

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

JOANA NERES DA CRUZ BALDISSERA

**Avaliação do comportamento meiótico e da viabilidade polínica em
híbridos de *Brachiaria decumbens* resistentes à degrana**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
DEZEMBRO – 2014

JOANA NERES DA CRUZ BALDISSERA

Avaliação do comportamento meiótico e da viabilidade polínica em híbridos de *Brachiaria decumbens* resistentes à degrana

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudete Aparecida Mangolin.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
DEZEMBRO – 2014

PÁGINA DESTINADA À FOLHA DE APROVAÇÃO. ENCONTRA-SE NA
SECRETARIA DO PGM

Aos meus amados pais, Eli e Francisco.
Aos meus queridos avós, Helena (*in memoriam*) e Sebastião.
Ao meu querido irmão, Jordão.
À professora e amiga, Débora Pardal.
À minha orientadora, Maria Suely Pagliarini (*in memoriam*).

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM) e a todos os professores do Programa pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, professora doutora Maria Suely Pagliarini (*in memoriam*), pela oportunidade e pelos ensinamentos durante parte deste estudo.

À minha orientadora, professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, por ter me acolhido e auxiliado, quando a saudosa professora Maria Suely Pagliarini partiu.

À minha coorientadora, doutora Cacilda Borges do Valle, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, por todas as contribuições no desenvolvimento desta pesquisa.

À professora doutora Andréa Beatriz Mendes Bonato, pelas conversas, por todo apoio e auxílio nas minhas dificuldades.

Aos membros da banca, pelas importantes sugestões a este trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Corte), por conceder-nos o material vegetal utilizado neste trabalho.

Aos professores doutores Altamir Frederico Guidolin e Jefferson Luis Meirelles Coimbra, pela dedicação e pelo conhecimento transmitido durante o mestrado, que muito contribuíram para a realização do Doutorado.

À Neide da Silva, Técnica do Laboratório de Citogenética Vegetal, pela dedicação e competência profissional.

Aos amigos, Marlon Coan, Giseli Valentini e Vanesca da Rocha, pela amizade, apoio, aprendizagem, companheirismo e pelos anos de convívio durante o período de Mestrado e o Doutorado.

Às colegas de laboratório, Ana Caroline, Lilian, Raquel e Viviane, pelo carinho, amizade, convívio e aprendizagem.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

BIOGRAFIA

JOANA NERES DA CRUZ BALDISSERA, filha de Francisco Baldissera e de Eli Neres da Cruz, nasceu em 15 de março de 1985, na cidade de Água Doce, estado de Santa Catarina.

Em dezembro de 1999, concluiu o Ensino Fundamental e, em 2002, o Ensino Médio, ambos na Escola de Educação Básica Ruth Lebarbechon, na cidade de Água Doce, estado de Santa Catarina.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas, em julho de 2003, no Centro Universitário Diocesano do Sudoeste do Paraná (UNICS), na cidade de Palmas, estado do Paraná, obtendo o título de Licenciada em Ciências Biológicas em fevereiro de 2007.

Em julho de 2006, ingressou no Curso de Pós-Graduação *lato sensu* em Biologia, Educação e Saúde, no Centro Universitário Diocesano do Sudoeste do Paraná (UNICS), na cidade de Palmas - PR, obtendo o título de Especialista, em setembro de 2008, com a pesquisa: efeito da batata yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sobre o metabolismo hepático de ratos normais e diabéticos.

Ingressou, em fevereiro de 2009, no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), na cidade de Lages, obtendo o título de Mestre em Produção Vegetal, em fevereiro de 2011, com a Dissertação “Herança genética da capacidade de regeneração *in vitro* em feijão e controle genético de características de interesse agrônomo para o planalto catarinense”.

Em março de 2011, ingressou no Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, estado do Paraná.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Importância das gramíneas forrageiras.....	3
2.2. Caracterização do gênero <i>Brachiaria</i>	4
2.2.1. Caracterização da espécie <i>Brachiaria decumbens</i>	5
2.3. Biologia reprodutiva do gênero <i>Brachiaria</i>	6
2.4. Banco de germoplasma do gênero <i>Brachiaria</i>	7
2.5. Melhoramento genético do gênero <i>Brachiaria</i>	8
2.6. Importância da apomixia para o melhoramento	11
2.7. Resistência à degrana natural no gênero <i>Brachiaria</i>	11
2.8. Citogenética do gênero <i>Brachiaria</i>	13
2.8.1. Número cromossômico e comportamento meiótico	14
2.9. Viabilidade do pólen	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Material	18
3.2. Análise do comportamento meiótico para os híbridos.....	19
3.3. Análise das tétrades de micrósporos	20
3.4. Análise da viabilidade polínica	20
3.5. Análise estatística	20
3.6. Documentação fotográfica	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Contagem cromossômica e associações.....	22
4.2. Comportamento cromossômico	24
4.3. Viabilidade do pólen.....	37
5. CONCLUSÃO	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

RESUMO

BALDISSERA, Joana Neres da Cruz, D.Sc. Universidade Estadual de Maringá, dezembro de 2014. **Avaliação do comportamento meiótico e da viabilidade polínica em híbridos de *Brachiaria decumbens* resistentes à degrana.** Professora orientadora: Claudete Aparecida Mangolin. Professores conselheiros: Andrea Beatriz Mendes Bonato, André Luis Laforga Vanzela, Cacilda Borges do Valle e Satiko Nanya.

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar os híbridos de *Brachiaria decumbens* com resistência à degrana natural e selecionar os que apresentaram maior porcentagem de pólen viável e melhor desempenho na microsporogênese, para serem utilizados no programa de melhoramento da Embrapa Gado de Corte. A diversidade genética no gênero *Brachiaria* é restrita e, portanto, cruzamentos intra e interespecíficos são realizados para gerar variabilidade. Acessos de *B. decumbens* foram cruzados e, na geração F₁, os híbridos resistentes à degrana natural foram selecionados. Avaliações citogenéticas foram realizadas para identificar as anormalidades meióticas que podem interferir na viabilidade do pólen e, conseqüentemente, na produção de sementes. Para os estudos meióticos, inflorescências jovens foram coletadas de 27 híbridos, fixadas em uma solução preparada com 6 partes de etanol, 3 partes de clorofórmio e duas partes de ácido propiônico por 24 horas e armazenadas em álcool 70%, sob refrigeração. Os microsporócitos e os grãos de pólen foram preparados utilizando a técnica de esmagamento e coloração com carmim propiônico a 1% e observadas sob microscopia de luz. Para cada híbrido, foram analisadas 100 células em cada fase da meiose, compreendidas entre a diacinese e a tétrade. As associações cromossômicas foram analisadas na diacinese e a contagem do número de cromossomos em anáfase I. O comportamento cromossômico foi analisado em metáfase I até a tétrade. As porcentagens de irregularidades observadas foram relacionadas com a segregação irregular dos cromossomos, formação de micronúcleos, micrócitos e políades. As porcentagens de tétrades anormais e dos grãos de polens inviáveis foram submetidas à análise de variância, utilizando o programa SAS 9.2. Após, foi realizado o teste de *Scott Knott*, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa Genes. Todos os 27 híbridos analisados são tetraploides ($2n=4x=36$). A frequência de anormalidades na meiose variou de 7% a 100% entre as fases e os híbridos. O comportamento dos

cromossomos durante a meiose caracterizou assincronia do genoma. No produto final da meiose, as principais irregularidades encontradas foram micronúcleos, micrócitos e políades. A alta frequência de irregularidades na segregação dos cromossomos afetou a viabilidade do pólen. Quinze dos 27 híbridos avaliados apresentaram viabilidade abaixo de 32%. Entre os 27 híbridos intraespecíficos, os híbridos apomíticos, que podem ser mantidos no processo de desenvolvimento de novas cultivares e também serem utilizados como doadores de pólen, foram R158, R169 e R184. Os híbridos sexuais mais promissores, que podem ser aproveitados em novos cruzamentos como receptores de pólen, foram R161, R163, R165, R167, R181, R193, S47, Y21 e Z9.

Palavras-chave: Meiose; melhoramento; gramíneas forrageiras.

ABSTRACT

BALDISSERA, Joana Neres da Cruz, D.Sc. Universidade Estadual de Maringá, May, 2014. **Evaluation of meiotic behavior and pollen viability in hybrids of *Brachiaria decumbens* resistant to shattering** Adviser: Claudete Aparecida Mangolin. Committee Members: Andréa Beatriz Mendes Bonato, André Luis Laforga Vanzela, Cacilda Borges do Valle e Satiko Nanya.

The objective of this research was to select hybrids with better performance in microsporogenesis and with lower percentage of unviable pollen to be used in the forage improvement programs of Embrapa Beef Cattle. The genetic diversity in the genus *Brachiaria* is restricted and intra- and interspecific crosses are being performed to create variability. Accessions of *B. decumbens* were crossed and in the F₁ generation hybrids that retained seeds in the inflorescence were selected. Cytogenetic evaluations were then performed to identify meiotic abnormalities which could be detrimental to pollen viability and consequently to seed production. For the meiotic studies, young inflorescences were collected from twenty seven intraspecific hybrids, fixed in a mixture of 6 ethanol: 3 chloroform: 2 propionic acid for 24 h and stored under refrigeration. The microsporocytes and the pollen grains were prepared by smear and staining with 1% propionic carmine and analyzed under light microscopy. For each hybrid, 100 cells in each phase of meiosis, between diakinesis and tetrad stages were analyzed. Chromosomal associations were analyzed in diakinesis and the counting of chromosome number in anaphase I. The chromosome behavior was analyzed in from metaphase I until the tetrad stage, and the percentages of irregularities were related to irregular segregation of chromosomes, micronuclei formation, microcytes and polyads. The percentages of abnormal tetrads and unviable pollen were subjected to analysis of variance with the SAS 9.2 software. Later, the Scott Knott test was applied at 5% probability of error with the GENES program. The hybrids are tetraploid ($2n=4x=36$). The frequency of meiotic abnormalities varied between 7% and 100%. Depending on the phases and hybrids, and the behavior of chromosomes during meiosis characterizes asynchrony of genomes. In the final product of meiosis, the main abnormalities identified were micronuclei, microcytes and polyads. The high frequency of irregularities in the segregation of chromosomes affects pollen viability. Fifteen of the 27 hybrids evaluated presented viability below 32%. Of the 27 intraspecific hybrids, the

apomictic hybrids R158, R169 and R184 can be kept for the development of new cultivars process and also be used as pollen donors, whereas the most promising sexual hybrids that can be utilized in new crossings as pollen receptors are R161, R163, R165, R167, R181, R193, S47, Y21 and Z9.

Keywords: Meiosis; breeding; forage grass.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Brachiaria* tem como centro de origem a África e foi introduzido no Brasil no início do período colonial (Sendulsky, 1978). De acordo com Dusi et al. (2000), este gênero abrange cerca de 100 espécies, destacando-se três: *B. ruzizensis*, *B. brizantha* e *B. decumbens*.

As forrageiras do gênero *Brachiaria* conquistaram significativa importância econômica no Brasil, devido à adaptação destas plantas a diversos tipos de solos e climas. No entanto, existe falta de diversidade de sementes forrageiras no mercado, uma vez que 45% da área plantada e 60% da produção de sementes é de *B. brizantha* cv. Marandu e 90% das sementes exportadas são de apenas quatro cultivares de *Brachiaria* (Euclides et al., 2010). Para contornar esta falta de diversidade, há a necessidade de serem desenvolvidas novas cultivares ou melhorar as cultivares já existentes com base na alta produtividade de sementes, no valor nutritivo e na resistência aos fatores bióticos e abióticos, pois estas características auxiliam no aumento e ou na manutenção da produção das pastagens que são essenciais à produção de proteína de origem animal (Silva e Nascimento, 2006)

O programa de melhoramento desta gramínea forrageira apresenta certas dificuldades e isso se deve ao fato de que este gênero apresenta modo de reprodução assexual, por apomixia, e também pelas diferenças de ploidia existentes entre os genótipos, dificultando os cruzamentos, gerando um baixo número de híbridos e um alto grau de esterilidade (Valle et al., 2004).

De acordo com Miles et al. (1996), é muito importante para o programa de melhoramento de *Brachiaria* o conhecimento de características básicas, como o modo de reprodução, o comportamento cromossômico e os níveis de ploidia nas espécies compatíveis. Dessa forma, dentre os estudos básicos necessários aos programas de melhoramento de *Brachiaria*, a citogenética, com as análises do comportamento meiótico e da viabilidade polínica, mostra-se muito eficaz, não apenas para a seleção de genitores compatíveis, mas também para resolver problemas em relação à fecundidade e à produção de sementes viáveis (Valle et al., 2009a; Simioni e Valle 2011). As análises citogenéticas em *Brachiaria* tiveram o seu início em 1940 e, apesar da sua importância como forrageira, pouco ainda se conhece sobre as características citogenéticas do gênero (Pagliarini, 2007).

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a microsporogênese e a viabilidade polínica de 27 híbridos de *Brachiaria decumbens* resistentes à degrana natural, originados dos cruzamentos entre os acessos D24/27 e D24/45 (tetraploides artificiais) com o acesso D62 (tetraploide natural), com o intuito de identificar genótipos estáveis, em relação ao comportamento meiótico e com maiores taxas de pólen viável, para serem utilizados no programa de melhoramento da Embrapa Gado de Corte.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância das gramíneas forrageiras

No Brasil, a pecuária assume lugar de destaque na economia brasileira. O cultivo de plantas forrageiras é relevante para a cadeia produtiva de carne e leite, uma vez que o pasto constitui a principal fonte de alimentação dos rebanhos. As pastagens apresentam uma excelente opção para a alimentação do gado, sendo responsáveis por aproximadamente 90% dos nutrientes exigidos pelos ruminantes (Euclides et al., 2010).

As gramíneas forrageiras promoveram um diferencial qualitativo para a produção de carne brasileira, contribuindo para o Brasil ser o maior exportador desse produto (Resende et al., 2008). De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (2013), o valor bruto da produção de carne e leite no país é estimado em R\$ 67 bilhões. De acordo com dados da Scot Consultoria, a produção de carne bovina aumentou de 9,15 milhões de toneladas, em 2008, para 10,06 milhões em 2012 (Coelho, 2013). Por outro lado, a área de pastagem no Brasil diminuiu 2,3% em dez anos, passando de 175,34 milhões de hectares, em 1999, para 171,35 milhões de hectares, em 2009, e continua diminuindo, pois, em 2012, a área de pastagem no Brasil foi de 167,61 milhões de hectares (Tonini, 2013).

O Brasil também está inserido no mercado exportador de sementes de forrageiras desde o início da década de 90 (Santos Filho, 1996), ocupando posição de destaque no cenário mundial, com relação à produção de sementes de *Brachiaria* (Pereira et al., 2011).

As forrageiras do gênero *Brachiaria* conquistaram uma importância econômica significativa para o Brasil, mas existe falta de diversidade de sementes forrageiras no mercado, uma vez que 45% da área plantada e 60% da produção de sementes provem de *B. brizantha* cv. Marandu, enquanto 90% das sementes exportadas são de quatro cultivares de *Brachiaria* (Euclides et al., 2010), *B. ruziziensis*, *B. brizantha* e *B. decumbens* e *B. humidicola*. Esse fator pode colocar em risco todo o sistema de produção, caso ocorram alterações muito drásticas ao meio ambiente.

Além disso, a qualidade das sementes nem sempre é satisfatória (Pereira et al., 2011), pois a colheita é feita por varredura, processo que consiste em recolher do chão todas as sementes que caíram sobre a superfície do solo (José, 2009), comprometendo a pureza física das sementes.

2.2. Caracterização do gênero *Brachiaria*

O gênero *Brachiaria* tem seu centro de origem na África, sendo introduzido no Brasil no início do período colonial (Sendulsky, 1978). Compreende cerca de 100 espécies, distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais da África, Austrália e América do Sul (Seiffert, 1980; Renvoize et al., 1996; Valle et al., 2009). Foi descrito inicialmente por Trinius (1834) como uma subdivisão do gênero *Panicum*. Mais tarde, Grisebach (1853) descreveu esta subdivisão como gênero (Renvoize et al., 1996; Valle et al., 2011). A *Brachiaria* pertence à tribo Paniceae e à família Gramineae. De acordo com Bogdan (1977), as gramíneas desse gênero podem ser perenes ou anuais, cespitosas ou decumbentes.

As inflorescências são terminais do tipo panícula, composta de dois a cinco racemos, organizados de forma unilateral (Renvoize et al., 1996). Cada racemo sustenta uma série de espiguetas, que podem apresentar forma de oval a oblonga e serem sésseis ou subsésseis, solitárias e unisseriadas (Bogdan, 1977; Nunes, 1984). A espiguetas é constituída por duas flores. A hermafrodita possui três anteras e um pistilo, com apenas um ovário e um só óvulo. A flor estaminada apresenta três anteras e se difere da hermafrodita pela ausência do pistilo (Seiffert, 1980; Carneiro et al., 2003).

No gênero *Brachiaria*, ocorre desuniformidade no florescimento e na maturação. Além disso, ocorre degrana natural (Souza, 2001). As plantas forrageiras tropicais, em geral, não retêm por muito tempo as sementes maduras conectadas às inflorescências, devido ao rompimento de uma camada de abscisão que se forma abaixo das glumas. Esta ruptura acontece após a semente alcançar a maturidade, ou antes, se houver estresses bióticos ou abióticos (Souza, 1981; Souza, 2001). Todos estes fatores dificultam o período da colheita das sementes, podendo afetar a qualidade das mesmas.

O gênero *Brachiaria* apresenta dois modos de reprodução, um sexual, comum aos acessos diploides e outro apomítico facultativo, comum aos acessos poliploides,

sendo este último o mais frequente. A maioria das espécies do gênero *Brachiaria* caracteriza-se como poliploide e apomítica (Resende et al., 2008). Todas as espécies de *Brachiaria* também podem ser propagadas vegetativamente, embora esta forma de propagação, apesar de simples, seja impraticável em grandes extensões, prestando-se apenas aos cultivos em pequena escala (Hopkinson et al., 1996).

