

Gislayne de Araujo Bitencourt

Universidade Anhanguera-Uniderp

gislayne86@hotmail.com

Lucimara Chiari

Empresa Brasileira de Pesquisa

Agropecuária - Embrapa

lchiari@cnpqg.embrapa.br

Cacilda Borges do Valle

Empresa Brasileira de Pesquisa

Agropecuária - Embrapa Gado de Corte

cacilda@cnpqg.embrapa.br

Anhanguera Educacional Ltda.

Correspondência/Contato

Alameda Maria Tereza, 4266

Valinhos, São Paulo

CEP 13.278-181

rc.ipade@aesapar.com

Coordenação

Instituto de Pesquisas Aplicadas e

Desenvolvimento Educacional - IPADE

Artigo Original

Recebido em: 13/02/2012

Avaliado em: 15/02/2012

Publicação: 30 de outubro de 2012

AVALIAÇÃO DE HÍBRIDOS POR MEIO DE MARCADORES RAPD E IDENTIFICAÇÃO DO MODO DE REPRODUÇÃO PELA ANATOMIA DE SACOS EMBRIONÁRIOS EM *BRACHIARIA HUMIDICOLA*

RESUMO

A identificação de um acesso sexual tetraplóide no germoplasma de *Brachiaria humidicola* dessa espécie permitiu a realização de cruzamentos intraespecíficos com a cv. Tupi, apomítica e tetraplóide. Dessa progênie foram selecionadas 60 plantas com base em caracteres morfoagronômicos. O objetivo desse trabalho foi identificar híbridos por meio de marcadores RAPD e determinar o modo de reprodução, pela análise dos sacos embrionários. Para tanto, utilizou-se oito *primers* de RAPD previamente selecionados como diferenciadores nos genitores e os sacos embrionários foram analisados por microscopia de contraste de interferência. Pela técnica de RAPD, 57 plantas foram confirmadas como híbridas e três plantas não apresentaram nenhuma das bandas exclusivas do genitor apomítico, indicando autofecundação. Na análise do modo de reprodução das plantas híbridas, 28 plantas apresentaram sacos embrionários de origem meiótica (plantas sexuais) e 29, sacos embrionários apospóricos únicos e/ou múltiplos (plantas apomíticas). Todas as plantas de autofecundação eram sexuais como esperado.

Palavras-Chave: biologia; híbridos; sacos embrionários; germoplasma; *Brachiaria humidicola*.

ABSTRACT

The identification of a sexual accession in the germplasm collection of *Brachiaria humidicola* allowed for intraspecific hybridization with an apomictic and tetraploid accession, cv. Tupi. Sixty plants of the progeny from this cross were selected based on morpho-agronomic traits. The objective of this project was to verify hybrids using the RAPD technique and determine the mode of reproduction by the analysis of embryo-sacs. For that, eight RAPD *primers* previously selected as discriminating between the genitors and embryo sac analyses were conducted using interference contrast microscopy. RAPD technique identified 57 plants as hybrids and 3 plants did not present any of the bands from the apomictic genitor thus were classified as self-pollinated. Analysis of the mode of reproduction of the hybrid plants identified 28 with sacs of meiotic origin (sexual plants) and 29 with single or multiple aposporous sacs (apomictic plants). All selfed plants were sexual as expected.

Keywords: *Brachiaria*; cytoembryology; crossed fertilization; molecular markers; genetic improvement.

1. INTRODUÇÃO

Brachiaria humidicola (Rendle) Schweick têm como origem do leste e sudeste da África. No Brasil, foi introduzida como forrageira em maior intensidade nas regiões norte e centro-oeste, com ocorrência predominante em áreas de solos úmidos e seu cultivo é recomendado para áreas com drenagem deficiente (DIAS-FILHO, 2005).

