber que quanto menor a taxa

de cruzamento natural, maior será a variabilidade interpopulacional (HAMRICK, 1990).

Identificação precoce de híbridos

O programa de melhoramento genético de *Brachiaria* via hibridação vem sendo realizado na Embrapa Gado de Corte desde 1988, envolvendo principalmente *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*: as duas primeiras, com uma maioria de acessos apomíticos e tetraplóides naturais e a última, caracterizada por sexualidade diplóide.

Recentemente, com a descoberta de um acesso sexual tetraplóide natural no BAG de *B. humidicola* (BOLDRINI et. al., 2006), a equipe de melhoramento da Embrapa Gado de Corte vem concentrando esforços na obtenção de populações de cruzamentos intra-específicos controlados em *B. humidicola* e desenvolveu uma população inédita em todo o mundo tropical.

Um entrave na continuidade desse processo está na identificação segura e precoce dos híbridos resultantes, uma vez que não se faz emasculação prévia aos cruzamentos e a identificação visual esbarra na necessidade de obtenção da planta adulta para avaliação das características morfológicas, que muitas vezes só é possível após o florescimento. Além disso, torna-se mais difícil quando os pais são fenotipicamente muito semelhantes, como é o caso de *B. humidicola*. Para avançar nesse programa, os marcadores moleculares representam um poderoso ferramental. Marcadores RAPDs, isoladamente ou em conjunto com outros marcadores, como SSR e AFLP, encontram-se entre os mais utilizados na identificação precisa e precoce de híbridos (OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2001; FALEIRO et al., 2003; SILVA et al., 2005; BASTIANEL et al., 2006).

Nesse contexto, tornou-se imprescindível ao programa a identificação de descritores moleculares, que, além de não serem influenciados pelo ambiente, permite a seleção precoce de híbridos, resultando em economia de tempo, custos e trabalho de campo.

Visando à identificação de híbridos, foi realizado um estudo com os principais genitores do programa de melhoramento de *Brachiaria* das quatro espécies mais utilizadas no programa (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. humidicola*). A seleção de oligonucleotídeos iniciadores baseou-se na presença de marcadores informativos (bandas de DNA amplificadas) nos genitores masculinos quando comparados aos genitores femininos, para que esses marcadores possam ser utilizados na análise de híbridos de primeira geração (ROCHA et al., 2006).

Dez oligonucleotídeos iniciadores foram selecionados para a identificação de híbridos em uma progênie de 345 plantas oriundas do cruzamento intraespecífico em *B. humidicola* entre a cv. BRS Tupi (apomíctica) e o acesso H31 (sexual) (CHIARI et al., 2007). Esse estudo demonstrou que aproximadamente 20% das plantas da progênie são resultantes de autofecundação, revelando que *B. humidicola* tolera endogamia quando esta é forçada em cruzamentos controlados.

As plantas determinadas como híbridas tiveram seu modo de reprodução avaliado por citoembriogenia (VALLE, 2007). Os híbridos apomíticos mais promissores serão candidatos a novas cultivares e os híbridos sexuais com melhor desempenho agronômico podem ser utilizados em novos cruzamentos.

O estudo do modo de reprodução dos híbridos de *B. humidicola*, assim como de outras espécies apomíticas, é, tradicionalmente, realizado pela análise da anatomia de sacos embrionários em microscopia de contraste de interferência. Para tanto, é necessário aguardar o florescimento, coletar as flores, extrair e clarificar os ovários, preparar e analisar as lâminas (YOUNG et al., 1979). Essa avaliação é um processo demorado e trabalhoso. A identificação de marcadores moleculares ligados à apomixia poderá facilitar muito esse processo, pois permitirá discriminar de forma precisa e precoce, ainda em estágio de plântula, plantas apomíticas, candidatas à cultivares, de plantas sexuais. Esse processo é denominado de seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM) ou, do inglês, *marker assisted selection* (MAS).

Seleção assistida por marcadores moleculares

A seleção assistida por marcadores moleculares visa a selecionar os indivíduos com base na presença do marcador molecular, sem que haja a necessidade de avaliar o fenótipo da característica. Para tanto, é necessária a detecção de marcadores moleculares ligados às características de interesse, qualitativas ou quantitativas. Logo, a SAMM representa uma forma de seleção indireta na qual o caráter indireto (o marcador molecular) apresenta herdabilidade próxima a 100%, uma vez que a seleção poderá ser conduzida independente do ambiente.