2.2.1. Caracterização da espécie *Brachiaria decumbens*

Brachiaria decumbens foi introduzida no Brasil em 1952, erroneamente como *B. brizantha*, na cidade de Belém - PA, pelo Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Norte (IPEAN). Anos mais tarde, plantas desta mesma espécie foram introduzidas, porém com o nome de cv. Ipean. Em 1930, um ecótipo de *B. decumbens*, originário da Uganda, foi levado para a Austrália e registrado como cv. Basilisk (Mackay, 1982). No ano de 1960, *B. decumbens* cv. Basilisk foi introduzida no Brasil, pelo Instituto de Pesquisas Internacionais (IRI) e, a partir de 1965, por incentivos governamentais e grandes quantidades de sementes importadas da Austrália, estabeleceu-se aqui um extenso monocultivo desta cultivar nos cerrados brasileiros (Valle et al., 2008; 2011). Atualmente, *B. decumbens* é cultivada principalmente na região central do Brasil.

B. decumbens cv. Basilisk é amplamente usada como pastagem nos trópicos, pois é adaptada a solos ácidos e pobres, é de fácil manejo e facilmente estabelecida por sementes. Além disso, produz uma forragem de alta qualidade que contribui para um bom desempenho animal (Keller-Grein et al., 1996; Valle et al., 2008). Entretanto, ela é susceptível à cigarrinha-das-pastagens e, devido a essa característica de susceptibilidade, viu-se a necessidade de desenvolver novas cultivares resistentes a esta praga, para substituir gradualmente as áreas de *B. decumbens* afetadas pelo inseto (Valério e Oliveira, 2005).

A espécie *B. decumbens* é constituída por plantas perenes, com hábito de crescimento semiereto, tipicamente decumbente, chegando a um metro de altura (Lascano e Euclides, 1996; Renovoize et al., 1996). O florescimento ocorre em dias longos de verão (janeiro-fevereiro), com maturação e colheita no cacho, a partir de fevereiro-março (Valle et al., 2011). Para a produção comercial de sementes, a colheita é feita por varredura, visto que este método é superior ao método do cacho,

pois neste último ocorre coleta de sementes imaturas e perda por degrana (Castro et al., 1994).

Segundo Renvoize et al. (1996), o gênero *Brachiaria* foi subdividido em 9 grupos. A espécie *B. decumbens* está inserida no Grupo 5, o qual contém mais cinco espécies africanas (*B. brizantha*, *B. dura*, *B. eminii*, *B. oligobrachiata*, *B. ruziziensis*). Neste grupo, estão incluídas as três espécies mais utilizadas como pastagens (*B. brizantha*, *B. ruziziensis* e *B. decumbens*). *B. decumbens* apresenta racemos dispersos ao longo de um eixo central. A ráquis pode ser larga ou estreita em forma de cinta. As espiguetas são únicas em pedicelos curtos, formando uma ou duas fileiras diferenciadas. Elas têm de 3,5 a 6,0 mm de comprimento, são túrgidas e podem apresentar forma oval ou oblonga (Sendulski, 1978). A gluma inferior é parecida com uma dobra e a lema superior é granulosa (Figura 1).

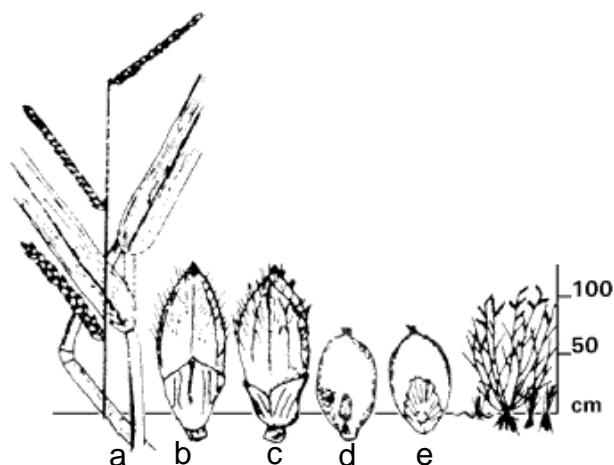


Figura 1 - Característica morfológica de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk. (Sendulski, 1977). a) ráquis com inflorescências e folhas de *B. decumbens*, b-e) espiguetas.

2.3. Biologia reprodutiva do gênero *Brachiaria*

Dois modos de reprodução são encontrados em *Brachiaria*, um sexual e outro apomítico facultativo, denominado aposporia (Valle e Savidan, 1996; Dall'Agnol e Schifino-Wittmann, 2005; Valle et al., 2008). Na reprodução sexual, a formação do gameta feminino (megagametogênese) ocorre por meiose normal da célula-mãe do megásporo, resultando em uma tétrade de células reduzidas, onde apenas uma sofre três mitoses, resultando em um saco embrionário do tipo *Polygonum* (oito núcleos). A célula-ovo, formada pela diferenciação dos oito núcleos, é fecundada e forma o embrião e os núcleos polares. Quando fecundados os

núcleos polares, dão origem ao endosperma da semente (Valle et al., 2008; Pereira et al., 2001).

Na megagametogênese, por via assexual, o saco embrionário apospórico, do tipo *Panicum*, se desenvolve a partir de uma célula somática ($2n$) no nucelo. A meiose ocorre, mas as quatro células reduzidas se degeneram e as células somáticas do nucelo sofrem mitoses sucessivas, produzindo sacos embrionários do tipo *Panicum*, com quatro núcleos: uma oosfera, duas sinérgides, e um núcleo polar. A oosfera não reduzida dá origem ao embrião por partenogênese (embrião é formado sem a fusão do gameta feminino com o masculino), reproduzindo o genótipo do embrião como o genótipo da planta-mãe (Pereira et al., 2001; Valle et al., 2008). De acordo com Ngendahayo (1988), em plantas apomíticas a fecundação do núcleo polar é necessária para a formação do endosperma. Logo, a apomixia é descrita como pseudogâmica. Alves et al. (2001) evidenciaram a pseudogamia em *B. brizantha*, por meio da análise citológica da fertilização núcleo polar, e determinaram o nível triploide do endosperma.

Em *Brachiaria*, a reprodução sexual gera variabilidade genética na progênie pela fusão de gametas femininos e masculinos, ambos reduzidos (n). Na apomixia, não é gerada variabilidade genética, pois a produção de embriões e de sementes viáveis é originária de uma oosfera não reduzida ($2n$), a qual contém exclusivamente os cromossomos somáticos maternos (Cabral et al., 2006). Dessa forma, a progênie das plantas apomíticas é exatamente uma réplica do parental feminino.

A apomixia é uma característica herdável (Grimanelli et al., 2001) e, com base na genética mendeliana, há indícios de que poucos genes controlam essa característica em *Brachiaria* (Dall’Agnol e Schifino-Wittmann, 2005). Para o caso de *Brachiaria*, ela é uma característica monogênica, dominante, sendo herdada como um único *locus* genético (Valle et al., 1994; Valle e Savidan, 1996).

2.4. Banco de germoplasma do gênero *Brachiaria*

Devido à necessidade de diversidade de pastagens tropicais, buscando desenvolver a variabilidade genética, foram realizadas, entre 1984 e 1985, viagens ao leste e ao sul da África para coletar genótipos de forrageiras. Essas viagens foram lideradas pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (Miles et al.,

1996). Parte da coleção do germoplasma que foi reunida constitui atualmente a coleção de trabalho da Embrapa Gado de Corte (Valle 1990).

A Embrapa Gado de Corte tem investido na sua coleção de forrageiras tropicais pela introdução, caracterização e melhoramento desde 1980 (Jank et al., 2011), mantendo o germoplasma conservado *ex situ* e utilizando constantemente seus genótipos em cruzamentos no programa de melhoramento (Valle et al., 2008). Atualmente, o banco de germoplasma de *Brachiaria* (BAG-*Brachiaria*) da Embrapa Gado de Corte possui 455 acessos (Valle et al., 2008), sendo 233 acessos de *B. brizantha*, 58 acessos de *B. humidicola*, 50 acessos de *B. ruziziensis* (Jank et al., 2011) e 44 acessos de *B. decumbens* (Ricci et al., 2011). A espécie *B. decumbens* contém 15 acessos diploides ($2n=18$), 27 acessos tetraploides ($2n=36$) e dois acessos pentaploides ($2n=45$ cromossomos) (Ricci et al., 2011).

De acordo com Borém e Miranda (2009), a caracterização e a documentação dos acessos são necessárias para que o melhorista possa identificar os genótipos potencialmente úteis no programa de melhoramento, explorando assim a diversidade genética disponível no banco de germoplasma.

2.5. Melhoramento genético do gênero *Brachiaria*

No Brasil, a partir da década de 80, em decorrência do processo de intensificação da produção pecuária, foram iniciados os primeiros programas de melhoramento de forrageiras. Hoje, o principal programa de melhoramento do gênero *Brachiaria* é desenvolvido pela Embrapa Gado de Corte (Valle et al., 2009b).

O desenvolvimento de novas cultivares de *Brachiaria* é muito importante. Atualmente, são poucas as variedades do gênero disponíveis para ocupar grandes áreas de pastagens, podendo causar a vulnerabilidade dos sistemas de produção (Macedo, 2006), como o ocorrido na década de 70 com a espécie *B. decumbens*, que foi dizimada na Amazônia pelo ataque da cigarrinha-das-pastagens (Valle et al., 2011). Segundo Araújo et al. (2008), a falta de variabilidade genética leva o ecossistema a grandes pressões sobre pragas e/ou doenças, o que pode levá-lo a eliminar uma variedade suscetível.

Nos programas de melhoramento de forrageiras, vários caracteres são avaliados: o rendimento de matéria seca total, a distribuição estacional e o valor nutritivo que envolve o consumo, palatabilidade e digestibilidade; a adaptação a

diversos ambientes em relação ao solo, clima e manejo; a persistência observada através da sobrevivência e do rendimento ao longo do tempo; a fixação de nitrogênio; o rendimento e qualidade das sementes; a resistência a pragas; e doenças e a compatibilidade e associação com outras espécies (Miles e Valle, 1994; Pereira, 1998).

No melhoramento de forrageiras, o interesse está na busca de um genótipo com melhor desempenho animal em relação à produção de carne e leite e com bom comportamento agrônômico. Neste caso, é importante avaliar a relação clima x solo x planta x animal (Pereira et al., 2001; Souza Sobrinho, 2005). De acordo com Valle et al. (2008), o maior objetivo do melhoramento de forrageiras é a criação e/ou a seleção de genótipos que respondam às demandas exigidas pelo mercado, solucionem problemas e corrijam as deficiências específicas das cultivares já existentes. Plantas com alta produtividade de sementes, valor nutritivo e resistência aos fatores bióticos e abióticos contribuem para o aumento e para a manutenção da produção das pastagens, que são essenciais para a produção de proteína de origem animal (Silva e Nascimento, 2006). Para que esse objetivo seja alcançado, é necessário definir as estratégias de melhoramento em relação à escolha dos métodos de melhoramento a serem utilizados e quais esquemas de cruzamentos devem ser realizados. Entretanto, alguns pré-requisitos devem ser observados, como a existência da variabilidade genética para os caracteres de interesse, o conhecimento do nível de ploidia, do modo de reprodução e da época de florescimento (Valle et al., 2008).

O principal método de melhoramento utilizado para as gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* consiste na avaliação e na seleção dos ecótipos naturais, por meio da exploração da variabilidade encontrada nos acessos introduzidos, principalmente os das savanas da África (Hacker e Jank, 1998; Valle et al., 2001). Segundo Valle et al. (2008), esse método de melhoramento visa à obtenção a curto prazo de cultivares superiores, pois se baseia apenas na avaliação da capacidade adaptativa dos materiais coletados na natureza. A maioria das cultivares de forrageiras existentes foram obtidas por este método (Araújo et al., 2008) como, por exemplo, as cultivares *B. brizantha* cv. Marandu, Xaraés, BRS Piatã, *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. humidicola* cv. BRS Tupi, entre outras (Valle et al., 2011).

Tanto no CIAT quanto na Embrapa Gado de Corte também é utilizado o método de seleção recorrente, no qual os híbridos sexuais obtidos do cruzamento da

planta sexual com a apomítica são selecionados e retrocruzados com a cultivar apomítica, até recuperar o genótipo da mesma com a característica introduzida. O melhoramento intrapopulacional recombina e seleciona os híbridos sexuais por várias gerações e, ao final, os cruza com uma planta apomítica elite, gerando, assim, uma nova cultivar apomítica (Valle et al., 2008). Esses dois métodos permitem a seleção de cultivares apomíticas e sexuais.

Tentativas de cruzamentos interplóidicos e interespecíficos foram realizadas entre *B. ruzizensis* sexual e diploide e *B. decumbens* apomítica tetraploide, embora sem sucesso (Ferguson e Crowder, 1974). Esse insucesso foi atribuído à diferença de ploidia entre os genitores. Hacker (1988) realizou cruzamentos entre plantas de *B. decumbens* (sexual e diploide x apomítica tetraploide), obtendo um híbrido triploide e estéril. Diante disso, sugeriu a duplicação dos cromossomos do híbrido obtido ou da planta sexual diploide para realizar os cruzamentos no nível tetraploide. Com a duplicação cromossômica das plantas sexuais diploides (Ndikumana, 1985; Ngendahayo, 1988; Simioni e Valle, 2009), tornou-se possível a realização dos cruzamentos interespecíficos e intraespecíficos, utilizando como genitores femininos as plantas sexuais duplicadas e as plantas apomíticas poliploides como genitores masculinos.

Em *B. ruzizensis* (planta sexual tetraploidizada artificialmente), os cromossomos foram duplicados, permitindo o cruzamento entre *B. ruzizensis* e *B. decumbens* e *B. brizantha* (plantas apomíticas tetraploides naturais) e desenvolvendo com sucesso os primeiros híbridos interespecíficos (Ndikumana, 1985).

Entre 2004 e 2007, a Embrapa Gado de Corte realizou a duplicação dos cromossomos de acessos sexuais diploides de *B. decumbens* com colchicina (Simioni e Valle, 2011), possibilitando o desenvolvimento de híbridos intraespecíficos, para tentar solucionar os problemas de incompatibilidade, fertilidade e recombinação genética (Hadley e Openshaw, 1980). Atualmente, das 100 espécies de *Brachiaria* existentes, apenas *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruzizensis*; desde 2005 *B. humidicola*; e, desde 2009, *B. decumbens*, são exploradas nos programas de melhoramento, pois já superaram as barreiras da poliploidia (Valle et al., 2008) por meio da duplicação do número de cromossomos dos acessos sexuais diploides (Pinheiro et al., 2000; Pereira et al., 2012).

2.6. Importância da apomixia para o melhoramento

A apomixia é um modo de reprodução interessante para o melhoramento de plantas, oferecendo várias vantagens, pois associa a fixação do vigor do híbrido com a propagação por sementes (Valle et al., 2004; Valle e Pagliarini, 2009a). Este modo de reprodução simplifica a produção de sementes híbridas comerciais, não havendo a necessidade de isolar a área semeada para evitar misturas com cruzamentos aleatórios, pois ela garante a pureza dos genótipos, uma vez que as progênies das plantas apomíticas são réplicas da planta-mãe (Hanna, 1987). Visto as plantas apomíticas não segregarem, a apomixia é considerada um método para a fixação de características desejáveis (Hanna, 1987).

Os híbridos apomíticos com características desejáveis são candidatos a se tornarem uma cultivar, podendo passar para as etapas finais de um programa de melhoramento, pois não perdem o vigor híbrido com a segregação. Isso reduz os custos e o tempo para o desenvolvimento de uma nova cultivar, facilita a multiplicação das sementes e, além disso, permite aos agricultores armazenar as próprias sementes para a próxima safra mantendo o vigor híbrido, que é normalmente perdido com o avanço das gerações devido a segregação (Grimanelli et al., 2001).

2.7. Resistência à degrana natural no gênero *Brachiaria*

A degrana natural que ocorre na maturação das plantas é uma característica importante de plantas selvagens, pois se trata de é um dos mecanismos mais relevantes de dispersão e distribuição das sementes, ou seja, este mecanismo não só aumenta a sobrevivência das plantas selvagens como também auxilia na distribuição das espécies (Delouche et al., 2007).

Em plantas selvagens, a degrana natural ocorre devido à formação de uma camada de abscisão na maturidade que permite as sementes caírem. Em plantas domesticadas, a camada de abscisão é suprimida ou o colapso é adiado até a colheita, o que promove a resistência à degrana. Acredita-se que o controle da supressão da abscisão das sementes está sob o controle de dois genes que se expressam muito cedo no processo de domesticação e podem ser encontrados em quase todas as populações de gramíneas (Harlan, 1992).

Burson et al. (1978) constataram em com duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Paspalum* que a degrana foi condicionada pela formação da camada de abscisão que se estende pelo pedicelo para a base da espiguetas. Segundo esses autores, foram descritos dois processos de abscisão das sementes: a desintegração de parte ou de todas as células da parede celular como resultado de mudanças bioquímicas e a abscisão mecânica.

A degrana, como observado em estudos anatômicos, ocorre logo após a antese e a utilização de reguladores de crescimento como, as auxinas, poderiam ser empregados para controlar esse processo de abscisão em plantas desde que aplicados no estágio certo e na concentração adequada (Burson, 1978).

A retenção das sementes nos racemos após a maturidade é uma característica que, em princípio, foi selecionada inconscientemente pelo homem, quando coletava apenas os grãos retidos na planta para a sua alimentação. Só mais tarde, com a domesticação e com o melhoramento genético, é que a resistência à degrana passou a ser selecionada de forma consciente, para facilitar a colheita e melhorar a qualidade e o rendimento de grãos (Delouche et al., 2007). De acordo com Burson (1983), foram feitas tentativas para aumentar a retenção das sementes nas inflorescências por meio do melhoramento e da seleção de plantas.

As gramíneas forrageiras não retêm por muito tempo as sementes unidas aos racemos após a maturidade. Assim, as sementes maduras ou sob estresse se desprendem do racemo caindo e se acumulando na superfície do solo ou em meio à palhada do capim (Souza, 2001). Young (1986) em seu trabalho com *Paspalum* verificou que as condições climáticas durante a maturação foi um fator que influenciou na taxa de abscisão das sementes, sugerindo que o ambiente influencia no processo da degrana natural.

As taxas elevadas de degrana natural resultam em perdas e baixa qualidade das sementes, sendo a maior limitação para uma produção consistente e de qualidade (Young, 1986). A qualidade das sementes está relacionada, principalmente, com a germinação, que é afetada pela dormência e pela colheita de sementes imaturas e com a pureza das mesmas, que é comprometida pela contaminação por sementes de constituição genética diferente, material inerte e patógenos (Castro et al., 1994).

Assim como em *Paspalum*, as sementes de *Brachiaria* amadurecem desuniformemente. Dessa forma, muitas sementes são colhidas imaturas, reduzindo,

assim, a qualidade e contribuindo para um aumento do preço (Burson, 1983). Isso explica o uso generalizado de colheita do chão para as espécies de braquiária comercializadas no Brasil e exportadas.

