

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**HIBRIDAÇÃO INTRAESPECÍFICA em *Paspalum notatum* Flügge**

ROBERTO LUIS WEILER  
Engenheiro Agrônomo/UFRGS  
Mestre em Fitotecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em  
Zootecnia  
Área de Concentração Plantas Forrageiras

Porto Alegre (RS), Brasil  
Fevereiro de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

WEILER, ROBERTO LUIS  
HIBRIDAÇÃO INTRAESPECÍFICA em Paspalum notatum  
Flügge / ROBERTO LUIS WEILER. -- 2013.  
111 f.

Orientador: MIGUEL DALL'AGNOL.  
Coorientadora: CARINE SIMIONI.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Melhoramento vegetal. 2. Paspalum notatum. 3.  
Modo de reprodução. I. DALL'AGNOL, MIGUEL, orient.  
II. SIMIONI, CARINE, coorient. III. Título.

ROBERTO LUIS WEILER  
Engenheiro Agrônomo e  
Mestre em Fitotecnia

## TESE


Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

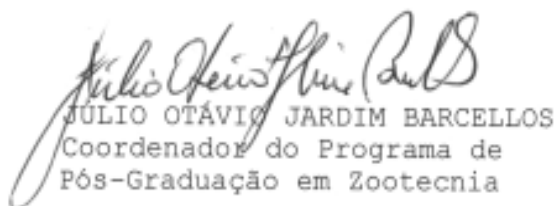
### DOUTOR EM ZOOTECNIA

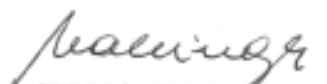
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

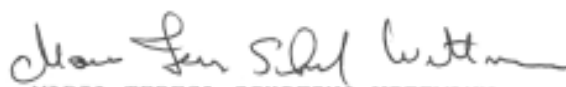
Aprovado em: 04.03.2013  
Pela Banca Examinadora


Homologado em: 17.05.2013  
Por

  
MIGUEL DALL'AGNOL  
PPG Zootecnia/UFRGS  
Orientador

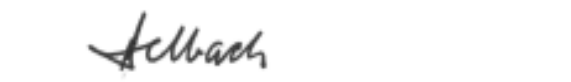
  
JÚLIO OTÁVIO JARDIM BARCELLOS  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia

  
CARLOS NABINGER  
PPG Zootecnia/UFRGS

  
MARIA TERESA SCHIFINO-WITTMANN  
PPG Zootecnia/UFRGS

  
IONARA FÁTIMA CONTERATO  
FEPAGRO/São Gabriel

  
DANIEL PORTELLA MONTARDO  
EMBRAPA/CPPSul

  
PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de Agronomia

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Elaine e Lirio por terem me gerado e criado da maneira que hoje sou e que apesar das dificuldades do passado sempre souberam passar o valor da educação.

## AGRADECIMENTOS

À Deus e a todos aqueles que me acompanham e protegem em todos os momentos.

Aos meus pais Eliane e Lirio, vocês são o meu exemplo de dignidade e de força de vontade, os responsáveis pela minha formação e caráter, sou eternamente grato, eu amo vocês. A minha esposa Liza Ting, que nas andanças pelo mundo tive o prazer de encontrar e “importar” para o Brasil, pelo apoio e estímulo para sempre lutarmos por mais. Aos meus irmãos Celson, André e Fábio pela amizade, companheirismo e pelas geladas. Às minhas cunhadas Márcia, Daniela e Vanessa pela torcida e apoio, à minha sobrinha Marina, princesinha da família.

Ao Professor Miguel Dall’Agnol pela orientação e amizade, estando pronto para transmitir valiosos ensinamentos que ampliaram meus horizontes, o meu muito obrigado.

À Professora Carine Simioni, por toda ajuda e orientação, muito obrigado pela sua amizade.

Ao Professor Carlos Nabinger e à Professora Maria Teresa Schifino-Wittmann pela ajuda e ensinamentos, que mesmo quando não tinham tempo paravam suas atividades para ajudar na solução de minhas dúvidas.

Aos colegas de orientador Emerson, Felipe, Juliana, Karla, Raquel S. e Thiago. Aos colegas do Departamento Denise, Divanilde, Igor, Nair e Raquel B. Aos bolsitas Ana Paula, Carlos, Gabriela, Felipe, Karine, Livia (em memória) e Memora. Obrigado pelo convívio agradável, trabalho e amizade.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e à Embrapa Gado de Corte pela disponibilização dos laboratórios e ao IBONE (Instituto de Botânica del Nordeste), da Universidad del Nordeste Argentino.

Agradeço ainda à todos aqueles que de alguma forma contribuíram positivamente e até mesmo aos que “atrapalharam”, pois serviram para aumentar os desafios desta jornada.

## HIBRIDAÇÃO INTRAESPECÍFICA em *Paspalum notatum* Flüggé<sup>1</sup>

Autor: Roberto Luis Weiler

Orientador: Miguel Dall'Agnol

### Resumo

*Paspalum notatum* (grama forquilha) é uma espécie reconhecida como de excelente valor forrageiro para o Rio Grande do Sul. A maioria dos biótipos de *P. notatum* são autotetraplóides ( $2n=4X=40$ ) e se reproduzem através de apomixia do tipo aposporia (pseudogamia). Foi descrita uma raça diplóide sexual ( $2n=2X=20$ ), Capim Pensacola, onde a duplicação cromossômica e utilização destas plantas sexuais em cruzamentos intraespecíficos oferecem novas possibilidades para os programas de melhoramento. Através de uma colaboração com o IBONE (Instituto de Botânica da Universidade do Nordeste da Argentina), foram obtidos três genótipos nominados 'Q4188', 'Q4205' e 'C44X' tetraplóides e sexuais que foram cruzados com o germoplasma elite tetraplóide nativo do Estado do Rio Grande do Sul (ecótipos 'Bagual' e 'André da Rocha'). Foram obtidos híbridos intraespecíficos de *P. notatum* os quais foram avaliados quanto a produtividade, sendo estes passíveis de registro e proteção varietal junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Em cruzamentos entre plantas apomíticas e sexuais pode ocorrer plantas dos dois modos de reprodução, portanto foi determinado o modo de reprodução desta progênie. Paralelamente foi induzida a duplicação cromossômica de plantas diplóides da cultivar Capim Pensacola, utilizando colchicina, para igualar a ploidia com os acessos apomíticos tetraplóides, como se trata de outro germoplasma do já disponível estes poderão ser utilizado em futuros cruzamentos. Dos híbridos produzidos, 196 foram levados ao campo para avaliações agronômicas, nos anos de 2011 e 2012, sendo realizados cinco cortes para avaliação de produção de massa seca. A planta híbrida que mais produziu, nominada "D3", apresentou 597 gramas de matéria seca total, o que representa cerca de 42% a mais do que o genitor mais produtivo (ecótipo 'Bagual'), o qual produziu 420 gramas por planta. As análises citoembriológicas permitiram identificar o modo de reprodução de 23 plantas, de um total de 28 que foram selecionadas após as avaliações agronômicas de produtividade. Destas, 15 apresentaram morfologia do saco embrionário compatível com o modo de reprodução apomítico e oito com o modo de reprodução sexual. As três plantas que confirmaram número cromossômico tetraplóide, nominadas k3, alfa 63 e delta 92 serão avaliadas quanto ao modo de reprodução. Esta estratégia de hibridações intraespecíficas é inédita no sul do país e permitirá a obtenção de híbridos e viabilizará o registro e a proteção varietal.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Zootecnia – Plantas Forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (102p.) Fevereiro, 2013.

## INTRASPECIFIC HYBRIDIZATION OF *Paspalum notatum* Flüggé<sup>1</sup>

Author: Roberto Luis Weiler

Adviser: Miguel Dall'Agnol

### Abstract

The native pastures with *Paspalum notatum* (bahiagrass) exhibit an excellent forage value in Rio Grande do Sul. Most biotypes of *P. notatum* are autotetraploid ( $2n = 4x = 40$ ) and reproduce through apomixis (apospory - pseudogamy). There is a sexual diploid race ( $2n = 2x = 20$ ), Pensacola, that can be duplicated and used in intraspecific crosses offering new possibilities for breeding programs. Through a collaboration with the IBONE (Instituto de Botânica del Nordeste), three tetraploid and sexual genotypes were obtained ('Q4188', 'Q4205' and 'C44X'), that were crossed with the ecotypes 'Bagual' and 'André da Rocha'. The intraspecific hybrids of *P. notatum* were evaluated for forage yield and agronomic traits, those materials that can be register at the Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. In crosses between sexual and apomictic plants can occur plants of two modes of reproduction, so it was necessary to determine the reproductive mode. Beside it was induced plant to duplicate the chromosomal number by using colchicine, Pensacola was used to duplicate and mach the ploidy level with apomictic tetraploid accessions, providing a germplasm different from that available now, that can be use in future crosses. One hundred ninety-six hybrid were evaluated, "D3" had the higher production with 597 grams of total dry matter, which represents about 42% more production than the parent most yield (ecotype 'Bagual'), which produced 420 grams per plant, accumulated in the five cuts. This hybrid produced about seven times more than 'Pensacola' cultivar (87 g). Cytogenetic analyzes were used to determine the reproductive mode of 23 plants, among a total of 28 that were selected after agronomic productivity evaluations, 15 of these had the morphology of the embryonic sac compatible with the apomictic and eight with the sexual mode of reproduction. Three plants confirmed tetraploid chromosome number after induction of replication, k3, alpha 63 and delta 92, those will be evaluated for mode of reproduction. This intraspecific hybridization strategy is unprecedented in the South of Brazil, would result in hybrids and that will be enable to register and protection of future varieties.

---

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Forage Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (102p.) February, 2013.

## SUMÁRIO

	Páginas
<b>1. CAPÍTULO I</b> .....	15
1.1. Introdução e justificativa.....	16
1.2. Objetivos .....	18
1.3. O gênero <i>Paspalum</i> .....	19
1.4. Apomixia.....	22
1.5. Poliploidia.....	27
1.6. Melhoramento genético de gramíneas forrageiras.....	30
1.7. Escolha de genitores para programas de hibridizações.....	33
<b>2. CAPÍTULO II - Produção de forragem de híbridos intraespecíficos de <i>Paspalum notatum</i></b> .....	34
Resumo .....	35
Abstract .....	36
Introdução .....	37
Material e Métodos .....	40
Resultados e Discussão .....	46
Conclusões .....	58
Agradecimentos e Conflitos de Interesses.....	59
Referências bibliográficas.....	59
<b>3. CAPÍTULO III - Determinação do modo de reprodução de híbridos de <i>Paspalum notatum</i> através de marcadores moleculares e análises citogenéticas</b> .....	63
Resumo .....	64
Abstract .....	65
Introdução .....	66
Material e Métodos .....	70
Resultados e Discussão .....	71
Conclusões .....	79
Agradecimentos e Conflitos de Interesses.....	79
Referências bibliográficas.....	79
<b>4. CAPÍTULO IV - Duplicação do número cromossômico de <i>Paspalum notatum</i></b> .....	83
Resumo .....	84
Abstract .....	84
Introdução .....	86
Material e Métodos .....	89
Resultados e Discussão .....	91
Conclusões .....	97



Agradecimentos e Conflitos de Interesses.....	97
Referências bibliográficas.....	98
<b>5. CAPÍTULO V - CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>101</b>
Conclusões Gerais.....	102
Considerações Finais .....	103
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>104</b>
<b>7. VITA .....</b>	<b>112</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Páginas
<b>2. CAPÍTULO II - Produção de forragem de híbridos intraespecíficos de <i>Paspalum notatum</i>.....</b>	<b>34</b>
1. Produção acumulada de cinco cortes da massa seca total (MST), em gramas, das 20 plantas mais produtivas, das cinco plantas menos produtivas, dos genitores e da cultivar 'Pensacola'.....	49
2. Número de afilhos por planta, massa seca produzida por afilho (g), hábito de crescimento, avaliação de coloração por antocianinas, efeito da geada e sobrevivência pós-inverno das 20 plantas híbridas mais produtivas, dos três genitores femininos, dos dois genitores masculinos, da cultivar 'Pensacola' e dos cinco híbridos menos produtivos.....	53
3. Correlação pelo coeficiente de Pearson entre as variáveis massa seca de Total (MST), massa seca do corte 3 (MSC3), número de afilhos, hábito de crescimento, coloração por antocianinas, efeito de geadas e sobrevivência pós inverno.....	55
4. Correlação pelo coeficiente de Pearson entre as variáveis massa seca de folhas (MSF), massa seca de colmo (MSC), massa seca de inflorescência (MSI), massa seca total (MST), número de afilhos e altura de plantas.....	55
5. Médias de rendimento de híbridos resultantes do cruzamento entre os genitores masculinos 'Bagual' e 'André da Rocha' e os genitores femininos 'Q4188', 'Q4205' e 'C44X'.....	57
6. Estimativas dos efeitos da Capacidade Geral de Combinação (CGC) e da Capacidade Específica de Combinação (CEC) entre os genitores masculinos 'Bagual' e 'André da Rocha' e os genitores femininos 'Q4188', 'Q4205' e 'C44X'.....	57

<b>3. CAPITULO III - Determinação do modo de reprodução de híbridos de <i>Paspalum notatum</i> através de marcadores moleculares e análises citogenéticas.....</b>	<b>63</b>
1. Modo de reprodução de 28 plantas híbridas selecionadas, obtidas de cruzamentos intraespecíficos de <i>Paspalum notatum</i> , determinado através de análises citoembriológicas.....	72
2. Modo de reprodução da progênie híbrida intraespecífica de <i>Paspalum notatum</i> determinada por marcador molecular do tipo RAPD.....	77
<b>4. CAPITULO IV - Duplicação do número cromossômico de <i>Paspalum notatum</i>.....</b>	<b>83</b>
1. Resumo dos resultados obtidos na etapa de indução de poliploidia: concentrações de colchicina, tempo de exposição à droga, número de plantas sobreviventes, plantas adultas em vasos, plantas avaliadas.....	93

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Páginas
<b>2. CAPÍTULO II - Produção de forragem de híbridos intraespecíficos de <i>Paspalum notatum</i>.....</b>	<b>34</b>
1. Sequência para polinização em <i>Paspalum notatum</i> . a - câmara com vedação e sombrite de 70%; b – umidificador para saturação do ambiente; c – emasculação de inflorescências com pinça de ponta fina; d – inflorescência emasculada, remanescendo somente as flores emasculadas no dia do cruzamento.....	41
2. Sequência para polinização em <i>Paspalum notatum</i> . a – pólen recém coletado em saco de papel encerado; b – inflorescência polinizada com grãos de pólen aderidas ao estigma; c – identificação de plantas e cruzamentos; d – sala com plantas polinizadas acondicionadas.....	42
3. Produção/obtenção de mudas de <i>Paspalum notatum</i> . a – plântulas no ponto de transplante para bandejas alveoladas com substrato; b – plantas em sacos plásticos; c – Muda enraizada no momento do transplante para o campo; d – vista do campo após a implantação do experimento.....	44
4. Avaliação da altura de plantas com régua graduada e hábito crescimento, evidenciando uma planta prostrada (a) e uma planta ereta (b).....	46
5. Vista parcial do campo onde foram estabelecidas 198 plantas híbridas, os pais utilizados nos cruzamentos e a cultivar ‘Pensacola’ em quatro repetições.....	47
6. Produção de massa seca total (em gramas), por cortes, das cinco plantas mais produtivas dos genitores masculinos e femininos, da cultivar Pensacola e a média de produção de cada uma das famílias.....	50
7. Produção de massa seca total (em gramas), por cortes, dos genitores masculinos e femininos, da cultivar Pensacola e a média de produção de cada uma das famílias.....	51
8. Produção de massa seca total (em gramas), por cortes, da cultivar Pensacola, a média dos cinco genótipos mais produtivos, a média dos cinco genótipos menos produtivos, a média de produção de toda população de híbridos e a média de produção de cada uma das	

famílias.....	51
<b>3. CAPITULO III - Determinação do modo de reprodução de híbridos de <i>Paspalum notatum</i> através de marcadores moleculares e análises citogenéticas.....</b>	<b>63</b>
1. Aspectos morfológicos do saco embrionário da planta híbrida apomítica B43. Setas indicam múltiplos sacos.....	74
2. Aspectos morfológicos do saco embrionário da planta híbrida sexual B37. Seta indica as antípodas.....	74
3. Gel de agarose a 1,8 % com os genitores femininos (colunas 1, 2, 3), genitores masculinos apomíticos (colunas 4 e 5), Pensacola (coluna 6) e cinco híbridos (colunas 7, 8, 9, 10 e 11). Em destaque as bandas avaliadas com 700 e 750 pb.....	75
<b>4. CAPITULO IV - Duplicação do número cromossômico de <i>Paspalum notatum</i>.....</b>	<b>83</b>
1. (a) Frascos para tratamento de plântulas com colchicina: (b) plântulas de <i>Paspalum notatum</i> tratadas com colchicina no momento de serem transplantadas para bandejas alveoladas. Departamento de Plantas Forrageiras – Faculdade de Agronomia, UFRGS (2009).....	90
2. Aspectos das plantas tratadas para duplicação cromossômica em casa de vegetação. (a) visão geral; (b) detalhe das plantas nos vasos. Departamento de Plantas Forrageiras – Faculdade de Agronomia, UFRGS (2009).....	92
3. (a) Analisador de ploidia utilizado nas análises de nível de ploidia. (b) Gráfico com dois picos formado quando foram misturadas plantas diploide e tetraploides. (c) Gráfico com um pico na altura que indica ser uma planta diplóide. (d) Gráfico com um pico na altura indicando que a planta é tetraploide.....	94
4. Aspectos da meiose (configurações cromossômicas) comprovando a duplicação cromossômica. (a) Testemunha: <i>P. notatum</i> cv Pensacola: 20 cromossomos (10 bivalentes em diacinese); (b) planta alfa 63: 40 univalentes em início de anáfase I; (c) planta delta 92: 40 cromossomos (20 bivalentes em diacinese); (d) planta k3: 40 cromossomos (20 bivalentes em diacinese).....	95

### LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Polimorfismo Amplificado de Fragmentos Longos
CEC	Capacidade Específica de Combinação
CGC	Capacidade Geral de Combinação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
IBONE	Instituto de Botânica del Nordeste
MSC	Massa Seca de Colmo
MSF	Massa Seca de Folha
MSI	Massa Seca de Inflorescência
MST	Massa Seca Total
MSTC3	Massa Seca Total Terceiro Corte
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA

## **1. CAPITULO I**

### **Introdução e Revisão Bibliográfica**

## 1.1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As gramíneas forrageiras nativas, durante muitas décadas, asseguraram a produção animal lucrativa, resistindo ao manejo inadequado ou a restrições bióticas, mas o cenário atual é o de degradação rápida das pastagens de gramíneas e de falta de opções para repor cultivares antigas (Valle, 2002).

O aumento da área cultivada com cereais e oleaginosas em áreas que historicamente foram consideradas marginais para a produção agrícola e ocupadas com produção pecuária criou a necessidade de aumento da eficiência da produção dos sistemas pecuários. É possível melhorar a produção de forragens através de pastagens mais produtivas ou de melhor valor nutricional. O melhoramento genético de plantas nativas pode contribuir para a produção de gado bovino, reduzindo o cultivo de espécies exóticas, que muitas vezes manifestam/apresentam problemas de adaptação (Pillar et al., 2009).

Em muitas situações, surge a necessidade de obter cultivares melhoradas através de seleção, em coleções de germoplasma, para características específicas dos gêneros e espécies mais bem estudados (Valle, 2002). A busca por espécies mais adaptadas ao ambiente local facilita o manejo e aumenta a produção, conservando os recursos naturais e diminuindo os custos, desta forma promovendo a maior sustentabilidade do sistema.

Espécies forrageiras nativas do Estado do Rio Grande do Sul desempenham um papel importante na atividade pecuária, representando o maior recurso utilizado para a produção de bovinos de corte, constituindo, em média, 76% de área pastoril utilizada (SEBRAE/SENAR/FARSUL, 2005).

Um conjunto de recursos genéticos vegetais importantes são aquelas espécies mais fáceis de serem domesticadas e/ou utilizadas *in situ*, tal como é o caso das forrageiras nativas (Ferrer & Clausen, 2001).

Dentre as gramíneas nativas do Brasil, as espécies do gênero *Paspalum* L. (família Poaceae) têm lugar de destaque, muitas delas apresentam bom valor forrageiro. As espécies ocorrem em praticamente todas as comunidades herbáceas nos distintos ecossistemas do país, sendo dominantes e responsáveis pela produção da maior parcela da forragem disponível em muitas dessas formações vegetais (Valls, 1987).

O gênero *Paspalum* apresenta importante valor agrônomo, servindo de base alimentar para bovinos, e suas sementes são importantes fontes alimentares para pássaros. As espécies se destacam pela tolerância ao frio, produção e qualidade de forragem, quando comparadas a outras gramíneas tropicais e subtropicais no Rio Grande do Sul (Prestes et al., 1976; Steiner, 2005; Soster, 2009; Fachinetto, 2010).