A utilização de marcadores moleculares para seleção é de grande impacto nos casos em que a característica de interesse é de difícil e/ou cara avaliação e, também, no caso de espécies perenes, de ciclo longo, quando houver necessidade de esperar alguns anos até que a característica fenotípica se expresse.

A apomixia é um tipo de reprodução assexuada que se caracteriza por originar embriões sem fertilização, portanto, geneticamente idênticos à planta-mãe (RICHARDS, 1997). Esse tipo de reprodução tem despertado interesse de vários grupos de pesquisa, por causa do seu potencial para revolucionar a produção agrícola, pois pode maximizar a produção por meio da fixação do vigor híbrido, evitando perdas por problemas de polinização e acelerando o processo de melhoramento (DALL'AGNOL; SCHIFINO-WITTMANN, 2005).

Para a transferência da apomixia por meio de cruzamentos são necessárias informações básicas, como a disponibilidade de recursos genéticos, número cromossômico dos doadores em potencial, homeologia genômica, fertilidade do pólen, tipo e grau de apomixia, características agronômicas e conhecimento prévio sobre a hibridação em questão. As tentativas de introduzir, por meio de cruzamentos, o(s) gene(s) da apomixia de espécies silvestres para espécies cultivadas não têm sido bem sucedidas até o momento, pois as plantas apomícticas obtidas têm cromossomos a mais e alto grau de aborto de sementes (SAVIDAN, 2001).

A possibilidade de se transferir a apomixia entre plantas usando técnicas de biologia molecular requer, antes de tudo, conhecimento da natureza dos genes envolvidos. Diferentes linhas de pesquisa estão sendo desenvolvidas para o conhecimento básico da reprodução, principalmente dos eventos de desenvolvimento do gametófito feminino e da fecundação.

Análises de populações segregantes em algumas culturas, derivadas de cruzamentos entre apomíticos e sexuais, têm ajudado a desvendar a transmissão genética da apomixia e a produzir mapas do loco apomítico (OZIAS-AKINS et al., 1993, 1998), baseado em marcadores moleculares. No entanto, a clonagem a partir desses mapeamentos ainda não foi obtida.

A análise de *bulks* segregantes, do inglês, *bulked segregant analysis* (BSA) usando RAPD, estratégia proposta por Michelmore et al. (1991), é uma ferramenta importante para identificar um potencial marcador quando a característica tem caráter monogênico e dominante. Esse parece ser o caso da apomixia em gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* que indica uma herança monogênica e dominante sobre a sexualidade (SAVIDAN 1982; VALLE et al. 1994; SHERWOOD et al. 1994). Dessa maneira, essa metodologia vem sendo empregada na população segregante de *B. humidicola*, recentemente obtida pela equipe de melhoramento da Embrapa Gado de Corte, com vistas a identificar marcadores RAPDs ligados à apomixia. Para tanto, o DNA dos híbridos, confirmados pela técnica de RAPD e analisados quanto ao modo de reprodução, foi utilizado para o preparo dos *bulks* apomíticos e *bulks* sexuais, constituídos por uma mistura equimolar de DNA de dez plantas por *bulk*. Marcadores RAPDs presentes apenas nos *bulks* apomíticos serão investigados em todos os indivíduos que constituem esses *bulks* e, também, os *bulks* sexuais, para estabelecer se há co-segregação do marcador com a apomixia. Marcadores RAPDs já foram identificados em populações de *Pennisetum* (OZIAS-AKINS et al., 1998) utilizando essa mesma metodologia.

Mapeamento genético

A existência de mapas genéticos de ligação saturados com marcadores moleculares consiste na base para estudos avançados de genética,

podendo possibilitar a identificação e o isolamento de genes, entendimento da herança, e estudos da estrutura, expressão e função desses genes (ROOSE et al., 2000).

Uma das aplicações mais importantes dos mapas genéticos é a localização de genes que controlam características de importância econômica, como produção de grãos e teor de proteína, que resultam da ação de um conjunto de genes. Essas características são denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa, e os locos que as controlam são chamados de *Quantitative Trait Loci* (QTL) (TANKSLEY, 1993).