As plantas resistentes à degrana natural retêm presas aos racemos às sementes maduras, as quais podem ser colhidas todas juntas, aumentando a eficiência da colheita e, conseqüentemente, a produtividade, pois é possível aguardá-las até que todas ou a maioria das sementes de uma planta estejam maduras para realizar a coleta (Fuller e Allaby, 2009).

O melhoramento genético de *Brachiaria* possui grande interesse em cultivares resistentes à degrana, para a obtenção de maior quantidade e qualidade das sementes forrageiras, possibilitando, desta forma, a expansão e a renovação das áreas de pastagens no Brasil (Souza e Cardoso, 1995). Nos cruzamentos intraespecíficos, realizados com plantas da espécie *B. decumbens* após a tetraploidização dos acessos diploides (Simioni e Valle, 2011), foram encontrados híbridos que expressam a resistência à degrana natural, os quais foram selecionados para as avaliações citogenéticas.

2.8. Citogenética do gênero *Brachiaria*

Dentre os estudos básicos necessários aos programas de melhoramento de *Brachiaria*, a citogenética se mostra essencial, não apenas para a seleção de genitores compatíveis, como também para resolver problemas em relação à fecundidade (Valle et al., 2009b). A grande contribuição da citogenética para o melhoramento de *Brachiaria* tem sido a possibilidade de identificar problemas na meiose que implicam na viabilidade do pólen, comprometendo a produção de sementes (Valle et al., 2008).

As análises citogenéticas em *Brachiaria* foram iniciadas em 1940. Apesar da sua importância como gramínea forrageira, até hoje pouco se conhece sobre as características citogenéticas desse gênero (Pagliarini et al., 2007). Os estudos citogenéticos clássicos são baseados em contagem cromossômica, comportamento dos cromossomos na meiose e a viabilidade polínica.

Em 1998, iniciaram os trabalhos citogenéticos com *Brachiaria* no Laboratório de Citogenética Vegetal da UEM, em parceria com a Embrapa Gado de Corte. As análises citogenéticas, como a avaliação do comportamento cromossômico em

todas as fases da meiose e contagem do número de cromossomos, já foram realizadas nas espécies *B. decumbens* (Mendes-Bonato, et al., 2002a; Junqueira-Filho et al., 2003; Ricci et al., 2010; 2011), *B. brizantha* (Mendes-Bonato et al., 2002b; Riso-Pascotto et al., 2003a; Pagliarini et al., 2012a), *B. ruziziensis* (Riso-Pascotto et al., 2003b; 2005a), *B. dictyoneura* (Riso-Pascotto et al., 2005d), *B. humidicola* (Adamowski et al., 2007; Boldrini et al., 2011a), *B. jubata* (Mendes-Bonato et al., 2003; 2006a; Riso-Pascotto et al., 2005c), *B. nigropedata* (Utsunomiya et al., 2004; 2005), *B. dura* (Riso-Pascotto et al., 2009a) e *B. bovonei* (Riso-Pascotto et al., 2009b). Híbridos interespecíficos também foram analisados como os obtidos dos cruzamentos entre *B. ruziziensis* x *B. brizantha* (Riso-Pascotto et al., 2004a; 2004b; Mendes-Bonato et al., 2006c; Felismino et al., 2010; 2011; Fuzinato et al., 2007a; 2012) e *B. ruziziensis* x *B. decumbens* (Mendes-Bonato et al., 2007). Híbridos intraespecíficos de *B. decumbens* foram analisados por Souza (2013). Essas análises citogenéticas foram empregadas para avaliar o desempenho do processo meiótico em acessos e híbridos do banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, para auxiliar no direcionamento de cruzamentos e na escolha dos melhores híbridos.

2.8.1. Número cromossômico e comportamento meiótico

As espécies do gênero *Brachiaria* estão contidas em dois grupos de acordo com o número básico de cromossomos $x=7$ e $x=9$, prevalecendo $x=9$ na maioria das plantas estudadas (Darlington e Wylie, 1995; Bernini e Marin-Morales, 2001; Mendes-Bonato et al., 2002b). Também há registros de $x=6$ para *B. dictyoneura* (Riso-Pascotto et al., 2005d) e *B. humidicola* (Boldrini et al., 2010). Para a espécie *B. decumbens*, o número básico de cromossomos é $x=9$ (Pritchard, 1967).

As descrições citogenéticas da espécie *B. decumbens* mostraram diferentes níveis de ploidia dentro desta espécie (Quadro 1). Segundo Ricci et al. (2010), foram encontrados acessos diploides ($2n=2x=18$), tetraploides ($2n=4x=36$) e pentaploides ($2n=5x=45$) de *B. decumbens* na coleção de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, sendo os pentaploides incomuns na espécie. No gênero *Brachiaria*, os poliploides mais frequentes são os tetraplóides (Valle e Savidan, 1996; Penteado et al., 2000).

As plantas diploides de *B. decumbens* apresentam meiose regular com nove bivalentes (Miles et al., 1996). Ricci et al. (2011) observaram que as taxas de anormalidades em diploides de *B. decumbens* foram baixas em comparação com as plantas poliploides (tetraploides e pentaploides). Pritchard (1967) registrou meiose irregular em tetraploides de *B. decumbens*, assim como a presença de cromossomos retardatários e associações cromossômicas uni, tri e quadrivalentes. Segundo Valle et al. (2008), a formação de uni, tri e quadrivalentes, em vez de bivalentes durante a meiose, é decorrente da poliploidia e pode resultar em gametas com número de cromossomos desbalanceados.

Quadro 1 - Número de cromossomos em espécies *B. decumbens* (x =número básico de cromossomos da espécie)

Espécie	x	Ploidia	$2n$	Referências
<i>B. decumbens</i>	9	2	18	Valle e Glienke, 1991 Ricci et al., 2011
	9	4	36	Pritchard, 1967 Ndikumana, 1985 Valle, 1986 Mendes-Bonato et al., 2001 Risso-Pascotto et al., 2002 Ricci et al., 2011
	9	5	45	Ricci et al., 2010 Ricci et al., 2011

A análise de uma planta tetraploide de *B. decumbens* cv. Basilisk, coletada na Universidade Estadual de Maringá, revelou em diacinese associações uni, bi e quadrivalentes, prevalecendo as bivalentes. Também foi observada, tanto na meiose I quanto na II, segregação irregular dos cromossomos, que levou à formação de micronúcleos nas tétrades (Mendes-Bonato et al., 2001a). As associações cromossômicas uni, bi e quadrivalentes também foram encontradas em tetraploides artificiais de *B. decumbens*, além das irregularidades na segregação dos cromossomos a partir da prófase I até o final da meiose (Simioni e Valle, 2011).

As irregularidades meióticas mais frequentes observadas nas espécies do gênero *Brachiaria* são: migração precoce dos cromossomos para os polos em metáfase I e II, cromossomos retardatários em anáfase I e II e micronúcleos nas telófases I e II e nas tétrades de micrósporos (Risso-Pascotto et al., 2003a; Risso-Pascotto et al., 2004a; 2004b; Ricci et al., 2011; Mendes-Bonato et al., 2006b; Valle

et al., 2008; Mendes-Bonato et al., 2009; Risso-Pascotto et al., 2009a; 2009b; Boldrini et al., 2011b; Pagliarini et al., 2012a). Também foram constatadas pontes de aderência cromossômica durante a anáfase I e II (Mendes-Bonato et al., 2001a; 2001b; Boldrini, et al., 2011a; 2011b; Simioni e Valle, 2011; Pagliarini et al., 2012a) e assincronia do genoma na metáfase I e II (Simioni e Valle, 2011).

De acordo com Valle e Pagliarini (2009), o comportamento irregular dos cromossomos durante a meiose leva à formação de micronúcleos em um ou mais micrósporos da tétrade, que podem permanecer no micrósporo após a dissolução da parede de calose podendo causar a esterilidade do pólen. No entanto, os micronúcleos podem ser eliminados por citocinese adicional formando micrócitos (Pagliarini et al., 2012b) eliminando cromossomos e formando as políades.

2.9. Viabilidade do pólen

A viabilidade polínica e o desenvolvimento dos grãos de pólen são fundamentais para o estudo da biologia reprodutiva e para o melhoramento genético de plantas (Flanklin et al., 1995). A análise da viabilidade do pólen é uma condição preliminar e indispensável para os programas de melhoramento (Dantas et al., 2005), pois grãos de pólen com altas taxas de viabilidade asseguram o sucesso nas hibridações (Einhardt et al., 2006). Segundo Techio et al. (2006), a eficácia dos cruzamentos tanto interespecíficos quanto intraespecíficos depende diretamente da viabilidade do pólen.

A viabilidade do grão de pólen pode variar bastante ao longo do seu desenvolvimento. Por exemplo, na abertura da flor, o grão de pólen é plenamente viável e, à medida que o tempo avança, a viabilidade vai diminuindo, reduzindo a sua eficiência na fertilização (Souza et al., 2002). Além disso, fatores como o período de florescimento, as alterações ambientais, os fatores bióticos e abióticos e as diferenças genótípicas podem afetar a fertilidade do pólen (Techio et al., 2006).

Existem diversos métodos para determinar a viabilidade polínica: os métodos diretos, como a indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro*, e os métodos indiretos pela coloração (Shivanna e Johri, 1989; Dafni, 1992), cada um deles com as suas vantagens e desvantagens (Ramos et al., 2008). Os testes que utilizam corantes químicos são utilizados quando se deseja fazer uma avaliação rápida do pólen que pode estar armazenado ou recém liberado da antera (*in vivo*). A coloração

é um procedimento simples e barato, porém não fornece informações sobre a capacidade germinativa do pólen (Peñaloza, 2005). Os corantes reagem com os constituintes celulares presentes no pólen maduro, conferindo uma coloração característica e diferenciando os grãos de pólen viáveis e inviáveis. O corante carmim propiônico cora mais intensamente núcleos do que citoplasma (Gerlach, 1858). Dessa forma, promove diferenças na coloração dos grãos de pólen, em relação à presença de ácidos nucleicos (DNA e RNA), corando fortemente apenas grãos de pólen funcionais, ou seja, com presença de DNA e RNA.

Não existe na literatura a descrição de um corante universal para testar a viabilidade do pólen (Techio et al., 2006). Entretanto, os corantes nucleares não são indicados para espécies cujo grão de pólen apresente parede celular espessa, pois isso dificulta a penetração do corante e, conseqüentemente, a coloração (Alexander, 1969). Portanto, se o corante não for adequado para a espécie em estudo, o material pode ser analisado equivocadamente (Techio et al., 2006). Galetta (1983) considera que os testes realizados utilizando corantes superestimam a porcentagem de fertilidade do pólen, enquanto os testes de germinação *in vitro* a subestimam. Isso porque nenhum teste é completamente satisfatório (Stanley e Linskens, 1974), visto que muitos fatores estão envolvidos na fertilidade do pólen.

A viabilidade do pólen foi testada por meio de métodos histoquímicos para muitas espécies de gramíneas, como *P. purpureum* e *P. glaucum* (Techio et al., 2006), *Trifolium pratense* (Simioni et al., 2006), *Paspalum notatum* (Dahmer et al., 2006), *Eragrostis plana* Nees, (Piccinini et al., 2010), *Mesosetum chaseae* (Silva et al., 2010). Para o gênero *Brachiaria*, avaliações da viabilidade polínica utilizando o corante carmim propiônico já foram realizadas para várias espécies. Em plantas sexuais diplóides de *B. brizantha*, Araújo et al. (2007) observaram de 80 a 84% de viabilidade polínica. Em tetraploides artificiais de *B. decumbens* Simioni e Valle (2011) encontraram uma média de 63% de polens inviáveis. Em híbridos interespecíficos, produzidos pelos cruzamentos entre as espécies *B. ruziziensis* e *B. brizantha*. Felismino et al. (2011) constataram que a viabilidade do pólen foi de 88,4% para o híbrido Hb331 de 62,9% para o Hb336. Souza (2013), analisando híbridos intraespecíficos de *B. decumbens*, encontrou taxas de polens inviáveis maiores que 80%.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Neste trabalho, foram avaliados citogeneticamente 27 híbridos de *B. decumbens* resistentes à degrana natural, produzidos a partir dos cruzamentos entre os genótipos tetraploides sexuais D24/27 e D24/45 e o genótipo apomítico D62 (Quadro 2).

As duplicações cromossômicas do acesso D24 ($2n = 2x = 18$) foram realizadas entre 2004 e 2007, a partir de um acesso sexual diploide de *B. decumbens*, produzindo plantas sexuais tetraplóides ($4x$) D24/2, D24/27 e D24/45 (Simioni e Valle 2011) que foram utilizadas como parental feminino no cruzamento com uma planta apomítica tetraploide, o acesso D62 ($2n = 4x = 36$), cultivar Basilisk. A partir dos cruzamentos, originou-se uma população base de 457 híbridos intraespecíficos de *B. decumbens*, implantada no campo experimental da Embrapa Gado de Corte em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul, coordenadas geográficas latitude de 20° 25' 03" e longitude de 54° 42' 20" e solo do tipo Latossolo Roxo Álico. Da população base, foram selecionados 27 híbridos, por serem resistentes à degrana natural e por possuírem características agronômicas de interesse para a Embrapa Gado de Corte.

No período de florescimento das plantas, as inflorescências de cada híbrido ainda envolvido pela folha bandeira, foram coletadas e fixadas em álcool etílico: clorofórmio: ácido propiônico na proporção 6:3:2 por 24 horas. Após este período, as inflorescências foram lavadas com álcool 70% e, em seguida, armazenadas em frascos de plásticos, contendo álcool 70% em geladeira a 4°C até a realização das análises meióticas. Para a análise da viabilidade polínica, as inflorescências foram coletadas no período de antese e armazenadas no freezer em álcool 70%.

Os cruzamentos, a determinação do modo de reprodução, a condução e a seleção dos híbridos a campo foram realizadas pela Embrapa Gado de Corte. As análises citogenéticas foram realizadas no Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Estadual de Maringá.

Quadro 2 - Lista dos híbridos de *B. decumbens* selecionados quanto à resistência à degrana para a realização das avaliações citogenéticas neste trabalho

Híbrido	Modo de reprodução	Genitor feminino	Genitor masculino
R158	Apomítico	D24/27	D62
R 161	Sexual	D24/27	D62
R163	Sexual	D24/27	D62
R165	Sexual	D24/27	D62
R167	Sexual	D24/27	D62
R168	Apomítico	D24/27	D62
R169	Apomítico	D24/27	D62
R171	Sexual	D24/27	D62
R176	Apomítico	D24/27	D62
R177	Apomítico	D24/27	D62
R179	Apomítico	D24/27	D62
R181	Sexual	D24/27	D62
R184	Apomítico	D24/27	D62
R187	Apomítico	D24/27	D62
R189	Apomítico	D24/27	D62
R193	Sexual	D24/27	D62
S47	Sexual	D24/27	D62
S48	Apomítico	D24/27	D62
T87	Apomítico	D24/27	D62
X113	Apomítico	D24/45	D62
X119	-	D24/45	D62
X122	Sexual- estéril	D24/45	D62
Y21	Sexual	D24/45	D62
Y22	Apomítico	D24/45	D62
Y23	Apomítico	D24/45	D62
Z8	Apomítico	D24/45	D62
Z9	Sexual	D24/45	D62

3.2. Análise do comportamento meiótico para os híbridos

Para a análise do comportamento meiótico, as lâminas da microsporogênese foram confeccionadas, usando três anteras da mesma flor hermafrodita por lâmina, sendo que cada flor foi escolhida aleatoriamente. Os microsporócitos foram preparados pela técnica de esmagamento e a coloração foi realizada com carmim propiônico a 1%. As análises foram realizadas sob microscopia de luz.

Para cada híbrido, foram analisadas 100 células em cada fase da meiose, compreendidas entre a diacinese e a tétrade, amostradas em flores de diferentes

pontos da inflorescência. As associações cromossômicas foram analisadas na fase de diacinese e a contagem do número de cromossomos em anáfase I.

3.3. Análise das tétrades de micrósporos

Para a análise do produto final da meiose, as lâminas foram confeccionadas, usando três anteras da mesma flor hermafrodita por lâmina, sendo que cada flor foi escolhida aleatoriamente. Cada lâmina foi considerada uma repetição, totalizando cinco repetições por híbrido. Para cada lâmina, foi estipulada a contagem de 100 células. As tétrades de micrósporos foram preparadas pela técnica de esmagamento e coloração com carmim propiônico a 1% e analisadas sob microscopia de luz.

3.4. Análise da viabilidade polínica

Para a análise polínica, as lâminas foram preparadas usando três anteras da mesma flor hermafrodita por lâmina, sendo que cada lâmina foi considerada uma repetição, totalizando cinco repetições por híbrido. Para cada lâmina foi estipulada a contagem de 100 grãos de pólen.

A coloração dos grãos de pólen foi realizada com carmim propiônico a 1%. A escolha do referido corante foi devido ao fato de que o mesmo é usado nas análises citogenéticas, principalmente em estudos da meiose.

A contagem dos grãos de pólen foi realizada em microscópio óptico comum. Os grãos de pólen analisados foram classificados em dois grupos: 1) polens viáveis bem corados e 2) polens inviáveis, com coloração mais fraca ou murchos e não corados.

3.5. Análise estatística

As anormalidades meióticas encontradas nos microsporócitos, entre as fases metáfase I e telófase II, foram estimadas por cálculos de porcentagens.

A análise do produto final da meiose e da viabilidade polínica e os dados de tétrades de micrósporos anômalas e de grãos de pólen inviáveis, obtidos em porcentagem (%) para cada uma das cinco repetições, foram transformados por apresentarem natureza binomial por meio da função arco-seno, aplicando-se a raiz quadrada (\sqrt{x}) da proporção de tétrades anormais. Em seguida, os dados foram

submetidos à análise de variância, utilizando o programa SAS 9.2 (Sas Institute, 2009).

As porcentagens médias obtidas pelo programa SAS 9.2 (Sas Institute, 2009) foram comparadas por meio da aplicação do teste de comparação de médias *Scott-Knott*, ao nível de 5 % de probabilidade de erro, utilizando o programa GENES (Cruz, 2001).

3.6. Documentação fotográfica

As anormalidades mais representativas nas fases da meiose, as tétrades irregulares e as lâminas de grãos de pólen foram fotografadas no microscópio de captura OLYMPUS CX 31, com câmera acoplada SC 30, por meio do software AnalySIS getIT, com aumento de 100x e 400x.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Contagem cromossômica e associações

A contagem cromossômica das lâminas que continham os microsporócitos revelou que os 27 híbridos analisados são tetraplóides ($2n=4x=36$) (Figura 2), derivados de $x=9$, assim como os seus genitores, o acesso D24/27 e D24/45 (Simioni e Valle, 2011) e o acesso D62 (Mendes-Bonato 2001a; 2002a).