Uma das espécies mais encontradas no sul do Brasil é *Paspalum notatum* Flügge e sua importância como forrageira subtropical é amplamente aceita, apresentando boa qualidade de forragem, alta resistência ao pastejo e ao pisoteio dos animais (Pozzobon & Valls, 1997). É uma das espécies tetraplóides de gramíneas nativas de maior importância no sul do Brasil, Uruguai, nordeste da Argentina e sul do Paraguai (Quarín et al., 1984).

O germoplasma nativo do Rio Grande do Sul de *P. notatum* é tetraplóide e mostra características de linhagens apomíticas. Genótipos elite podem ser selecionados através de avaliações agronômicas com o objetivo de selecionar acessos com boa produção de forragem. Por outro lado, formas apomíticas podem também ser usadas como uma fonte de variabilidade, como doadoras de pólen em cruzamentos com tetraplóides sexuais relacionados. A cultivar Pensacola (*P. notatum* var. *saurae*), originária da América do Sul, é largamente utilizada no sul do Brasil para a formação de pastagens, está bem adaptada a esta região e, por se reproduzir sexualmente (Dall'Agnoll et al., 2006) pode ser utilizada como genitor feminino nos cruzamentos. Porém, o diferente nível de ploidia destes materiais - genótipos apomíticos são tetraplóides e a cultivar Pensacola é diplóide - dificulta ou até mesmo impede tais cruzamentos (Carneiro & Dusi, 2002).

A indução artificial de poliploidia em plantas de Pensacola e os cruzamentos destas plantas sexuais com plantas tetraplóides apomíticas poderão produzir novas cultivares com genótipos superiores fixados pela apomixia. Sendo melhor adaptados e mais competitivos, poderão contribuir para a diversificação das pastagens e garantir sua sustentabilidade na região Sul do Brasil.

O programa de melhoramento genético do Departamento de Forrageiras e Agrometeorologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foca o trabalho em espécies nativas, e dentre estas, *P. notatum*. A duplicação cromossômica de acessos diplóides desta espécie objetiva a obtenção de plantas tetraplóides sexuais. Posteriormente, após um esquema de cruzamentos, a produção de híbridos intraespecíficos com características agronômicas superiores passíveis de registro e proteção varietal junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento visando a seu lançamento como cultivares no futuro representará um avanço nas pesquisas com melhoramento de plantas forrageiras nativas do Estado do Rio Grande do Sul.

## 1.2. OBJETIVOS

### Objetivo geral:

Obtenção, através de cruzamentos intraespecíficos, de híbridos tetraplóides de *Paspalum notatum* com potencial agrônômico e passíveis de registro e proteção de cultivar.

### Objetivos específicos:

- Realizar cruzamentos artificiais entre plantas apomíticas e sexuais tetraplóides.
- Avaliar as progênies quanto à produção de forragem e persistência sob condições de campo.
- Determinar o modo de reprodução dos híbridos intraespecíficos de *P. notatum* através de análises citoembriológicas e marcadores moleculares do tipo RAPD.
- Obter poliplóides artificiais sexuais de *P. notatum* com o uso de colchicina.

### 1.3. O GÊNERO *Paspalum*

O gênero *Paspalum* L. encontra-se entre os mais importantes da tribo Paniceae (subfamília Panicoideae), família Poaceae, sendo que suas espécies se destacam entre as gramíneas brasileiras por englobar o maior número de espécies nativas e por reunir o maior número de espécies com bom valor forrageiro (Valls, 1987). De acordo com Barreto (1974), no Rio Grande do Sul, as espécies de *Paspalum* estão distribuídas em todas as regiões fisiográficas e fazem parte de todas as formações campestres.

O gênero possui cerca de 315 espécies (Zuloaga et al., 2004) com o maior centro de diversidade na América Tropical. Chase (1929) estimou cerca de 400 espécies para o gênero, as quais ocorrem em regiões tropicais a temperadas, de ambos os hemisférios. Valls & Pozzobon (1987) estimaram a ocorrência de cerca de 220 espécies. Estas ocorrem em praticamente todas as comunidades herbáceas dos diferentes ecossistemas do Brasil, sendo dominantes e responsáveis, em muitas comunidades, pela formação da maior parcela de forragem disponível (Valls, 1987). As espécies de *Paspalum*, além de apresentarem interesse pelo seu valor forrageiro, são também utilizadas como ornamentais, em gramados e jardins, parques e quadras de esporte.

A análise da diversidade das espécies do gênero tem recebido atenção especial. Vários autores o subdividiram em grupos informais, com base em características morfológicas, o que tem sido muito questionado, por estarem disponíveis instrumentos mais modernos que permitem uma comparação genética mais acurada, como é o caso dos marcadores moleculares (Valls, 2005). De acordo com Batista (2005), o Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG- *Paspalum*), localizado em São Carlos, Estado de São Paulo, tem a finalidade de preservar, multiplicar e caracterizar acessos, para que possam ser usados em atividades de pesquisa, principalmente em melhoramento genético. A característica base desse tipo de coleção é sua dinâmica, pela qual busca sempre atender às principais demandas por parte dos pesquisadores. Dentro da família Poaceae, *Paspalum* destaca-se pela variabilidade genética, tendo suas espécies e ecótipos distribuídos principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil, leste da Bolívia, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai.

Os acessos mantidos no BAG representam 13 unidades federativas do Brasil, sendo 31% coletados no Rio Grande do Sul e com múltiplos usos. Além da produção de forragem para alimentação animal, podem ser utilizados para fixação de dunas, na contenção de erosão em encostas de rodovias e em aplicações ornamentais (Prestes et al., 1976).

Entre as diversas espécies destaca-se, como forrageira, *Paspalum notatum* Flügge (grama forquilha), uma das mais importantes espécies das pastagens nativas do sul do Brasil, Uruguai, nordeste da Argentina e sul do Paraguai (Quarín et al., 1984). É a espécie de ocorrência mais freqüente na maioria das formações campestres do Rio Grande do Sul e a mais cultivada nas regiões do Planalto e das Missões (Barreto, 1974). Seus inúmeros ecótipos apresentam adaptações às mais variadas condições de solo e clima e apresentam características morfológicas muito variadas quanto ao tamanho e espessura do rizoma, tamanho das flores e das inflorescências, rendimento e qualidade (Nabinger & Dall'Agnol, 2008).

*P. notatum* é uma espécie polimórfica, comum a todas as pastagens naturais dos países de clima quente e temperado da América. Em diferentes condições ecológicas ocorrem morfotipos também diversos desta importante espécie. Os caracteres mais significativos que permitem diferenciar estas formas estão relacionados com o aspecto, vigor, dimensões e pilosidade das folhas, altura dos colmos floríferos, número e comprimento dos racemos, dimensões e coloração das espiguetas (Barreto, 1974; Prestes et al., 1976; Steiner, 2005; Soster, 2009; Fachinetto, 2010).

Esta espécie tem ciclo perene e é de estação quente, dispersando-se através de rizomas característicos (supraterrâneos), além de sementes (Barreto, 1974). Produz forragem da primavera ao outono, é bem adaptada ao pastejo e resistente ao pisoteio, pois seus rizomas ficam protegidos pela bainha e emitem novas folhas, estimulados pelas temperaturas de primavera (Maraschin, 2001).

A cultivar Pensacola é uma das poucas alternativas de espécie cultivada de verão em que há sementes disponíveis para compra. Entretanto, é importante ressaltar que praticamente todos os estudos realizados com a espécie *P. notatum* em comparação a cv. Pensacola demonstraram que os acessos nativos apresentam produções de matéria seca superiores à desta cultivar, apontando para a necessidade de explorar o potencial produtivo destes materiais nativos tetraplóides (Fachinetto, 2010).

Steiner (2005) avaliou a produção e a estabilidade de produção de forragem de dois acessos nativos de *P. notatum* (ecótipos 'Bagual' e 'André da Rocha') e comparou-os com a cultivar Pensacola. As avaliações foram realizadas durante dois anos e demonstraram que a produção total de matéria seca do acesso 'Bagual' foi superior, enquanto o acesso 'André da Rocha' teve produção semelhante ao da cultivar Pensacola.

A maioria dos biótipos de *P. notatum* são autotetraplóides ( $2n=4X=40$ ) e se reproduzem através de apomixia do tipo aposporia com pseudogamia (Forbes & Burton, 1961a). Uma raça diplóide sexual ( $2n=2X=20$ ), Capim Pensacola (*Paspalum notatum* var. *saurae*), nativa do nordeste e centro-oeste da Argentina foi descrita. A forma diplóide é sexual e meioticamente estável, alógama e auto-incompatível (Burton, 1946; Forbes & Burton, 1961a).

O Capim Pensacola é de estação quente e apresenta a maior produção de forragem em temperaturas médias superiores a 15°C. Segundo Sinclair et al. (2001), sob efeito de fotoperíodo estendido no inverno, a cultivar Pensacola apresentou um aumento na produção de forragem de 3,6 vezes, em comparação com outros tratamentos que não estabeleceram este mesmo

efeito. Blout et al. (2001), estudando a resposta de acessos de *P. notatum* ao fotoperíodo, obtiveram resultados semelhantes. Estes estudos estão de acordo com Dall'Agnol & Gomes (1987), onde os autores sugerem que o maior determinante da diminuição da produção de forragem no inverno é a redução do comprimento do dia. Seu hábito de crescimento é rasteiro, com rizomas curtos e firmemente presos à superfície do solo, formando uma cobertura densa (Mislevy, 1985). A cultivar Pensacola é comercializada na região sul dos EUA. Sua utilização e difusão merecem destaque, principalmente nas criações de eqüinos, onde se tornou uma alternativa interessante para o pastejo desses animais, devido a características como: tolerância a intenso e freqüente pisoteio, baixa altura da planta, ausência de estruturas vegetais contundentes e princípios anti-nutricionais não relatados (Haddad et al., 1999). No Rio Grande do Sul, o capim Pensacola se destacou principalmente na região do Planalto, daí a importância de ser comparada sob ponto de vista de produção e valor forrageiro com os ecótipos nativos (Dall'Agnol et al., 2006).

A alta variabilidade morfológica em *P. notatum* levou diferentes autores a estudar esta diversidade, com a finalidade de caracterizar as diferentes formas desta espécie. Barreto (1974) destacou diferentes formas ocorrentes no Rio Grande do Sul na época, sem nível taxonômico definido, para *P. notatum*: Capivari (comum no litoral), a forma comum dos campos do Estado, a forma gigante (encontrada nos Campos de Cima da Serra e Planalto) e a forma Uruguiana (ocorrente na região da Campanha).

*P. notatum* var. *saurae* (Pensacola) é nativa do leste da Argentina, onde é esparsamente distribuída nas Províncias de Santa Fé, Corrientes e Entre Rios (Burton, 1967). No Brasil, plantas diplóides nativas não têm sido encontradas (Pozzobon & Valls, 1997, Dahmer et al., 2008) e no Rio Grande do Sul sua presença está associada a ambientes modificados, provavelmente como escape de cultivo da cultivar Pensacola (Canto-Dorow, 1993).

*P. notatum* var. *notatum* tem seu centro de origem no sul do Brasil, norte da Argentina e Paraguai (Parodi, 1937). No Rio Grande do Sul, formas tetraplóides (possivelmente todas apomíticas) são predominantes (Pozzobon & Valls, 1997; Dahmer et al., 2008). Uma vez que a apomixia dificulta cruzamentos, o melhoramento de raças tetraplóides tem sido historicamente limitado à identificação e seleção de acessos superiores.

No estudo realizado por Fachinetti (2010), foi determinado o número cromossômico a partir de células mãe de pólen em 25 acessos de *P. notatum* provenientes do USDA (*United States Department of Agriculture*) de um total de 53 propostos, os demais acessos foram analisados por Dahmer (2008). Dos 53 acessos analisados, seis foram diplóides ( $2n= 2X= 20$  cromossomos), são eles a cultivar 'Pensacola', o acesso V12, este considerado um escape de Pensacola (coletado em Candido Godói – Rio Grande do Sul), os acessos 66N, 87N e 92N, provenientes de Santa Fé – Argentina e o acesso 92N, proveniente de Paysandú – Uruguai. O acesso V9, hexaplóide ( $2n= 6x= 60$ ), foi coletado em Vale do Sol – Rio Grande do Sul. Os demais acessos apresentaram número cromossômico tetraplóide ( $2n= 4x= 40$ ).

#### 1.4. APOMIXIA

Para que a diversidade genética conservada pela apomixia seja plenamente explorada, é necessário viabilizar cruzamentos por meio de plantas sexuais compatíveis, com a finalidade de gerar novas combinações gênicas e selecionar indivíduos que solucionem os problemas relacionados a estas espécies, possibilitando o registro e proteção da cultivar desenvolvida. A utilização de plantas diplóides sexuais de populações naturais de Capim Pensacola (*P. notatum* var. *saurae*) oferece novas possibilidades para os programas de melhoramento (Burton & Forbes, 1960).

Apomixia no seu sentido mais amplo significa “longe do ato de mistura”; é sinônimo de formação assexual de sementes ou agamospermia (Asker & Jerling, 1992). Para Koltunow (1993), o processo apomítico mimetiza muitos dos eventos da reprodução sexual e dá origem a sementes férteis. Este mesmo autor diz que uma importante diferença entre o embrião apomítico e o zigótico é o fato de que o primeiro é derivado somente das células do tecido do óvulo materno enquanto o segundo é derivado da fusão de um gameta masculino com um gameta feminino.

Segundo os autores Asker & Jerling (1992), há dois tipos principais de apomixia. Na apomixia esporofítica, o embrião é formado diretamente de uma célula do envoltório do óvulo, sem que haja formação do saco embrionário e célula-ovo, recebendo também o nome de embrionia adventícia ou nucelar, típica dos gêneros *Citrus* e *Mangifera*. Na embrionia adventícia, a característica de mono ou poliembrionia parece ser governada por um gene, já na outra forma de apomixia, a gametofítica, há formação de saco embrionário com um número cromossômico não reduzido, ao contrário do que ocorre nos embriões de origem sexual. A meiose, responsável pela redução do número cromossômico, foi substituída em ambas pela mitose, com a formação de um saco embrionário e célula-ovo com a mesma constituição genética da planta mãe. Há dois tipos de apomixia gametofítica: a diplosporia e a aposporia. Na diplosporia, o saco embrionário origina-se por divisão mitótica da célula mãe de megásporos, enquanto que na aposporia, o saco embrionário se origina por divisão mitótica de uma célula somática do saco embrionário. O endosperma pode desenvolver-se autonomamente, ou seja, somente a partir dos núcleos polares, ou pela união de um núcleo masculino com os núcleos polares (pseudogâmica) (Hanna & Bashaw, 1987; Asker & Jerling, 1992).

Espécies apomíticas são na sua quase totalidade perenes e muitas vezes possuem propagação vegetativa através de estolões ou rizomas. Assim, no campo, através da combinação de apomixia e divisão vegetativa, plantas apomíticas podem formar grandes populações clonais e estas podem persistir por longos períodos de tempo. Apomixia pode levar à formação e manutenção

de variedades ou biótipos morfológicamente distintos, mas ainda férteis entre eles, onde a taxonomia de tais complexos agâmicos pode ser uma tarefa difícil e controversa (Dickinson, 1998 ; Horandl, 1998).

Devido à existência de apomixia em 40 famílias de plantas e pela diversidade de processos apomíticos, sugere-se que as rotas que levaram à evolução da apomixia podem ser tão diversas como os mecanismos citológicos conhecidos. Comparações morfológicas de estruturas formadas durante a reprodução sexual e apomítica podem fornecer informações dos caminhos reprodutivos e que estes podem compartilhar elementos comuns, mas com algumas discrepâncias (Bicknell & Kultonow, 2004).

Com uma combinação de reprodução sexuada e assexuada, espécies podem adaptar-se a novos ambientes. No momento de expansão para novas áreas, tais espécies se utilizam da recombinação sexual ao mesmo tempo que conservam os benefícios da reprodução assexuada, como a manutenção de desempenhos superiores providos pela heterozia. No oeste dos Estados Unidos, as espécies nativas de *Rubus* (Rosaceae) reproduzem-se sexualmente enquanto que as espécies exóticas e naturalizadas deste gênero reproduzem-se por apomixia pseudogâmica. O estudo feito por Clark & Jasieniuk (2012) mostrou que há a possibilidade de hibridação do *R. ursinus* (nativo) com *R. armeniacus* e *R. Pensilvanicus* (ambos exóticos), gerando uma progênie com os dois modos de reprodução.

A apomixia proporciona uma oportunidade única de clonagem de plantas através da semente e por isso tem um papel importante como ferramenta no melhoramento de plantas (Hanna & Bashaw, 1987). Uma das principais vantagens da apomixia é possibilitar a imediata fixação de qualquer genótipo superior selecionado no processo de melhoramento, permitindo que o mesmo origine plantas idênticas à original, independente do seu grau de heterozigose e vigor híbrido (Koltunow et al., 1993). Desta forma, maiores são as oportunidades de desenvolvimento de combinações gênicas superiores e de incorporação de características desejáveis, pois não há necessidade de realizar testes de progênie para verificar a estabilidade do genótipo; assim, o mesmo estaria pronto para entrar em testes de competição.

Em trabalho conduzido por Steiner (2005), os ecótipos 'Bagual' e 'André da Rocha', tetraplóides e apomíticos, produziram, respectivamente, 7812 e 6931 Kg de massa seca por hectare no período estival de 2003-2004 e neste mesmo período, a Cultivar 'Pensacola' produziu 4559 Kg de massa seca por hectare. Já no trabalho de Interrante et al. (2009), medindo produção de massa seca em três anos de avaliação (2005, 2006 e 2007), os acessos tetraploides apomíticos 'Argentine' e 'Tifton7' de *P. notatum*, produziram em média, 12,1 e 11,4 toneladas de massa seca por ano por hectare, respectivamente, e foram comparados com a cultivar diplóide sexual 'Pensacola', que produziu, na média dos três anos, 10,4 toneladas de massa seca por ano por hectare.

O processo de produção de híbridos comerciais utilizando a apomixia poderia ser feito a um custo bastante inferior ao processo convencional, uma vez que não se torna mais necessário os métodos para produção de  $F_1$  que requerem isolamento dos estoques parentais e a realização de cruzamentos todos os anos. A semente de qualquer híbrido

apomítico superior poderia ser produzida por um número ilimitado de gerações sem que ocorresse perda de vigor ou mudanças no genótipo (Hanna & Bashaw, 1987).

A variabilidade intrapopulacional de culturas apomíticas é baixa, quando comparada a outras culturas com outros modos de reprodução, uma vez que as plantas originadas de sementes apomíticas serão clones e terão o mesmo genótipo da planta-mãe, salvo raras mutações. Porém, em plantas apomíticas facultativas, em casos de estresse ambiental, alguns embriões se desenvolvem do tipo sexual, lançando mão de variabilidade para superar as condições adversas impostas pelo ambiente.

De acordo com Ozias-Akins & van Dijk (2007), o controle genético da apomixia permaneceu obscuro até muito recentemente, devido as complicações da genética mendeliana, tais como interações entre genes epistáticos, componentes que são expressos na apomixia esporofítica ou na gametofítica, modificadores de expressão, poliploidia, aneuploidia, distorções da segregação, supressão de recombinação, entre outros, e estes parecem ter se acumulado durante a evolução da apomixia. O controle genético da apomixia em tetraplóides de *P. notatum* é feito por um único *locus* dominante e de segregação mendeliana. Porém, no controle da expressão da apomixia provavelmente há um efeito letal pleiotrópico do loco dominante ou uma letalidade parcial de fatores ligados ao gene da aposporia que possivelmente cause uma distorção na segregação (Martinez et al., 2001).

No gênero *Paspalum* há uma estreita correlação entre nível de ploidia e modo de reprodução, onde diploidia está correlacionada com reprodução sexuada e alogamia e poliploidia está correlacionada com apomixia (Adamowski et al., 2005).

Nas plantas que apresentam modo de reprodução apomítico, predominante nos ecótipos de *P. notatum*, a meiose feminina, normal nas espécies de reprodução sexual, não ocorre ou não é funcional. Assim, a oosfera contém o mesmo número de cromossomos somáticos maternos. Como não há fusão de gametas durante a fertilização, o embrião se desenvolve por partenogênese, gerando uma planta idêntica à planta-mãe (Carneiro & Dusi, 2002).

Os genótipos tetraplóides apomíticos usualmente mostram associações de cromossomos quadrivalentes na meiose. A maior parte das espécies apomíticas tetraplóides tem, em contrapartida, co-específicos sexuais, diplóides e auto-incompatíveis (Quarín & Norrmann, 1990).

Moraes-Fernandes et al. (1973) avaliaram cinco formas provenientes de 17 acessos nativos do Rio Grande do Sul de *P. notatum* e confirmaram o número cromossômico de  $2n = 40$ . Dahmer et al. (2008) avaliaram o número cromossômico de 85 acessos de *P. notatum* e sete acessos de Pensacola. Os acessos de *P. notatum* apresentaram-se tetraplóides, com  $2n = 4x = 40$ , com exceção de um diplóide, considerado como escape de Pensacola. Todas as plantas dos sete acessos de Pensacola examinadas tinham  $2n = 2x = 20$ . Pozzobon & Valls (1997) também consideraram que os acessos diplóides encontrados na coleção de *P. notatum* avaliada por eles são provavelmente um escape da Pensacola.