Procedimentos como a localização e o mapeamento de QTL, estudos de sintenia e clonagem de genes com base em mapas genéticos passaram a representar complementos importantes a serem considerados em programas de melhoramento das mais variadas espécies vegetais (LEE, 1995).

O mapeamento de QTLs possibilita mensurar o número de locos quantitativos envolvidos na herança complexa, bem como suas localizações cromossômicas, modo de ação gênica (aditividade, dominância, heterose e epistasia), além de possibilitar a decomposição da interação de genótipos por ambientes de cada QTL (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A capacidade de detecção de um QTL é função da magnitude do seu efeito sobre a característica, do tamanho da população segregante avaliada, da freqüência de recombinação entre o marcador e o QTL, bem como da herdabilidade da característica (TANKSLEY, 1993).

Outra importante abordagem da utilização dos mapas é o mapeamento comparativo (*comparative mapping* ou *synteny mapping*). A comparação das estruturas genômicas de diferentes espécies, do ponto de vista de homologia de genes, conservação de distâncias e da ordem de ligação nos cromossomos contribui para o entendimento sobre a evolução dos genomas (KELLER; FEUILLET, 2000). O mapeamento comparativo é também uma estratégia para obtenção de mapa único de referência para a maioria das espécies vegetais cultivadas (SEWELL et al., 1999), pelo menos de famílias taxonômicas.

Por fim, a clonagem de genes com base em mapas genéticos (*map-based cloning* e *positional cloning*) constitui a mais audaciosa aplicação dos mapas genéticos. Nessa abordagem, o efeito fenotípico do gene é verificado anteriormente avaliando-se a característica de interesse na progênie, e sua posição cromossômica aproximada é determinada pelo mapeamento. Esse mapeamento detalhado, de alta resolução, consiste em identificar marcadores próximos a um gene, sendo essa resolução dependente do número de marcadores e da disponibilidade de grande número de indivíduos na progênie, o que aumenta a probabilidade de se encontrarem eventos de recombinação no segmento de interesse (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Para o planejamento de um programa de mapeamento genético, alguns requisitos são fundamentais, destacando-se: a) escolha de genitores com comportamento fenotípico contrastante em relação à característica a ser mapeada; b) cruzamentos controlados entre os genitores com produção de uma progênie com eventos meióticos representativos; e c) disponibilidade de técnicas para a obtenção de centenas de marcadores com comportamento mendeliano (OLIVEIRA, 2001).

O programa de melhoramento de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Corte desenvolveu várias populações de cruzamentos controlados interespecíficos (*B. brizantha* X *B. ruziziensis* e *B. decumbens* X *B. ruziziensis*) e, recentemente, intra-específicos em *B. humidicola*. Sabe-se que os genitores contrastam para várias características de interesse econômico, como exemplo, a tolerância ao alumínio tóxico, que segregou de acordo com as proporções esperadas pelas leis de Mendel (BUITRAGO et al., 2003) e, portanto, pode ser utilizada para a construção de mapas de ligação.

No momento, projetos estão sendo propostos para captação de recursos, além disso, marcadores microssatélites estão sendo desenvolvidos para essas espécies, como já mencionado.

Prospecção de genes com características econômicas

A prospecção de genes é um dos desafios atuais da ciência. Baseia-se em estratégias para identificação e isolamento de genes que conferem características de interesse econômico. Embora tenha avançado bastante nos últimos anos, ainda constitui uma área a ser explorada, principalmente em espécies pouco estudadas, como o caso da maioria das forrageiras.

A estratégia que vem sendo mais adotada para a prospecção de genes inicia com a construção de uma ou mais bibliotecas de cDNA. Posteriormente, é realizada uma busca de seqüências por homologia, dos genes de interesse, em bancos de dados públicos. Em seguida, das seqüências selecionadas (DNA, cDNA ou proteínas), regiões, ou domínios conservados, são identificadas por alinhamento múltiplo e, de posse dessa informação, oligonucleotídeos iniciadores específicos são desenhados para triagem das bibliotecas de cDNA, analisadas para a localização de um ou mais genes de interesse, utilizando sondas marcadas ou estratégias de amplificação por PCR. O espetacular avanço da bioinformática nos últimos tempos, aliado à crescente capacidade computacional e velocidade de acesso à Internet, tem facilitado a realização dessas análises.