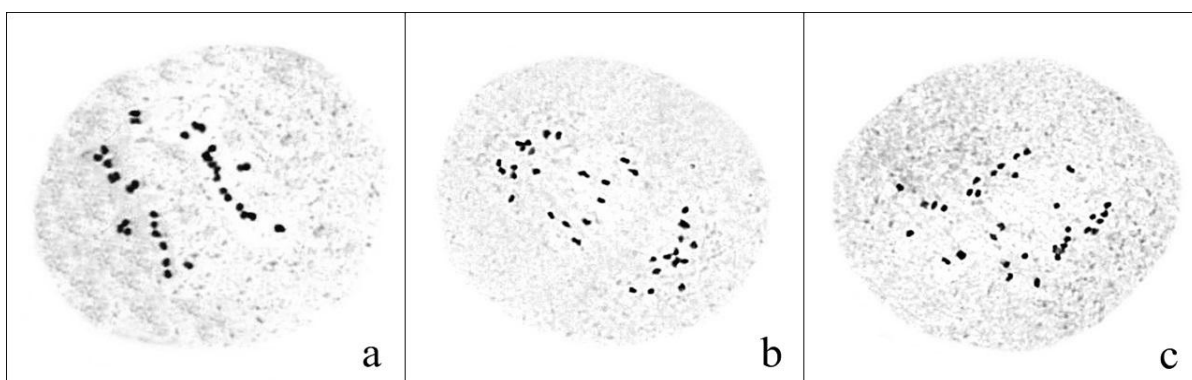


Figura 2 - Caracterização do número de cromossomos dos híbridos de *Brachiaria decumbens*: a-c) meiócitos em anáfase I, apresentando 36 cromossomos ($2n=4x=36$) (aumento 400x).

A poliploidia é frequente em *Brachiaria*, como pode ser observado em vários trabalhos citogenéticos realizados com as espécies do banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte. Foram encontrados acessos de *B. brizantha* diploide, tetraploides e hexaploides (Mendes-Bonato et al., 2001a; 2001b; 2002b; Pagliarini et al., 2012a), acessos de *B. humidicola* hexaploides, heptaploides e nonaploides (Boldrini et al., 2006a; 2011a; 2011b) e inclusive o acesso de *B. decumbens* tetraploide, D62 (Mendes-Bonato et al., 2001a; 2002a; Junqueira-Filho et al., 2003) e pentaploides (Ricci et al., 2010; 2011).

A poliploidia está normalmente associada ao modo de reprodução apomítico das espécies (Pereira et al., 2001) e, no gênero *Brachiaria*, predominam as espécies poliploides e apomíticas (Araújo et al., 2008). A apomixia, por muito tempo, foi considerada uma barreira para o melhoramento, mas hoje é apreciada e muito importante, pois, com a reprodução apomítica, o vigor do híbrido pode ser fixado imediatamente. Além disso, a apomixia confere maior competitividade ao genótipo,

facilitando a colonização do habitat e facilita ainda a multiplicação de sementes (Savidan, 1986). A pastagem formada com cultivar apomítica é de fácil manejo por ser homogênea.

Os híbridos avaliados citogeneticamente no presente trabalho apresentaram reprodução sexual e apomítica, predominando a apomítica. Quinze híbridos são apomíticos, dez apresentam reprodução sexual e para dois híbridos (X119 e X122) não foi possível identificar com precisão o modo de reprodução, pois as flores em antese não apresentaram a qualidade necessária para análise (Quadro 2).

A variabilidade genética das plantas apomíticas pode ser explorada com a descoberta de plantas sexuais na mesma espécie (Hanna et al., 1973). Assim, foi possível o desenvolvimento de híbridos apomíticos superiores, por meio de cruzamentos com plantas sexuais, como, por exemplo, os híbridos interespecíficos originários de cruzamentos entre plantas sexuais tetraploidizadas artificialmente, como a *B. ruziziensis*, com plantas apomíticas tetraplóides de *B. brizantha* (Felismino et al., 2010; Felismino et al., 2011) e os híbridos intraespecíficos de *B. decumbens*, avaliados por Souza (2013).

Os microsporócitos observados em diacinese nos 27 híbridos apresentaram diferentes tipos de associações cromossômicas, como univalentes, bivalentes e quadrivalentes, indicados pelas setas na Figura 3. Associações em uni, bi, tri e quadrivalentes também foram encontradas para o genitor masculino destes híbridos, o D62 (Mendes-Bonato et al., 2001a; 2002a; Junqueira et al., 2003), enquanto para os genitores femininos D24/27 e D24/45 prevaleceram associações em bi e quadrivalentes (Simioni e Valle, 2011).

De acordo com White (1977), em uma planta tetraploide podem ser encontradas associações em quadrivalentes, trivalentes, bivalentes e univalentes. Contudo, a ocorrência de baixa frequência de quadrivalentes em diacinese para um genoma tetraploide sugere aloploidia segmentar, em que alguns conjuntos de cromossomos são homólogos e outros compartilham de menor grau de homologia (Sybenga, 1996). Entretanto, isso não significa dizer que um aloploidio formará somente bivalentes (White, 1977). Como pode ser observado nas avaliações citogenéticas de híbridos interespecíficos de *B. ruziziensis* x *B. brizantha*, analisados por Felismino et al. (2011), estes híbridos apresentaram associações em bivalentes e quadrivalentes. A homologia parcial dos genomas também pode ser observada nos trabalhos citogenéticos realizados por Mendes-Bonato (2001a), com plantas de

B. decumbens, coletadas no campus da Universidade Estadual de Maringá, e também por Mendes-Bonato et al. (2002), analisando *B. decumbens* cv. Basilisk.

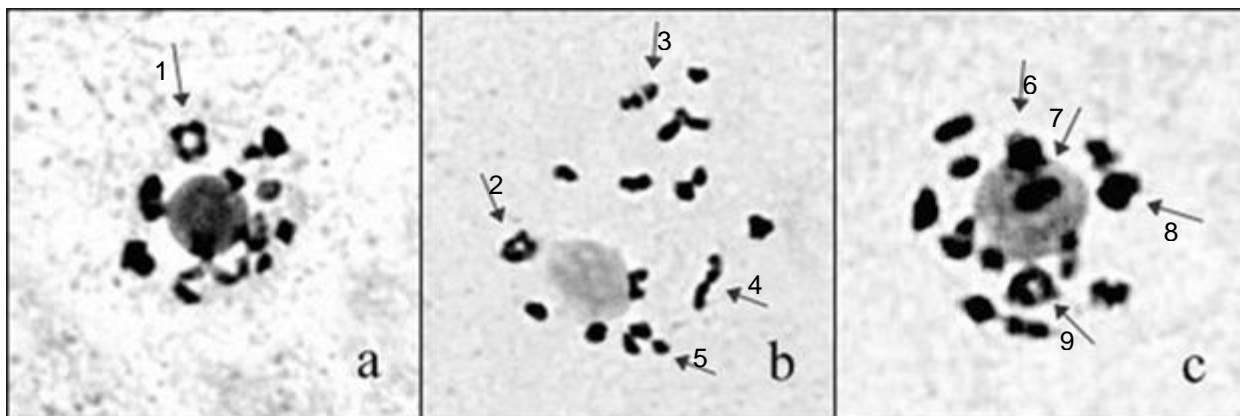


Figura 3- Diacinese demonstrando o comportamento meiótico dos híbridos tetraploides ($2n=4x=36$) de *Brachiaria decumbens*: a) tetraivalentes em anel (seta 1); b) univalentes (setas 3 e 5), bivalentes, tetraivalente em anel (seta 2) e em cadeia (seta 4); c) tetraivalentes em anel (setas 6, 7, 8, 9) (aumento 400x).

Em diacinese, também foram observados os dois tipos principais de quadrivalentes, em forma de anel (Figura 3 a, b, c) e em cadeia (Figura 3b seta 4), para todos os híbridos analisados, mas com menor frequência os quadrivalentes em cadeia. Nos quadrivalentes em anel, os quatro cromossomos se ligam por quiasmas com seus cromossomos vizinhos, sendo comum que cada dois centrômeros se orientem para cada pólo. Já nos quadrivalentes em cadeia, a orientação pode ser menos regular, por exemplo, três centrômeros indo para um pólo e somente um se deslocando para o outro pólo (White, 1977).

As associações cromossômicas em diacinese são consideradas um excelente método para conhecer a relação entre os genomas de um determinado cruzamento (Pagliarini, 2001), mas, nestas análises, não foi encontrado um número suficiente de células que confirmassem esse pareamento cromossômico para os híbridos analisados.

4.2. Comportamento cromossômico

A ocorrência de irregularidades meióticas em células-mãe de grão de pólen está relacionada com o nível de ploidia das espécies, com o comportamento e com a distribuição dos cromossomos nas fases que precedem a formação do produto meiótico (Pagliarini, 2001; Soares-Scott et al., 2005).

Nas Figuras 4 e 5, estão apresentadas as anormalidades observadas nas duas divisões meióticas, sendo que as mais frequentes foram aquelas relacionadas com a segregação irregular dos cromossomos, como a migração precoce para os pólos em metáfase I (Figura 4 a-c) e metáfase II (Figura 5 b-c-d), cromossomos retardatários em anáfase I (Figura 4 d-f) e anáfase II (Figura 5 e-f), além da presença de micronúcleos nas prófases II (Figura 5 a), telófases I (Figura 4 g-i) e telófase II (Figura 5 g-i). Essa segregação irregular dos cromossomos pode ocorrer geralmente por falhas na sinapse, ou na formação de quiasmas, ou ainda pela terminalização tardia de quiasma, que levam à formação de cromossomos univalentes, que ascendem, precocemente, em metáfase ou, tardiamente, em anáfase (White, 1977; Pagliarini, 2001).

As mesmas irregularidades observadas nos 27 híbridos de *B. decumbens*, avaliadas no presente trabalho, também foram evidenciadas nos genitores D24/27 e D24/45 (Simioni e Valle et al., 2011) e D62 (Mendes-Bonato et al., 2001a; 2002a). Souza (2013). Em acessos poliploides de *B. brizantha* (Mendes-Bonato et al., 2002b) e *B. humidicola* (Boldrini et al., 2011a), também foram constatados problemas com relação à segregação dos cromossomos, como migração precoce em metáfase I e II, retardatários em anáfase I e II e a formação de micronúcleos, em telófases e tétrades.

Os micronúcleos formados nas telófases I (Figura 4 g-i) e prófases II (Figura 5 a) são decorrentes da segregação irregular dos cromossomos nas metáfases I e anáfases I. Apesar da grande quantidade de cromossomos retardatários em anáfase I, a maioria destes chega a tempo de ser incluído no núcleo, durante a telófase I, pois, para a maioria dos híbridos, esta fase apresentou porcentagens médias de anormalidades, variando de 20% a 60%, juntamente com a prófase II (Quadro 3). Os micronúcleos em telófases II (Figura 5 g-i) foram originados da segregação irregular de cromossomos na metáfase II e anáfase II.

A frequência de anormalidades observadas na meiose foi variável entre as fases nos híbridos analisados (Quadro 3). Na metáfase I, telófase I e prófase II ocorreram as menores porcentagens de irregularidades cromossômicas, exceto para o híbrido R187, que apresentou 60% de suas células com segregação irregular em metáfase I, 99% de micronúcleos em telófase I e 92% em prófase II. As fases mais afetadas com irregularidades foram anáfase I, metáfase II, anáfase II e telófase II (Quadro 3). A porcentagem de micronúcleos nas telófases II variou de 58 a 100%,

sendo que os híbridos com menor índice de micronúcleos, nessa fase, foram R158, R161, R165, Y23 e Z8 (Quadro 3).

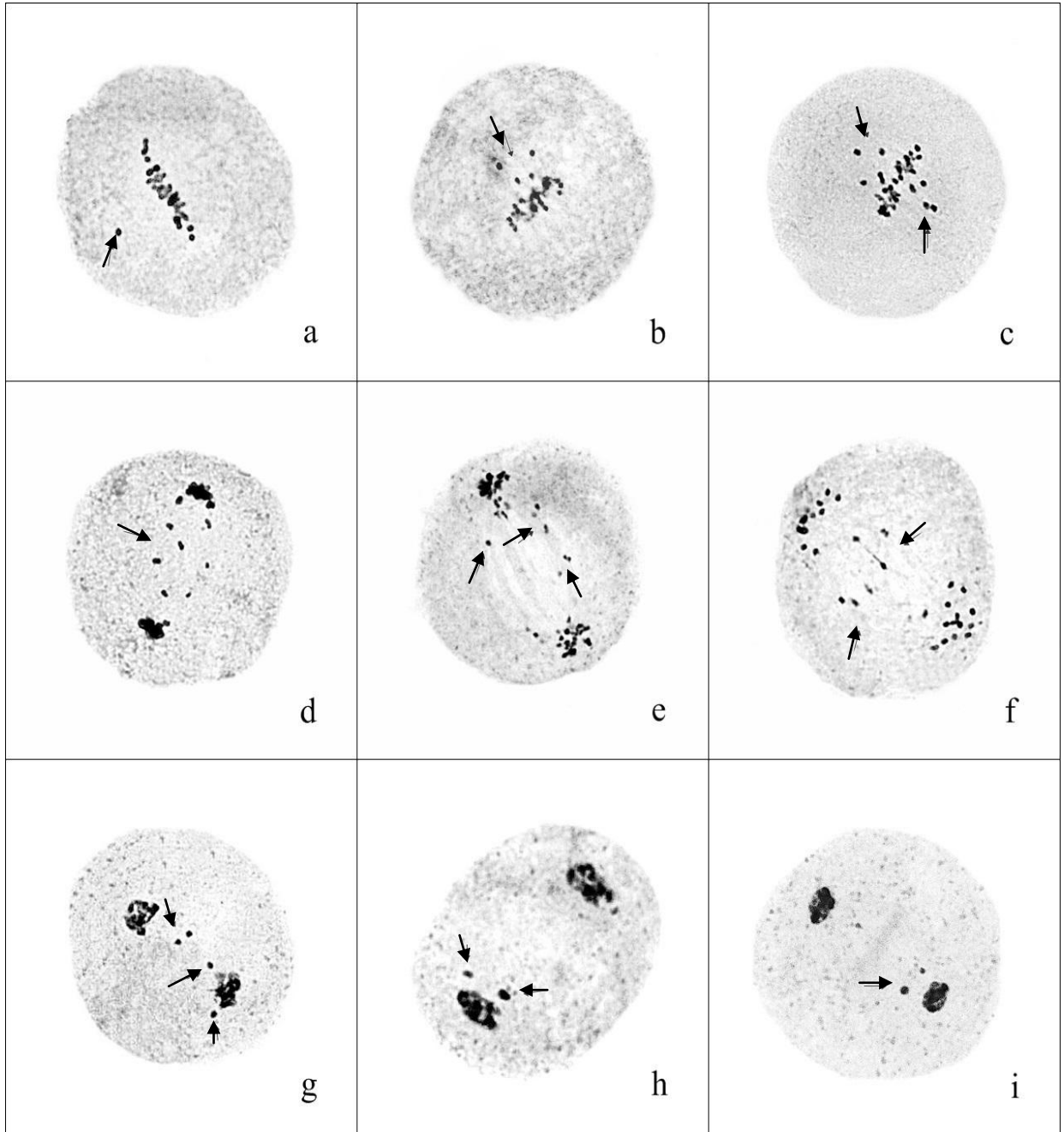


Figura 4 - Segregação irregular dos cromossomos na meiose reducional dos híbridos tetraploides de *Brachiaria decumbens*: a-c) meiócitos em metáfase I com cromossomos em ascensão precoce para os polos (setas); d-f) meiócitos em anáfase I com cromossomos retardatários (setas); g-i) meiócitos em telófase I com micronúcleos (setas) (aumento 400x).

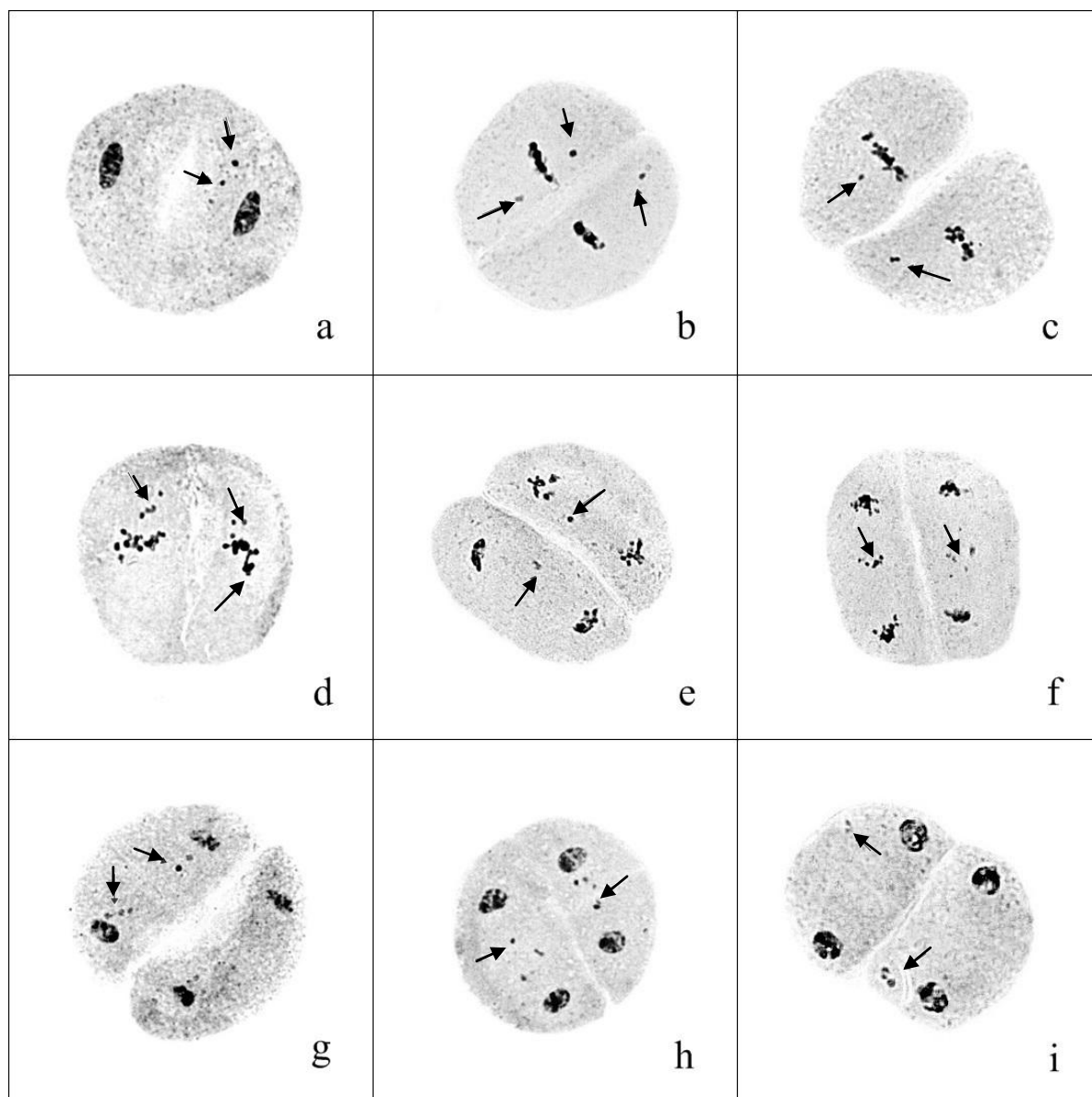


Figura 5 - Segregação irregular dos cromossomos na meiose equacional dos híbridos tetraploides de *Brachiaria decumbens*: a) meiócitos em prófase II com micronúcleos (setas); b-d) meiócitos em metáfase II com cromossomos em ascensão precoce para os polos (setas); e-f) meiócitos em anáfase II com cromossomos retardatários (setas); g-i) meiócitos em telófase com micronúcleos (setas) (aumento 400x).