A incontestável importância das pastagens de braquiárias para a bovinocultura na região dos Trópicos como base da alimentação animal. Entretanto, o número de cultivares comercialmente disponíveis é baixo e, especialmente crítico, é o caso de *B. humidicola*, com apenas três cultivares registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2007).

Espécies de *Brachiaria* são, na maioria, poliplóides e apomíticas. A apomixia é um modo de reprodução assexuada por meio de sementes clonais (OZIAS-AKINS; VAN DIJK, 2007). Esse fato também dificulta o aumento da variabilidade genética desse gênero, pois é uma barreira para a fecundação cruzada (ASSIS et al., 2003).

Características citológicas e moleculares da reprodução apomítica, seu controle genético e sua relação com o mecanismo sexual são aspectos que vêm sendo explorados por vários grupos de pesquisa, devido ao seu potencial para revolucionar a produção agrícola, maximizando a produção através da fixação do vigor híbrido, facilitando a produção de sementes híbridas e acelerando o processo de melhoramento (DALL'AGNOL; SCHIFINO-WITTMANN, 2005).

Para realizar um programa de melhoramento genético de plantas apomíticas torna-se necessária a utilização de plantas sexuais que possam ser utilizadas como planta-mãe nos cruzamentos com as plantas apomíticas, que serão as doadoras de pólen. No caso de *B. humidicola*, foi identificado no banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande - MS, um acesso sexual poliplóide (BOLDRINI et al., 2006) que possibilitou a realização de cruzamentos intraespecíficos.

Um entrave no processo de melhoramento genético de braquiária é a identificação visual de híbridos de cruzamentos, especialmente quando os pais são fenotipicamente semelhantes. A continuidade dos trabalhos esbarra na dificuldade em se diferenciar na progênie as plantas híbridas daquelas oriundas de autofecundação, uma vez que não se faz emasculação prévia ao cruzamento.

Tradicionalmente, os melhoristas utilizam descritores morfológicos para a identificação de híbridos dentro dos programas de melhoramento. Porém o uso desses descritores possui diversas limitações, como o fato de serem, freqüentemente, afetados

pelo efeito ambiental e de que a avaliação só pode ser feita na planta adulta e, muitas vezes, após o florescimento (SILVA et al., 2005).

Os marcadores moleculares vêm sendo aplicados com sucesso em várias espécies de plantas cultivadas (BASTIANEL et al., 2006), especialmente porque acessam diretamente o genótipo da planta, evitando, assim, a expressão do fenótipo e a influência do ambiente sobre este. Além disso, podem ser analisados a partir de amostras de tecidos de qualquer parte da planta e em qualquer estágio de desenvolvimento. Dentre esses marcadores, destaca-se o *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) por ser um marcador de baixo custo, fácil execução e utilização, utilizam pequenas quantidades de DNA e, principalmente, por que podem ser utilizados sem o conhecimento prévio do genoma do organismo que se deseja estudar (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo identificar híbridos por meio de marcadores RAPD e a determinar o modo de reprodução pela análise anatômica dos sacos embrionários em 60 plantas da progênie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cruzamentos Artificiais

Os cruzamentos artificiais foram realizados na casa de vegetação da Embrapa Gado de Corte, no mês de janeiro de 2005, usando o acesso (H31) sexual, como planta-mãe e pólen da cv. BRS Tupi (H16) apomítico. Desse cruzamento foi obtida uma progênie de 364 plantas. Destas, 60 plantas foram selecionadas com base em características morfo-agronômicas.

2.2. Marcadores RAPD

Material Vegetal: coleta, extração e quantificação de DNA

Folhas jovens das 60 plantas selecionadas foram coletadas no campo de *B. humidicola*. O DNA de cada uma foi extraído segundo o protocolo de Bonato et al. (2002). A quantificação foi feita em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, por comparação com bandas de DNA de concentração conhecida (100ng/μL e 300ng/μL).