O modo de reprodução é um dos fatores principais que determinam a estrutura genética das populações. De acordo com a espécie, que pode ser predominantemente autógama, alógama, apomítica, sexual ou de reprodução vegetativa, a diversidade genética entre e dentro de populações se estrutura de forma diferente. As atividades em recursos genéticos vegetais, melhoramento e multiplicação de sementes requerem o conhecimento do sistema reprodutivo para a conservação adequada, utilização e manutenção da diversidade genética de espécies consideradas, sendo a pesquisa, neste sentido, extremamente relevante (Rivas, 2001).

A reprodução por apomixia implica em populações que são geneticamente homogêneas. A adaptação pode ser dificultada em ambientes divergentes e há riscos onde agentes bióticos interagem, especialmente quando pragas e doenças ameaçam o desenvolvimento, a produção e a persistência (Adamowski et al., 2005).

Em cruzamentos entre plantas apomíticas e sexuais pode ocorrer uma ampla segregação de níveis de plantas dos dois modos de reprodução. Portanto, análises do modo de reprodução das progênies segregantes, dentro de um programa de melhoramento de plantas, é imprescindível. Assim, é possível formar grupos de plantas separados pelo modo de reprodução, onde plantas apomíticas podem ser utilizadas diretamente como cultivares após comprovação de seu valor agrônomico e plantas sexuais inseridas como mães em cruzamentos dirigidos.

A determinação do modo de reprodução, apomítico ou sexual, pode ser feita através de análises citoembriológicas dos sacos embrionários, com observações diretas em microscópio óptico de contraste de interferência, que possibilita distinguir morfologicamente sacos embrionários sexuais e sacos embrionários apomíticos (Martínez et al., 2001). Outra maneira de avaliar uma espécie quanto ao seu modo de reprodução é através de uso de marcadores moleculares, onde se necessita de um marcador ligado, ou pelo menos, bem próximo à região gênica que controla a apomixia. Em *P. notatum*, dois marcadores moleculares do tipo RAPD foram selecionados dentre 400 *primers* em análise de materiais sexuais e apomíticos em *bulk*, por estarem completamente ligados à expressão da aposporia: BCU 243 e BCU 259 (Martínez et al., 2003). A utilização de marcadores moleculares possibilita a determinação rápida do modo de reprodução ainda no estágio de plântula, com isso é possível realizar um *screening* das plantas que serão levadas ao campo.

As plantas com modo de reprodução sexual apresentam sacos embrionários com oito células (oosfera, duas sinérgidas, dois núcleos polares e três antípodas). Nas plantas apomíticas, além dos sacos apospóricos, pode ocorrer, na mesma planta, a formação de sacos embrionários sexuais. Em *Brachiaria*, os sacos embrionários sexuais, quando presentes em plantas apomíticas, podem ser fecundados, formar um zigoto e dar origem a uma planta através da sexualidade, caracterizando assim a apomixia facultativa. Por definição, apomixia facultativa é a ocorrência de sementes viáveis oriundas da fecundação de um saco embrionário sexual em uma planta apomítica (Nogler, 1984; Koltunow, 1993). Valle & Savidan (1996) relataram que a ocorrência de dois tipos de sacos embrionários em um mesmo óvulo nas plantas apomíticas de *Brachiaria* é considerada um indicativo de apomixia facultativa.

No livro de Princípios de Desenvolvimento de Cultivares de Walter Fehr (1987), o capítulo “Desenvolvimento de cultivares de propagação assexuada” inclui o melhoramento de plantas de modo de reprodução apomítico. Neste capítulo é descrito que, para o melhoramento destas, deve-se obter algum acesso sexual para gerar uma  $F_1$  e desta forma selecionar as plantas apomíticas que poderão ser lançadas como cultivares, mostrando o exemplo de *Pennisetum ciliare*. Nesta espécie, foi proposto que a aposporia do tipo obrigatória é resultante da ação de dois genes em epistasia (Taliaferro & Bashaw, 1966). Já em *Panicum maximum*, um gene dominante simples foi proposto como responsável pela aposporia (Savidan et al., 1989).

## 1.5. POLIPLOIDIA

A poliploidia é um importante processo na evolução cromossômica dos eucariotos, onde três ou mais conjuntos cromossômicos compartilham o mesmo núcleo. Nas plantas, a poliploidia representa o maior mecanismo de adaptação e especiação (Ramsey & Schemske, 1998). Cerca de 80% das angiospermas são poliplóides, evidenciando que a poliploidia tem um papel relevante na evolução de plantas superiores (Leitch & Bennet, 1997).

Os poliplóides são classificados em autopoliplóides, originados pela duplicação de um mesmo genoma, e alopoliplóides, originados pela duplicação de genomas diferentes, normalmente após um evento de hibridização. As consequências citogenéticas e genéticas dos diferentes tipos de poliploidização são diferentes. Nos autotetraplóides, por haver cópias iguais de um mesmo genoma, espera-se pareamento cromossômico em multivalentes (nas primeiras gerações) e herança polissômica, já em alotetraplóides, a existência de genomas diferentes levaria à formação de bivalentes e herança dissômica. Os alopoliplóides se comportariam semelhantemente aos diplóides, por possuírem uma cópia de genomas diferentes. Em milho, há fortes evidências que este é um alopoliplóide no qual ocorreram rearranjos cromossômicos e silenciamentos, sendo um excelente exemplo de poliplóide diploidizado. (Sybenga, 1992).

Na natureza, a duplicação somática é um evento raríssimo e seria um evento momentâneo. Pode ocorrer principalmente em plantas perenes, quando essas são expostas a estresses, podendo aumentar as chances de uma duplicação somática, como é o caso das borbulheiras de citros, onde cortes muito freqüentes das regiões apicais das plantas induz alterações gênicas (De Wet, 1980).

Anteriormente acreditava-se que o evento de poliploidização tivesse ocorrido num momento único e que a população originada, tendo características adaptativas superiores, se estabeleceria e se perpetuaria. Porém fortes evidências revelam que o surgimento dos poliplóides naturais ocorre pela união de gametas não reduzidos e que em muitas, senão na maioria das espécies poliplóides conhecidas, tiveram origens múltiplas, ou seja, o evento de poliploidização ocorreu de forma recorrente, envolvendo ancestrais variados (Soltis & Soltis, 1999).

Madlung (2013) cita três vantagens que os poliplóides têm sobre os seus antepassados diplóides. Em primeiro lugar, o aumento do número de alelos de um dado gene em um poliplóide deve permitir que o mascaramento de mutações recessivas prejudiciais e, assim, assegurar contra a perda da aptidão (Gu et al., 2003). A segunda vantagem atribuída aos alopoliplóides e

autopoliplóides heterozigotos é de que a heterose permite que a progênie tenha um desempenho transgressivo em comparação com suas espécies progenitoras (Birchler et al., 2010). Em contraste com os híbridos diplóides, onde decai vigor híbrido ao longo de gerações subsequentes, devido à recombinação homóloga, a heterose é estável em alopólíplóides devido ao emparelhamento predominante dissômico de cromossomos homólogos idênticos (Comai, 2005). A terceira vantagem de poliplóides advém da possibilidade de que as cópias de genes duplicados podem evoluir para assumir novas funções ou funções um pouco variadas, potencialmente permitindo a expansão para novos nichos ecológicos ou uma maior flexibilidade na capacidade de resposta do organismo a mudanças ambientais (Adams & Wendel, 2005).

Os poliplóides naturais diferem dos artificiais no sentido que os primeiros sofreram a diploidização há muito tempo. Ao longo de sua história evolutiva, regularizaram o pareamento cromossômico, adquirindo um comportamento meiótico como de um diplóide com formação de bivalentes, ou seja, são estáveis meioticamente e com segregação dissômica. Provavelmente houve silenciamento de uma das cópias do gene ou aquisição de uma nova função gênica para este gene. Os poliplóides artificiais são recentes e por isso não tiveram tempo para se estabilizarem. Por essa razão, geralmente, há muitas irregularidades meióticas nas células mães de grãos de pólen de poliplóides recém formados (Ramsey & Schemske, 1998).

*P. notatum* é considerado um complexo agâmico, pois apresenta vários níveis de ploidia e um sistema reprodutivo complexo, com citótipos diplóides ( $2n=2x=20$ ) autoincompatíveis e de reprodução sexuada e citótipos autotetraplóides apomíticos (Burton, 1948), triplóides e pentaplóides ocasionais (Quarin et al., 1989). As formas diplóides (*P. notatum* var. *saurae* Parodi) são sexuais e meioticamente estáveis formando dez bivalentes na diacinese (metáfase I da meiose) (Moraes-Fernandes et al., 1973), enquanto que poliplóides reproduzem-se por apomixia apospórica obrigatória (Forbes & Burton 1961a) ou facultativa (Quarín et al., 1984).

De acordo com Rosengurt et al. (1970), estudos de caracterização morfológica em *P. notatum* têm demonstrado que esta é uma espécie polimorfa, sendo proposta a separação da espécie em variedades. Entretanto, de acordo com Canto-Dorow (1993), existem apenas duas variedades, a sexual diplóide, *Paspalum notatum* var. *saurae* e a tetraplóide apomítica, *P. notatum* var. *notatum*.

Poliplóides artificiais podem ser obtidos com a utilização de agentes antimitóticos, como por exemplo, a colchicina. A aplicação pode ser nas sementes, plantas jovens ou partes vegetativas com tecidos meristemáticos ativos, como afilhos e estolhos (Silva et al., 2000).

No melhoramento, a poliploidização pode ser utilizada com diferentes finalidades:

(a) Obtenção de plantas maiores e melhores, o chamado efeito “gigas”.

(b) Para restauração da fertilidade de híbridos estéreis, como foi utilizado no melhoramento de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) ( $2n=4x=28$ ) e no de milheto (*Pennisetum glaucum*) ( $2n=2x=24$ ). Nestas

culturas, o triplóide originado foi duplicado com o uso de colchicina para obter-se um hexaplóide fértil (Ferreira & Pereira, 2005).

(c) Como uma ponte para transferir genes de interesse entre níveis de ploidia diferentes.

De acordo com Mable (2013), demonstrar previsões generalizadas sobre a resposta de poliplóides sob diferentes condições ambientais pode ser irreal, especialmente quando são utilizados poucos exemplos. Além disso, ainda permanece por resolver, em muitos aspectos, se a hibridação ou poliploidia, ou ambos, explicam o potencial de ocupação de espaços e adaptação a diferentes condições ambientais, sendo necessária a integração da ecologia, evolução e genômica, tanto em plantas como em animais. Porém com os avanços tecnológicos recentes, principalmente da genômica, esta questão se torna uma meta realista e tratável.

Em um trabalho conduzido com *Brachiaria*, os dados indicam haver um controle genético do pareamento nos poliplóides recém formados. *Brachiaria decumbens* diplóide foi induzida artificialmente com o uso de colchicina e as três plantas poliplóides formadas apresentaram comportamento meiótico regular, evidenciado pelo predomínio de associações bivalentes dos cromossomos durante a prófase I meiótica (diacinese) e satisfatória viabilidade polínica. Isto evidencia a possibilidade de escolher genitores nos programas de melhoramento em poliplóides recém induzidos (Simioni & Valle, 2007; 2011). Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados em autotetraplóides induzidos artificialmente em *Trifolium riograndense* (Schifino & Moraes-Fernandes, 1986; 1987), em *Brachiaria brizantha* (Araújo et al., 2005) e em *Brachiaria ruziziensis* (Risso-Pascotto et al., 2005).

Em trabalho de Ferreira & Pereira (2005), foi restaurada a fertilidade de um híbrido estéril, obtido do cruzamento de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) ( $2n=4x=28$ ) e milho (*Pennisetum glaucum*) ( $2n=2x=24$ ), onde o triplóide originado foi duplicado com o uso de colchicina e obteve-se um hexaplóide fértil.

Quarín et al. (2001) duplicaram cromossomos de *P. notatum* com a aplicação de colchicina diretamente no meio de cultura em plântulas. Os autores registraram que duas plantas efetivamente duplicaram o número cromossômico, as quais foram submetidas a uma dose de 0,2 g/l da droga. No mesmo trabalho, foram induzidos artificialmente calos de cultura de tecido jovem de inflorescências de *P. notatum*, com colchicina. Os calos foram submetidos à análise de confirmação de duplicação cromossômica utilizando um citômetro de fluxo, que permite avaliar a quantidade e DNA das amostras e assim inferir sobre o nível de ploidia. Somente a região de calos que se mostrava duplicada foi utilizada para regeneração de plantas. De 40 inflorescências, 37 regeneraram calos; destes, 74% mostraram regiões tetraploidizadas e a dose mais eficaz foi de 0,2 g/l da droga por 72 horas.

## 1.6. MELHORAMENTO GENÉTICO DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS APOMÍTICAS

De acordo com Valle et al. (2008), um programa de melhoramento compreende três atividades básicas: a formação de populações segregantes, com combinações genéticas novas, a avaliação da variabilidade gerada e seleção dos melhores indivíduos e famílias para novas combinações e a multiplicação, distribuição e utilização dos produtos do melhoramento com a finalidade de concretizar ganhos, sejam em produtividade ou eficiência.

Os critérios de seleção para plantas forrageiras são inerentemente mais complexos do que os de uma cultura anual como o milho ou arroz. Estes se concentram em uma única espécie, de ciclo anual, cultivados em monocultura, cujo valor está no produto direto da planta, enquanto o valor final de uma planta forrageira não está em sua produção maior, mas sim em proporcionar uma maior e mais eficiente produção de proteína animal na forma de carne, leite, lã ou couro. Assim, plantas forrageiras devem expressar seu mérito em sistemas produtivos ao longo do tempo, em um ambiente complexo de interações solo-planta-animal-clima, resultando em maior produção animal, com sustentabilidade (Valle et al., 2008).

O principal método de melhoramento genético utilizado para gramíneas forrageiras no Brasil é a seleção a partir da variabilidade natural em coleções de germoplasma, introduzidas de seu ambiente de origem (Valle et al., 2008). No caso de *P. notatum*, a cultivar de reprodução sexual 'Pensacola', originária da Argentina, pode ser incorporada aos programas de melhoramento juntamente com os ecótipos nativos no Rio Grande do Sul. Estes, devido ao modo de reprodução apomítico, têm a vantagem de fixar genótipos superiores, simplificando e reduzindo custos para a obtenção de sementes.

De acordo com Savidan et al. (1989), o melhoramento de espécies apomíticas necessita de plantas totalmente ou altamente sexuais para que se possam fazer cruzamentos e desta forma liberar a variabilidade genética sobre a qual o melhorista vai atuar. Uma vez que elas estão disponíveis, as espécies apomíticas são consideradas as ideais sob o ponto de vista do melhoramento, pois sua hibridação com plantas sexuais oferece a oportunidade de produzir novas combinações gênicas e permanentemente fixar uma progênie heterozigota para imediata avaliação como variedades  $F_1$  potenciais que apresentam a conveniência da propagação por semente. No caso de espécies apomíticas obrigatórias que não possuem fontes próximas conhecidas de sexualidade, o método de melhoramento permanece sendo a seleção entre os ecótipos variáveis ocorrentes na espécie (Asker & Jerling, 1992).

Plantas tetraplóides sexuais não foram encontradas entre as populações apomíticas nativas do RS de *P. notatum*. Torna-se, então,

necessário duplicar o número cromossômico dos acessos diplóides sexuais para mais facilmente produzir plantas tetraplóides sexuais e usá-las como genitores femininos nos cruzamentos com plantas apomíticas doadoras de pólen (Quarín et al., 2001).

Forbes & Burton (1961b) duplicaram artificialmente, com colchicina, cromossomos em *P. notatum* diplóide sexual. Os indivíduos poliplóides sexuais gerados foram utilizados como genitores femininos em hibridações intraespecíficas, enquanto os apomíticos com características desejáveis serviram como doadores de pólen. Nas progênies estudadas havia indivíduos que possuíam as características de interesse agrônomo e que eram sexuais e outros, que, sendo apomíticos, fixavam estas características. Este procedimento permitiu a introdução de grande variabilidade em *P. notatum*, abrindo novas perspectivas para o melhoramento da espécie.

Identificar híbridos apomíticos em populações segregantes para o modo de reprodução é talvez a fase mais importante no programa de melhoramento das espécies apomíticas. Na maioria destes programas, a determinação se os híbridos são apomíticos ou sexuais é realizada através de estudos citoembriológicos do tipo de saco embrionário presente no ovário maduro (antese) e/ou teste de progênie no campo (uniformidade fenotípica). Estas técnicas são trabalhosas e exigem que a progênie atinga a floração e que estes produzam descendentes (Quarín, 1992).

De acordo com Sybenga (1992), a citogenética no melhoramento de plantas apresenta dois aspectos fundamentais: primeiramente fornecer informações e depois, fornecer métodos para a manipulação do material genético. Após obter as informações, pode-se manipular o material genético estabelecendo técnicas como: transferência de genes inter e intra-específicos (hibridização somática, adição, manipulação de recombinação, entre outros). É possível manipular o nível de ploidia e a dose de genes (haploidização, autopoliploidização, aloploidização) e também os sistemas genéticos (melhoramento de híbridos, apomixia e outros). A contribuição da citogenética no melhoramento é de viabilizar e monitorar o processo de transferência de genes, esterilidade nos cruzamentos e incompatibilidade entre genomas.

Para *Brachiaria*, Valle et al. (2008) recomendam que sejam utilizadas plantas apomíticas oriundas de pelo menos um retrocruzamento, ou seja, as plantas F<sub>1</sub> sexuais devem ser cruzadas novamente com os genitores masculinos adaptados. Somente após esse novo ciclo de cruzamento são selecionadas plantas apomíticas para liberação como novas cultivares. Esse procedimento é recomendado porque a espécie é exótica e necessita de maior esforço no sentido de adaptação às condições edafo-climáticas. Em *Poa pratensis*, a alta frequência de biótipos apomíticos dificulta o melhoramento pela baixa frequência de hibridação entre os mesmos. Para superar a apomixia nesta espécie e criar variação via recombinação sexual são propostos métodos como a indução de sexualidade temporária por meio da aplicação de reguladores de crescimento e a regeneração de plantas a partir do endosperma (Matzk, 1991).

Capim colômbio (*Panicum maximum*) se apresenta como uma boa oportunidade de melhoramento de uma espécie de gramínea apomítica no Brasil. Como há disponibilidade de plantas sexuais, o procedimento de

melhoramento que tem sido proposto consiste em cruzá-las com plantas apomíticas portadoras de alguma característica de interesse, selecionando na  $F_1$  as plantas apomíticas portadoras da característica para que sejam novamente cruzadas com plantas sexuais de alto rendimento. Este procedimento é repetido até que se obtenha uma variedade apomítica melhorada e portadora da característica de interesse (Savidan et al., 1989). Em *Paspalum dilatatum*, um método de hibridação intraespecífica, em que um biótipo sexual foi utilizado como genitor feminino e um apomítico como genitor masculino, foi bastante eficiente quando foi feita seleção nas gerações segregantes para hábito semi-decumbente e fertilidade de sementes (Bennett et al., 1969).



## 1.7 ESCOLHA DE GENITORES PARA PROGRAMAS DE HIBRIDAÇÕES

A escolha do material parental é um importante passo para um programa de melhoramento. Esta escolha deve ser feita após considerar o problema a ser solucionado e então avaliar os prováveis genitores: no mínimo um dos pais deverá garantir o sucesso do material genético a ser melhorado (Hadley & Openshaw, 1980).

Para execução dos trabalhos nos programas de melhoramento, alguns pré-requisitos devem ser observados. Primeiramente deve-se reunir diversidade genética em uma coleção a ser explorada. Esta deverá ser a mais representativa possível, ou pelo menos com diversidade para as características-alvo do programa. Além disso, características básicas das espécies, dos acessos e dos indivíduos envolvidos precisam ser determinadas, tais como a ploidia, modo de reprodução, afinidade entre espécies, distância genética, época de florescimento, entre outras. Dependendo do modo de reprodução, traçam-se as estratégias de cruzamentos visando à criação de populações segregantes (Valle et al., 2008)

De acordo com Mendes-Bonato et al. (2002), híbridos intra e interespecíficos com combinações genéticas favoráveis podem ser obtidos através da seleção e cruzamentos de genitores. A escolha deverá obedecer alguns critérios, como a procura de genitores com ampla diversidade genética na coleção de germoplasma. Esta etapa requer um conhecimento prévio sobre modo de reprodução das plantas, comportamento cromossômico e nível de ploidia entre as espécies compatíveis. Plantas com comportamento cromossômico regular e produção de pólen viável, por exemplo, poderão ser escolhidas, pois garantirão uma progênie fértil, com conseqüente produção de sementes.