As irregularidades cromossômicas que ocorrem na meiose são mais preocupantes no final do ciclo, pois os cromossomos que não conseguiram se associar para formar o núcleo irão formar micronúcleos que podem ser eliminados por uma citocinese adicional. Geralmente, as telófases II anormais resultam em tétrades anormais e, conseqüentemente, geram gametas anômalos, como pode ser observado para os resultados encontrados nos trabalhos de Risso-Pascotto et al. (2004a), Boldrini et al. (2011a) e Ricci et al. (2010; 2011).

Alguns trabalhos citogenéticos com *Brachiaria* evidenciam que as anormalidades cromossômicas encontradas na meiose podem levar à formação de gametas inférteis (Boldrini et al., 2006a; Mendes-Bonato et al., 2001a; 2004; 2006c; 2007; Mendes-Vieira et al., 2005; Risso-Pascotto et al., 2003b; 2005a; 2005c; Fuzinato et al., 2007b; Felismino et al., 2008; 2010; Ricci et al., 2010; 2011; Souza-Kaneshima et al., 2010; Pagliarini et al., 2012a; 2012b).

A frequência de anormalidades pode ser comprometida por qualquer alteração nos genes que regulam o processo meiótico (Gottschalk e Kaul, 1974; Mercier e Grelon, 2008) e também por fatores ambientais (Fuzinato, 2008; Felismino et al., 2011), como luz, temperatura, salinidade e adubação do solo (Sun et al., 2004), pois a meiose é o estágio mais sensível do ciclo de vida das plantas (Saini, 1997). Dessa forma, seria desejável realizar análises citogenéticas das inflorescências dos híbridos, coletados em vários anos, para maior confiabilidade dos resultados apresentados.

A alta incidência de cromossomos em ascensão precoce e cromossomos retardatários pode ser consequência de assincronia de genomas. Como pode ser observado nas Figuras 6 e 7, houve alta frequência de cromossomos fora da placa equatorial em metáfase I (Figura 6 a-b), bem como muitos cromossomos retardatários em anáfase I (Figura 7 c-d) e anáfase II (Figura 7 a-b). Isso indica que os genomas dos parentais não apresentam o mesmo ritmo meiótico, levando à formação de micronúcleos de vários tamanhos nas telófases I (Figura 6 e-f) e telófases II (Figura 7 c-d), que podem resultar na eliminação de cromossomos e, conseqüentemente, na perda de genes importantes (Pagliarini et al., 2012a).

O comportamento cromossômico, para os 27 híbridos estudados neste trabalho, sugere que os genomas destes podem ser parcialmente aloploidos. Isso pode ser explicado com base na procedência dos genitores que deram origem aos 27 híbridos avaliados. O genitor feminino é sexual e autotetraploide artificial, oriundo da duplicação do genoma com uso de colchicina (Simioni e Valle, 2011). Entretanto, o genitor masculino é apomítico e tetraploide natural, sendo possivelmente originado por cruzamentos espontâneos na natureza. Problemas relacionados com essa diferença no ritmo da meiose têm sido frequentemente relatados entre híbridos interespecíficos tetraploides de *Brachiaria* (Adamowski et al., 2008; Souza-Kaneshima et al., 2010).

Quadro 3 - Porcentagem de células anormais observadas durante a meiose dos 27 híbridos de *Brachiaria decumbens* avaliados

Híbrido	Cromossomos				Micronúcleo		
	Precoces		Retardatários		TI	PII	TII
	MI	MII	AI	AII			
R158	30	7	66	83	24	17	70
R161	10	19	60	70	20	30	68
R163	48	45	83	97	33	14	89
R165	17	30	57	81	49	27	75
R167	30	45	76	90	50	21	88
R168	70	71	96	85	58	50	88
R169	35	61	94	98	73	50	95
R171	50	84	95	100	45	21	96
R176	30	51	85	96	60	25	97
R177	25	73	77	100	32	35	97
R179	38	60	77	91	66	47	82
R181	40	68	80	92	50	55	80
R184	30	62	57	89	51	33	94
R187	60	99	99	100	99	92	100
R189	60	89	97	100	55	70	100
R193	72	90	50	91	53	56	88
S47	51	78	94	94	52	50	86
S48	70	82	73	99	60	61	100
T87	40	70	77	90	53	50	96
X113	57	79	56	86	55	68	80
X119	60	78	87	95	65	50	87
X122	56	94	72	90	30	25	79
Y21	43	84	62	90	48	53	88
Y22	42	70	64	69	43	44	80
Y23	60	84	57	88	28	35	58
Z8	30	57	47	86	19	37	65
Z9	56	71	53	84	36	34	95
Médias	44,8	66,7	73,7	90,1	48,4	42,6	86,0

MI e MII = Metáfase I e II; AI e AII = Anáfase I e II; TI e TII = Telófase I e II; PII = Prófase II.

As principais anormalidades encontradas nos produtos finais da meiose foram micronúcleos em um, dois, três e quatro micrósporos (Figura 8), micrócitos (Figura 9. a-c) e políades (Figura 9 d-f), que são provavelmente consequência das irregularidades segregacionais observadas nas fases anteriores.

de grandes micronúcleos (setas) (aumento 400x).

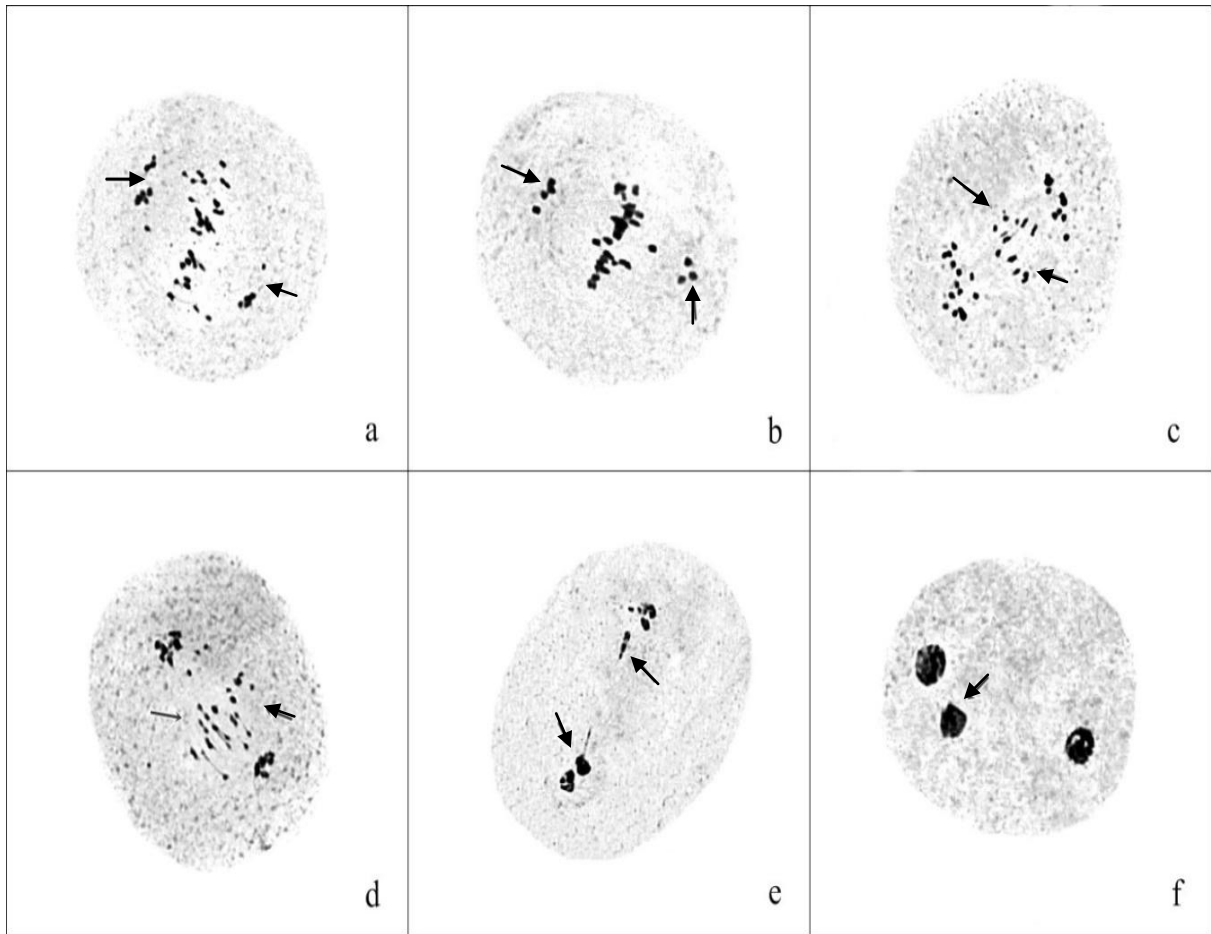


Figura 6 - Assincronia de genomas durante a meiose reducional dos híbridos tetraploides de *Brachiaria decumbens*: a-b) metáfase I, com os cromossomos ainda migrando para a placa metafásica (setas); c-d) anáfase I apresentando parte do genoma em metáfase I (setas); e-f) telófase I com a formação.

Segundo Risso-Pascotto et al. (2003a), os micronúcleos, em um ou mais micrósporos (Figura 8), correspondem à consequência citológica mais comum da segregação irregular dos cromossomos em plantas superiores. Quando formados, os micronúcleos podem permanecer nas tétrades de micrósporos mesmo após a dissolução da parede de calose e da liberação do micrósporo (Valle et al., 2008), prejudicando a formação de gametas normais. Muitas vezes, os micronúcleos podem ainda ser eliminados das tétrades, como micrócitos, por uma citocinese adicional (Mendes-Bonato et al., 2002a; Valle e Pagliarini, 2009). Nos híbridos analisados, foi observada a eliminação dos micronúcleos por meio da citocinese adicional, originando os micrócitos e as políades.

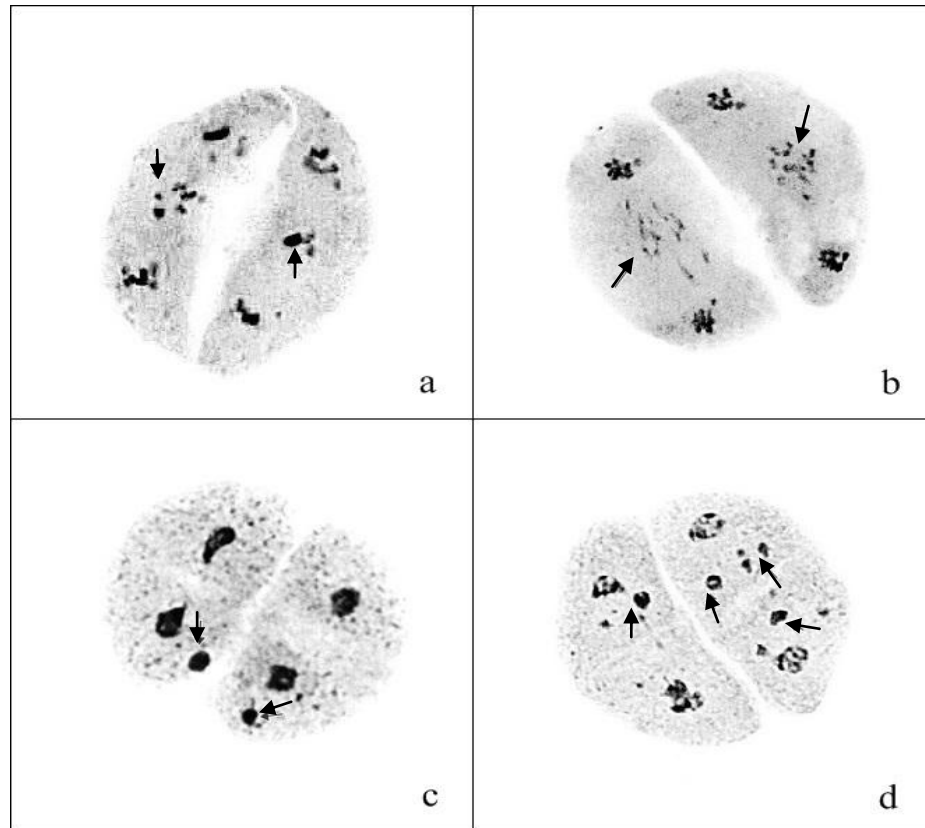


Figura 7- Assincronia do genoma durante meiose equacional dos híbridos tetraploides de *Brachiaria decumbens*: a-b) anáfase II apresentando parte do genoma em metáfase II (seta); c-d) telófase II com a formação de grandes micronúcleos (setas) (aumento 400x).

Muitas células apresentaram micronúcleos e micrócitos na mesma tétrade (Figura 9 a-c) e políades com micronúcleos (Figura 9 d-f). A presença de micronúcleos nas tétrades de micrósporos também foi relatada em vários trabalhos citogenéticos, com híbridos interespecíficos de *Brachiaria* (Mendes-Bonato et al., 2004; 2006c; 2007; Risso-Pascotto et al., 2004a; Felismino et al., 2010).

Teoricamente, as hibridações intraespecíficas deveriam produzir poucas anomalias na meiose, em comparação com as interespecíficas. Contudo, na prática, isso não ocorreu, conforme observado nas avaliações citogenéticas dos 27 híbridos resistentes à degrana. Acredita-se que tal fato se deve à duplicação dos cromossomos da planta-mãe empregando a colchicina, um alcaloide que, em muitas espécies vegetais, pode provocar diferentes níveis de variação genética, tais como perdas ou rearranjos cromossômicos, mutações, bem como esterilidade e crescimento anormal (Luckett, 1989). Outro fator que pode ser levado em conta é a

incompatibilidade entre os genomas dos genitores, pois, apesar dos mesmos serem da mesma espécie, o genitor masculino é apomítico e tetraploide natural, sendo possivelmente originado por cruzamentos espontâneos na natureza, acarretando homologia parcial dos genomas de *B. decumbens* (Simioni e Valle, 2011).

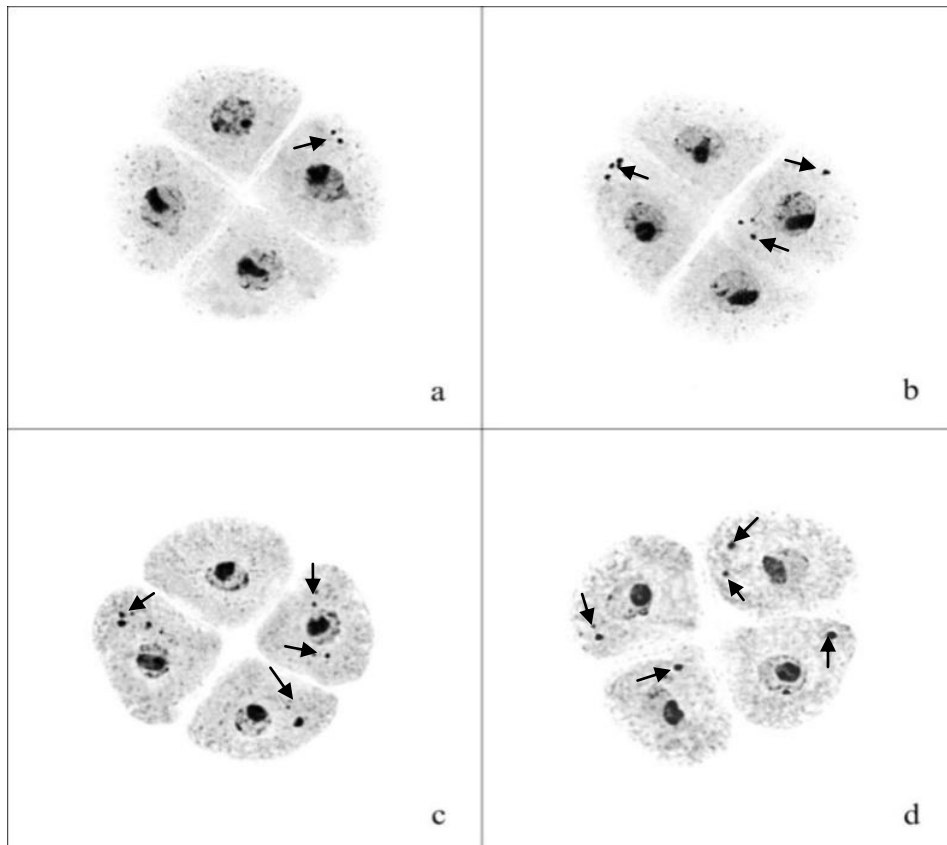


Figura 8 - Anormalidades meióticas observadas nas tétrades de micrósporos, em decorrência da segregação irregular dos cromossomos, nos híbridos tetraploides de *Brachiaria decumbens*: a) micronúcleos em um micrósporo (seta); b) micronúcleos em dois micrósporos (setas); c) micronúcleos em três micrósporos (setas); d) micronúcleos em quatro micrósporos (setas) (aumento 400x).