Reações de RAPD

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25μL contendo: 2,5μL de tampão da Taq DNA polimerase 10X (Invitrogen), 1,0μL de MgCl₂ 50mM (Invitrogen),

1,10µL de dNTPs 10mM (Invitrogen), 1µL de DMSO (Sigma), 3,0µL de *primer* 10µM, 0,4µL de Taq polimerase 500U (Invitrogen) e 6µL de DNA genômico na concentração de 5ng/µL e 10,0µL de H₂O milliQ autoclavada. Para todas as reações foi feito um controle negativo, sem a adição de DNA molde.

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research), programado para uma etapa de 94°C por 5 min, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 min, 40° C por 1,5 min e 72°C por 2 min e para finalizar uma etapa de extensão a 72°C por 7 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, já corados com brometo de etídio (0,5µg/mL). O tampão utilizado para o preparo do gel e na cuba foi o TBE 1X.

Os resultados foram visualizados em luz UV, fotodocumentados em sistema digital e analisados.

Identificação dos híbridos

Cinquenta *primers* foram testados nos genitores (ROCHA et al., 2006), e destes, oito foram selecionados para a análise das 60 plantas. A seleção foi feita com base na presença de bandas informativas para identificação dos híbridos, ou seja, presentes no genitor masculino e ausentes no feminino.

A identificação dos híbridos foi feita diretamente pela análise dessas bandas informativas no gel. Foi considerada híbrida a planta que apresentasse pelo menos três bandas informativas.

2.3. Modo de Reprodução

Material vegetal: coleta e fixação de flores

Foram colhidas com o auxílio de pinça, no mínimo 50 flores em antese, com os dois estigmas visíveis, sempre nas primeiras horas do dia, de cada uma das plantas selecionadas da progênie mantida no campo.

As flores foram fixadas em solução de FAA na proporção 40:14:3:3 respectivamente de Formalina 40%:Água destilada:Álcool etílico 95%:Ácido acético glacial. Permaneceram neste fixador por 24 horas. Após esse período, trocou-se o fixador por álcool etílico 70%, e as flores foram armazenadas à 4°C.

Extração, clarificação de ovários e análise de sacos embrionários

Os ovários foram retirados do interior das flores com auxílio de lupa e pinça e foram armazenados em álcool etílico 70%. O clareamento dos sacos embrionários foi feito pela técnica de Young et al., (1979). Após foram montadas lâminas, onde os ovários clarificados foram enfileirados em uma lâmina com salicilato de metila e analisados por microscopia de contraste de interferência.

A taxa de sexualidade foi calculada com base no número de ovários contendo sacos meióticos em análise de pelo menos 50 ovários.

Plantas sexuais são as que apresentam ovários com um único saco meiótico, o que indica a reprodução sexual, plantas apomíticas apresentaram ovários com sacos embrionários apospórico único, ou ovários com sacos embrionários múltiplos. Sacos estéreis aparecem normalmente em plantas sexuais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados oito *primers* e amplificaram 27 bandas informativas, dos quais o que mais se destacou foi o *primer* AB01 com seis bandas informativas (Tabela 1).

Tabela 1. Seqüência de nucleotídeos dos *primers* utilizados e o número de bandas amplificadas que permitiram a discriminação de híbridos de *B. humidicola*.

Primer	Seqüência de nucleotídeo	Nº de bandas informativas	Primer	Seqüência de nucleotídeo	Nº de bandas informativas
P14	CCA GCC GAA C	5	AC17	CCT GGA GCT T	2
81	GGA GCG TAC T	3	AK04	AGG GTC GGT C	2
AB01	CCG TCG GTA G	6	AK19	TCG CAG CGA G	5
AB02	GGA AAC CCC T	1	AL03	CCC ACC CTT G	3

Das 60 plantas analisadas com os *primers*, 57 apresentaram pelo menos três bandas do genitor apomítico, o que confirma a fecundação cruzada. Três plantas foram consideradas resultantes de autofecundação, revelando que tal evento pode ocorrer em *B. humidicola*, justificando a necessidade de identificar os híbridos em cruzamento controlados.