No caso de poliplóides, segregações cromossômicas irregulares podem afetar a viabilidade do pólen. Acessos poliplóides de *P. notatum* apresentam, em geral, elevada frequência de anormalidades meióticas relacionadas diretamente com o nível de ploidia e com o modo de reprodução apomítico (Adamowski et al., 2005; Pagliarini et al., 2001, Dahmer et al., 2008).

Nas análises realizadas por Dahmer et al. (2008), com acessos tetraplóides de *P. notatum*, foi verificada uma alta fertilidade do pólen, o que assegura a formação do endosperma, já que a espécie se reproduz por apomixia do tipo pseudogamia. Para o melhoramento, esses acessos analisados, sendo potencialmente macho-férteis, podem ser utilizados como genitores masculinos em programas de cruzamentos.

## **2. CAPITULO II**

**Produção de forragem de híbridos intraespecíficos de *Paspalum notatum***

## **Produção de forragem de híbridos intraespecíficos de *Paspalum notatum***

Roberto Luis Weiler, Miguel Dall'Agnol, Carine Simioni, Karine Cristina Krycki, Emerson André Pereira e Juliana Medianeira Machado

### **Resumo**

As gramíneas forrageiras nativas do sul do Brasil, durante muitas décadas, foram a base da produção animal. Uma das espécies nativas mais frequente no sul do Brasil é *Paspalum notatum* Flügge (grama forquilha). O germoplasma nativo de *P. notatum* é tetraplóide ( $2n=4X=40$ ) e de reprodução apomítica e, para viabilizar cruzamentos, é necessária a duplicação de acessos sexuais diplóides ( $2n=2X=20$ ). O objetivo principal desse trabalho foi avaliar a produção de forragem e outras características agronômicas de híbridos intraespecíficos de *P. notatum*, com a finalidade de obter materiais passíveis de registro e proteção varietal junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, visando ao seu lançamento como cultivares no futuro. Através de uma colaboração com o IBONE (Instituto de Botânica da Universidade do Nordeste da Argentina), foram obtidos três genótipos nominados 'Q4188', 'Q4205' e 'C44X', tetraplóides e sexuais que foram cruzados com os ecótipos 'Bagual' e 'André da Rocha'. Os híbridos obtidos foram avaliados quanto à produção de massa seca de folhas, colmos e inflorescências, ao hábito de crescimento, altura de plantas e contagem do número de afilhos. Também foi avaliado o comportamento dos híbridos quanto às injúrias causadas pelo frio durante o inverno. Os dados obtidos foram analisados através do programa estatístico SAS utilizando a comparação múltipla de Dunnett e entre eles foi feita a correlação de Pearson. Também foi calculada a Capacidade Geral de Combinação (CGC) e a Capacidade Específica de Combinação (CEC) a partir das seis famílias geradas. Dos 196 híbridos avaliados, o que mais produziu aquele nominado "D3", com 597 gramas de matéria seca total, representando cerca de 42% a mais do que o genitor mais produtivo (ecótipo 'Bagual'), que produziu 420 gramas por planta no acumulado dos cinco cortes. Este híbrido produziu cerca de sete vezes mais que a cultivar 'Pensacola' (87g). Os genitores 'Bagual' e 'Q4205' foram os que apresentaram maior Capacidade Geral de Combinação (CGC). Não houve relação entre o grau de coloração ocasionado pelo acúmulo de antocianinas com o efeito de geada e com a retomada de crescimento pós-inverno, assim como não foi encontrada correlação entre hábito de crescimento e produção de massa seca. Os híbridos mais produtivos foram analisados quanto ao seu modo de reprodução, distinguindo os genótipos apomíticos e os sexuais para, no futuro ser possível seu registro e proteção.

Palavras-chave: Grama forquilha, hibridização, avaliações agronômicas.

## Forage production of intraspecific *Paspalum notatum* hybrids

### Abstract

The native grasses from southern Brazil for many decades are the basis animal production. One of the most frequent native species in southern Brazil is *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass). The native germplasm of *P. notatum* is tetraploid ( $2n = 4x = 40$ ) and has apomictic reproduction and to make crosses possible, the duplication sexual diploid accessions ( $2n = 2x = 20$ ) has to be made. The main objective of this study was to evaluate forage yield and agronomic traits of intraspecific *P. notatum* hybrids, in order to obtain materials that can be registered at the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aiming its release as cultivars in the future. Through a collaboration with the IBONE (Instituto de Botânica del Nordeste), three tetraploid and sexual genotypes were obtained ('Q4188', 'Q4205' and 'C44X'), that were crossed with the ecotypes 'Bagual' and 'André da Rocha'. The hybrids were evaluated for leaves, stems and flowers dry mass production, growth habit, plant height and number of tillers. The hybrids response to inter injuries caused by the cold was also evaluated. All data were analyzed using the SAS statistical software using the Dunnett's model of multiple comparison as well as Pearson correlation. The General and Specific Combining Ability for the six families were generated. A total of 196 hybrids were tested and the hybrid "D3" had the highest yield with 597 grams of total dry matter, which represents about 42% more production than the parent most productive (ecotype 'Bagual'), which produced 420 grams per plant, accumulated in the five cuts. This hybrid produced about seven times more than the cultivar 'Pensacola' (87.02g). The parents 'Bagual' and 'Q4205' are those with a higher General Combining Ability. It was not possible to find a relation between the coloring caused by the accumulation of anthocyanins with the effect of cold, neither with the vigor of regrowth after winter. Also, no correlation was found between growth habit and dry matter production. The hybrids with highest yield are being evaluated in larger areas and were analyzed for their mode of reproduction, distinguishing between apomictic and sexual genotypes in order to register and protect them in the future.

Key words: Bahiagrass, hybridization, agronomic evaluations.

## Introdução

As gramíneas forrageiras nativas do sul do Brasil, durante muitas décadas, estão sendo a base da produção animal, resistindo ao manejo inadequado ou a restrições bióticas, o que acabou levando ao cenário atual, que é de degradação rápida das pastagens e da falta de opções para repor cultivares antigas. Espécies forrageiras nativas do Estado do Rio Grande do Sul desempenham um papel importante na atividade pecuária, representando o maior recurso utilizado para a produção de bovinos de corte, constituindo, em média, 76% da área pastoril utilizada (SEBRAE/SENAR/FARSUL, 2005).

Dentre as gramíneas nativas do Brasil, o gênero *Paspalum* L. (família Poaceae) têm lugar de destaque, possuindo cerca de 300 espécies, muitas delas com bom valor forrageiro, que vegetam em condições de clima quente (tropical, subtropical e temperado quente) (Barreto, 1974). Ocorrem em praticamente todas as comunidades herbáceas nos distintos ecossistemas do país, sendo dominantes e responsáveis pela produção da maior parcela da forragem disponível em muitas formações vegetais (Valls, 1987). As espécies também se destacam pela maior tolerância ao frio, produção e qualidade de forragem, quando comparadas a outras gramíneas tropicais e subtropicais no Rio Grande do Sul (Prestes et al., 1976).

Uma das espécies nativas mais comuns no sul do Brasil é *Paspalum notatum* Flüggé (grama forquilha) e sua importância como forrageira subtropical é amplamente aceita, apresentando boa qualidade de forragem, alta resistência ao pastejo e ao pisoteio dos animais (Pozzobon & Valls, 1997). É uma das espécies tetraplóides de gramíneas nativas de maior importância no sul do Brasil, Uruguai, nordeste da Argentina e sul do Paraguai (Quarín et al., 1984). Perene de estação quente, é a espécie de ocorrência mais freqüente na maioria das formações campestres do Rio Grande do Sul (Barreto, 1974). Os inúmeros ecótipos nativos apresentam adaptações às mais variadas condições de solo e clima e apresentam características morfológicas muito variadas quanto ao tamanho e espessura do rizoma, tamanho das flores e das inflorescências, rendimento e qualidade (Nabinger & Dall'Agnol, 2008). A

espécie, de uma maneira geral, produz forragem da primavera ao outono, é bem adaptada ao pastejo e resistente ao pisoteio, pois seus rizomas ficam protegidos pela bainha e emitem novas folhas estimuladas pelas temperaturas de primavera (Maraschin, 2001).

No Rio Grande do Sul, a cultivar Pensacola (*P. notatum* var. *saurae*), nativa do nordeste e centro-oeste da Argentina e encontrada e difundida nos Estados Unidos é a mais utilizada. Esta já foi a mais cultivada nas regiões do Planalto e das Missões do Rio Grande do Sul (Barreto, 1974). Reproduz-se sexualmente, é meioticamente estável, alógama e autoincompatível (Burton, 1946). De estação quente, apresenta maior produção de forragem em temperaturas médias superiores a 15°C. Seu hábito de crescimento é rasteiro com rizomas curtos e firmemente presos à superfície do solo formando uma cobertura densa (Mislevy, 1985). Sua utilização e difusão merecem destaque, principalmente nas criações de eqüinos, onde se tornou uma alternativa para o pastejo desses animais, devido a características como: tolerância a intenso e freqüente pisoteio, baixa altura da planta, ausência de estruturas vegetais contundentes e princípios anti-nutricionais não relatados (Haddad et al., 1999).

A maioria dos biótipos de *P. notatum* são tetraplóide ( $2n=4X=40$ ) e de reprodução apomítica (Forbes & Burton, 1961). O termo apomixia no seu sentido mais amplo significa “longe do ato da mistura”, é sinônimo de formação assexual de sementes ou agamospermia (Asker & Jerling, 1992). A apomixia tem sido descrita em mais de 400 espécies com flores, contudo ela é pobremente representada entre as espécies cultivadas. As principais exceções são as gramíneas tropicais dos gêneros *Brachiaria*, *Paspalum* e *Panicum* (Asker & Jerling, 1992). A apomixia proporciona uma oportunidade única de clonagem de plantas através da semente e por isso pode ter um importante papel como ferramenta no melhoramento de plantas (Hanna & Bashaw, 1987).

Para que a diversidade genética conservada pela apomixia seja plenamente explorada é necessário viabilizar cruzamentos por meio de plantas sexuais compatíveis. Por exemplo, em *P. notatum*, o processo de duplicação de acessos sexuais diplóides ( $2n=2X=20$ ) possibilita a obtenção de plantas sexuais tetraplóides ( $2n=4X=40$ ), viabilizando o cruzamento destas com

ecótipos nativos tetraplóides apomíticos (doadores de pólen) (Quarín et al., 2001). Assim é possível obter híbridos apomíticos com potencial produtivo passíveis de proteção de novas cultivares junto ao Ministério da Agricultura, gerando interesse da indústria de sementes e possibilidade de comercialização de novos materiais.

Uma reação das plantas de *P. notatum* a estresses ambientais é mudança de coloração de verde para arroxeadas devido ao acúmulo de antocianinas. As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonóides, pigmentos com estruturas fenólicas variadas (Kuskoski et al., 2004). Seu espectro de cor vai do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons de púrpura. Os flavonóides são pigmentos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal e já foi detectada a ocorrência de mais de 8000 compostos fenólicos em plantas (Volp et al., 2008). Estes compostos protegem os organismos de danos produzidos por agentes oxidantes como raios ultravioletas, poluição ambiental, estresses, dentre outros. Os flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas (Moon et al., 2006), sendo responsáveis pelo aspecto colorido das folhas e flores, podendo estar presentes em outras partes das plantas. Em *P. notatum* ocorre o arroxejamento das folhas quando as plantas são submetidas a frio, podendo esse ser um marcador morfológico de fácil avaliação se estiver associado a algum tipo de tolerância a esse estresse. Costa & Scheffer-Basso (2003), avaliando *Paspalum dilatatum*, descreveram que as folhas dessa espécie ficaram arroxeadas durante o inverno, indicando elevado conteúdo de antocianinas que, segundo Salisbury & Ross (1991) ocorre em diversas espécies submetidas ao frio. De acordo com Chatterton et al. (1989), em gramíneas hibernais, a cor arroxeadada está associada com o acúmulo de carboidratos solúveis.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de forragem e outras características agronômicas de híbridos intraespecíficos de *P. notatum* obtidos através de esquemas de cruzamentos, com a finalidade de selecionar materiais superiores passíveis de registro e proteção varietal junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento visando o lançamento como

cultivares no futuro. Além disso, através da análise da capacidade geral e específica de combinação, objetivou-se também indicar qual o melhor genitor para ser utilizado em futuros cruzamentos no programa de melhoramento genético de forrageiras da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **Material e Métodos**

Os cruzamentos para obtenção de híbridos e a condução das mudas foram realizados no Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS. A avaliação da progênie híbrida foi realizada na Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS), localizada no município de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, à latitude 30°29'S e longitude 51°06'W. O clima do local é do tipo Cfa, temperado sem estação seca definida (KÖEPPEN, 1948). As temperaturas médias anuais mínimas e máximas da região são 14°C e 24,2°C, respectivamente, com uma temperatura média anual de 19,6°C. A precipitação pluviométrica média anual é de 1.398 mm e a umidade relativa do ar média anual de 79% (MOTA et al., 1971).

Através de uma colaboração com o IBONE (Instituto de Botânica del Nordeste), da cidade de Corrientes, Argentina, foram obtidos três genótipos nominados 'Q4188', 'Q4205' (Quarín et al., 2003). O genótipo 'Q4188' apresenta hábito de crescimento ereto, rizomas curtos e grossos, bainhas foliares de coloração vermelho-roxo e anteras e estigmas de cor roxo. O genótipo 'Q4205' apresenta rizomas curtos, hábito de crescimento ereto, bainhas foliares de coloração vermelho-roxo e estigmas de cor branco. O genótipo 'C44X' apresenta hábito de crescimento prostrado, rizomas longos, filhas curtas e bainhas foliares de coloração verde (Quarín et al., 2001). Os três genótipos são tetraplóides e sexuais e foram cruzados com o germoplasma elite tetraplóide nativo do Estado do Rio Grande do Sul (ecótipos 'Bagual' e 'André da Rocha'). Foram realizados cruzamentos dirigidos usando-se a metodologia descrita por Burton (1948): destacavam-se afilhos com rizomas que tinham inflorescências que exporiam as anteras e estigmas na manhã do



dia, no qual ocorreria a polinização, ficando acomodadas, no dia anterior, em uma câmara com um umidificador de ambiente, saturando o ar dentro da câmara, evitando-se assim a liberação do pólen pelas anteras (imitando-se uma situação de dia de chuva na natureza) (FIGURAS 1a e 1b). A seguir, a emasculação era realizada com a utilização de uma pinça, que era limpa sempre que tocava em alguma antera (FIGURA 1c), deixando no racemo somente as flores que iriam abrir (expunham o estigma e as anteras) na manhã da polinização, com a finalidade de evitar que alguma flor que não havia aberto no início da manhã abrisse e liberasse o pólen durante o dia (FIGURA 1d).

Obtiveram-se seis combinações nos cruzamentos, sendo elas: 'Q4188' X 'André da Rocha' (Progênie "A"), 'Q4188' X 'Bagual' (Progênie "B"), 'Q4205' X 'André da Rocha' (Progênie "C"), 'Q4205' X 'Bagual' (Progênie "D"), 'C44X' x 'André da Rocha' (Progênie "E") e 'C44X' x 'Bagual' (Progênie "F").

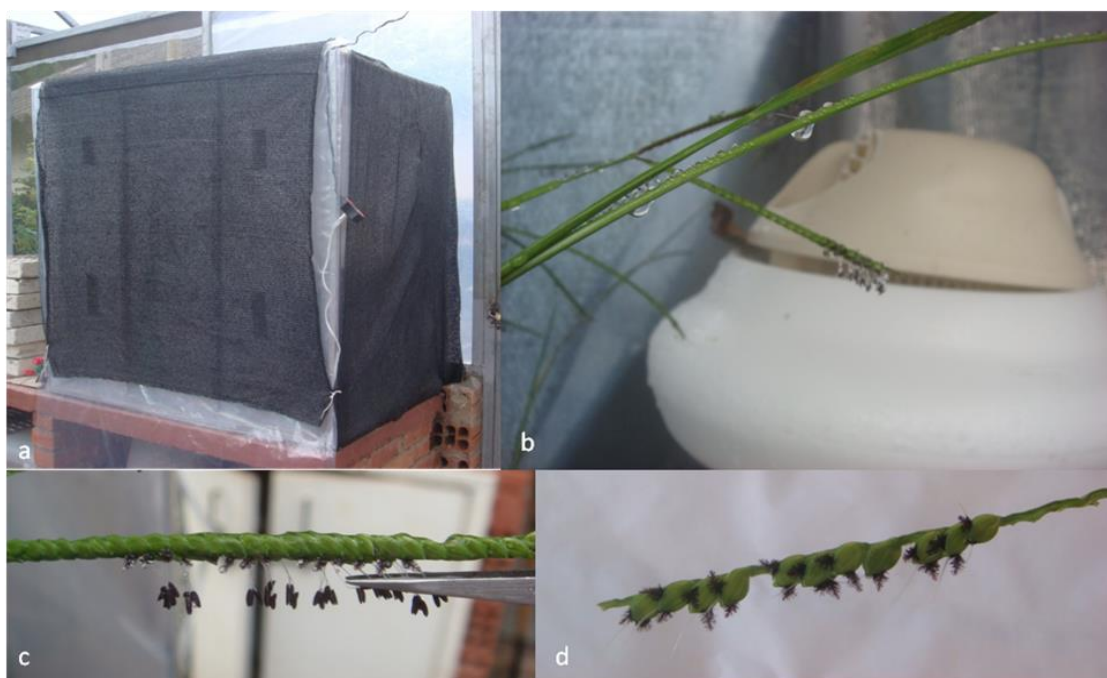


FIGURA 1. Sequência para polinização em *Paspalum notatum*. (a) câmara com vedação e sombrite de 70%; (b) umidificador para saturação do ambiente; (c) emasculação de inflorescências com pinça de ponta fina; (d) inflorescência emasculada, permanecendo somente as flores emasculadas no dia do cruzamento.

A coleta do pólen era realizada ao amanhecer, na hora da exposição dos estigmas e anteras, sendo que as plantas doadoras de pólen ficavam acondicionadas em casa de vegetação fechada com a finalidade de evitar a entrada de insetos, que poderiam ser fonte de mistura de pólen de diferentes plantas (FIGURA 2a). A polinização ocorria após uma leve fricção do racemo feminino (recém emasculado) contra os grãos de pólen presentes em um saco de papel encerado que foi em seguida utilizado para o ensacamento da inflorescência feminina (FIGURA 2b).



FIGURA 2. Sequência para polinização em *Paspalum notatum*. (a) pólen recém coletado em saco de papel encerado; (b) inflorescência polinizada com grãos de pólen aderidas ao estigma; (c) identificação de plantas e cruzamentos; (d) sala com plantas polinizadas acondicionadas.

Os afilhos com racemos polinizados foram identificados e mantidos em garrafas “pet” com cerca de meio litro de água em lugar fresco, com luz e protegidas (FIGURA 2c e 2d). Em torno de um mês depois do ensacamento, as inflorescências eram coletadas e debulhadas e as flores contendo cariopses eram separadas para a coleta das sementes (Bennett et al., 1969).

As sementes colhidas foram escarificadas e postas a germinar em placas de petri com papel germitest, quando as plântulas emitiam a primeira folha expandida, eram transferidas para bandejas alveoladas com substrato comercial (FIGURA 3a). Quando as plantas apresentavam quatro ou mais afilhos, estes eram separados em quatro copos com a finalidade de se obter quatro clones que seriam as repetições à campo (FIGURA 3b). Quando as mudas estavam bem enraizadas, estas foram levadas ao campo (FIGURA 3c). O transplante foi realizado no dia 26 de dezembro de 2010 numa área da EEA/UFRGS previamente corrigida, adubada e arada, conforme as recomendações do Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (2004). As repetições foram distribuídas no campo seguindo-se um delineamento completamente casualizado, em um espaçamento de 1 metro entre plantas nas linhas e nas colunas (FIGURA 3d). Logo após o transplante foi utilizada irrigação por aspersão para facilitar o estabelecimento das mudas e a “pega” no campo. Não foi realizado corte de uniformização das mudas: as plantas dos genitores apresentavam o mesmo tamanho das plantas dos híbridos no momento do transplante e com enraizamento similar.

Foram avaliados os germoplasmas obtidos de cruzamentos dirigidos entre plantas sexuais tetraplóides e ecótipos apomíticos nativos. Avaliou-se a produção de massa seca de folhas, colmos e inflorescências, o hábito de crescimento, altura de plantas, contagem do número de afilhos e o comportamento dos híbridos quanto a injúrias causadas pelo frio durante o inverno. Os dados obtidos foram analisados através do programa estatístico SAS utilizando a comparação múltipla de Dunnett.



FIGURA 3. Produção/obtenção de mudas de *Paspalum notatum*. (a) plântulas no ponto de transplante para bandejas alveoladas com substrato; (b) plantas em sacos plásticos; (c) Muda enraizada no momento do transplante para o campo; (d) vista do campo após a implantação do experimento.