A análise das tétrades é uma técnica que facilmente comprova o grau de estabilidade do processo meiótico (Love, 1951), pois pode demonstrar a regularidade do comportamento dos cromossomos, durante as fases da meiose (Love, 1949). Segundo Love (1951), uma planta com 90 a 100% de tétrades normais é considerada estável citogeneticamente.

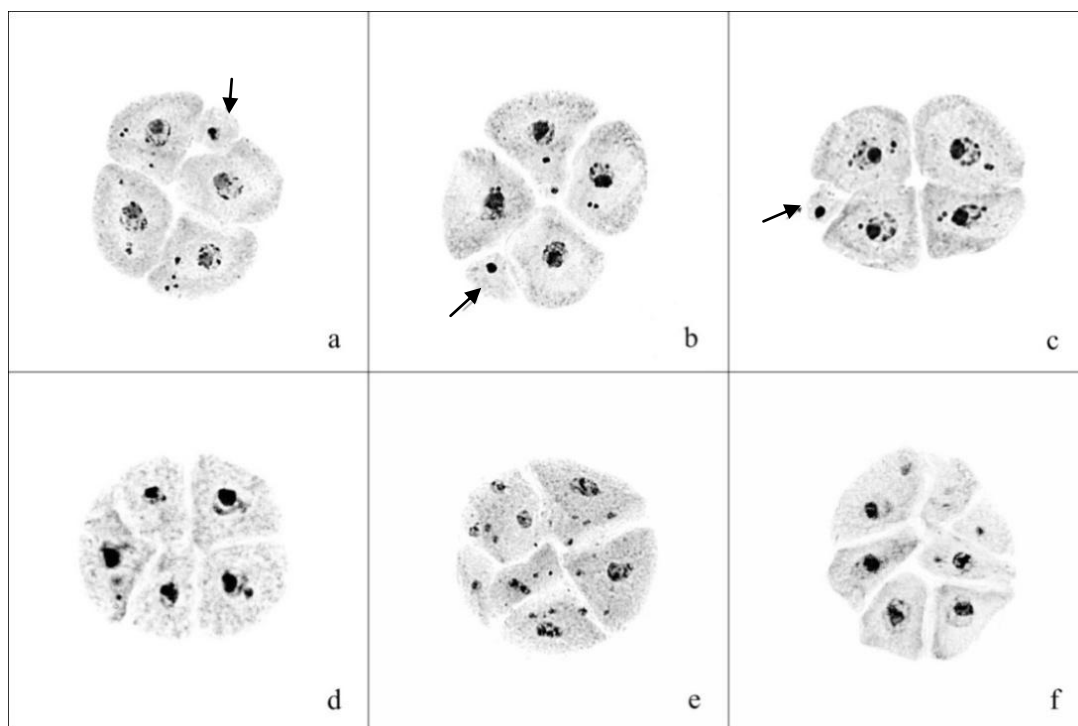


Figura 9 - Comportamento cromossômico observado nos produtos finais da meiose, nos híbridos tetraploides de *Brachiaria decumbens*, em decorrência da assincronia do genoma, nos híbridos tetraploides de *Brachiaria decumbens*: a-c) tétrade com micronúcleos nos micrósporos e micrócito (seta); d-f) políades com micrósporos de diferentes tamanhos e com micronúcleos (aumento 400x).

O resultado das análises das tétrades de micrósporos, realizadas para os 27 híbridos de *Brachiaria decumbens*, estão apresentados no Quadro 4.

As anormalidades meióticas nas tétrades foram expressas em porcentagens de células anormais e as diferenças significativas entre as irregularidades dos híbridos foram testadas pelo teste de *Scott Knott* (Quadro 4).

As anormalidades mais frequentes nas tétrades foram os micronúcleos. Os híbridos que apresentaram menos de 10% de tétrades com micronúcleos em um micrósporo foram: R158, R163, R167, R168, R169, R176, R177, R184, S47, S48, T87, X113, X122, Y21, Y22, Z8 e Z9. Os híbridos R187 e R189 não apresentaram essa irregularidade. A presença de micronúcleos em apenas 1 micrósporo da tétrade não afeta os demais, sendo que estes podem ser normais.

Seis híbridos apresentaram porcentagens inferiores a 10% de tétrades, com micronúcleos em 2 micrósporos: R163, R169, R187, R189, S48 e X122. Apesar dos demais híbridos apresentarem porcentagens superiores a 10%, estas não ultrapassaram 33,8%, não sendo considerada uma taxa alta de tétrades irregulares.

Quadro 4 - Porcentagem média de células anormais (contendo micronúcleos), observadas no produto final da meiose dos 27 híbridos de *Brachiaria decumbens* avaliados

Híbrido	Ocorrência de Micronúcleo em micrósporos					
	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %	6 %
R158	7,7 b	23,8 a	30,4 a	30,2 b	0,6 f	0 d
R 161	19 a	24,4 a	15,6 c	10,9 c	15 c	0,2 d
R163	0,7 d	7,8 c	19 b	64,5 a	3,3 e	2,3 c
R165	10 b	21,3 a	27,7 a	28,1 b	1,1 e	0,2 d
R167	2,6 c	6,1 c	22,9 b	53,8 a	10 d	2,8 c
R168	8,3 b	14,8 b	19,1 b	29,5 b	3,1 e	1,2 c
R169	1,6 d	8 c	21,3 b	56,2 a	6,1 e	1,3 c
R171	11 b	26,5 a	28 a	25,7 b	1,3 e	0,2 d
R176	7,8 b	16,9 b	20,9 b	18,6 c	28 b	0,5 d
R177	4,2 c	17,9 b	32,9 a	39,5 b	0,8 f	0 d
R179	23 a	30,1 a	24,1 b	11,7 c	0,1 f	0 d
R181	28 a	26,8 a	13,2 c	7,1 c	0 f	0,2 d
R184	5,4 c	19,8 b	29,6 a	42 b	0 f	0 d
R187	0 d	0,3 d	1,8 d	33,3 b	33 b	25 a
R189	0 d	0,3 d	5,1 d	68 a	17 c	5,5 b
R193	19 a	33,8 a	27,1 a	12,1 c	0 f	0 d
S47	4 c	18,2 b	26,2 a	48,2 a	0 f	0 D
S48	0,2 d	1,6 d	10,2 c	37,9 b	42 a	6,6 B
T87	5,3 c	24,5 a	27 a	34,5 b	2 e	0 D
X113	3,7 c	18,7 b	36,5 a	37,1 b	0,2 f	0 D
X119	11 b	28,9 a	29,7 a	24,8 b	0,5 f	0 D
X122	0,4 d	3,6 c	19,4 b	43,5 b	23 b	7,8 B
Y21	4,5 c	16,5 b	25,5 b	37 b	8,6 d	1,3 C
Y22	0,2 d	10,3 b	38,6 a	50 a	0 f	0 D
Y23	14 b	21,6 a	24,6 b	24,3 b	2,5 e	2 C
Z8	6,1 c	13,8 b	28,6 a	43,3 b	2 e	0,1 D
Z9	6,2 c	24,8 a	30 a	33,1 b	0,7 f	0,2 D

1 = micronúcleo em 1 micrósporo; 2 = micronúcleo em 2 micrósporos; 3 = micronúcleo em 3 micrósporos; 4 = micronúcleo em 4 micrósporos; 5 = micrócito; 6 = políade.

Porcentagens médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Para os híbridos R187 e R189, foram obtidas uma porcentagem média de 1,8% e 5,1% para a presença de micronúcleos em 3 micrósporos da tétrade, respectivamente, enquanto os demais híbridos apresentaram porcentagens médias, variando de 15,6% a 38,6%.

A porcentagem média de tétrades com micronúcleos nos 4 micrósporos foi superior a 10% para a maioria dos híbridos, exceto para o R181, que apresentou 7,1%. A frequência de micronúcleos é considerada mais grave quando afeta os 4 micrósporos da tétrade, pois podem resultar em quatro gametas desbalanceados pela perda de cromossomos (Twel, 1995). A formação de micrócitos foi menor que 10% para a maioria dos híbridos, exceto para os R161, R167, R176, R187, R189, S48 e X122, nos quais foram observadas porcentagens médias de 10 a 42%. Os híbridos R181, R193, S47, Y22 não formaram micrócitos nas tétrades.

Com base nos dados do Quadro 4, pode-se dizer, ainda, que houve a formação de poucas políades. Apenas o híbrido R187 apresentou a maior porcentagem de 25% de formação de políades. Os híbridos R158, R177, R179, R184, R193, S47, T87, X113, X119, Y22 não formaram políades em nenhuma célula observada.

Love (1951) trabalhou com trigo e observou que, de modo geral, plantas com menos de 90% de produtos meióticos normais dificultam o trabalho dos melhoristas, devido à baixa produção de sementes viáveis. As avaliações citogenéticas realizadas nestes híbridos, resistentes à degrana, comprovam que as irregularidades na meiose e nos produtos meióticos ultrapassam os 10%. Por serem plantas perenes que só dependem de formação de sementes quando da renovação de pastagens ou em campos de produção de sementes, a quantidade de gametas viáveis produzidos deve ser suficiente para originar pólen viável, resultando em sementes férteis. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar quão regular deve ser a meiose para gerar mais gametas normais, e quais são os fatores que mais influenciam no processo meiótico.

Na análise de variância para as anormalidades meióticas, o quadrado médio para o efeito de híbrido foi significativo pelo teste F a 5% de probabilidade de erro, evidenciando que existem diferenças entre os híbridos em relação à frequência de irregularidades cromossômicas das tétrades de micrósporos (Quadro 5). Segundo Pimentel Gomes (2000), um experimento com coeficientes de variação (CV) inferior a 10% possui alta precisão; de 10% a 20% boa precisão; 20% a 30% baixa precisão;

e acima de 30% são considerados valores muito altos. Entretanto, essa classificação deveria levar em conta a variável em estudo. No caso das variáveis analisadas neste experimento, o coeficiente de variação (CV) estimado foi alto para a presença de micronúcleo em 1 micrósporo (38,28%), micrócitos (41,89%) e políades (86,66%). Os altos valores do CV podem ser justificados pelas diferenças existentes na quantidade de células encontradas por lâminas com essas anormalidades. Uma forma de melhor estimar o efeito das anormalidades meióticas na fecundidade desses híbridos implicaria acompanhar o florescimento, colher e pesar, ou contar todas as sementes de inflorescências marcadas, determinar o peso/número de sementes cheias e correlacionar com as anormalidades encontradas. Ao proceder essa avaliação agrônômica, visando a determinar a produtividade sob cortes e incidência de pragas e doenças, o verdadeiro potencial desses híbridos poderá ser avaliado e explorado. Além disso, é de suma importância estudar a herdabilidade da resistência à degrana, a fim de incorporar essa característica aos novos híbridos.

Com base no teste de *Scott-Knott*, quanto à presença de micronúcleos em 1 micrósporo, foi possível separar os híbridos em quatro grupos (a, b, c e d). Os grupos diferem entre si, com base na diferença mínima significativa, enquanto os híbridos dentro dos grupos são semelhantes. O grupo a é constituído pelos híbridos R161, R179, R181 e R19, que apresentaram porcentagem média superior a 10%, sendo que os híbridos que pertencem ao grupo c, R167, R177, R184, S47, T87, X113, Y21, Z8, Z9 e d R163, R169, R187, R189, S48, X122 e Y22, apresentaram as menores taxas dessa irregularidade: de 2,6% a 6,2%; e de 0% a 0,7% para o grupo d (Quadro 4). Para as irregularidades em 2 micrósporos, quatro grupos também foram formados, sendo que os híbridos R163, R167, R169, X122, com menor irregularidade, de 3,6% a 8%, encontram-se no grupo c e os híbridos R187, R189 e S48 encontram-se no grupo d, apresentando porcentagem de 0,3% a 1,6%. Com relação à presença de micronúcleos em 3 micrósporos, os melhores híbridos foram R187 e R189, pois apresentaram as menores porcentagens de irregularidades: 1,8% e 5,1%, respectivamente, em comparação aos demais híbridos avaliados para esta anormalidade. Quanto à presença de micronúcleo em 4 micrósporos, o teste de *Scott Knott* separou os híbridos em 3 grupos a, b e c. Os híbridos pertencentes ao grupo c apresentaram as menores porcentagens de irregularidades nas tétrades, sendo eles: R161 (10,9%), R176 (18,6%), R179 (11,7%), R181 (7,1%) e R193

(12,1%). Estes híbridos obtiveram a melhor performance quanto à presença de micronúcleos em quatro micrósporos.

Quadro 5 - Análise de variância para as anormalidades meióticas encontradas nos 27 híbridos de *Brachiaria decumbens*

		Quadrado Médio (QM) das anormalidades meióticas					
FV	GL	Micronúcleos					
		1	2	3	4	5	6
Híbrido	26	0,109*	0,123*	0,072*	0,156*	0,208*	0,073*
Erro	108	0,008	0,007	0,007	0,018	0,007	0,006
Total	134						
CV%		38,28	22,04	16,52	21,63	41,89	86,66

1 = micronúcleo em 1 micrósporo; 2 = micronúcleo em 2 micrósporos; 3 = micronúcleo em 3 micrósporos; 4 = micronúcleo em 4 micrósporos; 5 = micrócito; 6 = políade.

*Significativo pelo teste F ($P < 0,05$)

Os melhores híbridos com menor formação de micrócitos nas tétrades (porcentagem menor que 1%) foram: R158, R177, R179, R181, R184, R193, S47, X113, X119, Y22 e Z9, não diferindo entre si, significativamente, apresentando 5% de probabilidade pelo teste F. Para a formação de políades, os híbridos com melhor desempenho obtiveram porcentagem inferior a 1% para a presença desta anormalidade e foram eles: R158, R161, R165, R171, R176, R177, R179, R181, R184, R193, S47, T87, X113, X119, Y22, Z8 e Z9.

No geral, considerando todas as anormalidades (porcentagem média entre parênteses), os melhores híbridos foram: R181 (12,55%), R168 (12,67%), R161 (14,18%), R165 (14,73%), R179 e Y23 (14,83%).

4.3. Viabilidade do pólen

A viabilidade polínica é considerada uma medida de fertilidade masculina e pode ser estimada pelos métodos de coloração, após a determinação do período da maturidade do grão de pólen (Dafni, 1992; Souza et al., 2002).

Neste trabalho, foi realizada a avaliação da viabilidade polínica nos 27 híbridos de *B. decumbens*, utilizando o corante carmim propiônico a 1%. Vários

autores testaram a viabilidade polínica em *Brachiaria* com o mesmo corante: Mendes-Bonato et al. (2001a); Risso-Pascotto et al. (2003b; 2004b; 2005a); Araujo et al. (2007); Mendes-Bonato et al.(2009); Ricci et al. (2010); Felismino et al. (2011); Simioni e Valle (2011).

A coloração dos grãos de pólen foi uniforme e adequada para uma interpretação segura e eficiente dos resultados. Foram observados grãos de pólen com diferentes tamanhos e coloração, sendo considerados viáveis os grãos túrgidos com protoplasma fortemente corado (Figura 10a) e inviáveis aqueles grãos murchos, pois o protoplasma é reduzido ou ausente, pouco corado ou sem coloração (Figura 10b). A Figura 10c apresenta grãos de pólen nos quais podem ser observadas as diferenças de tamanho e coloração entre um grão de pólen viável (à esquerda) e um inviável (à direita).

A proporção de grãos de pólen viáveis foi bem menor que a proporção de grãos inviáveis em cada lâmina analisada, como pode ser observado na Figura 11.

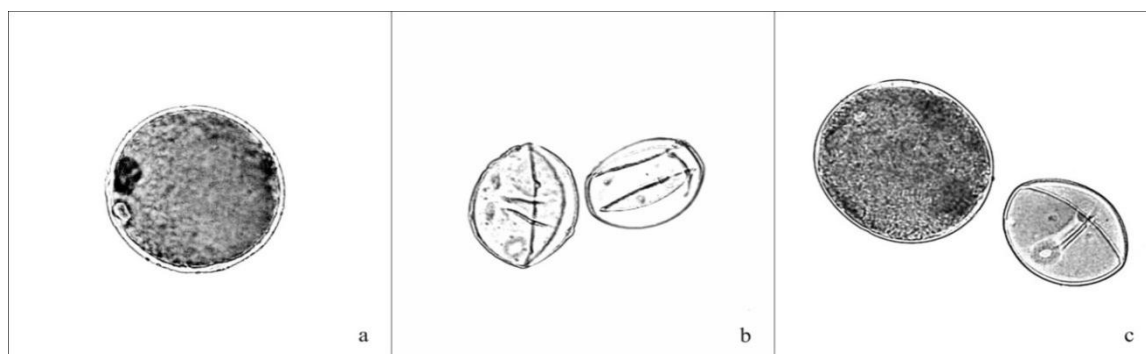


Figura 10 - Viabilidade polínica avaliada com o corante carmim propiônico 1% nos 27 híbridos tetraploides de *Brachiaria decumbens*: a) grão de pólen viável corado fortemente; b) grãos de pólen inviáveis não corados; c) grãos de pólen viável e não viável (aumento 400x).

Segundo a análise de variância, o valor do quadrado médio para o efeito de viabilidade polínica foi significativo a 5%, pelo teste F, para a fonte de variação híbrido (Quadro 6), indicando que existem diferenças entre os 27 híbridos quanto à frequência de pólen viável. Isso comprova a importância da avaliação da fertilidade do pólen para cada híbrido obtido em um cruzamento, pois a viabilidade do pólen pode variar consideravelmente entre indivíduos da mesma espécie e entre amostras de um mesmo indivíduo (Zanotto et al., 2009). Além disso, conhecer as diferenças entre os híbridos, quanto à frequência de grãos de pólen normais e anormais é

importante para o sucesso do programa de melhoramento de *Brachiaria*, especialmente quando se utilizam técnicas de polinização artificial para a hibridação das espécies (Sahar e Spiegel-Roy, 1984; Rodrigues-Riano e Dafni, 2000).

No programa de melhoramento da Embrapa Gado de Corte para a produção de híbridos, são utilizados acessos sexuais, como planta-mãe, e acessos apomíticos, como doadores de pólen (Mendes-Bonato et al., 2004). Além disso, os híbridos apomíticos, com características desejáveis, são candidatos a se tornarem uma cultivar, após passarem por várias etapas de avaliação, plantados por sementes até as etapas finais de avaliação sob pastejo. Para a adoção, uso e sucesso, uma cultivar depende de uma boa produção de sementes, o que justifica a importância em determinar a fertilidade e a fecundidade desses híbridos precocemente no programa de melhoramento. A apomixia reduz os custos e o tempo para o desenvolvimento de uma nova cultivar, facilita a multiplicação das sementes e permite aos agricultores armazenarem as sementes para a próxima safra, mantendo o vigor híbrido, que é normalmente perdido nas plantas sexuais com o avanço das gerações devido à segregação (Grimanelli et al., 2001).