A Figura 1 exemplifica os perfis de RAPD em 17 plantas, obtidos com os *primers* AB01 e 81, e os genitores. Os resultados destes *primers* somados aos demais revelaram que dessas 17 plantas apenas a planta 51 não é híbrida, sendo considerado produto de autofecundação.

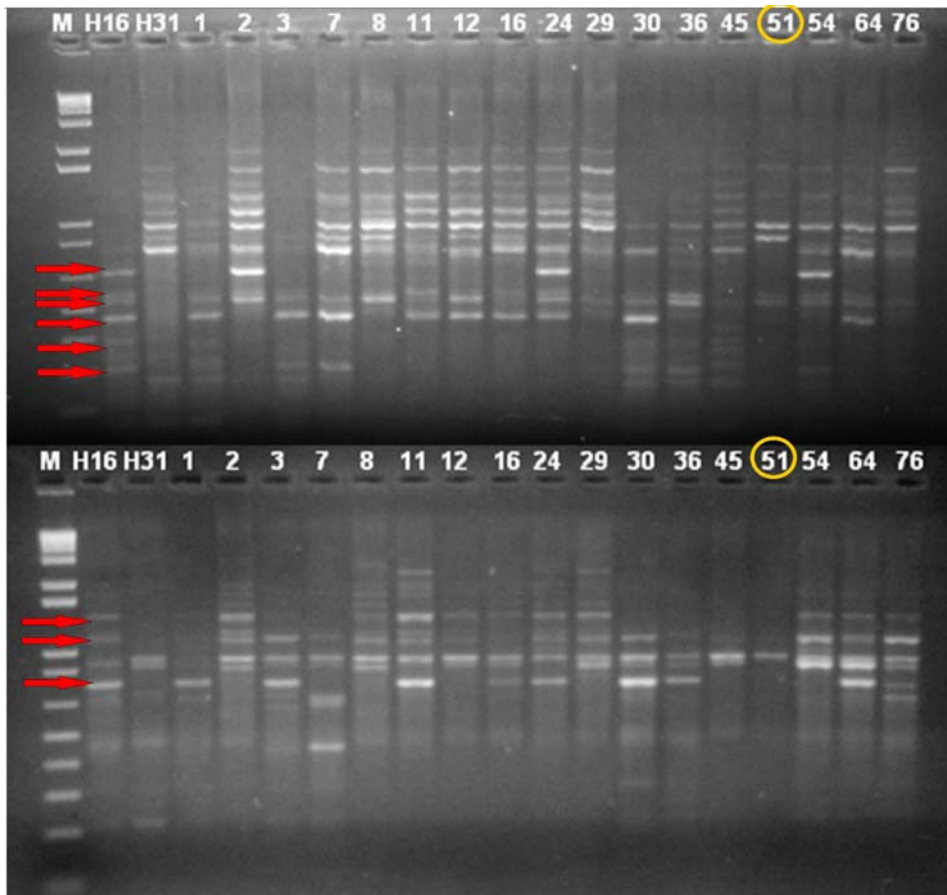


Figura 1. Perfil de RAPD gerados pelos *primers* AB01 (foto superior) e 81 (foto inferior) para os genitores, H16 e H31, e 17 plantas da progênie. As setas apontam as bandas informativas utilizadas para identificação dos híbridos e em destaque uma das plantas originada de autofecundação.

A caracterização molecular permite a identificação precoce dos híbridos, na fase de plântulas, por meio de bandas que estão presentes no genitor masculino (apomítico) e ausentes no genitor feminino (sexual), acelerando o programa de melhoramento, pois reduz o tempo, o trabalho e os custos necessários para a análise de todas as plantas. As plantas identificadas como híbridas seguem no programa de melhoramento genético podendo ser candidatas a novas cultivares (híbridos apomíticos) ou utilizadas como genitores em novos cruzamentos (híbridos sexuais).