No período estival de 2010-2011 foi possível realizar dois cortes para avaliação de produção de massa seca e no período estival de 2011-2012 foi possível realizar mais três cortes. As datas dos cortes foram: 22 de fevereiro de 2011 (Corte 1), 06 de abril de 2011 (Corte 2), 17 de novembro de 2011 (Corte 3), 09 de janeiro de 2012 (Corte 4) e 16 de março de 2012 (Corte 5). Os cortes eram feitos a uma altura de 5 cm e realizados quando as plantas de hábito de crescimento ereto atingiam 25 cm de altura.

No momento dos cortes eram feitas as avaliações de produção da massa seca de folhas (lâminas foliares), colmos (colmos mais bainhas) e inflorescências. As plantas verdes e frescas eram cortadas em três partes com o auxílio de uma tesoura. Assim, as lâminas foliares eram separadas das bainhas e estas eram depositadas junto com os colmos, enquanto as

inflorescências eram cortadas no ponto de separação dos racemos. A massa fresca era seca em estufa a 50°C durante cerca de dez dias; a pesagem era feita imediatamente após a secagem.

No momento de cada corte foi avaliado o hábito de crescimento através de uma avaliação visual do tipo de planta. Foram adotadas cinco classes (nota de um a cinco), onde um era atribuído a plantas completamente prostradas e cinco a plantas completamente eretas. A avaliação do número de afilhos por planta foi feita através de contagem direta de todos os afilhos que apresentam folhas expandidas e a altura foi medida com o auxílio de uma régua graduada em centímetros (FIGURA 4).

Através das notas dadas visualmente no dia 15 de junho de 2011 foi avaliada a intensidade de coloração nas folhas dos híbridos no campo com a finalidade de encontrar uma possível relação entre o grau de coloração, ocasionado pelo acúmulo de antocianinas, com o efeito de geadas e com a retomada de crescimento pós-inverno. Foi utilizada uma escala de zero a 10, onde a nota zero foi atribuída às plantas com folhas completamente verdes e 10 às plantas com todas as folhas com coloração vermelha. O acúmulo de antocianinas ocorre em reação a um estresse que a planta está sofrendo. Mesmo não tendo ocorrido nenhuma geada até esta data de avaliação foi possível visualizar a diferença na coloração das folhas.

No dia 12 de agosto de 2011 foi avaliado o efeito das geadas, através de notas qualitativas da incidência de folhas com injúrias causadas pelo frio numa escala de um a quatro, onde a nota um foi dada para plantas com pouco ou nenhum efeito e a nota quatro para plantas totalmente ou com muitas folhas afetadas. De acordo com os dados meteorológicos da Estação Experimental Agronômica da UFRGS (latitude: -30,1°; longitude: -51,7°; altitude 32 metros), no período de 03 de julho até o dia 08 de julho de 2011, as temperaturas mínimas pela manhã eram abaixo de 0°C. As folhas atingidas por geadas ficaram secas, não sendo mais possível diferenciar quanto à coloração. No dia 06 de outubro de 2011 foi realizada uma avaliação da sobrevivência das plantas após o período de frio, utilizando novamente uma escala de notas de

um a quatro, onde a nota um foi atribuída às plantas com menor injúria e nota quatro às plantas que menos sofreram injúrias.

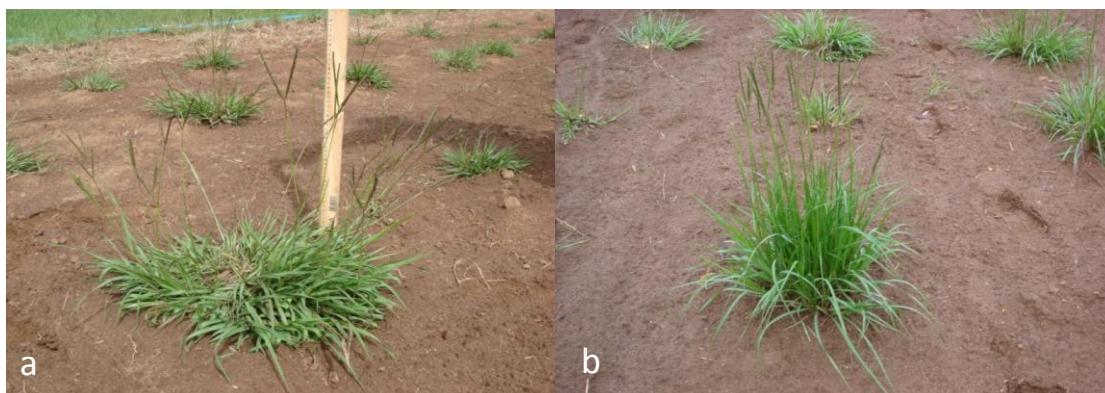


FIGURA 4. Avaliação da altura de plantas com régua graduada e hábito crescimento, evidenciando uma planta prostrada (a) e uma planta ereta (b).

Os resultados obtidos foram computados e analisados usando programa de análise estatística SAS, onde os valores de massa seca total (MST), massa seca de folhas (MSF), massa seca de inflorescência (MSI), massa seca de colmo (MSC), altura de planta e número de afilhos de cada acesso foram comparados um a um com a testemunha superior; neste caso o ecótipo 'Bagual'. Também foi calculado o teste "F" e feita a comparação múltipla de Dunnett. Foi calculada ainda a Capacidade Geral de Combinação (CGC) e a Capacidade Específica de Combinação (CEC) a partir das médias de produção de massa seca das seis progênies geradas. Finalmente, foi realizada a correlação de Pearson, entre as variáveis massa seca de folhas (MSF), massa seca de colmo (MSC), massa seca de inflorescência (MSI), massa seca total (MST), número de afilhos e altura de plantas. Em outra análise também foi utilizada a correlação de Pearson para as variáveis MST, número de afilhos, MST do terceiro corte (primeiro corte após inverno), hábito de crescimento, coloração por acúmulo de antocianinas, efeito da geada e sobrevivência pós-inverno.

### Resultados e Discussão

Dos cruzamentos entre os genitores femininos sexuais 'Q4188', 'Q4205' e 'C44X' e os genitores masculinos apomíticos 'Bagual' e 'André da

Rocha', obteve-se um total de 250 plantas híbridas. Destas, 196 foram levadas ao campo com quatro repetições distribuídas a acaso dentro de uma mesma área para a realização das avaliações agronômicas (FIGURA 5). Na progênie "A" foram avaliados 29 híbridos, na progênie "B" avaliou-se 44 híbridos, na progênie "C" foram 37, na progênie "D" foram 27, na progênie "E" foram 26 e na progênie "F" foram avaliadas 33 plantas híbridas.

Os dados de produção de massa seca são apresentados na Tabela 1. Em função do espaço disponível, esta Tabela apresenta apenas os valores médios de produção das quatro repetições das 20 plantas mais produtivas, dos genitores, da cultivar 'Pensacola' e das cinco plantas menos produtivas, sempre comparadas dentro de cada corte. Para cada corte, o valor de massa seca total (MST) foi comparado estatisticamente com o genitor masculino mais produtivo, o ecótipo 'Bagual'. Observa-se na Tabela 1 que o ranqueamento dos materiais mais produtivos se alterou de acordo com os cortes; mudança essa observada mais acentuadamente após o período hibernal de 2011.



FIGURA 5. Vista parcial do campo onde foram estabelecidas 196 plantas híbridas, os pais utilizados nos cruzamentos e a cultivar 'Pensacola' em quatro repetições.

Os híbridos D17 e C17 apresentaram boa produção nos quatro

primeiros cortes, porém no último corte não acompanharam o aumento de produção dos outros genótipos. Os híbridos C15, C1, C23, B8, B29, B28, D6, B4, D25, C35, D24 e A13 estavam entre as 20 plantas mais produtivas, mas após o inverno não mantiveram o mesmo desempenho e não se destacaram no segundo ano de produção. Semelhante ao genótipo C15, que no primeiro ano foi o quinto mais produtivo e mesmo assim não repetiu a produção no segundo ano, com 246 g no acumulado de três cortes.

Os híbridos B17, B43, C24, F15, C18, C32, C9, F24, B37, C6, A20 e D23 não estavam entre as plantas mais produtivas no primeiro ano, mas no segundo ano tiveram um incremento de produção de MST. Destaque para o híbrido B43, que mesmo não tendo boa produção no primeiro ano produziu mais do que o híbrido D3 no quinto corte, que vinha sendo o mais produtivo em todos os cortes. Os cortes com as maiores produções foram os de verão e mesmo os híbridos que produziram bem no primeiro ano tiveram decréscimo nas produções de MST no corte de primavera, se recuperando nos cortes subsequentes.

A produção de massa seca de alguns híbridos das progênes evidenciam o vigor híbrido de vários genótipos, já que apresentaram valores superiores aos pais. Esse vigor híbrido, de certa forma, já era esperado, pois as plantas mães são homogêneas, e a distância genética dos pais é grande (Paterniani & Campos, 2005), visto que os genitores masculinos e apomíticos são nativos do Rio Grande do Sul e os genitores femininos foram obtidos através de duplicação cromossômica realizada na Argentina.

O híbrido que mais produziu no acumulado de cinco cortes foi o D3, que apresentou 597 gramas de matéria seca total, o que representa cerca de 42% a mais do que o genitor mais produtivo (ecótipo 'Bagual'), que produziu 420 gramas por planta no acumulado dos cinco cortes. A planta D3 é oriunda do cruzamento entre o genitor feminino 'Q4205' e o genitor masculino 'Bagual'. Este híbrido produziu cerca de sete vezes mais que a 'Pensacola' (87g).



TABELA 1. Produção acumulada de cinco cortes da massa seca total (MST), em gramas, das 20 plantas mais produtivas, das cinco plantas menos produtivas, dos genitores e da cultivar 'Pensacola'.

MST Ano 1			MST Ano 2					MST Acumulado 2 anos		
Genótipo	Corte 1	Corte 2	Total	Genótipo	Corte 3	Corte 4	Corte 5	Total	Genótipo	Total Geral
D3	96,7 *	70,0 *	166,7 *	D3	112,3 *	80,1	238,0	430,4 *	D3	597 *
D17	64,2 *	65,2	129,3	B43	59,7	50,2	247,8	357,7	D16	456
C17	67,7 *	59,1	126,7	C24	89,0	69,1	196,7	354,8	C17	454
D16	58,9 *	59,0	117,8	B17	77,5	56,6	215,2	349,2	C2	446
C15	62,8 *	51,6 *	114,4	D16	81,6	57,9	198,9	338,4	B17	439
C2	60,6 *	52,5	113,1	F15	35,4	57,0	241,7	334,1	D17	438
C1	58,2 *	50,6	108,7	C2	78,4	83,6	170,9	332,9	B43	425
C23	52,2	50,9	103,1	C18	92,1 *	49,6	189,8	331,5	C24	425
B8	42,0	54,8	96,7	C17	93,5 *	60,4	173,5	327,4	D25	414
B29	43,5	51,4	94,9	C32	59,8	63,1	201,3	324,1	C18	412
B28	43,9	49,7	93,6	D25	49,9	58,9	214,1	322,8	F15	405
D6	41,8	51,4	93,2	C9	71,8	48,9	190,7	311,3	F29	392
B4	43,2	49,5	92,6	F24	33,2	62,9	213,8	310,0	B26	388
D25	41,2	49,7	90,8	D17	81,7	47,9	179,1	308,6	B37	377
B17	41,8	48,1	89,9	B37	81,8	58,8	165,6	306,2	F24	372
C35	48,8	39,7	88,5	B26	70,6	60,8	173,2	304,5	C32	366
F29	47,5	40,5	88,0	F29	30,6	51,8	221,4	303,7	C9	363
D24	44,1	41,3	85,4	C6	48,9	60,1	186,5	295,5	C6	362
A13	43,6	39,6	83,2	A20	55,8	49,4	182,2	287,3	C15	360
B26	42,4	40,6	83,0	D23	44,5	38,2	191,3	273,9	B29	356
BAGUAL	20,5	26,9	47,4	BAGUAL	40,9	74,0	258,6	373,4	BAGUAL	421
AR	8,6	9,9	18,6	AR	19,0	48,8	224,2	292,0	AR	311
Q4188	19,3	29,9	49,2	Q4188	38,6	25,8 *	79,8 *	144,3	Q4188	193
Q4205	10,8	12,2	23,0	Q4205	9,3	6,5 *	22,2 *	38,0 *	Q4205	55
C44X	1,8	1,6	3,4	C44X	4,5	8,3 *	32,4 *	45,1 *	C44X	50
PENSAC	4,6	6,3	10,9	PENSAC	10,9	19,8 *	45,4 *	76,1 *	PENSAC	87
D21	2,5	2,0	4,5	E5	2,8	3,3 *	17,3 *	23,5 *	E5	34 *
F5	1,7	1,4	3,0	A35	6,3	3,5 *	11,9 *	21,7 *	F5	28 *
E22	0,9	0,9	1,8	D21	4,2	2,1 *	9,6 *	15,9 *	A35	23 *
D15	0,8	1,2	1,6	E19	2,7	3,3 *	9,7 *	15,6 *	D21	22 *
A21	0,2	0,2	0,4	D15	1,6	0,9 *	7,6 *	10,1 *	D15	11 *

(\*valores significativos, a 5% de probabilidade de erro, comparado com o ecótipo 'Bagual', por coluna.

Os gráficos (FIGURAS 6, 7 e 8) mostram a distribuição estacional de produção de MST de alguns genótipos selecionados. Os genitores masculinos ‘Bagual’ e ‘André da Rocha’ destacam-se por terem os maiores aumentos de produtividade no quarto corte (o segundo corte do período estival 2011-2012), com as maiores produtividades no quinto e último corte, possivelmente relacionado à adaptação que estes ecótipos nativos possuem.

Os cinco híbridos mais produtivos foram superiores até o terceiro corte, sendo iguais ou até superados pelos genitores masculinos. O genitor feminino ‘C44X’ se manteve com baixas produtividades durante todo o período de avaliação. Dentre os genitores femininos, o ‘Q4188’ foi o mais produtivo acima até mesmo da média de uma das suas progênes. A família “E” apresentou os menores índices de produção de massa seca, seguido da família “A”, já as famílias “B”, “C”, “D” e “F” apresentaram desempenho muito semelhante com produção superior às duas anteriores.

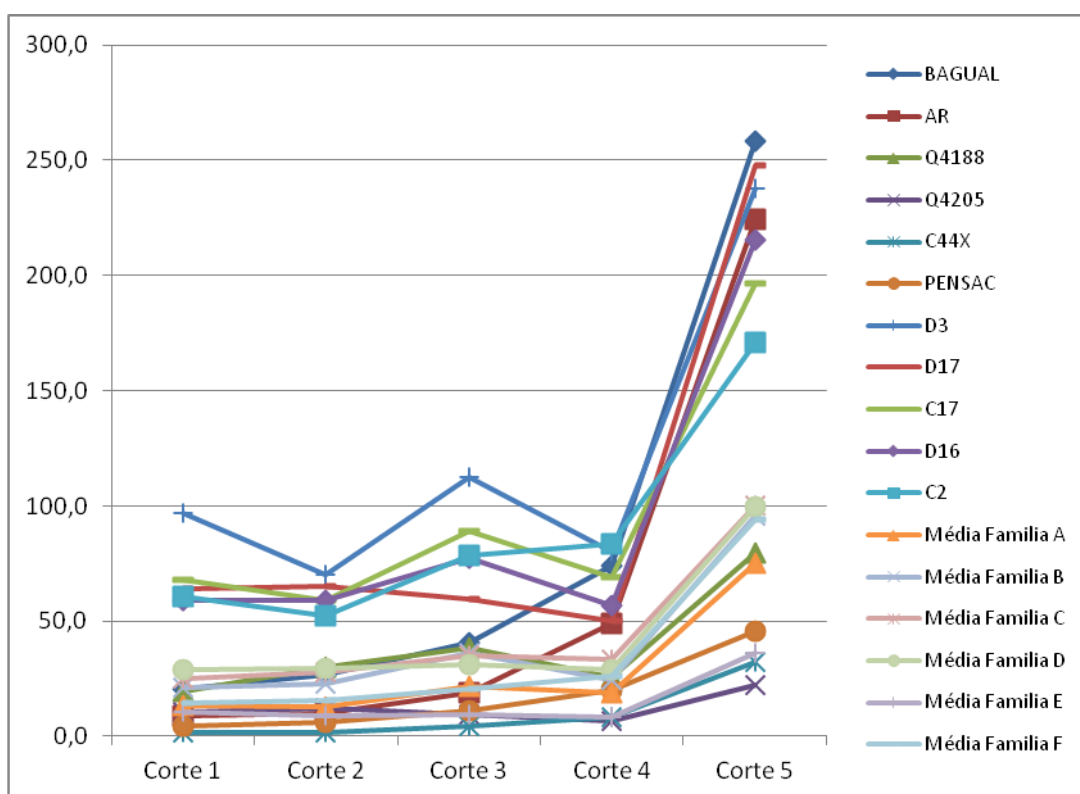


FIGURA 6. Produção de massa seca total (em gramas), por cortes, das cinco plantas mais produtivas dos genitores masculinos e femininos, da cultivar Pensacola e a média de produção de cada uma das famílias.

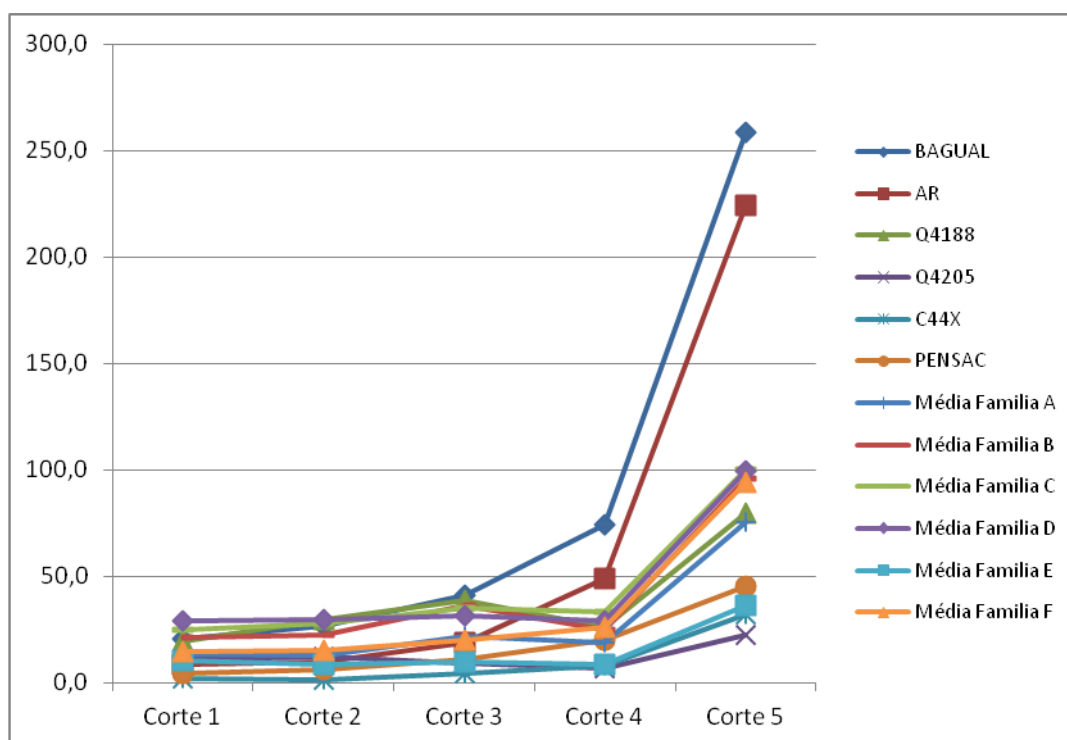


FIGURA 7. Produção de massa seca total (em gramas), por cortes, dos genitores masculinos e femininos, da cultivar Pensacola e a média de produção de cada uma das famílias.

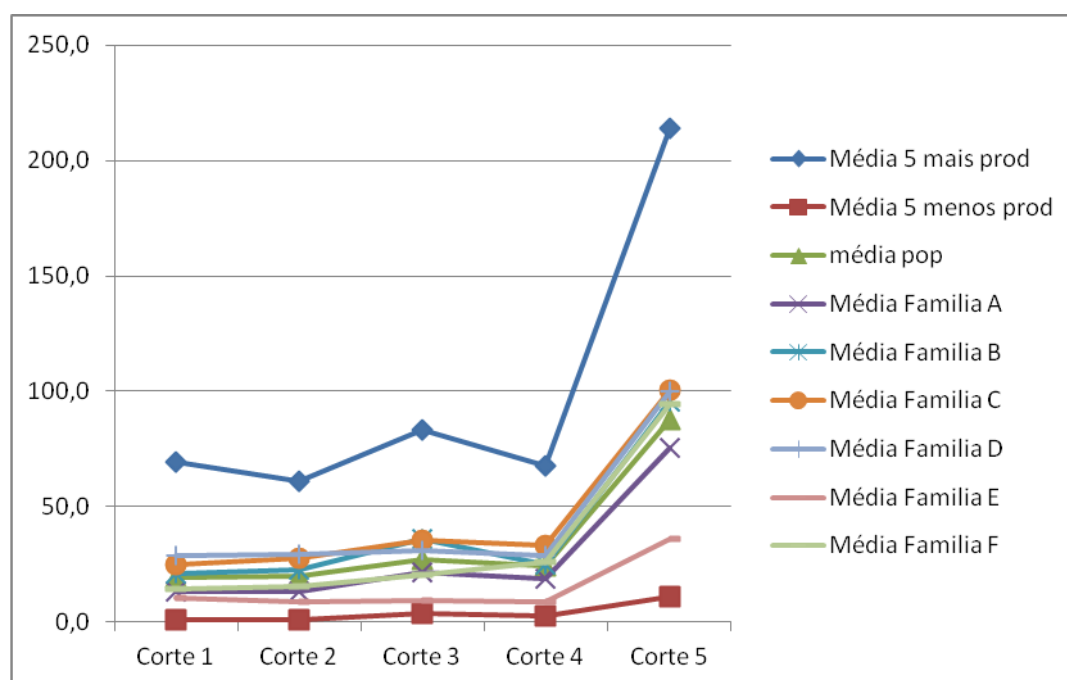


FIGURA 8. Produção de massa seca total (em gramas), por cortes, da cultivar Pensacola, a média dos cinco genótipos mais produtivos, a média dos cinco genótipos menos produtivos, a média de produção de toda população de híbridos e a média de produção de cada uma das famílias.