Em contraste com os estudos de prospecção de genes já desenvolvidos para grandes culturas, poucos avanços foram alcançados para forrageiras. No entanto, a comparação de mapas genéticos obtidos para gramíneas demonstra que os genomas nesse grupo vegetal apresentam alto grau de conservação, ou seja, de sintenia (AHN et al., 1993; DEVOS et al., 1993; SHERMAN et al., 1995; SAGHAI-MAROOOF et al., 1996). Desse modo, as espécies de gramíneas têm sido consideradas como um sistema genético único (BENNETZEN; FREELING, 1997), o que significa que informações geradas para gramíneas cultivadas extensamente estudadas, como arroz, trigo, milho, cana-de-açúcar, podem servir de base para o estudo de espécies forrageiras.

É explorando essa sintenia que vem sendo desenvolvido um trabalho de prospecção de genes para tolerância ao alumínio (Al) em *Brachiaria* na

Embrapa Gado de Corte, com a parceria de outras unidades da Embrapa e da Unicamp.

Uma extensa pesquisa foi realizada em dois bancos de dados públicos GenBank/NCBI – National Center for Biotechnology Information¹ e Gramene – A Comparative Mapping Resource for Grains², buscando genes de tolerância ao Al identificados em outras gramíneas, como trigo, milho e arroz. Genes induzidos por Al em trigo, milho e arroz que codificam para proteínas transportadoras de ácidos orgânicos (relacionados com mecanismos de tolerância ao Al) foram identificados, as seqüências foram alinhadas para identificar as regiões conservadas e oligonucleotídeos iniciadores ortólogos foram desenhados nessas regiões.

Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados serão utilizados para triagem de bibliotecas de expressão, utilizando a PCR, que tem se mostrado uma ferramenta muito eficiente na identificação e no isolamento de clones de interesse (ISRAEL, 1993; ALFANDARI; DARRIBERE, 1994; MUNROE et al., 1995).

Uma vez identificados e isolados, os genes podem ser clonados e transferidos para cultivares comerciais ou acessos elite por meio da transformação genética, superando as barreiras biológicas, especialmente por causa da natureza apomítica da maioria dos acessos de *Brachiaria* e de *P. maximum*, dispensando a necessidade de cruzamentos.

Considerações finais

De modo geral, pode-se considerar que a utilização da biotecnologia nos programas de melhoramento de forrageiras da Embrapa Gado de Corte é uma atividade bastante recente e, portanto, ainda há poucos resultados e muito a ser explorado.

¹ Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

² Disponível em: <http://www.gramene.org>

A maioria dos trabalhos realizados utiliza marcadores RAPD para aplicações em curto prazo: estudos de diversidade em acessos de bancos de germoplasma, identificação de híbridos e estimativa da taxa de cruzamento. Aplicações em médio e longo prazos do uso de marcadores, como mapeamento genético e SAMM, ainda necessitam de mais investimentos, tanto na busca de novos marcadores, quanto no desenvolvimento de populações adequadas para esses estudos. Nesse sentido, marcadores SSRs estão sendo desenvolvidos pela Unicamp em parceria com a Embrapa Gado de Corte, e, em um futuro próximo, pretendem-se avaliar progêneres desenvolvidas pelos programas na tentativa de identificar marcadores específicos para características agronômicas desejadas.

Ainda mais recente são as pesquisas na área de prospecção de genes com características econômicas, iniciadas em 2007, com a parceria de outras unidades da Embrapa e da Unicamp. Genes para a tolerância ao alumínio são o foco da pesquisa que pretende explorar a sintenia entre os genomas de gramíneas, visando a encontrar alelos interespecíficos (genes ortólogos) em *Brachiaria*, considerando as gramíneas como um sistema genético integrado. Depois de identificados, esses genes podem ser utilizados no melhoramento assistido, visando ao desenvolvimento de cultivares de braquiária mais tolerantes ao alumínio. Além disso, podem ser transferidos para cultivares comerciais ou acessos elite por meio da transformação genética, dispensando a realização de cruzamentos e avaliação de numerosas progêneres.

Para dar continuidade e, efetivamente, avançar no uso da biotecnologia nos Programas de Melhoramento de Forrageiras, a Embrapa Gado de Corte vem investindo na aquisição de equipamentos para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal, na contratação de pessoal especializado e na capacitação de recursos humanos, pelo treinamento de estagiários e técnicos para a realização das pesquisas.