Quanto às análises do modo de reprodução, das 57 plantas híbridas, 28 apresentaram ovários de origem meiótica (Fig. 2) e total ausência de sacos apospóricos, indicando reprodução sexual, e 29 apresentaram ovários contendo sacos embrionários apospóricos únicos (Fig. 3A) e/ou múltiplos (Fig. 3B), indicando claramente reprodução por apomixia.

A determinação do modo de reprodução é baseada nas diferenças estruturais encontradas entre um saco embrionário meiótico e um apospórico. O saco embrionário meiótico é constituído por três antípodas, dois núcleos polares, duas sinérgidas e uma oosfera. Já o saco embrionário apospórico, apresenta uma célula central constituída por

apenas um núcleo polar, e duas sinérgidas e uma oosfera. Este tipo não apresentam antípodas.

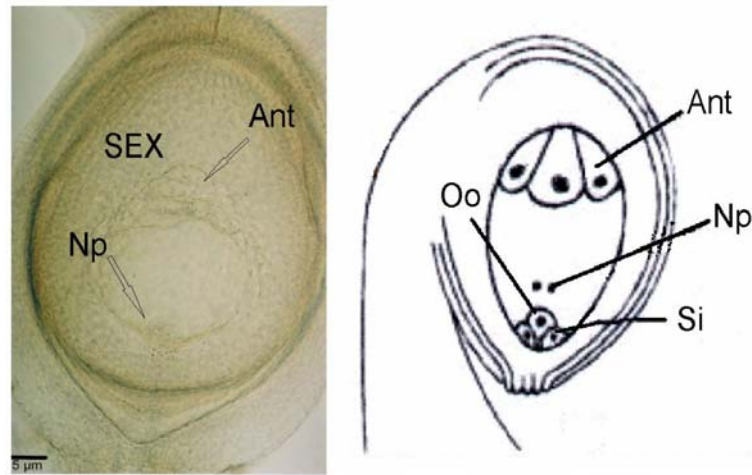


Figura 2. Fotomicrografia e desenho esquemático modificado (Carneiro et al., 2006) de ovário clarificado de *B. humidicola*, visto ao microscópio de contraste de interferência 200X. SEX = Saco embrionário meiótico (Ant = antípodas; Np = núcleos polares; Oo = oosfera; Si = sinérgidas).

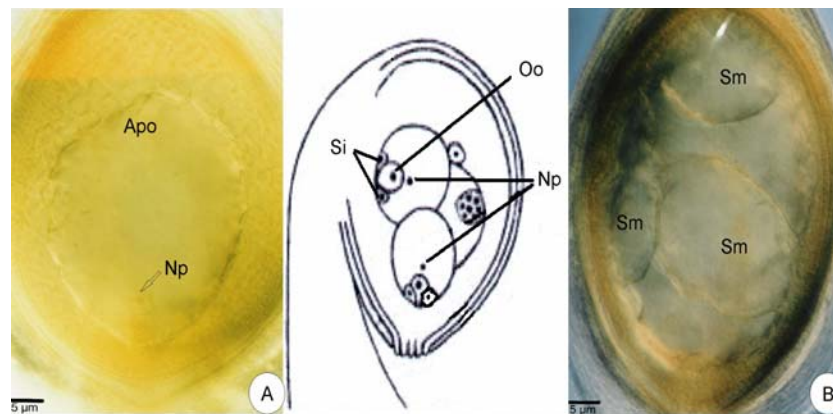


Figura 3. Fotomicrografias (A e B) e desenho esquemático modificado (Carneiro et al., 2006) de ovários clarificados de *B. humidicola*, vistos ao microscópio de contraste de interferência 200X. **A.** APO = Saco embrionário apospórico; **B.** Sm =saco embrionário apospórico múltiplo. (Np = núcleos polares; Oo = oosfera; Si = sinérgidas).