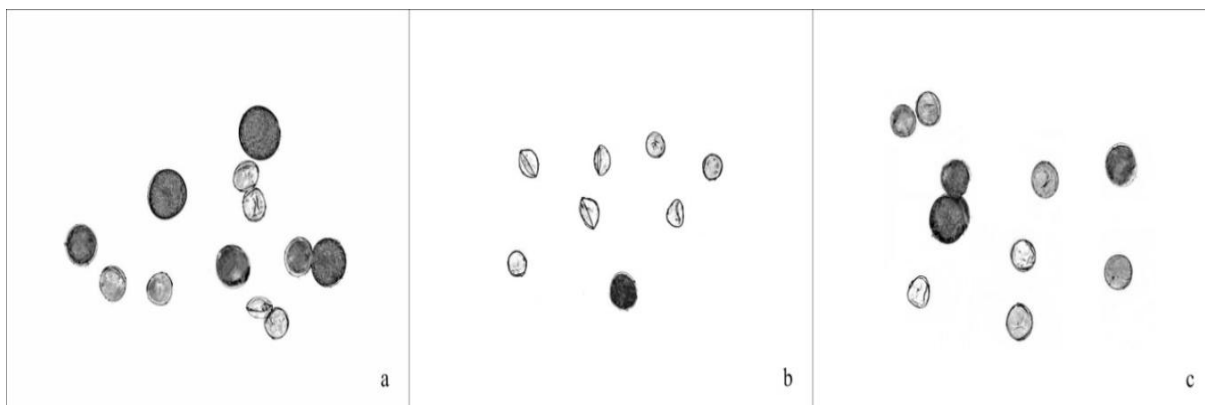


Figura 11 - Viabilidade polínica testada com o corante carmim propiônico 1% nos 27 híbridos tetraploides de *Brachiaria decumbens*: a-c) grãos de pólen viáveis corados fortemente e os grãos de pólen inviáveis não corados (aumento 100x).

As cultivares e híbridos para serem utilizados nos programas de melhoramento devem produzir pólen viável, em quantidade e com qualidade, para garantir a produção de sementes viáveis (Neves et al., 1997) e que supram a necessidade do mercado.

Quadro 6 - Análise de variância para a viabilidade polínica dos 27 híbridos de *Brachiaria decumbens*

		Quadrado Médio para Viabilidade Polínica
FV	GL	Não-Viável
Híbrido	26	0,125*
Erro	108	0,026
Total	134	
CV		12,77

*Significativo pelo teste F ($P < 0,05$).

Os híbridos analisados possuem uma característica muito importante para o gênero *Brachiaria*: a resistência à degrana natural. Dada a importância deste caráter, são relevantes as análises de viabilidade do pólen, para selecionar os híbridos que poderão produzir quantidades maiores de sementes férteis, visto que plantas com potencial de produção de sementes garantem maior recuperação natural das pastagens, o que pode contribuir para a sustentabilidade destas (Fonseca et al., 2011).

As porcentagens médias de grãos de pólen inviáveis foram testadas pelo teste de comparação de médias *Scott Knott*, que separa os híbridos em dois grupos: a) e b). O grupo a) inclui os híbridos com as maiores porcentagens de polens inviáveis, de 96% a 99,9%, sendo eles: R168, R171, R176, R177, R179, R187, R189, S48, T87, X113, Y22 e Z8. A porcentagem de esterilidade polínica entre os híbridos deste grupo não diferem significativamente entre si. Os híbridos R158, R161, R163, R165, R167, R169, R181, R184, R193, S47, X119, X122, Y21, Y23 e Z9, pertencentes ao grupo b), apresentaram porcentagens entre 68,2% a 90,9% de pólen anômalo (Quadro 7). Como, no programa de melhoramento, os genitores apomíticos são utilizados como doadores de pólen, os híbridos do grupo a) não são indicados como genitores masculinos, pois a taxa de pólen inviável foi muito alta. No grupo b), podemos indicar como doadores de pólen os híbridos R158, R169 e R184. Já para genitores femininos, podemos recomendar os híbridos R161, R163, R165, R167, R181, R193, S47, Y21 e Z9. Mendes-Bonato et al. (2001b) descrevem que, para os híbridos apomíticos, a esterilidade do pólen não é normalmente um problema. Entretanto, Felismino et al. (2011) apontam que gametas viáveis são necessários para o desenvolvimento do endosperma, pois a apomixia é pseudogâmica.

Os resultados obtidos neste trabalho apontam que, quando a porcentagem de grãos de pólen viáveis variou de 0,6% a 31,8% e a de grãos inviáveis de 99,4% a 68,2%, os 27 híbridos apresentaram baixa viabilidade polínica, pois, conforme Souza (2002), valores de viabilidade polínica acima de 70% são considerados altos, de 31 a 69% são considerados altos; até 30% são considerados baixos.

Quadro 7- Porcentagem média de grãos de pólen inviáveis observados nos 27 híbridos de *Brachiaria decumbens*

Híbrido	Pólen inviável	
		%
R158	85,5	B
R 161	80,5	B
R163	86,6	B
R165	85,7	B
R167	81,8	B
R168	97	A
R169	81,1	B
R171	99,4	A
R176	96	A
R177	93,4	A
R179	96,1	A
R181	89,5	B
R184	74,1	B
R187	98,9	A
R189	99,9	A
R193	89,5	B
S47	68,2	B
S48	98,7	A
T87	96,1	A
X113	95,8	A
X119	70,8	B
X122	90,3	B
Y21	81,6	B
Y22	97,8	A
Y23	90,9	B
Z8	97,2	A
Z9	79,4	B

Pelo teste *Scott Knott* a 5% de probabilidade de erro, porcentagens médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si.

As diferenças de viabilidade encontradas neste estudo indicam que a estimativa de viabilidade polínica pode ter sido afetada pelas irregularidades meióticas, como é descrito por Zanotto et al. (2009), e estas anomalias ocorrem principalmente pela falta de homologia cromossômica entre os genomas dos

genitores de *B. decumbens* envolvidos nos cruzamentos, que geram gametas aneuploides (Souza et al., 2002) ou, ainda, por falhas no processo de microgametogênese (Twel, 1995), pela perda natural de água que ocorre durante a coleta e armazenamento das inflorescências (Tecchio et al., 2006), pelo tempo de armazenamento (Stanley e Linskens, 1974), que foi de um ano e oito meses, mantidas em álcool 70% ou, ainda, pelo estágio de maturação do grão de pólen, pois a viabilidade do grão de pólen pode variar bastante ao longo do seu desenvolvimento. Na abertura da flor, por exemplo, o grão de pólen é plenamente viável e, à medida que o tempo avança, a viabilidade do grão de pólen vai diminuindo e reduzindo sua eficiência (Souza et al., 2002). Além disso, o período de florescimento, as alterações ambientais, fatores bióticos e abióticos e as diferenças genótípicas podem contribuir para aumentar ou diminuir a viabilidade polínica (Shivanna e Rangaswamy, 1992; Techio et al., 2006).

Os resultados evidenciam que novas análises de citogenética clássica sejam realizadas juntamente com citogenética molecular, para estimar o efeito do ambiente sobre esses híbridos e avaliar as anormalidades que ocorreram durante a meiose e que estão afetando a viabilidade polínica.

Nas análises de viabilidade polínica, as altas taxas de polens inviáveis já eram esperadas, uma vez que, nas análises do produto final da meiose, foram encontradas porcentagens altas de tétrades anormais e, conforme Zanotto et al. (2009), altas taxas de tétrades anormais afetam a porcentagem de pólen viável.

5. CONCLUSÃO

As análises citogenéticas realizadas foram importantes para determinar quais genótipos devem continuar no processo de desenvolvimento de novas cultivares dentro do programa de melhoramento de *Brachiaria*, conduzido na Embrapa Gado de Corte.

A contagem cromossômica revelou que os 27 híbridos são tetraplóides ($2n=4x=36$). O comportamento dos cromossomos nos híbridos, durante a meiose, demonstrou assincronia dos genomas, ou seja, os genomas não apresentam o mesmo ritmo meiótico. Além disso, as associações cromossômicas, observadas em diacinese, foram uni, bi e quadrivalentes. Com base nesses resultados, podemos sugerir que o genoma do genitor masculino D62 é aloploiploide segmentar, o que explica a alta frequência de irregularidades na meiose dos híbridos, apesar dos mesmos serem oriundos de cruzamento intraespecífico.

A alta frequência de irregularidades na segregação dos cromossomos afetou a viabilidade do pólen. Quinze dos 27 híbridos avaliados apresentaram viabilidade abaixo de 32%.

Entre os 27 híbridos intraespecíficos, os híbridos apomíticos R158, R169 e R184 podem ser mantidos no processo de desenvolvimento de novas cultivares e também podem ser utilizados como doadores de pólen são. Os híbridos sexuais mais promissores, passíveis de serem aproveitados em novos cruzamentos como receptores de pólen, são R161, R163, R165, R167, R181, R193, S47, Y21 e Z9.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOWSKI, E.V.; BOLDRINI, K.R.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Abnormal cytokinesis in microsporogenesis of *Brachiaria humidicola* (Poaceae:Paniceae). **Genetics and Molecular Research**, 6:616-621, 2007.

ADAMOWSKI, E.V.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in three interspecific three way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, 87:33-38, 2008.

ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, 44:117- 122, 1969.

ALVES, E.R.; CARNEIRO, V.T.; ARAÚJO, A.C. Direct evidence of pseudogamy in apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, 14:207-12, 2001.

ARAÚJO, A.C.G.; FALCÃO, R.; CARNEIRO, V.T.C. Seed abortion in the sexual counterpart of *Brachiaria brizantha* apomicts (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, 20:109-121, 2007.

ARAÚJO, S.A.C.; DEMINICIS, B.B.; CAMPOS, P.R.S.S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Archivos de Zootecnia**, 57:61-76, 2008.

BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M.A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios**, 104: 57-171, 2001.

BOGDAN, A.V. **Tropical pasture and fodder plants**. New York: Longman, 1977. 475p.

BOLDRINI, K.R.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, 85:225-228, 2006a.

BOLDRINI, R.K.; ADAMOWSKI, E.V.; MESSAGE, H.; CALISTO, V.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior as a selection tool in the breeding of *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Euphytica**, 182:317-324, 2011a.

- BOLDRINI, R.K.; ADAMOWSKI, E.V.; SILVA, N.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in nonaploid accessions of *Brachiaria humidicola* (Poaceae) and implications for breeding. **Genetics and Molecular Research**, 10:169-176, 2011b.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2009. 529p.
- BURSON, B.L.; CORREA, J.; POTTS, H.C. Anatomical basis for seed shattering in kleingrass and guineagrass. **Crop Science**, 23:747–751, 1983.
- BURSON, B.L.; CORREA, J.; POTTS, H.C. Anatomical study of seed shattering in bahiagrass and dallisgrass. **Crop Science**, 18:122–125, 1978.
- CABRAL, G.B.; SANTANA, C.G.; CARNEIRO, V.T.C.; DUSI, D.M.A.; MATSUMOTO, K. Ocorrência de albinismo em embriogênese somática repetitiva em *Brachiaria brizantha*. **Comunicado técnico**, 155:1-7, 2006.
- CARNEIRO, V.T.C.; ARAÚJO, A.C.G.; DUZI, D.M.A.; CABRAL, G.B.; RODRIGUES, J.C.M.; ALVES, E.R.; SILVEIRA, E.D.; LACERDA, A.L.M.; GOMES, A.C.; FALCÃO, R. **Contribuição da biotecnologia ao domínio da apomixia de *Brachiaria* sp.** 2003. 4p. (Comunicado Técnico, 95).
- CASTRO, R.D.; GUIMARÃES, VIEIRA, M.G.C.; CARVALHO, M.L.M. Influência de métodos e épocas de colheita sobre a produção e qualidade de sementes de *Brachiaria decumbens* cv. “Basilisk”. **Revista brasileira de sementes**, 16:6-11, 1994.
- CHIARI, L.; SALGADO, L.R.; VALLE, C.B.; CANÇADO, L.J.; VALLE, J.V.R.; LEGUIZAMON, G.O.C. Estimativa da variabilidade genética em acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando marcadores RAPD. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 22:1-23, 2007.
- COELHO, D. **Produção de carne aumentou 9,9% e área de pastagem recuou 2,4% em cinco anos.** Disponível em: <http://www.scotconsultoria.com.br/noticias/todas-noticias/30742/producao-de-carne-aumentou-99-e-area-de-pastagem-recuou-24-em-cinco-anos.htm>. Acesso em: 04, dezembro, 2013.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES – Versão Windows**. Viçosa: UFV, 2001. 642p.

DAFNI, A. Pollen and stigma biology. In: DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1992. p. 59-89.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: University Press, 2000. 272p.

DAHMER, N.; CASTRO, B.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL´AGNOL, M. In: XXI REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL – Grupo Campos desafios e oportunidades do bioma campos frente a expansão e intensificação agrícola. Porto Alegre, 2006. **Resumos...** Porto Alegre: DPFA/UFRGS, 2006. p.1-7.

DALL´AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista Brasileira Agrociência**, 11:127-133, 2005.

DANTAS, A.C.M.; PEIXOTO, M.L.; NODARI,R.O.; GUERRA, M.P. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus spp.*) **Revista Brasileira de Fruticultura**, 27:356-359, 2005.

DARLINGTON, C.D.; WYLIE, A.P. **Chromosome Atlas of Flowering Plants**. London: Allen and Unwin, 1955. 519p.

DELOUCHE, J.C.; BURGOS, N.R.; GEALY, D.R.; SAN MARTÍN, G.Z.; LABRADA, R.; LARINDE, M.; ROSELL, C. **Weedy rices: origin, biology, ecology and control**. Rome: FAO, 2007.149p.

DUSI, D.A.; ARAUJO, A.C.G.; CARNEIRO, V.T.C. Apomixia: reprodução assexual nas angiospermas. **Universa**, 8:133-148, 2000.

EINHARDT, P.M.; CORREA, E.R.; RASEIRA, M.C.B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28:5-7, 2006.

EUCLIDES, V.P.B.; VALLE, C.B.; MACEDO, M.C.M.; ALMEIDA, R.G.; MONTAGNER, D.B.; BARBOSA, R.A. Brazilian scientific progress in pasture research during the first decade of XXI century. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39:151-168, 2010.

FELISMINO, M.F.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. A differential phenotypic expression of a divergent spindle mutation in interspecific *Brachiaria* hybrids. **Cell Biology International**, 32:1459-1463, 2008.

FELISMINO, M.F.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior of interspecific hybrids between artificially tetraploidized sexual *Brachiaria ruziziensis* and tetraploid apomictic *B. brizantha* (Poaceae). **Scientia Agrícola**, 67:191-197, 2010.

FELISMINO, M.F.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; RESENDE, R.M.S. Meiotic stability in two valuable interspecific hybrids of *Brachiaria* (Poaceae). **Plant Breeding**, 131:402-408, 2011.

FERGUSON, J.E.; CROWDER, L.V. Cytology and breeding behavior of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. **Crop Science**, 14:893-895, 1974.

FISHER, M.J.; KERRIDGE, P.C. The agronomy and physiology of *Brachiaria* species. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. **Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement**. Cali: CIAT/Brasília: EMBRAPA-CNPGC, 1996. p. 43-52.

FLANKLIN, F.H.C.; LAWRENCE, M.J.; FLANKLIN-TONG, V.E. Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. **International Review of Cytology**, 158:1-62, 1995.

FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. **Plantas forrageiras**. Viçosa: UFV, 2011. 537p.

FULLER, D.Q.; ALLABY, R. Seed dispersal and crop domestication: shattering, germination and seasonality in evolution under cultivation. **Annual Plant Reviews**, 38:238-295, 2009.

FUZINATTO, V.A.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Evaluation of microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* hybrid (Poaceae) collected in distinct years. **Genetics and Molecular Research**, 7:424-432, 2008.

FUZINATTO, V.A.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Evidence of programmed cell death during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Poaceae:

- Panicoideae: Paniceae) hybrid. **Genetics and Molecular Research**, 6:208-215, 2007a.
- FUZINATTO, V.A.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in apomictic *Brachiaria ruziziensis* x *B. brizantha* (Poaceae) progenies. **Scientia Agricola**, 69:380-385, 2012.
- FUZINATTO, V.A.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Microsporogenesis in sexual *Brachiaria* hybrids (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, 6:1107-1117, 2007b.
- GALETTA, G.J. Pollen and Seed Management. In: MOORE, J.N.; JANIK, J. **Methods in fruit Breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983. p. 23-47.
- GERLACH, J.V. **Mikroskopische studien aus dem gebiete der menschlichen morphologie**. Erlanger: Verlag von Ferdinand Enke, 1858. 72p.
- GOTTSCHALK, W.; KAUL, M.L.H. The genetic control of microsporogenesis in higher plants. **The nucleous**, 17:193-166, 1974.
- GRIMANELLI, D.; LEBLANC, O.; GROSSNIKLAUS. Developmental genetics of gametophytic apomixis. **Trends in Genetics**, 17:597-604, 2001.
- GRISEBACH, A. Gramineae. In: LEDEBOUR, C.F.; SUMPTIBUS, L.E.; SUMPTIBUS, L. E. **Flora Rossica**. Germany: Schweizerbart, 1853. p. 324-484.
- HACKER, J.B. Sexuality and hybridization in signal grass, *Brachiaria decumbens*. **Tropical Grasslands**, 22:139:144, 1988.
- HACKER, J.B.; JANK, L. Breeding tropical and subtropical grasses. In: CHERNEY, J.H.; CHERNEY, D.J.R. (eds.). **Grass for dairy cattle**. Oxon: CABI, 1998. p. 49-71.
- HADLEY, H.H.; OPENSHAW, S.J. Interspecific and intergeneric hybridization. In: FEHR, W.R.; HADLEY, H.H. **Hybridization of crop plants**. Madison: ASA, CSSA, 1980. p. 133-159.
- HANNA, W.W.; BASHAW, E.C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, 27:1136-1139, 1987.

HANNA, W.W.; POWELL, J.B. Stubby head, an induced facultative apomictic in pearl millet. **Crop Science**, 13:726-728, 1973.