O genitor feminino 'Q4205' foi o que apresentou o menor incremento de produção ao longo dos cortes e, apesar de nos primeiros cortes apresentar posição intermediária no ranqueamento por produtividade, não conseguiu acompanhar o incremento de produção nos últimos cortes. Porém cabe salientar que este genótipo gerou a planta mais produtiva, o híbrido D3 (no somatório dos cortes), evidenciando a capacidade dessa de imprimir a característica de alta produção de massa na sua progênie. A média de produtividade das cinco plantas mais produtivas e das cinco plantas menos produtivas mostra a variabilidade existente nas progênies avaliadas. Das cinco plantas mais produtivas, quatro são filhas do genitor 'Bagual', e dos cinco híbridos com pior desempenho de produção, duas plantas menos produtivas são filhas deste mesmo genitor masculino. Esta variabilidade disponível poderá ser amplamente explorada, possibilitando a seleção dos melhores híbridos pelo melhorista de plantas.

Na avaliação de hábito de crescimento (TABELA 2), das 20 plantas mais produtivas, oito são de hábito ereto e 12 de hábito prostrado, sendo o hábito de crescimento ereto uma característica herdada do genitor feminino, visto que dos 20 híbridos mais produtivos, 19 são filhos de dois dos genitores femininos de hábito ereto. As plantas de hábito ereto investem menos em estruturas de reserva, como os rizomas supraterrâneos, podendo essa característica ser determinante na sobrevivência das plantas no futuro, em uma intensidade de pastejo elevada ou na sobrevivência a estresses ambientais como o frio. Pedreira & Brown (1996), avaliando hábito de crescimento e persistência de acessos de *P. notatum*, constataram que os acessos 'Tifton 9' e 'T14' comparados com a cultivar 'Pensacola' apresentavam maior altura, porém tinham menos rizomas supraterrâneos. Na avaliação de sobrevivência pós inverno, a 'Pensacola' teve uma sobrevivência de 90% e os dois outros acessos tiveram 51 e 64% de sobrevivência, respectivamente.

Em geral, *P. notatum* é encontrado com maior frequência em campos com baixa altura de forragem justamente por conseguir sobreviver a essa condição, graças às estruturas de sobrevivência, sendo que tipos eretos podem requerer um manejo mais cuidadoso. Os cinco híbridos menos produtivos apresentaram hábito de crescimento prostrado. Pedreira & Brown (1996) citam que aparentemente a seleção para aumento de produtividade em

*P. notatum* resulta em plantas mais altas com menos estruturas de reservas (rizomas), com uma maior tendência a danos por frio. Neste trabalho não foi encontrada correlação significativa entre hábito de crescimento e produção de massa seca (TABELA 3).

TABELA 2. Número de afilhos por planta, massa seca produzida por afilho (g), hábito de crescimento, avaliação de coloração por antocianinas, efeito da geada e sobrevivência pós-inverno das 20 plantas híbridas mais produtivas, dos três genitores femininos, dos dois genitores masculinos, da cultivar 'Pensacola' e dos cinco híbridos menos produtivos.

Genótipo	Número afilhos/planta	Massa seca por afilho	Hábito de crescimento	Coloração por antocianinas	Efeito da geada	Sobrevivência pós-inverno
D3	1144	0,52	Ereto	3	2	3
D16	970	0,47	Prostrado	2	2	3
C17	855	0,53	Ereto	6	2	3
C2	860	0,52	Prostrado	1	3	3
B17	1137	0,39	Prostrado	5	3	3
D17	957	0,46	Ereto	0	2	3
B43	985	0,43	Prostrado	7	2	4
C24	922	0,46	Prostrado	4	2	4
D25	922	0,45	Ereto	5	2	3
C18	919	0,45	Prostrado	6	3	3
F15	1011	0,40	Prostrado	6	3	2
F29	989	0,40	Prostrado	6	3	2
B26	830	0,47	Prostrado	4	2	3
B37	909	0,41	Ereto	3	2	3
F24	986	0,38	Prostrado	5	3	2
C32	901	0,41	Ereto	4	3	3
C9	827	0,44	Prostrado	5	3	3
C6	911	0,40	Ereto	5	2	3
C15	660	0,55	Prostrado	5	2	3
B29	713	0,50	Ereto	7	2	4
Bagual	1053	0,40	Prostrado	5	3	2
AR	945	0,33	Prostrado	5	3	3
Q4188	480	0,40	Ereto	4	2	3
Q4205	143	0,38	Ereto	6	2	1
C44X	237	0,21	Prostrado	0	3	1
Pens	324	0,27	Prostrado	4	3	1
E5	144	0,24	Prostrado	3	3	1
F5	95	0,29	Prostrado	5	2	1
A35	118	0,19	Prostrado	8	2	2
D21	101	0,22	Prostrado	3	2	1
D15	53	0,21	Prostrado	9	3	1

Durante o período hibernar de 2011 foi feita a avaliação qualitativa da coloração das folhas, causada por acúmulo de antocianinas. Observou-se uma grande variação de coloração, com notas que vão desde zero até nove (TABELA 2). Não foi possível estabelecer uma relação da quantidade de antocianinas acumuladas com o efeito da geada e da sobrevivência pós-inverno, com correlações não significativas de 0,03 e 0,01, respectivamente (TABELA 3).

A coloração das folhas também já foi associada com o hábito de crescimento e crescimento em condições de frio. Em *Agropyrum sp.*, Hu et al. (2001) observaram que a coloração de antocianinas foi negativamente correlacionada com a altura das plantas e positivamente relacionada com o hábito prostrado, indicando que essa característica pode ser um efetivo marcador fenotípico para crescimento lento sob condições de baixa temperatura. Porém esta não foi a tendência neste trabalho, ou seja, não foi encontrada uma relação entre acúmulo de antocianinas e hábito de crescimento, com uma correlação não significativa de 0,03 (TABELA 3).

Na avaliação visual do efeito da geada sobre as plantas, constatou-se que todas as plantas apresentavam folhas queimadas, com danos variando de moderado à intenso. Destacando-se a correlação de 0,97 entre efeito de geada e hábito de crescimento. Onde plantas com hábito de crescimento ereto foram mais afetadas pelas geadas. Na avaliação da sobrevivência e retomada de crescimento das plantas após o período de frio, observou-se que as plantas mais produtivas foram as com melhor retomada de crescimento numa correlação significativa de 0,60 para a produção de massa seca no primeiro corte pós primavera.

Na TABELA 4 são apresentados os dados de correlação feitos pelo coeficiente de Pearson das variáveis massa seca de folhas (MSF), massa seca de colmo (MSC), massa seca de inflorescência (MSI), massa seca total (MST), número de afilhos e altura de plantas. A variável massa seca de folhas foi a que apresentou mais alta correlação quando comparada com a variável massa seca total, com 93% do seu valor explicado por essa variável. Estes dados podem indicar que, em trabalhos futuros, poderá ser estudada a possibilidade de não mais separar as plantas em folhas, colmos e inflorescência, processo esse que demanda muita mão de obra em um curto espaço de tempo.

TABELA 3. Correlação pelo coeficiente de Pearson entre as variáveis massa seca de Total (MST), massa seca do corte 3 (MSTC3), número de afilhos, hábito de crescimento, coloração por antocianinas, efeito de geadas e sobrevivência pós inverno.

Váriavel	MST	MSC3	Afilhos	Hábito	Antocianinas	Geadas	Sobrevivência
MST							
MST C3	<b>0,63 *</b>						
Afilhos	<b>0,78 *</b>	0,48 *					
Hábito	0,06	0,24 *	0,02				
Antocianinas	0,04	0,12 *	0,04	0,03			
Geadas	0,05	0,23 *	0,01	<b>0,97 *</b>	0,03		
Sobrevivência	0,49 *	<b>0,60 *</b>	0,33 *	0,30 *	0,01	0,30 *	

(\*) valores significativos a 5% de probabilidade de erro.

A MST é obtida através do somatório das MSF, MSC e MSI. Assim, esperava-se que estas variáveis fossem de alta significância para a MST. A única correlação não significativa foi entre altura de plantas e o número de afilhos. Mesmo para as variáveis onde a altura de plantas foi correlacionada com outras variáveis, essa se mostrou com pouco significado biológico, onde no máximo, apenas 16% do efeito dessas se explicavam na característica correlacionada. A correlação baixa de altura de plantas e MST poderia ser explicada pelo hábito de crescimento de parte dos híbridos avaliados, ou seja, aqueles que tem hábito prostrado investem mais em estruturas de reserva, com crescimento mais rente ao solo, diminuindo assim a altura de planta, podendo ter, ou não, alta produtividade de MST.

TABELA 4. Correlação pelo coeficiente de Pearson entre as variáveis massa seca de folhas (MSF), massa seca de colmo (MSC), massa seca de inflorescência (MSI), massa seca total (MST), número de afilhos e altura de plantas.

Variável	MSF	MSC	MSI	MST	Afilhos	Altura
MSF						
MSC	0,62 *					
MSI	0,56 *	<b>0,89 *</b>				
MST	<b>0,93 *</b>	<b>0,86 *</b>	<b>0,80 *</b>			
Afilhos	0,72 *	0,67 *	0,67 *	<b>0,78 *</b>		
Altura	0,16 *	0,15 *	0,06 *	0,16 *	0,01	

(\*) valores significativos a 5% de probabilidade de erro.

De acordo com Cruz & Regazzi (1994), a análise por dialelos parciais envolve a avaliação de genitores dispostos em dois grupos, pertencentes estes ou não a um conjunto comum, sendo as inferências feitas para cada grupo. Nos dialelos parciais, os genitores de um grupo estão representados por números constantes, porém passíveis de serem diferentes do número de combinações híbridas em que estão representados os genitores do outro grupo. Algumas metodologias de dialelos parciais distinguem-se pelas gerações avaliadas, sendo mais comum a análise de  $F_1$ 's ou de  $F_1$ 's e genitores, e pelas informações genéticas que provêm, sendo possível avaliar a capacidade combinatória geral e específica, e, em outros, o potencial "per se" dos genitores e seus efeitos heteróticos, utilizando a estimativa de parâmetros genéticos adaptados de Griffing (1956) e/ou Eberhart & Russell (1966). Na TABELA 5 encontra-se um esquema de um dialelo parcial estabelecido pelas combinações híbridas dos dois genitores masculinos e três genitores femininos, onde as médias apresentadas foram feitas utilizando todos os valores de produção de MST das quatro repetições de cada planta por cruzamento. Por exemplo, na combinação entre 'André da Rocha' e 'Q4188', foram avaliados 28 híbridos com as suas repetições, onde o valor de 146,2 é uma média de todas as produções da progênie.

O termo Capacidade Geral de Combinação (CGC) é utilizado para designar o comportamento médio de um parental em todos os cruzamentos que participa (Sprange & Tatum, 1942; Cruz & Vencovsky, 1989) e está associado aos efeitos aditivos dos alelos e às ações epistáticas do tipo aditivo. As estimativas dos efeitos da CGC fornecem informações a respeito das potencialidades do parental em gerar combinações favoráveis à formação de genes predominantemente aditivos em seus efeitos. Quanto mais altas forem estas estimativas, positivas ou negativas, determinado parental será considerado muito superior ou inferior aos demais incluídos no dialelo, e, se próximo à zero, seu comportamento não difere da média geral dos cruzamentos (Cruz et al., 2004).



TABELA 5. Médias de rendimento de híbridos resultantes do cruzamento entre os genitores masculinos ‘Bagual’ e ‘André da Rocha’ e os genitores femininos ‘Q4188’, ‘Q4205’ e ‘C44X’.

Mães	Pais		Total
	AR	Bagual	
Q4188	146,2	205,3	<b>351,5</b>
Q4205	227,2	231,8	<b>459,0</b>
C44X	75,8	182,9	<b>258,7</b>
<b>Total</b>	<b>449,2</b>	<b>620,0</b>	<b>1069,2</b>

TABELA 6. Estimativas dos efeitos da Capacidade Geral de Combinação (CGC) e da Capacidade Específica de Combinação (CEC) entre os genitores masculinos ‘Bagual’ e ‘André da Rocha’ e os genitores femininos ‘Q4188’, ‘Q4205’ e ‘C44X’.

Capacidade geral de combinação (CGC)				Capacidade específica de combinação (CEC)		
Mães	Pais			Mães	Pais	
	AR	Bagual	Total		AR	Bagual
Q4188	-2,5	AR	-28,5	Q4188	-1,1	1,1
Q4205	51,3	Bagual	28,5	Q4205	26,2	-26,2
C44X	-48,9			C44X	-25,1	25,1

Por outro lado, de acordo com Sprange & Tatum (1942), o termo capacidade específica de combinação é utilizado para designar os casos em que certas combinações híbridas são superiores ou inferiores em relação ao esperado quanto à *performance* média dos dois pais. Falconer (1981), contudo, definiu CEC como sendo o desvio do desempenho médio de uma combinação particular em relação à média dos parentais envolvidos no cruzamento. Os efeitos da CEC enfatizam a importância de interações não-aditivas resultantes da complementação gênica entre os parentais, possibilitando antever respostas de ganho genético com a exploração da heterose (Bastos et al., 2003).

Analisando-se a TABELA 6, o genitor ‘Bagual’ do grupo dos “Pais” possui o maior efeito Capacidade Geral de Combinação (CGC), e para o grupo das “Mães”, o genitor ‘Q4205’ destaca-se entre os demais genitores, sendo então estes recomendados para participarem da formação de populações-base para futuras seleções. O genitor feminino ‘Q4205’ apresenta a característica de investir pouco em estruturas de reserva e com hábito de crescimento ereto, onde grande parte da massa seca produzida pela planta está disponível para ser apreendida num corte ou pastejo. Já a mãe ‘C44X’ ao contrário, investe

grande parte dos seus fotoassimilados em estruturas de reserva, com um hábito prostrado e com folhas mais curtas.

Se houver interesse na participação de um genitor específico para obtenção de híbridos, as estimativas da Capacidade Específica de Combinação (CEC) serão úteis na recomendação do melhor par (Cruz & Regazzi, 1994). Assim considerando, por exemplo, um interesse particular no genitor 'Q4205', recomenda-se o cruzamento do mesmo com o genitor 'André da Rocha' (AR), uma vez que os híbridos destes cruzamentos apresentaram a maior CEC.

No momento, os híbridos mais produtivos estão sendo avaliados em parcelas maiores, com a finalidade de observar o comportamento e avaliar a produtividade destes, quando se encontram num ambiente homogêneo, mas com competitividade por espaço, luz e nutrientes. Os híbridos selecionados para essa segunda etapa de avaliação foram analisados quanto ao seu modo de reprodução, distinguindo os genótipos apomíticos e os sexuais. Os genótipos apomíticos, uma vez que se comprove seu valor agrônômico, podem, potencialmente, ser registrados e protegidos como cultivares e plantas sexuais com boa produtividade podem continuar no programa para ser utilizadas como mães em futuros cruzamentos.

### **Conclusões**

Nas avaliações de produção de massa seca foram encontrados genótipos com vigor híbrido e produtividades superiores ao melhor pai.

Os genótipos D3, D16 e C17 apresentaram as maiores produções de massa seca total no acumulado de cinco cortes.

O melhor genitor masculino é o ecótipo 'Bagual', enquanto que o melhor genitor feminino é o 'Q4205'.

A família "E" ('C44X' x 'André da Rocha') apresentou os menores valores de produção de massa seca na média, seguido da família "A" ('Q4188' x 'André da Rocha'). As famílias "B" ('Q4188' x 'Bagual'), "C" ('Q4205' x 'André da Rocha'), "D" ('Q4205' x 'Bagual') e "F" ('C44X' x 'Bagual') apresentaram desempenho semelhante, com produção superior às duas anteriores.

Não foi possível encontrar uma relação entre o grau de coloração ocasionado pelo acúmulo de antocianinas com o efeito de geada e com a retomada de crescimento pós-inverno.

Não foi encontrada correlação entre hábito de crescimento e produção de massa seca.

Plantas com hábito de crescimento ereto apresentaram maior efeito de frio se comparado com plantas de hábito prostrado.

A variável massa seca de folhas apresentou maior interação com a massa seca total, mostrando que em trabalhos futuros talvez não seja necessária a separação de partes da planta para uma avaliação de produção.

### **Agradecimentos e conflitos de interesses**

Agradecemos ao suporte financeiro da SULPASTO, CNPq e CAPES, também ao IBONE (Instituto de Botânica del Nordeste da Argentina).

O presente trabalho não apresenta conflitos de interesses que sejam do conhecimento dos autores.

### **Referências bibliográficas**

ASKER, S.E. and JERLING, L. Apomixis in Plants. Boca Raton and London: CRC Press, 1992, p.298.

BARRETO, I.L. **O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul.** 1974. 258f. Dissertação (Livre Docência-Fitotecnia). Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1974.

BASTOS, I.T.; BARBOSA, M.H.P; CRUZ, C.D.; BURNQUIST, W.L.; BRESSIANI, J.A; SILVA, F.L.da. Análise dialélica em clones de cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas. v.62, n.2, p.199-206, 2003.

BURTON, G.W. Artificial fog chamber facilitates *Paspalum* emasculation. **Journal America Society Agronomy**, Madison, v.40, p.281-282, 1948.

BURTON, G. W. Bahiagrass types. **Agronomy Journal**, Madison, v.38, p.273-281, 1946.

CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; BENNETT, J.H.; ASAY, K.H. Carbohydrate partitioning in 185 accessions of Gramineae grown under warm and cool temperatures. *Journal of Plant Physiology*, Urbana, v.134, p.169-179, 1989.

COSTA, D.I.; SCHEFFER-BASSO, S.M. Caracterização morfofisiológica e agrônômica de *Paspalum dilatatum* Poir. biótipo Virasoro e *Festuca arrundinaceae* Schreb. 1. Desenvolvimento Morfológico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.5, p.1054-1060, 2003.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, Minas Gerais, 1994. 390p.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV. CAP VII, 2004. p. 223-375.

CRUZ, C.D.; VENCOVSKY, R. Comparação de alguns métodos de análise dialélica. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.12, n.2, p.425-438, 1989.

EBERHART, S.A.; RUSSELL, W.A. Stability parameters for comparing varieties. **Crop Science**, Madison, v.6, p.36-40, 1966.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa, MG: UFV. Imp. Univ. 1981. 279p.

FORBES, I.; BURTON, G. W. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intra-species hybrids of Bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. **Crop Science**, Madison, v. 1, p. 402-406, 1961.

GRIFFING, B.A concept of a general and specific combination ability in relation to diallel crossing systems. **Australian Journal of Biological Science**. East Melbourn, v.9, p.463-493. 1956.

HADDAD, C.M.; DOMINGUES, J.L.; CASTRO, F.G.F.; TAMASSIA, L.F.M. Características de produção e valor nutritivo do capim Pensacola (*Paspalum notatum* Flüggé var. *saurae* Parodi) em função da idade de corte. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.56, n.3, p.753-761, 1999.

HANNA, W.W.; BASHAW, E.C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, Madison, v. 27, p.1136-1139, 1987.

HU, Z.; WANG, R.R.C.; LARSON, S.R. Selection response for molecular markers associate with anthocyanin coloration and low-temperature growth traits in crested wheatgrass. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 81, p.665-671, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: [http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_auto\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf), consulta em: 25 de janeiro de 2013.