Na reprodução sexual em *Brachiaria*, como na maioria das angiospermas, uma célula do nucelo se diferencia em célula-mãe do megásporo formando quatro megásporos haplóides após divisão meiótica. Três deles se degeneram e o megásporo sobrevivente sofre três mitoses até formar o saco embrionário reduzido, esse saco embrionário é monospórico, ou seja, saco embrionário meiótico (OZIAS-AKINS; VAN DIJK, 2007).

Em plantas apomíticas, o desenvolvimento do embrião se dá em um saco embrionário não reduzido (apomeiose), independentemente da fecundação, ou seja, autonomamente (partenogênese). Dependendo da origem do saco embrionário, a apomixia gametofítica pode ser classificada em diplospórica ou apospórica (NOGLER, 1984; ASKER; JERLING, 1992; KOLTUNOW, 1993, 1995).

As células que originam sacos embrionários são designadas como iniciais apospóricas que através de mitoses originam apenas um ou vários sacos embrionários, denominados de sacos embrionários múltiplos, em um mesmo óvulo. As células iniciais apospóricas podem se diferenciar durante a degeneração dos megásporos no processo de reprodução sexual (ARAUJO et al., 2000) ou, ainda, durante ou após a meiose da célula-mãe do megásporo (DUSI; WILLEMSE, 1999).

As plantas de *Brachiaria* com reprodução sexual apresentam exclusivamente sacos embrionários meióticos (VALLE; SAVIDAN, 1996). Já as plantas apomíticas, além dos sacos embrionários apospóricos únicos, podem ocorrer em um mesmo óvulo, a formação de um saco embrionário meiótico, o qual pode ser fecundado. Quando ocorre a fecundação e a formação do zigoto, pode ser formada uma progênie originada por meio de sexualidade, caracterizando uma apomixia facultativa, que é a formação de sementes viáveis por meio de um saco embrionário (KOLTUNOW, 1993).

A formação do endosperma em *Brachiaria* depende da fecundação do núcleo polar da célula central, diferentemente da formação do embrião, ou seja, ocorre pseudogamia (NGENDAHYO, 1988; ALVES et al., 2001).

Foram determinadas 28 plantas com reprodução sexual. Na tabela 2 pode-se observar alta variação na taxa de sexualidade e de esterilidade. As altas taxas de esterilidade foram observadas entre os acessos sexuais (46,7%), podendo ser resultado de incompatibilidades cromossômicas ou problemas de incompatibilidade pós-gamética entre a cv. BRS Tupi e o acesso sexual H31. As taxas de sexualidade foram em média 38,46%, variando até 92,7%, estando de acordo com outros resultados em *Brachiaria* (VALLE, 1990).

As taxas de sexualidade encontradas nas plantas apomíticas refletem a ocorrência de elevados níveis de sexualidade, e estas passam a ser consideradas apomíticas facultativas. As plantas sexuais dependem de uma meiose regular para a produção de gametas, portanto apresentaram apenas ovários sexuais. Enquanto que plantas apomíticas sobrepõem a meiose e produzem os gametas não reduzidos por mitose. Por isso normalmente exibem bem menos esterilidade no exame dos sacos embrionários.

Tabela 2. Modo de reprodução e valores médios de sexualidade em híbridos de *B. humidicola* analisados por microscopia com contraste de interferência.

Nº de híbridos	Modo de reprodução	Taxa de sexualidade média	Varição na taxa de sexualidade	Varição na taxa de esterilidade
28	SEX	38,46%	22,8 – 92,7%	0 – 46,7%
29	APO	13,6%	0 – 62,1%	0 – 43,9%
Total 57				

APO = apomixia; SEX = sexualidade.