HARLAN, J.R. Origins and processes of domestication. In: CHAPMAN, G.P. **Grass evolution and domestication**. New York: Cambridge University Press, 1992. p. 159- 175.

HOPKINSON, J.M.; SOUZA, F.H.D.; DIULGHEROFF, S.; ORTIZ, A.; SÁNCHEZ, M. Reproductive physiology, seed production, and seed quality of *Brachiaria*. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. **Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement**. Cali: CIAT / Brasília: EMBRAPA-CNPGC, 1996. p. 124-140.

JANK, L.; VALLE, C.B.; RESENDE, R.M.S. Breeding tropical forages. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:27-34, 2011.

JOSÉ, M.R. Sementes de forrageiras tropicais: pontos importantes da produção. **Seed News**, 13: 28-31, 2009.

JUNQUEIRA FILHO, R.G.; MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; BIONE, N.C.P.; VALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O. Absence of microspore polarity symmetric divisions and pollen cell fate in *Brachiaria decumbens* (Gramineae). **Genome**, 1:83-88, 2003.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B.L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germoplasm collections. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 16-39.

LAPOINTE, S.L. Manejo de dos plagas clave para forrajes de las sabanas neotropicales. **Pasturas Tropicales**, 15:1-9, 1993.

LASCANO, C.E.; EUCLIDES, V.P.B. Nutritional quality and animal production of *Brachiaria* pastures. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 106-123.

LOVE, R.M. **Estudos citológicos preliminares de trigos rio-grandenses**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, 1949, 23p.

LOVE, R.M. Varietal differences in meiotic behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**, 43:2-6, 1951.

LUCKETT, D. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. **Euphytica**, 42:177-182, 1989.

MACEDO, M.C.M. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: BARBOSA, R.A. **Morte de pastos de *Brachiaria***. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006. p. 35-65.

MACEDO, M.C.M. Pastagens no ecossistema Cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Goiânia, 2005. A produção animal e o foco no agronegócio. **Resumos...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia/UFG, 2005. p. 56-84.

MACKAY, J.H.E. **Register of Australian herbage plant cultivars**. Canberra: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1982. 122p.

MAPA. **Bovinos e bubalinos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: 12, maio, 2014.

MASCHIETTO, R.W.; NOVENBRE, A.D.L.C.; DA SILVA, W.R. Métodos de colheita e qualidade das sementes de capim coloniã cultivar mombaça. **Bragantia**, 62:291-296, 2003.

MENDES-BONATO, A.B.; FELISMINO, M.F.; KANESHIMA, A.M.S.; PESSIM, C.; CALISTO, V.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Abnormal meiosis in tetraploid genotypes of *Brachiaria brizantha* (Poaceae) induced by colchicine: its implications for breeding. **Journal of Applied Genetics**, 50:83-87, 2009.

MENDES-BONATO, A.B.; JUNQUEIRA FILHO, R.G.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O. Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. **Cell Biology International**, 26:641-646, 2002a.

MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI M.S.; VALLE, C.B. Abnormal pollen mitoses (PMI and PMII) in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruzizensis* and *Brachiaria decumbens* (Gramineae). **Journal of Genetics**, 83:279-283, 2004.

MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; FORLI, F.; VALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O. Chromosome number and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica**, 125:419-425, 2002b.

MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Abnormal spindle orientation during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Gramineae) hybrid. **Genetics and Molecular Biology**, 29:122-125.

MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Abnormal spindle orientation during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Gramineae) hybrid.

MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic arrest compromises pollen fertility in an interspecific hybrid between *Brachiaria ruzizensis* x *Brachiaria decumbens* (Poaceae: Paniceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 50:831-837, 2007.

MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O. A severe case of chromosome stickiness in pollen mother cells of *Brachiaria brizantha* (Hochst) Stapf (Gramineae). **Cytologia**, 66:287-291. 2001b.

MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O. Meiotic instability in invader plants of signal grass *Brachiaria decumbens* Stapf (Gramineae). **Acta Scientiarum**, 23:619–625, 2001a.

MENDES-BONATO, A.B.; RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Cytogenetic evidence for genome elimination during microsporogenesis in interspecific hybrid between *Brachiaria ruzizensis* and *B. brizantha* (Poaceae). **Genetics and Molecular Biology**, 29:711–714, 2006c.

MENDES-BONATO, A.B.; RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Normal microspore production after cell fusion in *Brachiaria jubata* (Gramineae) **Genetics and Molecular Biology**, 26:517-520, 2003.

MENDES-BONATO, A.B.; RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Chromosome number and meiotic behaviour in *Brachiaria jubata* (Gramineae). **Journal of Genetics**, 85:83-87, 2006a.

MENDES-VIEIRA, D.V.; MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Abnormal meiotic behavior in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) leading to microspore degeneration. **Caryologia**, 58:396-402, 2005.

MERCIER, R.; GRELON, M. Meiosis in plants: ten years of gene discovery. **Cytogenetic and Genome Research**, 120:281-290, 2008.

MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. **Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement**. Cali: CIAT / Brasília: Embrapa-CNPGC, 1996. 288p.

MILES, J.W.; VALLE, C.B. Germoplasma y mejoramiento genético de plantas forrajeras tropicales. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FORRAGICULTURA. Maringá, 1994. **Resumos...** Maringá: SBZ, 1994. p.119-139.

NDIKUMANA, J. **Etude de l'hybridation entre espèces apomictiques et sexuées dans le genre *Brachiaria***. Louvain-la-Neuve: Université Catholique de Louvain, 1985. 210p. Dissertation (PhD).

NEVES, T.S.; MACHADO, G.M.E.; OLIVEIRA, R.P. Efeitos de diferentes concentrações de carboidratos e ácido bórico na germinação de grãos de pólen de cubiuzeiro e cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 19:140-144, 1997.

NGENDAHOYO, M. **Mechanisms de la reproduction dans le genre *Brachiaria***. Belgium: Université Catholique de Louvain, 1988. 165p. Dissertation (PhD).

NUNES, S.G.; BOOK, A.; PENTEADO, M.I.O.; GOMES, D.T. ***Brachiaria brizantha* cv Marandu**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1984. 28p.

PAGLIARINI, M.S. Citogenética aplicada ao melhoramento. In: PEREIRA, A.V.; VALLE, C.B.; FERREIRA, R.P.; MILES, J.W. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 871-909.

PAGLIARINI, M.S.; ADAMOWSKI, E.V.; BOLDRINI, K.R.; MENDES BONATO, A.B.; FELISMINO, M.F.; MESSAGE, H.J.; RISSO-PASCOTTO, C.; SILVA, N.; VALLE,

C.B. DO. Cytogenetics of *Paspalum* and *Brachiaria* in relation to breeding. **Euphytica**, 1:1-25, 2007.

PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; SANTOS, E.M.; MENDES, D.V.; BERNARDO, Z.H.; MENDES-BONATO, A.B.; SILVA, N.; CALISTO, V. Microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) as a selection tool for breeding. **Genetics and Molecular Research**, 11:1309-1318, 2012a.

PAGLIARINI, M.S.; VIEIRA, M.L.C.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in intra- and interspecific sexual and somatic polyploid hybrids of some tropical species. Croatia: InTech Europe, 2012b. 472p.

PEÑALOZA. A.P.S. II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. **Documento**, 154:1-89, 2005.

PENTEADO, M.I.O.; SANTOS, A.C.M.; RODRIGUES, I.F.; VALLE, C.B.; SEIXAS, M.A.C.; ESTEVES, A. **Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria***. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 11, 2000. 32p.

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

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

PEREIRA, C.E.; OLIVEIRA, J.A.; ROSA, M.C.M.; KIKUTI, A.L.P. Armazenamento de sementes de braquiária peletizadas e tratadas com fungicida e inseticida. **Ciência Rural**, 41:2060-2065, 2011.

PEREIRA, R.C.; DAVIDE, L.C.; TECHIO, V.H.; TIMBÓ, A.L.O. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, 42:1278-1285, 2012.

PICCININI, F.; TEDESCO, B.S.; PEREZ, N.B.; BORTOLY, E.D. Estimativa da viabilidade polínica de *Eragrostis plana* Nees. In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, Ribeirão Preto, 2010. **Resumos...** Ribeirão Preto, 2010. p. 766-760.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Degaspari, 2000. 477p.

PINHEIRO, A.A.; POZZOBON, M.T.; VALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O.; CARNEIRO, V.T.C. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. **Plant Cell Report**, 19:274-278, 2000.

PRITCHARD, A.J. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, 33:264-265, 1967.

PUPO, N.I.H. **Manual de pastagens forrageiras: formação, conservação-utilização**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1981. 343p.

RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; SALLES, L.A.; CHAGAS, E.A.; PIO, R. Receptividade do estigma e ajuste de protocolo para germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Interciência**, 33:51-55, 2008.

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. **Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 1-15.

RESENDE, R.M.S.; VALLE, C.B.; JANK, L. **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 2008. 293p.

RICCI, G.C.L.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Genome elimination during microsporogenesis in two pentaploid accessions of *Brachiaria decumbens* (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, 9:2364-2371, 2010.

RICCI, G.C.L.; SOUZA-KANESHIMA, A.M.; FELISMINO, M.F.; MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Chromosome numbers and meiotic analysis in

the pre-breeding of *Brachiaria decumbens* (Poaceae). **Journal of Genetics**, 90:289-294, 2011.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. A mutation in the spindle checkpoint arresting meiosis II in *Brachiaria ruziziensis*. **Genome**, 46:724-728, 2003b.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Abnormal nucleolar cycle in microsporogenesis of *Brachiaria decumbens* (Gramineae), **Cytologia**, 67:355-360, 2002.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Asynchronous meiotic rhythm as the cause of selective chromosome elimination in an interspecific *Brachiaria* hybrid. **Plant Cell Reports**, 22:945–950, 2004a.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Chromosome number and microsporogenesis of two accessions of *Brachiaria dura* Stapf (Poaceae). **Biota Neotropica**, 9:257-262, 2009a.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in interspecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, 145:155-159, 2005b.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Microsporogenesis in *Brachiaria bovonei* (Chiov.) Robyns and *B. subulifolia* (Mez) Clayton (Poaceae). **Scientia Agricola**, 66:691-696, 2009b.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Multiple spindles and cellularization during microsporogenesis in an artificially induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). **Plant Cell Reports**, 23:522–527, 2005a.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Symmetric pollen mitosis I and suppression of pollen mitosis II prevent pollen development in *Brachiaria jubata* (Gramineae). **Brazilian Journal of Biological and Medical Research**, 38:1603-1608, 2005c.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; JANK, L. Asynchronous meiosis in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruzizensis* and *B. brizantha*. **Plant Cell Reports**, 23:304-310, 2004b.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; MENDES-BONATO, A.B. Chromosome number and microsporogenesis in pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Plant Breeding**, 122:136-140. 2003a.

RISSO-PASCOTTO, P.C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetics Resources and Crop Evolution**, 53:7-10, 2005d.

SAHAR, N.; SPIEGEL-ROY, P. *Citrus* pollen storage. **Horticultural Science**, 15:81-2, 1984.

SAINI, H. Effect of water stress on male gametophyte development in plants **Sexual Plant Reproduction**. 10:67-73, 1997.

SANTOS FILHO, L.F. Seed production: perspective from the Brazilian private sector. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. (eds.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 141-146.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's Guide. Version 9.2. Cary: SAS Institute, 2009. 7869p.

SAVIDAN, Y.H. Apomixis as a new tool to increase grain crop production in semi-arid tropics - A research project. **Agriculture, ecosystems and environment**, 16:285-290, 1986.

SEIFFERT, N. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1980. 14p. (Circular Técnica).

SENDULSKY, T. *Brachiaria*: Taxonomy of cultivated and native species in Brazil. **Hoehnea**, 7:99-139, 1978.

SENDULSKY, T. Chave para identificação de *Brachiaria*. **Jornal Agroceres**, 5:4-5, 1977.

SHERWOOD, R.T. Genetic analysis of apomixis. In: SAVIDAN, Y. CARMEN, J.G.; DRESSELHAUS, T. **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. El Batan: CIMMYT, 2001, p. 64-82.

SHIVANNA, K.R.; JOHRI, B.M. **The angiosperm pollen: structure and function**. New Dehli: Wiley Eastern Ltd, 1989. 374p.

SHIVANNA, K.R.; RANGASWAMY, N.S. **Pollen biology. A laboratory manual**. Berlin/New York: Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1992, 119p.

SILVA, L.A.C.; PAGLIARINI, M.S.; SANTOS, S.A.; VALLE, C.B. Uso de testes colorimétricos na determinação da viabilidade do grão de pólen de acessos da grama-do-cerrado, Pantanal. SIMPAN: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SOCIOECONÔMICOS DO PANTANAL. Corumbá, 2010. **Resumos...** Corumbá, 2010, p.1-4.

SILVA, S.C.; NASCIMENTO, D. Ecofisiologia de Plantas Forrageiras. In: PEREIRA, O.G.; OBEID, J.A.; NASCIMENTO, D.D.; FONSECA, D.M. SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM III. Viçosa, 2006. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2006, p.1-42.

SIMIONI, C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL' AGNOL, M. Sexual polyploidization in red clover. **Scientia Agricola**, 23:26-31, 2006.

SIMIONI, C.; VALLE, C.B. Meiotic analysis in induced tetraploids of *Brachiaria decumbens* Stapf. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 11:43-49, 2011.

SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 213-240.

SOUZA SOBRINHO, F. PEREIRA, A.V.; LEDO, F.J.S.; BOTREL, M.A.; OLIVEIRA, J. S.; XAVIER, D.F. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim-elfante e milheto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40:873-880, 2005.

SOUZA, F.D.; CARDOSO, E.G. **A relação da cadeia produtiva na agroindústria**. São Paulo: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1995.

SOUZA, F.H.D. Maturação e colheita de sementes de plantas forrageiras. **Revista Brasileira de Sementes**, 3:143-157, 1981.

SOUZA, F.H.D. **Produção de sementes de gramíneas forrageiras tropicais**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2001. 43p. (Documento 30).

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Revista Ciência Agropecuária**, 26:1209-1217, 2002.

SOUZA, V.F. **Microsporogênese e viabilidade polínica em híbridos de *Brachiaria decumbens* e seus genitores**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2013. 82p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

SOUZA-KANESHIMA, A.M.; SIMIONI, C.; FELISMINO, M.F.; MENDES-BONATO, A.B.; RISSO-PASCOTTO, C.; PESSIM, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in the first interspecific hybrid between *B. brizantha* and *B. decumbens*. **Plant Breeding**, 129:186-191, 2010.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen biology biochemistry management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307p.

SUN, K.; HUNT, K. HAUSER, B.A. Ovule abortion in *Arabidopsis* triggered by stress. **Plant physiology**, 135:2358-2367, 2004.

SYBENGA, J. Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: do segmental allopolyploids exist ? **Genome**, 39:1176-1184, 1996.

SYBENGA, J. Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids. **Genetics and Molecular Biology**, 29:122-125, 2006b.

TECHIO, V.H.; DAVIDE, L.C.; PEDROZO, C.A.; PEREIRA, A.V. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). **Acta scientiarum biological sciences**, 28:7-12, 2006.

TONINI, M.G. **Área de pasto encolheu quase 4 milhões de hectares nos últimos dez anos.** Disponível em: <http://www.scotconsultoria.com.br/noticias/todas-noticias/6520/area-de-pasto-encolheu-quase-4-milhoes-de-hectares-nos-ultimos-dez-anos.htm>. Acesso em: 04, dezembro, 2013.

TRINIUS, C.B. Panicearum genera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 6:3-194, 1834.

TWEL, D. Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: vegetative cell ablation blocks generative cell migration. **Science**, 187:144-154, 1995.

UTSUNOMIYA, K.S.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Chromosome transfer among meiocytes in *Brachiaria nigropedata*. (Ficalho & Hiern) Stapf (Gramineae). **Japan Mendel Society**, 69:395-398, 2004.

UTSUNOMIYA, K.S.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Microsporogenesis in tetraploid accessions of *Brachiaria nigropedata* (Ficalho & Hiern) Stapf (Gramineae). **Biocell**, 29:295-301, 2005.

VALÉRIO, J.R.; OLIVEIRA, M.C.M. Parasitismo de ovos de cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera: Cercopidae) pelo Microhimenóptero *Anagrus urichi* Pickles (Hymenoptera: Mymaridae) na Região de Campo Grande, MS. **Neotropical Entomology**, 34:137-138 2005.

VALLE, C.B. Coleção de Germoplasma de Espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético. **Documentos**, 46:7-25, 1990.

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

VALLE, C.B.; GLIENKE, C. New sexual accessions in *Brachiaria*. **Apomixis Newsletter**, 3:11-13, 1991.

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

- VALLE, C.B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, 56:460-472, 2009.
- VALLE, C.B.; MACEDO, M.C.M.; EUCLIDES, V.P.B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S. Gênero *Brachiaria*. In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. **Plantas forrageiras**. Viçosa: UFV, 2011. 537p.
- VALLE, C.B.; PAGLIARINI, M.S. Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*. In: SINGH, R.J. **Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement series**. New York: CRC Press, 2009. p.103-151.
- VALLE, C.B.; PEREIRA, A.V.; JANK, L. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2001, Goiânia, 2001. **Resumos...** Goiânia: Embrapa-CNPAP/UFV, 2001, CD-ROM: Seção palestras - melhoramento de forrageiras tropicais.
- VALLE, C.B.; SAVIDAN, Y.H. Genética, citogenética y biología reproductiva de *Brachiaria*. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. (eds.). **Brachiaria, biología, agronomía y mejoramiento**. Cali: CIAT, 1996. p. 163-180.
- VALLE, C.B.; SIMIONI, C.; RESENDE, R.M.S.; JANK, L. Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: RESENDE, M.S.R.; VALLE, C.B.; JANK, L. **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 2008. p.13-47.
- WHITE, M.J.D. **Os cromossomos**. Editora Universidade de São Paulo, 1977. 196p.
- YOUNG, B.A. A source of resistance to seed shattering in kleingrass, *Panicum coloratum* L. **Euphytica**, 35:687-694, 1986.
- YOUNG, B.A.; SHERWOOD, R.T.; BASHAW, E.C. Cleared-pistyl and thick - sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. **Canadian Journal of Botany**, 57:1668-1672, 1979.
- ZANOTTO, M.; BRAMMER, S.P.; JUNIOR, A.N.; SCAGLIUSI, S.M. Viabilidade polínica como seleção assistida no programa de melhoramento genético de triticale. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, 33:2078-2082, 2009.