- KÖEPPEN, W. **Climatologia**. Cidade do México. Fundo de cultura econômico, 1948, 478 p.
- KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; GARCÍA-PARILLA, M.C.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.4, p.691-693, 2004.
- MARASCHIN, G.E. A planta forrageira no sistema de produção: grama batatais, forquilha e bahiagrass. In: PEIXOTO, A. M.; PEDREIRA, C .G. S.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. 17º Simpósio sobre Manejo da Pastagem. FEALQ. **Anais...** Piracicaba, 2001. 393p.
- MISLEVY, P. Forages for grazing systems in warm climates. In: McDOWELL, L.R. (Ed.). **Nutrition of grazing ruminants in warm climates**. Orlando: Ademic Press, 1985. Cap.5, p.73-102.
- MOON, Y.J.; WANG, X.; MORRIS, M.E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicol in Vitro**. Rome, v.20, n.2, p.187-210, 2006.
- MOTA, F.S.; BEIRSDORF, M.I.C.; GARCEZ. J.R.B. **Zoneamento agroclimático de Rio Grande do Sul e Santa Catarina: normais agroclimáticos**. Porto Alegre: Ministério da Agricultura – Instituto de Pesquisa Agropecuária do Sul, 1971. 80p.
- NABINGER, C.; DALL'AGNOL, M. Principais gramíneas nativas do RS: características gerais, distribuição e potencial forrageiro. In: DALL'AGNOL, M.; NABINGER, C.; SANTOS, R. J. (Eds.). Simpósio de Forrageiras e Produção Animal, 3º, Porto Alegre, 2008. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, p.7-54, 2008.
- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do Milho Em: BORÉM, A. (Ed) **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2.ed Viçosa, Minas Gerais, 2005. p.491-553.
- PEDREIRA, C.G.S.; BROWN, R.H. Physiology, Morphology, and Growth of Individual Plants of Selected and Unselected Bahiagrass Populations. **Crop Science**, Madison, v. 36, n.1, p.138-142, 1996.
- POZZOBON, M.T; VALLS, J.M. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.20, n.1, p.29-34, 1997.
- PRESTES, P.J.Q.; FREITAS, E.A.G.; BARRETO, I.L. **Hábito vegetativo e variação estacional do valor nutritivo das principais gramíneas da pastagem do Rio Grande do Sul**. Anuário Técnico do Instituto de Pesquisas Zootécnicas “Francisco Osório”, Porto Alegre. v.3, p.516-531, 1976.
- QUARÍN, C.L. Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germoplasm of bahiagrass. **Crop Science**, Madison, v.43, p.745-746, 2003.

QUARÍN, C.L.; BURSON, B.L.; BURTON, G.W. Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. **Botanical Gazette**, Chicago, v.145, n.3, p.420-426, 1984.

QUARIN, C.L.; ESPINOZA, F.; MARTINEZ, E.J.; PESSINO, S.C.; BOVO, O. A. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction**, Norman, v.13, p.243-249, 2001.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. 4 ed., Belmont: Wassworth Publishing Company, 1991, 682p.

SEBRAE/SENAR/FARSUL. **Diagnóstico de sistemas de produção de bovinocultura de corte no estado do Rio Grande do Sul**. Relatório. Porto Alegre: SENAR, 2005. 265 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIAS DO SOLO/ Comissão de Química e Fertilidade do Solo. Manual de adubação e calagem para o estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 10 ed., Porto Alegre, 2004, 400p.

SPRAGUE, G.F.; TATUM, L.A. General vs. Specific combining ability in single crosses of corn. **Journal of American Society of Agronomy**, Madison, v.34, n.10, p.923-932, 1942.

VALLS, J.F.M. **Recursos genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil**. Encontro Internacional sobre melhoramento genético de *Paspalum*. **Anais...** Nova Odessa: IZ, 1987, p.3-13.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P.C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v.23, n.2, p.141-149, 2008.

### **3. CAPITULO III**

**Determinação do modo de reprodução de híbridos de *Paspalum notatum*  
através de marcadores moleculares e análises citogenéticas**

## **Determinação do modo de reprodução de híbridos de *Paspalum notatum* através de marcadores moleculares e análises citogenéticas**

Roberto Luis Weiler, Miguel Dall’Agnol, Carine Simioni, Divanilde Guerra, Nair Dahmer, Karine Cristina Krycki, Maria Teresa Schifino-Wittmann, Emerson André Pereira e Juliana Medianeira Machado

### **Resumo**

A produção de bovinos no Rio Grande do Sul ocorre principalmente sobre pastagens nativas e essencialmente sobre o Bioma Pampa. *Paspalum notatum* (grama forquilha) apresenta excelente valor forrageiro, é bem adaptada ao pastejo e resistente ao pisoteio, com produção principalmente no período estival. O germoplasma nativo de *P. notatum* é predominantemente tetraplóide e de reprodução apomítica. Em cruzamentos entre plantas apomíticas e sexuais pode ocorrer plantas dos dois modos de reprodução. O objetivo desse trabalho foi determinar o modo de reprodução de uma progênie híbrida oriunda de cruzamentos intraespecíficos de *P. notatum* através de análises citoembriológicas, visualizando as características morfológicas do saco embrionário e com uso de marcadores moleculares do tipo RAPD. As análises citoembriológicas permitiram identificar o modo de reprodução de 23 plantas, de um total de 28 que foram selecionadas após as avaliações agrônômicas de produtividade. Destas, 15 apresentaram morfologia do saco embrionário compatível com o modo de reprodução apomítico e oito apresentaram morfologia do saco embrionário compatível com o modo de reprodução sexual. Foi encontrado um número elevado de ovários anormais em quase todas as plantas. Plantas que apresentavam tanto ovários apomíticos como sexuais foram consideradas de reprodução facultativas. As análises com marcadores moleculares evidenciaram que somente o *primer* BCU 243 obteve um padrão estável de amplificação de bandas. Das 23 plantas analisadas através dos dois métodos de análises do modo de reprodução, nove tiveram desacordo nos resultados. A análise citoembriológica é feita através da visualização direta dos ovários de diferentes inflorescências implicando em maior confiabilidade deste em comparação a análise molecular, necessitando esta maior aprimoramento de protocolos para análises futuras. A apomixia segregou de forma distorcida da esperada 3:1. As plantas apomíticas podem ser submetidas a ensaios à campo para comprovar o valor agrônômico e sua viabilização para o registro e proteção de cultivares, enquanto as plantas sexuais podem ser utilizadas como genitores potenciais em futuros cruzamentos.

Palavras-chave: Modo de reprodução; citogenética; marcadores moleculares.



## Determination of reproduction mode of *Paspalum notatum* hybrids by molecular markers and cytogenetic analyses

### Abstract

The production of cattle in Rio Grande do Sul occurs mainly on native pastures and essentially on the Pampa biome. The native pastures of *Paspalum notatum* (bahiagrass) have an excellent value. This species is well adapted to grazing and resistant to trampling, producing mainly in the summer. The native germplasm of *P. notatum* is predominantly apomictic and tetraploid. Moreover, there is a close correlation between ploidy level and mode of reproduction, which diploidy is correlated with sexual reproduction and polyploidy is correlated with apomixis. The cross between sexual and apomictic plants could give plants with both reproductive mechanisms. Thus, this study was aimed to determine the mode of reproduction of a hybrid progeny derived from intraspecific crosses of *P. notatum* through cytogenetic analysis and RAPD molecular markers. The cytogenetic analysis determined the mode of reproduction of 23 from the 28 plants analyzed, which were selected after agronomic evaluations of productivity. From those, 15 had embryonic sac morphology compatible with sexual reproduction mode and eight compatible with apomictic reproduction. Almost, all the plants had a high numbers of abnormal ovaries. Plants that had both ovaries apomictic and sexual, were considered with facultative mode. The molecular markers analysis showed that only the primer BCU 243 had a stable standard of bands amplification. From the 23 plants analyzed through the two methods, nine had results in disagreement. The cytogenetic analysis is made by direct visualization of the ovaries of different inflorescences, resulting in higher reliability than molecular analysis, thus, is necessary a greater improvement of this protocol for further analysis. Furthermore, apomixis segregation distorted of expected 3:1. Apomictic plants may be subjected to field trials to prove its viability and agronomic value for the registration and protection of plant varieties, whereas the sexual plants can be used as potential parents in future crosses.

**Key-words:** Reproduction mode; cytogenetic; molecular markers.

## Introdução

No Estado do Rio Grande do Sul tem destaque a produção animal baseada em pastagens nativas, onde estas representam a base alimentar desses herbívoros. A grande diversidade de espécies existentes no Bioma Pampa, com cerca de 400 espécies de gramíneas e 150 espécies de leguminosas, aliado ao fato de serem estas adaptadas às características locais, permitem um manejo dos recursos naturais no sentido de promover a sustentabilidade do sistema (Boldrini, 1997). Porém, surge a necessidade de introduzir cultivares melhoradas através de seleção, em coleções de germoplasma, para características específicas dentre os gêneros e espécies mais bem estudados e de maior interesse (Valle, 2002).

Dentre as gramíneas nativas do Brasil, as espécies do gênero *Paspalum* L., pertencentes à tribo *Paniceae*, destacam-se por serem representantes de vários ecossistemas herbáceos e responsáveis pela produção de grande parcela da forragem disponível nos campos (Valls, 1987), representando um importante recurso utilizado para a produção de bovinos de corte (Nabinger, 2006). Este gênero, representado por inúmeras espécies, apresenta importante valor agrônomo, servindo de base alimentar para bovinos e suas sementes são importantes fontes alimentares para pássaros. Muitas delas destacam-se pela tolerância ao frio, produção e qualidade de forragem, quando comparadas a outras gramíneas tropicais e subtropicais no Rio Grande do Sul (Barreto, 1974; Prestes et al., 1976; Steiner, 2005; Soster, 2009; Fachinetto, 2010). No gênero *Paspalum* há uma estreita correlação entre nível de ploidia e modo de reprodução, onde diploidia está correlacionada com reprodução sexuada e alogamia enquanto poliploidia está correlacionada com apomixia (Adamowski et al., 2005).

A espécie de grande destaque deste gênero, *Paspalum notatum*, comumente chamada de grama forquilha, é reconhecida por constituir pastagens nativas de excelente valor forrageiro para o Rio Grande do Sul. Esta espécie tem ciclo perene e é de estação quente, se dispersando através de rizomas característicos (supraterrâneos), além de sementes (Barreto, 1974). Produz forragem da primavera ao outono, é bem adaptada ao pastejo e

resistente ao pisoteio, pois seus rizomas ficam protegidos pela bainha e emitem novas folhas estimuladas pelas temperaturas de primavera (Maraschin, 2001).

O germoplasma nativo de *P. notatum* é tetraplóide e mostra características de linhagens apomíticas. Genótipos elite podem ser selecionados através de avaliações agronômicas com o objetivo de selecionar acessos com boa produção de forragem. Por outro lado, formas apomíticas podem também ser usadas como uma fonte de variabilidade, como doadoras de pólen em cruzamentos com tetraplóides sexuais relacionados. Os ecótipos 'Bagual' e 'André da Rocha', que fazem parte do germoplasma elite nativo do Rio Grande do Sul, são apomíticos e podem ser utilizados com esta finalidade. Estes ecótipos têm demonstrado, em inúmeros trabalhos, que, quando manejados adequadamente, apresentam produções de forragem semelhantes às aquelas apresentadas por cultivares de espécies tropicais já melhoradas (Sawasato, 2007; Steiner, 2005; Pereira, 2009).

Em *P. notatum*, naqueles ecótipos que apresentam modo de reprodução apomítico, a meiose feminina não ocorre ou não é funcional. Assim, a oosfera contém o mesmo número de cromossomos somáticos maternos. Como não há fusão de gametas durante a fertilização, o embrião se desenvolve por partenogênese, gerando uma planta idêntica à planta-mãe (Carneiro & Dusi, 2002).

Apomixia na grama forquilha é do tipo gametofítica, onde há formação do saco embrionário com um número cromossômico não reduzido. A meiose, responsável pela redução do número cromossômico, foi substituída pela mitose, com a formação de um saco embrionário e célula-ovo com a mesma constituição genética da planta mãe. Na grama forquilha, a apomixia é do tipo apospórica e pseudogâmica, onde o saco embrionário se origina por divisão mitótica de uma célula somática do saco embrionário e o endosperma se desenvolve pela união de um núcleo masculino do grão de pólen com os núcleos polares (Acuña et al., 2009).

Em cruzamentos entre plantas apomíticas e sexuais ocorre uma ampla segregação de plantas dos dois modos de reprodução. O controle

genético da apomixia em tetraplóides de *P. notatum* é por um único *locus* dominante e de segregação mendeliana, mas no controle da expressão da apomixia provavelmente há um efeito letal pleiotrópico do loco dominante ou uma letalidade parcial de fatores ligados ao gene da aposporia que possivelmente cause uma distorção na segregação a favor de plantas com o modo de reprodução sexual (Martínez et al., 2001).

Num programa de melhoramento torna-se imprescindível a determinação do modo de reprodução das progênes segregantes após cruzamentos induzidos entre genótipos sexuais e apomíticos, sendo possível formar grupos de plantas separados pelo modo de reprodução. Assim, plantas apomíticas podem ser utilizadas diretamente como cultivares se apresentarem características agronômicas de interesse e plantas sexuais podem ser inseridas como genitores femininos na continuidade dos programas de cruzamentos dirigidos.

A maneira mais segura de avaliar se uma espécie é apomítica ou sexual é através de análises citoembriológicas no lado feminino, pelo método de clareamento de ovários, com observações destes em microscópio óptico de contraste de interferência, que possibilita distinguir morfologicamente sacos embrionários sexuais e sacos embrionários apomíticos. Outra maneira de avaliar uma espécie quanto ao seu modo de reprodução é através de uso de marcadores moleculares, onde se necessita de um marcador ligado, ou pelo menos, bem próximo à região gênica que controla a apomixia. Em *P. notatum*, dois marcadores moleculares do tipo RAPD foram selecionados, dentre 400 *primers* em análise de materiais sexuais e apomíticos em *bulk*, por estarem completamente ligados à expressão da aposporia: BCU 243 e BCU 259 (Martínez et al., 2003). A utilização de marcadores moleculares possibilita a determinação rápida do modo de reprodução e ainda no estágio de plântula, com isso é possível realizar um *screening* das plantas que serão levadas ao campo.

O objetivo desse trabalho foi de determinar o modo de reprodução de uma progênie híbrida oriunda de cruzamentos intraespecíficos de *P.*

*notatum* através de análises citoembriológicas e através do uso de marcadores moleculares do tipo RAPD.

### **Material e métodos**

Em colaboração com o IBONE (Instituto de Botânica del Nordeste), localizado no município de Corrientes, Argentina, foram obtidos três genótipos artificialmente poliploidizados utilizando colchicina, denominados 'Q4188', 'Q4205' (Quarín et al., 2003) e 'C44X' (Quarín et al., 2001), tetraplóides e sexuais que foram utilizados como genitores femininos em cruzamentos artificiais e genótipos elite tetraplóide apomítico nativo do Estado do Rio Grande do Sul (ecótipos 'André da Rocha' e 'Bagual') foram os genitores masculinos. Os cruzamentos dirigidos foram realizados usando metodologia descrita por Burton (1948), com a finalidade de obter uma progênie híbrida. Os esquemas de cruzamentos permitiram seis combinações de genitores que deram origem às famílias. São elas: 'Q4188' X 'André da Rocha' (Progênie "A"), 'Q4188' X 'Bagual' (Progênie "B"), 'Q4205' X 'André da Rocha' (Progênie "C"), 'Q4205' X 'Bagual' (Progênie "D"), 'C44X' x 'André da Rocha' (Progênie "E") e 'C44X' x 'Bagual' (Progênie "F").

A determinação do modo de reprodução através de análises citoembriológicas foi realizada em 28 híbridos, selecionados entre os 196 avaliados pela sua produtividade de Massa Seca Total (MST) (artigo em fase de submissão). Também foi confirmado, através destas análises, o modo de reprodução de todos os genitores envolvidos nos cruzamentos e da cultivar 'Pensacola' de *P. notatum*, utilizada como testemunha em todas as avaliações agrônômicas realizadas na progênie híbrida.

Para tais análises, as inflorescências em antese (quando o saco embrionário normalmente está completamente desenvolvido) foram coletadas e as flores dissecadas foram fixadas em FAA (etanol 95%(40 ml): água destilada (14ml): formalina 40% (3ml) e ácido acético glacial (3ml)) por 24 horas a temperatura ambiente. Após este período, foram armazenadas em álcool 70% e mantidas sob refrigeração até a extração dos ovários que foram dissecados das flores. A amostra contendo os ovários passou por um processo de

clareamento através de uma série de desidratação alcoólica com salicilato de metila, seguindo o protocolo proposto por Young et al. (1979) e modificado por Acuña et al (2007).

Os ovários clareados foram armazenados em solução de salicilato de metila (100%) até as análises em microscópio óptico de contraste interferencial. Para tal, estes foram arranjados sobre uma lâmina e mantidos úmidos com salicilato de metila. Para cada planta híbrida avaliada, um número mínimo de 30 ovários foi analisado para determinar o modo de reprodução.

Sacos embrionários contendo três antípodas e dois núcleos polares centrais foram classificados como sexuais, enquanto sacos embrionários que se caracterizaram por apresentarem sacos múltiplos ou únicos com uma célula central, ausência de antípodas e uma morfologia alterada por grumos de células embrionárias (originadas por mitose) foram considerados apomíticos.

Das 250 plantas híbridas resultantes dos cruzamentos realizados, 194 foram avaliadas quanto ao seu modo de reprodução utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD. A extração de DNA genômico e a análise molecular foram realizadas no Laboratório de Análise Genética do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS. A extração de DNA foi realizada segundo a metodologia descrita por Ferreira e Grattapaglia (1998), com modificações, fazendo uma microextração de cerca de 1cm<sup>2</sup> de uma folha jovem, desprezando-se a nervura central. O DNA das amostras foi quantificado através de eletroforese (100V por uma hora) em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio, para visualização das bandas e comparação com os padrões de concentração conhecida (50, 100, 200 e 500 ng de DNA).

As reações da polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas num volume final de 13 µL, contendo 1,5 unidades da enzima Taq polimerase; 10 mmol L<sup>-1</sup> de dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 2,5 µl de tampão 10X (10 mmol L<sup>-1</sup> de Tris – HCl 9 pH 8,3), 50 mmol L<sup>-1</sup> de MgCl, 30 ng de cada *primer*, 20 ng de DNA genômico e água autoclavada e amplificadas em termociclador MJ. A visualização foi feita em gel de agarose a 1,8% preparado com tampão

TAE (0,04 M, tris acetato, 1 mM de EDTA), três horas a 100 Volts em cubas horizontais.

A análise dos géis foi feita através de um comparativo do padrão de bandas entre os híbridos e o padrão de bandas dos genitores (femininos e masculinos), repetindo as análises de géis com bandas duvidosas ou não muito claras.

### **Resultados e discussão**

As análises citoembriológicas permitiram identificar o modo de reprodução de 23 plantas, de um total de 28 que foram selecionadas após as avaliações agrônômicas de produtividade (TABELA 1).

Para a maior confiança dos dados, aqueles materiais que apresentaram um número de sacos embrionários indefinidos, ou seja, maior do que o número de sacos apomíticos ou sexuais, não tiveram seu modo de reprodução determinado, considerando-se a análise não conclusiva. Por isso, não foi possível determinar o modo de reprodução em cinco híbridos selecionados. Das 23 plantas determinadas, 13 apresentaram morfologia do saco embrionário compatível com o modo e reprodução apomítico (FIGURA 1) e oito apresentaram morfologia do saco embrionário compatível com o modo de reprodução sexual (FIGURA 2). Duas plantas se mostraram apomíticas facultativas. Foi encontrado um número elevado de ovários anormais em quase todas as plantas, possivelmente porque os ovários não estavam no melhor período da antese no momento da coleta das inflorescências para as análises. Plantas que apresentavam tanto ovários apomíticos como sexuais, como o híbrido B26 e A16, foram consideradas de modo de reprodução facultativo.

As plantas com modo de reprodução sexual apresentam sacos embrionários com oito células (oosfera, duas sinérgidas, dois núcleos polares e três antípodas), porém as estruturas visualizadas no microscópio de interferência se resumem às antípodas e aos núcleos polares. Nas plantas apomíticas, além dos sacos apospóricos, pode ocorrer também na mesma planta, a formação de um ou mais sacos embrionários sexuais. Em *Brachiaria*,

foi verificado que esse saco embrionário sexual presente em plantas apomíticas pode ser fecundado, formar um zigoto e dar origem a uma planta através da sexualidade, caracterizando assim a apomixia facultativa, que por definição, é a ocorrência de sementes viáveis oriundas da fecundação de um saco embrionário sexual em uma planta apomítica (Nogler, 1984; Koltunow, 1993). Valle & Savidan (1996) relataram que a ocorrência de dois tipos de sacos embrionários em um mesmo óvulo nas plantas apomíticas de *Brachiaria* é considerada um indicativo de apomixia facultativa. No trabalho de Quarín et al. (2001) é citado que populações tetraplóides induzidas artificialmente podem apresentar modo de reprodução apomítico, sexual ou facultativo, indicando que genes de apomixia existem em plantas diplóides e que a expressão destes genes é reprimida no nível diploide.

TABELA 1. Modo de reprodução de 28 plantas híbridas selecionadas, obtidas de cruzamentos intraespecíficos de *Paspalum notatum*, determinado através de análises citoembriológicas.