Para testar as proporções esperadas e observadas foi realizado o teste do Qui-quadrado:

$$\chi^2 = (O - E)^2 / E$$

$$\chi^2 = (28-28,5)^2 / 28,5 + (29 - 28,5)^2 / 28,5 =$$

$$0,00877 + 0,00877 = 0,0175$$

(não significativo, $P < 0,01$ para 1 grau de liberdade)

Sendo assim, o resultado observado está de acordo com a proporção de 1:1 esperada.

A herança da apomixia segue a hipótese de herança monogênica (controlada por um único gene) com a apomixia dominante sobre a sexualidade, onde o genótipo apomítico tetraplóide pode ser representado por Aaaa e o genótipo sexual tetraplóide por aaaa. Cruzamentos entre planta apomítica e planta sexual, de acordo com a hipótese de herança monogênica com dominância da apomixia, resultam numa proporção esperada de 1:1 de plantas apomíticas e sexuais na progênie (VALLE; SAVIDAN, 1996).

As plantas determinadas como produto de autofecundação não entram no cômputo do cálculo da herança da apomixia, pois são resultado do cruzamento: SEX x SEX (autofecundação da planta-mãe sexual). No exame de sacos embrionários, observa-se apenas sacos embrionários meióticos e apresentam bem menos esterilidade do que plantas sexuais híbridas.

4. CONCLUSÕES

Os indivíduos híbridos, resultantes do cruzamento intraespecífico entre o acesso sexual tetraplóide de *B. humidicola* (H31) e a cv. BRS Tupi (apomítico), foram identificados com base em marcadores RAPD. Três plantas foram determinadas como produto de autofecundação, revelando que tal evento pode ocorrer em *B. humidicola*, justificando a

necessidade de identificar os híbridos em cruzamento controlados. O modo de reprodução de todas as plantas híbridas analisadas foi determinado e a proporção de plantas apomíticas e sexuais foi igual a 1:1. Pelos resultados apresentados a herança da apomixia em *B. humidicola* segue a hipótese de herança monogênica e dominante sobre a sexualidade.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Gado de Corte pela possibilidade de desenvolvimento deste trabalho. À equipe do Laboratório de Citogenética e Biotecnologia Vegetal - Embrapa Gado de Corte. Ao CNPq pela bolsa PIBIC e à UNIPASTO e Fundect pelos recursos financeiros.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E.R.; CARNEIRO, V.T.C.; ARAUJO, A.C.G. Direct evidence of pseudogamy in an apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, New York, v.14, p. 207-212, 2001.
- ARAUJO, A.C.G.; MUKHAMBETZHANOV, S.; POZZOBON, M.T.; SANTANA, E.F.; CARNEIRO, V.T.C. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Revue de Cytologie et de Biologie Vegetables - Le Botaniste**, Paris, Tome XXIII, p. 13-28, 2000.
- ASSIS, G.M.L.; EUCLYDES, R.F.; CRUZ, C.D.; VALLE, C.B. Discriminação de espécies de *Brachiaria* baseada em diferentes grupos de caracteres morfológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n.3, p. 576-584, 2003.
- ASKER, S.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. CTC Press, Boca Raton. 1992. 298 p.
- BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A.C.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor 'Murcott' avaliada por AFLP e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 779-784, 2006.
- BOLDRINI, K.R.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, Bangalore, v.85, p. 225-228, 2006.
- BONATO, A.L.V.; VALLE, C.B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S.; LEGUIZAMON, G.O.C. **Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum maximum***. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte. 2002. 4p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 79).
- 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, 2005.
- DIAS-FILHO, M.B. Opções forrageiras para áreas sujeitas a inundação ou alagamento temporário. In: PEDREIRA, C.G.S.; MOURA, J.C.; DA SILVA, S.C.; FARIA, V.P. (Ed.). 22º Simpósio sobre manejo de pastagem. **Teoria e prática da produção animal em pastagens**. Piracicaba: FEALQ, 2005, p.71-93.
- DUSI, D.M.A.; WILLEMSE, M.T.M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: gametophytic development and reproductive calendar. **Acta biologica cracoviense Society botany**, v. 41, p. 151-162, 1999.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 1998. 220 p.