Assim, espera-se que tais avanços representem não só a produção de cultivares de forrageiras mais adaptadas às necessidades de um mercado cada vez mais exigente, como também o crescimento institucional do setor de biotecnologia.

Referências

- AHN, S.; ANDERSON, J. A.; SORRELLS, M. E.; TANKSLEY, S. D. Homoeologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 241, n. 5-6, p. 483-490, Dec. 1993.
- ALFANDARI, D.; DARRIBERE, T. A simple PCR method for screening cDNA libraries. **Genome Research**, Woodbury, NY, v. 4, p. 46-49, 1994.
- ALVES, S. J.; MORAES, A. de; CANTO, M. W. do; SANDINI, I. Espécies forrageiras recomendadas para produção animal. Disponível em: <<http://www.fundepec.org.br/tev/palestras/palestra10.doc>> Acesso em: 1 fev. 2007.
- BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A. C. de; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor 'Murtcott' avaliada por fAFLP e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 5, p. 779-784, Maio 2006.
- BENNETZEN, J. L.; FREELING, M. The unified grass genome: synergy in synteny. **Genome Research**, Woodbury, NY, v. 7, p. 301-306, Apr. 1997. Issue 4.
- BOLDRINI, K. R.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 85, n. 3, p. 225-228, Dec. 2006.
- BUITRAGO, M. E.; RECIO, M. E.; CHAVES, A. L.; WENZL, P.; TOHME, J.; MILES, J. W.; RAO, I. M. Evaluating physiological components of acid soil adaptation in a population of *Brachiaria ruziziensis* x *Brachiaria decumbens* hybrids. **Annual Report of Biotechnology Research Project**. CIAT, Cali, Colombia, p. 253-255, 2003.
- CHIARI, L.; SALGADO, L. R.; VALLE, C. B. do; CANÇADO, L. J.; VALLE, J. V. R. do; LEGUIZAMON, G. O. de C. Estimativa da variabilidade genética em acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando marcadores RAPD. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Produção animal em biomas tropicais: anais**. João Pessoa: SBZ: UFPB, 2006a. 4 p. 1 CD-ROM.
- CHIARI, L.; VALLE, J. V. R. do; RESENDE, R. M. S.; CANÇADO, L. J.; LEGUIZAMON, G. O. de C.; SALGADO, L. R. Variabilidade genética em acessos de *Stylosanthes guianensis* utilizando marcadores RAPD. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Produção animal em biomas tropicais: anais**. João Pessoa: SBZ: UFPB, 2006b. 4 p. 1 CD-ROM.

CHIARI, L.; BITENCOURT, G. de A.; SALGADO, L. R.; LEGUIZAMON, G. O. C. Identificação precoce de híbridos de *Brachiaria humidicola* por marcadores moleculares. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS, 1., 2007, Campo Grande, MS. **Palestras-resumos [do]...** Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2007. 3 p. 1 CD-ROM.

CIAT. **International Center for Tropical Agriculture.** Disponível em: <<http://www.ciat.cgiar.org>>. Acesso em: 14 ago. 2007.

DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 2, p. 127-133, abr. jun. 2005.

DEVOS, K. M.; MILLAN, T.; GALE, M. D. Comparative RFLP maps of the homoeologous group-2 chromosomes of wheat, rye and barley. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 6-7, p. 784-792, Feb. 1993.

DIAS-FILHO, M. B. Opções forrageiras para áreas sujeitas a inundação ou alagamento temporário. In: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO DE PASTAGEM, 22., 2005, Piracicaba. **Teoria e prática da produção animal em pastagens: anais**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 71-93.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotrópica**, Ilhéus, v. 15, n. 1, p. 41-46, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20).

HAMRICK, J. L. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. (Ed.). **Isozymes in plant biology**. London: Chapman & Hall, 1990. p. 87-105.

ISRAEL, D. I. A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 11, p. 2627-2631, June 1993.

JUNGMANN, L; VALLE, C. B. do; LABORDA, P R; RESENDE, R M S; JANK, L;
SOUZA, A. P. Construction of microsatellite-enriched libraries for tropical forage
species and characterization of the repetitive sequences found in *Brachiaria brizantha*.
In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE MOLECULAR BREEDING OF FORAGE AND
TURF, 4., Aberystwyth. **Genetic improvement of grasses and other forage crops:**
[proceedings]. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2005. p. 128.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; CAMERON, D. F. Genetic variation in agronomically
important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic
DNA markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 6-7, p. 882-888,
Feb. 1993.

KELLER, B.; FEUILLET, C. Colinearity and gene density in grass genomes. **Trends in
Plant Science**, London, v. 5, p. 246-251, June 2000. Issue 6.

KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology
Advances**, Oxford, v. 17, p. 143-182, Sept. 1999. Issues 2-3.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, San
Diego, v.55, p.265-344, 1995.

MALUF, M. P.; GUERREIRO FILHO, O.; FAZUOLI, L. C. Biotecnologia: aporte
tecnológico ao melhoramento do cafeeiro no IAC. **O Agronômico**, Campinas, v. 53, n.
2, p. 5-7, 2001. Série Técnica Apta.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 21 jul. 2007.

MICHELMORE, R. W., PARAN, I.; KESSELLI, R. V. Identification of markers linked to
disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect
markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of
the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC,
v. 88, n. 21, p. 9828-9832, Nov. 1991.

MILES, J. W. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of
outcrossing rate in *Stylosanthes guianensis*. **Australian Journal of Agricultural
Research**, Victoria, v. 36, n. 2, p. 259-265, Feb. 1985.

MILES, J. W. Natural outcrossing in *Stylosanthes capitata*. **Tropical Grasslands**,
Queensland, v. 17, n. 3, p. 114-117, Sept. 1983.

A biotecnologia nos programas de melhoramento de forrageiras tropicais da
Embrapa Gado de Corte

MUNROE, D. J; LOEBBERT, R; BRIC, E. et al. Systematic screening of an arrayed cDNA library by PCR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 92, n. 6, p. 2209 - 2213. Mar. 1995

MURAWSKI, D. A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from canopy perspective. In: LOWMAN, M. D.; NADKARNI, N. M. (Ed.). **Forest canopies**. New York: Academic Press. 1995. p. 457-493.

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MACHADO, M. A. Diversidade genética entre híbridos de tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 4, p. 479-484, Abr. 2002.

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 477-481, Dez. 2001.

OLIVEIRA, R. P. de. Biotecnologia em citros. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 36 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 160).

OZIAS-AKINS, P.; LUBBERS, E. L.; HANNA, W.; MCNAY, J. W. Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 5, p. 632-638, Jan. 1993.

OZIAS-AKINS, P.; ROCHE, D.; HANNA, W. W. Tight clustering and hemizigosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apomixis by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 95, n. 9, p. 5127-5132, Apr. 1998.

PATRIARCHA-GRACIOLLI, S. R.; CHIARI, L.; JUNGMANN, L.; RESENDE, R. M. S.; LAURA, A. L. C.; LEGUIZAMÓN, G. O. C. Análise da variabilidade genética em *Stylosanthes capitata* por meio de marcadores RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Resumos...** Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2005. p. 649. 1 CD-ROM.

PEREIRA, J. M.; NASCIMENTO, JUNIOR, D. do; CANTARUTTI, R. B.; REGAZZI, A. J. Consumo e ganho em peso de bovinos em pastagens de capim *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweickt., em monocultivo ou consorciado com leguminosas, submetidas a diferentes taxas de lotação. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 21, n. 1, p. 118-131, Jan-fev.1992.

RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems**. Londres: Chapman & Hall, 1997. 529 p.

ROCHA, M.; SALGADO, L. R.; VALLE, C. B.; DOURADO, D.; CHIARI, L. **Caracterização molecular de acessos de Brachiaria spp. usando RAPD**. 2006. 23 f. Monografia (Bacharelado em Ciência Biológicas) - Departamento de Biologia, Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, Campo Grande, MS.

ROOSE, M. L.; FENG, D.; CHENG, F. S.; TAYYAR, R. I.; FEDERICI, C. T.; KUPPER, R. S. Mapping the citrus genome. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 535, p. 25-32, 2000.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; YUE, Y. G.; XIANG, Z. X.; STROMBERG, E. L.; RUFERNR, G. K. Identification of quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot disease in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, n. 4, p. 539-546, Sept. 1996.

SANTOS, M. O.; SASSAKI, R. P.; JUNGMANN, L.; CHIARI, L.; RESENDE, R. M. S.; SOUZA, A. P. Desenvolvimento e caracterização de microssatélites em *Stylosanthes capitata*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 52., 2006, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2006. p. 1017. 1 CD-ROM.