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

KOLTUNOW, A.M. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiology**, Bethesda, MD, v. 108, p. 1345-1352, 1995.

OZIAS-AKINS, P.; VAN DIJK, P.J. Mendelian genetics of apomixis in plants. **Annu Rev Genet**. 2007;41:509-37.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2007. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/cultivares/snpc_06_48.htm#4>.

NGENDAHYO, M. **Mecanismes de la reproduction dans le genre *Brachiaria* Gris. et strategies d'amélioration et de selection**. 1988. 165f. Thèse (Doctorat) – Laboratoire de phytotechnie Tropicale et Subtropicale, Faculté des Sciences Agronomiques Université Catholique de Louvain, Louvain, Belgique. 1988.

NOGLER, G.A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, B.M. (Ed.). **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, p. 475-518. 1984.

ROCHA, M.; SALGADO, L.R.; VALLE, C.B.; DOURADO, D.; CHIARI, L. **Caracterização molecular de acessos de *Brachiaria spp.* usando RAPD**. 2006. 23p. Monografia (Curso de Ciências Biológicas), Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – UNIDERP, Campo Grande, 2006.

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.

VALLE, C.B. **Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT. Estudos básicos visando ao melhoramento genético**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1990. 33 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 46).

VALLE, C.B.; SAVIDAN, Y.H. Genetics, Cytogenetics, and Reproductive Biology of *Brachiaria*. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, B.C. (Ed.). ***Brachiaria: biology, agronomy and improvement***. Cali: CIAT, EMBRAPA/CNPGC, Campo Grande, p. 147-163, 1996.

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**, v. 57, p. 1668-1672, 1979.

Gislayne de Araujo Bitencourt

Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura) pela Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal e mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Tem experiência na área de Genética, com ênfase em Genética e Melhoramento Vegetal, atuando principalmente nos seguintes temas: Anatomia vegetal; Citoembriologia; Cultura de Tecidos Vegetais; Marcadores Moleculares e Propagação vegetativa.

Lucimara Chiari

Graduação em Ciências Biológicas, Licenciatura e Bacharelado, pela Universidade Estadual de Londrina (1996). Mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Estadual de Londrina (1999). Doutorado em Genética e

Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa (2003). Foi bolsista recém-doutor do CNPq, atuando na área de Desenvolvimento de Vacinas Gênicas, na Universidade Federal de Minas Gerais (2003-2004) e foi bolsista de Desenvolvimento Científico Regional do CNPq/FUNDECT, atuando na área de Biotecnologia Vegetal, na Embrapa Gado de Corte (2005-2007). Desde novembro de 2006, é Pesquisadora A na Embrapa Gado de Corte, atuando na área de Biotecnologia Vegetal, com ênfase em Genômica, Transcriptômica, Expressão Gênica e Marcadores Moleculares em espécies forrageiras tropicais. Consultora ad hoc de projetos de pesquisa da Embrapa e da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul FUNDECT; Consultora ad hoc de artigos técnico-científicos para as revistas *Ciência Rural* (Santa Maria, RS Brasil), *Ciência e Agrotecnologia* (Lavras, MG Brasil) e *African Journal of Biotechnology*.

Cacilda Borges do Valle

Graduação em Agronomia pela Universidade de São Paulo- ESALQ (1973), mestrado em AGRONOMIA - Fisiologia de Pastagens - Iowa State University of Science and Technology (1977) e doutorado em Melhoramento de Plantas - University of Illinois (1986). É pesquisadora A da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Trabalha em Melhoramento de Plantas Forrageiras e Produção de Sementes, responsável por projetos de Caracterização de germoplasma, Melhoramento do capim braquiária, atuando principalmente nos seguintes temas: apomixia, citogenética, melhoramento genético, desenvolvimento de novas cultivares, caracterização cromossômica e molecular de braquiaria.