SANTOS, M. O.; SASSAKI, R. P.; CHIARI, L.; RESENDE, R. M. S.; SOUZA, A. P. Seleção de microssatélites para estimar a taxa de cruzamento de acessos brasileiros de *Stylosanthes capitata*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 53., 2007, Águas de Lindóia. **Resumos...** Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2007. p. 120. 1 CD-ROM.

SANO, E. E.; BARCELLOS, A. O.; BEZERRA, H. S. Assessing the spatial distribution of cultivated pastures in the Brazilian savanna. **Pasturas Tropicales**, Cali, v. 22, n. 3, p. 2-15, Dic. 2000.

SASSAKI, R. P.; SANTOS, M. O.; JUNGMANN, L.; CHIARI, L.; RESENDE, R. M. S.; SOUZA, A. P. Desenvolvimento e caracterização de marcadores moleculares do tipo microssatélites em *Stylosanthes macrocephala*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 52., 2006, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2006. p. 1016. 1 CD-ROM.

SAVIDAN, Y. Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. **Travaux et Documents**, Paris, v. 153, p. 1-159, 1982.

SAVIDAN, Y.; CARMAN, J. G.; DRESSELHAUS, T. **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. El Batán: CIMMYT, 2001. 243 p.

SEWELL, M. M.; SHERMAN, B. K.; NEALE, D. B. A consensus map for Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.): I. Construction and integration of individual linkage maps from two outbred three-generation pedigrees. **Genetics**, Baltimore, v.151, p.321-330, Jan. 1999. Issue 1.

SHERMAN, J. D.; FENWICK, A. L.; NAMUTH, D. M.; LAPITAN, N. L. V. A barley RFLP map: alignment of the three barley maps and comparisons to gramineae species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 91, n. 4, p. 681-690, Sept. 1995.

SHERWOOD R. T.; BERG, C. C.; YOUNG, B. A. Inheritance of apospory in Buffelgrass. **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 1490-1494, Nov.-Dec. 1994. Issue 6.

SILVA, M. P.; AMARAL, Jr. A. T.; PEREIRA, M. G.; RODRIGUES, R.; DAHER, R. F.; POSSE, S. C. P. Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 3, p. 531-539, 2005.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (Bombaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 113-121, Mar. 2003.

STACE, H. M. Breeding systems in *Stylosanthes*. I. Observations of outcrossing in *S. scabra* at an alcohol dehydrogenase locus. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 33, n. 1, p. 87-96, Jan. 1982.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.27, p.205-233, Dec. 1993.

VALLE, C. B. do; GLIENKE, C.; LEGUIZAMON, G. O. C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. **Apomixis Newsletter**. v. 7, p. 42-43, 1994.

VALLE, C. B. do; BITENCOURT, G. de A.; ARCE, A. Estudos citoembriológicos do modo de reprodução em *Brachiaria humidicola*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS, 2007, Campo Grande, MS. **Palestras-resumos [do]...** Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2007. 3 p. 1 CD-ROM.

VENCOVSKY, R.; PEREIRA, M. B.; CRISÓSTOMO, J. R.; FERREIRA, M. A. J. F. Genética e melhoramento de populações mistas. In: NASS, L. L.; VALLOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 549-601.

VIGNA, B.; PAIVA, J.; JUNGMANN, L.; SOUSA, A. C. D.; VALLE, C. B.; SOUZA, A. P. Desenvolvimento e caracterização de microssatélites para *Brachiaria humidicola*, uma gramínea forrageira tropical. In: In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 53., 2007, Águas de Lindóia. **Resumos...** Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2007. p. 75. 1 CD-ROM.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. L.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. **Nucleic Acidic Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

YOUNG, B. A.; SHERWOOD, R. T.; BASHAW, E. C. Cleared-pistyl and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 57, n. 15, p. 1668-1672, Aug. 1979.

ZORZATTO, C.; CHIARI, L.; VALLE, C. B.; MELO, M. V.; LEGUIZÁMON, G. O. C. Estudo da variabilidade genética de acessos de *Brachiaria dictyoneura* usando marcadores RAPD. In: In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 53., 2007, Águas de Lindóia. **Resumos...** Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2007. p. 118. 1 CD-ROM.



Gado de Corte

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**

CGPE 7734