Genótipo	Ovários Sexuais	Ovários Apomíticos	Ovários Atrofiados	Ovários Estéreis	Ovários Anormais	Total de ovários	Modo de reprodução
D3	-	24	-	-	18	42	Apomítico
C17	-	22	-	-	18	40	Apomítico
D16	30	-	-	-	8	38	Sexual
B17	7	1	-	1	97	106	Não conclusivo
C2	1	21	-	2	14	38	Apomítico
B43	-	41	3	-	1	45	Apomítico
C24	17	-	3	-	14	34	Sexual
D25	23	-	-	-	8	31	Sexual
C18	24	-	-	1	16	41	Sexual
F15	-	40	-	-	-	40	Apomítico
F29	2	26	-	-	10	38	Apomítico
B26	26	16	-	-	14	56	Facultativo
B37	-	31	-	-	7	38	Apomítico
F24	-	29	-	-	10	39	Apomítico
D17	28	-	4	-	24	56	Sexual
C32	4	-	-	-	26	30	Não conclusivo
C9	2	3	-	-	28	33	Não conclusivo
C6	-	21	-	-	9	30	Apomítico
C15	-	29	-	1	1	31	Apomítico
B29	2	-	-	-	28	30	Não conclusivo
D23	23	-	-	-	17	40	Sexual
B35	26	-	-	7	12	45	Sexual
A20	2	34	1	-	3	40	Apomítico
C22	-	24	-	1	6	31	Apomítico
A16	12	19	-	-	33	64	Facultativo
C23	-	27	2	-	10	39	Apomítico
B2	4	1	-	-	26	31	Não conclusivo
B28	24	-	-	-	16	40	Sexual
Bagual	-	28	-	1	9	38	Apomítico
AR	-	22	1	1	14	38	Apomítico
Pensac	19	-	2	3	12	36	Sexual



Durante o desenvolvimento apospórico, a célula-mãe do megásporo pode se degenerar antes ou após a diferenciação das iniciais apospóricas ou ainda, sofrer meiose e formar um saco embrionário reduzido. Deste modo, o processo sexual pode co-existir com sacos embrionários não reduzidos oriundos das iniciais apospóricas em um mesmo saco embrionário (Karasawa, 2009). Assim, plantas apomíticas apospóricas podem apresentar também alguma reprodução sexual, em diferentes frequências e são, portanto, designadas de plantas apomíticas facultativas. Nestes casos, uma série de fatores tais como flutuações sazonais associadas com fotoperíodo durante o desenvolvimento da inflorescência e respostas ao comprimento do dia, intensidade de luz, temperatura, tipo e nível de fertilidade do solo causam mudança na frequência de incidência de embriões sexuais e apomíticos (Koltunow, 1993). Em *Brachiaria* spp, a frequência da presença de saco embrionário reduzido junto aos apospóricos pode variar de zero até 50% (Valle et al., 1994).

Neste trabalho, através das análises citoembriológicas, foi encontrada uma proporção de 1:1,6 (sex:apo). A segregação genética da aposporia foi explicada anteriormente mediante um modelo genético de herança mendeliana simples, com dominância da aposporia sobre a reprodução sexual exclusiva, porém com uma forte distorção da segregação (Martinez et al., 2001). Diferentemente do encontrado neste trabalho, Fortes et al. (2004) citaram que esta distorção teria sido responsável pelos valores encontrados de 4,3:1 (sex:apo), diferenciando-se do esperado de 1:1. Já nos trabalhos de Martinez et al. (2001), o encontrado foi de 2,8:1 (sex:apo) e no trabalho de Stein et al. (2004) foi de 6,5:1 (sex:apo).



FIGURA 1. Aspectos morfológicos do saco embrionário da planta híbrida apomítica B43. Setas indicam múltiplos sacos. Barra: 10  $\mu$ m.



FIGURA 2. Aspectos morfológicos do saco embrionário da planta híbrida sexual B37. Seta indica as antípodas. Barra: 10  $\mu$ m.

As análises com marcadores moleculares mostraram que somente o *primer* BCU 243 mostrou um padrão estável de amplificação de bandas em dez reações diferentes com os genitores femininos ('Q4188', 'Q4205' e 'C44X'), os genitores masculinos ('Bagual' e 'André da Rocha') e a cultivar 'Pensacola'. Nas plantas sexuais, foi encontrada uma banda na altura de 700 pb e para plantas apomíticas duas bandas, uma na altura de 700 pb e outra na altura de 750 pb (FIGURA 3). Já o *primer* BCU 259 não mostrou um padrão estável de diferenciação de plantas apomíticas e sexuais quando testados nos pais. O *primer* BCU 243, no trabalho de Martínez et al. (2003), mostrou ter amplificado um fragmento específico aos pais apomíticos, numa análise em *bulk*.

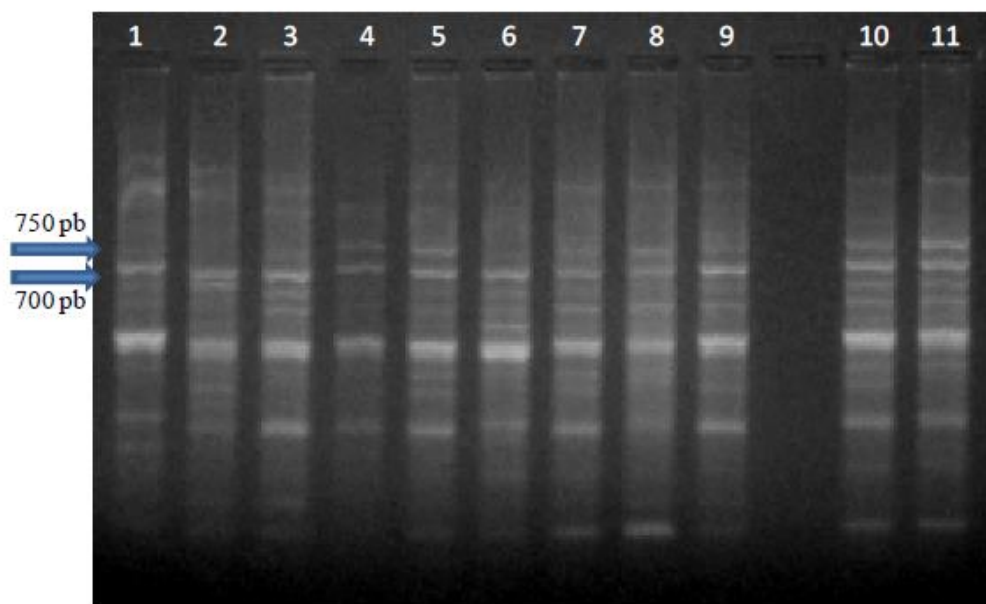


FIGURA 3 - Gel de agarose a 1,8 % com os genitores femininos sexuais 'Q4188', 'Q4205' e 'C44X' (colunas 1, 2 e 3), genitores masculinos apomíticos 'André da Rocha' e 'Bagual' (colunas 4 e 5), Pensacola (coluna 6) e os híbridos A24, A25, A26, A28, A29 (colunas 7, 8, 9, 10 e 11). Em destaque as bandas avaliadas com 700 e 750 pb.

Seria esperada uma proporção de 1:3 de plantas sexuais em relação às plantas apomíticas, porém, nos estudos realizados no IBONE, foi encontrada uma proporção de 36 plantas sexuais e oito plantas apomíticas nos híbridos obtidos nos cruzamentos (Martínez et al. 2001), ou seja, 4,5:1,

segregação esta distorcida, possivelmente relacionada ao efeito letal pleiotrópico do loco dominante ou uma letalidade parcial de fatores ligados ao gene da aposporia.

A análise com marcadores moleculares neste estudo encontrou algo semelhante ao esperado, com 54 plantas sexuais e 140 plantas apomíticas (Tabela 2), ou seja, uma proporção semelhante à esperada de 1:2,6.

Na Progênie **A**, dos 29 híbridos obtidos, 21 foram considerados apomíticos e oito são sexuais. Na Progênie **B**, em um total de 44 híbridos, 27 são apomíticos e 17 são sexuais. Na Progênie **C**, dos 37 híbridos, 30 são apomíticos e sete sexuais; na Progênie **D**, dos 27 híbridos, 20 são apomíticos e sete sexuais; na Progênie **E**, do total de 26 híbridos, 15 são apomíticos e 11 são sexuais e na Progênie **F**, dos 33 híbridos obtidos, 27 são apomíticos e seis são sexuais (Tabela 2). Em todas as progênies foram encontrados menos híbridos sexuais do que apomíticos, variando de uma proporção de 1:1,4 (sex/apo) na família **E** até uma proporção de 1:4,5 (sex/apo) na família **F**.

Na análise citoembriológica é feita uma visualização direta do ovário e a determinação do modo de reprodução se dá pelas estruturas observadas. São avaliados muitos ovários de flores de diferentes inflorescências e este método implica em maior confiabilidade em comparação à análise molecular. As análises utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD ligados à região da aposporia são de grande valia dentro do programa de melhoramento, porém para serem utilizados em substituição as análises citogenéticas, tornam-se necessárias adaptações nos protocolos, para ajustes na técnica e assim ter acesso aos benefícios da técnica.

Comparando as duas análises do modo de reprodução das 23 plantas analisadas através dos dois métodos, oito destas tiveram desacordo nos resultados. Ou seja, as plantas D16, C24, D25, D17, C6, D23, B35 e B28 mostraram resultados diferentes na determinação do modo de reprodução utilizando-se marcadores moleculares e análises citoembriológicas.

TABELA 2. Modo de reprodução da progênie híbrida intraespecífica de *Paspalum notatum* determinada por marcador molecular do tipo RAPD.

Híbrido	Reprodução	Híbrido	Reprodução	Híbrido	Reprodução	Híbrido	Reprodução
A 2	Sexual	B22	Apomítico	C28	Sexual	E14	Sexual
A 7	Sexual	B23	Apomítico	C29	Apomítico	E15	Apomítico
A 8	Apomítico	B25	Apomítico	C30	Apomítico	E16	Sexual
A10	Apomítico	B26	Apomítico	C31	Apomítico	E17	Apomítico
A11	Apomítico	B27	Sexual	C32	Apomítico	E18	Apomítico
A12	Apomítico	B28	Apomítico	C32	Apomítico	E19	Apomítico
A13	Apomítico	B29	Apomítico	C33	Apomítico	E20	Sexual
A14	Apomítico	B30	Apomítico	C34	Apomítico	E21	Apomítico
A15	Apomítico	B31	Sexual	C35	Apomítico	E22	Apomítico
A16	Sexual	B32	Apomítico	C36	Apomítico	E23	Sexual
A17	Apomítico	B33	Apomítico	D 1	Apomítico	E24	Apomítico
A18	Apomítico	B34	Apomítico	D 2	Apomítico	F 1	Sexual
A20	Apomítico	B35	Apomítico	D 3	Apomítico	F 2	Apomítico
A21	Apomítico	B36	Apomítico	D 4	Sexual	F 3	Apomítico
A22	Sexual	B37	Sexual	D 5	Apomítico	F 4	Apomítico
A23	Sexual	B38	Apomítico	D 6	Apomítico	F 5	Apomítico
A24	Apomítico	B39	Sexual	D 7	Apomítico	F 6	Sexual
A25	Apomítico	B40	Apomítico	D 8	Apomítico	F 7	Sexual
A26	Apomítico	B41	Apomítico	D 9	Apomítico	F 8	Apomítico
A27	Apomítico	B42	Apomítico	D10	Apomítico	F 9	Apomítico
A28	Apomítico	B43	Apomítico	D11	Apomítico	F10	Apomítico
A29	Apomítico	B44	Apomítico	D12	Sexual	F11	Sexual
A31	Sexual	B52	Sexual	D13	Sexual	F12	Apomítico
A32	Apomítico	C 1	Apomítico	D14	Sexual	F13	Sexual
A33	Apomítico	C 2	Apomítico	D15	Apomítico	F14	Apomítico
A35	Apomítico	C 3	Apomítico	D16	Apomítico	F15	Apomítico
A36	Sexual	C 4	Apomítico	D17	Apomítico	F16	Apomítico
A37	Apomítico	C 5	Apomítico	D18	Sexual	F17	Apomítico
A38	Sexual	C 6	Apomítico	D19	Apomítico	F18	Apomítico
B 1	Apomítico	C 7	Apomítico	D20	Sexual	F19	Apomítico
B 2	Sexual	C 8	Apomítico	D21	Apomítico	F20	Apomítico
B 3	Sexual	C 9	Apomítico	D22	Sexual	F21	Sexual
B 4	Sexual	C10	Sexual	D23	Apomítico	F22	Apomítico
B 5	Apomítico	C11	Sexual	D24	Apomítico	F23	Apomítico
B 6	Sexual	C12	Apomítico	D25	Apomítico	F24	Apomítico
B 7	Apomítico	C13	Apomítico	D26	Apomítico	F25	Apomítico
B 8	Sexual	C14	Sexual	D27	Apomítico	F26	Apomítico
B 9	Sexual	C15	Apomítico	E 1	Apomítico	F27	Apomítico
B10	Apomítico	C16	Sexual	E 2	Sexual	F28	Apomítico
B11	Sexual	C17	Apomítico	E 3	Apomítico	F29	Apomítico
B12	Apomítico	C18	Sexual	E 4	Apomítico	F30	Apomítico
B13	Sexual	C19	Apomítico	E 5	Apomítico	F31	Apomítico
B14	Apomítico	C20	Apomítico	E 6	Apomítico	F32	Apomítico
B15	Apomítico	C21	Apomítico	E 7	Apomítico	F33	Apomítico
B16	Sexual	C22	Apomítico	E 8	Apomítico	Bagual	Apomítico
B17	Sexual	C23	Apomítico	E 9	Sexual	AR	Apomítico
B18	Sexual	C24	Apomítico	E10	Sexual	Q4188	Sexual
B19	Apomítico	C25	Apomítico	E11	Sexual	Q4205	Sexual
B20	Sexual	C26	Sexual	E12	Apomítico	C44X	Sexual
B21	Apomítico	C27	Apomítico	E13	Sexual	Pensac	Sexual

Possivelmente o desacordo dos resultados pode ser atribuído ao marcador utilizado, que mesmo tendo funcionado em trabalhos no IBONE, não mostrou resultados satisfatórios quanto à repetibilidade dos resultados. Porém, os dados apresentados por Fortes et al. (2004), após análise de 44 híbridos utilizando marcadores do tipo RAPD mostraram resultados semelhantes aos das análises citoembriológicas encontrando mais plantas sexuais do que apomíticas.

Rebozzio et al. (2012), utilizando os marcadores de RAPD BCU 243 e BCU 259 juntamente com onze marcadores do tipo AFLP, mostraram que estes marcadores, que anteriormente eram ligados à região apospórica de planta apomítica Q4117, também estavam conservados em outros acessos apomíticos, ainda que particularmente o marcador do *primer* BCU 243 apresentasse uma banda claramente associada à região apospórica. De acordo com os mesmos autores, numa tentativa de conseguir marcadores SCAR (sequence-characterized amplified regions), que seriam mais específicos na discriminação de plantas apomíticas, somente foi possível desenvolver um marcador SCAR a partir de um marcador do tipo AFLP (Espinoza et al., 2006).

Os marcadores moleculares podem ser uma ferramenta útil na distinção de plantas sexuais e apomíticas, acelerando o processo de identificação e seleção de plantas apomíticas. No entanto devem ser validados para cada laboratório através da comparação com dados embriológicos. Em função disso, a repetição das análises moleculares, incluindo outros marcadores, deverá ser realizada.

Os dados obtidos neste trabalho representam um grande avanço para o programa de melhoramento da Faculdade de Agronomia da UFRGS, uma vez que foi possível determinar o modo de reprodução da progênie segregante dos cruzamentos intraespecíficos. Assim será possível direcionar as plantas selecionadas pelo seu desempenho agrônomo, submetendo as plantas apomíticas para novos ensaios à campo para comprovar o valor agrônomo e viabilizar o registro e proteção de cultivares e utilizar as plantas sexuais para futuros cruzamentos, inserindo-as como potenciais genitores dentro deste programa.

## Conclusões

Através de análises citoembriológicas foi possível a determinação do modo de reprodução da maioria das plantas híbridas avaliadas.

Neste trabalho, através das análises citoembriológicas, foi encontrada uma proporção de 1:1,6 de plantas sexuais em relação a apomíticas, corroborando com trabalhos anteriores, que obtiveram uma segregação distorcida da apomixia em *Paspalum notatum*.

O marcador BCU 243 mostrou um padrão estável de amplificação, porém com alguns resultados divergentes com as análises citoembriológicas, mostrando ser mais confiáveis quando na determinação do modo de reprodução de plantas sexuais.

## Agradecimentos e conflitos de interesse

Agradecemos ao suporte financeiro da SULPASTO, CNPq e CAPES, também ao IBONE (Instituto de Botânica del Nordeste da Argentina).

O presente trabalho não apresenta conflitos de interesses que sejam do conhecimento dos autores.

## Referências bibliográficas

ACUÑA, C.A.; BLOUNT, A.R.; QUESENBERRY, K.H.; HANNA, W.W.; KENWORTHY, K.E. Reproductive characterization of bahiagrass germplasm. **Crop Science**, Madison, v.47, p.1711-1717, 2007.

ACUNÃ. C.A.; BLOUNT, A.R.; QUESENBERRY, K.H.; KENWORTHY, K.E.; HANNA, W.W. Bahiagrass Tetraploid Germoplasm: Reproductive and Agronomic Characterization of Segregating Progeny. **Crop Science**, Madison, v.49, p.581-588, 2009.

ADAMOWSKI, E.V.; PAGLIARINI, M.S.; MENDES-BONATO, A.B.; BATISTA, L.A.R.; VALLS, J.F.M. Chromosome numbers and meiotic behavior of some

*Paspalum* accessions. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.4, p.773-780, 2005.

BARRETO, I.L. **O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul**. 1974. 258f. Dissertação (Livre Docência-Fitotecnia). Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1974.

BOLDRINI, I.I. **Campos do Rio Grande do Sul: caracterização fisionômica e problemática ocupacional**. (S.L.): UFRGS, 1997, p. 1-39, 1997. (Boletim do Instituto de Biociências, 56).

BURTON, G.W. Artificial fog chamber facilitates *Paspalum* emasculation. **Journal America Society Agronomy**, Madison, v. 40, p.281-282, 1948.

CARNEIRO, V.T.C.; DUSI, D.M.A. Apomixia. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, n.25, p.36-42, 2002.

FACHINETTO, J. M. **Caracterização agronômica, molecular, morfológica e determinação do nível de ploidia em uma coleção de acessos de *Paspalum notatum* Flügge**. 2010. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília, DF: EMBRAPA Cenargem, 1998, 220p.

FORTES, N.B.; TCACH, M.; ACUÑA, C.A.; MARTÍNEZ, E.J.; QUARIN, C.L. Segregación de la apomixis in *Paspalum notatum* a partir de cruzamientos entre una planta sexual autotetraploide induzida y un padre apomictico. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**. Resume A-008, 2004.

KARASAWA, M.M.G. **Diversidade Reprodutiva de Plantas**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética – SBG, 2009. 113 p.

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

MARASCHIN, G.E. A planta forrageira no sistema de produção: grama batatais, forquilha e bahiagrass. In: PEIXOTO, A.M.; PEDREIRA, C.G.S.; MOURA, J.C.; FARIA, V. P. 17º Simpósio sobre Manejo da Pastagem. FEALQ. **Anais...** Piracicaba, 2001, 393 p.

MARTÍNEZ, E.J.; URBANI, M.H.; QUARIN, C.L.; ORTIZ, J.P.A. Inheritance of apospoy in bahiagrass, *Paspalum notatum*. **Hereditas**, Lund, v.135, p.19-25, 2001.



MARTÍNEZ, E.J.; ORTIZ, J.P.A.; HOPP, H.E.; QUARIN, C.L. Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. **Molecular Breeding**, Berlin, v.12, p.319-327, 2003.

NABINGER, C. **Manejo e Produtividade das Pastagens Nativas do Subtrópico Brasileiro**. Simpósio de Forrageiras e Produção Animal., 1º, **Anais...** Canoas: ULBRA, p.25-75, 2006.

NOGLER, G.A. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. **Botanica Helvetica**, Zurich, v. 94, 411–422, 1984.

PEREIRA, E.A. **Estudo da produção agrônômica e utilização da análise de adaptabilidade e estabilidade como critério de seleção de uma coleção de acessos de *Paspalum nicorae* Parodi** 2009. 173f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PRESTES, P.J.Q.; FREITAS, E.A.G.; BARRETO, I.L. **Hábito vegetativo e variação estacional do valor nutritivo das principais gramíneas da pastagem do Rio Grande do Sul**. Anuário Técnico do Instituto de Pesquisas Zootécnicas “Francisco Osório”, Porto Alegre. v.3, p.516-531, 1976.

QUARÍN, C.L.; ESPINOZA, F.; MARTINEZ, E.J.; PESSINO, S.C.; BOVO, O. A. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction**, Norman, v.13, p.243-249, 2001.

QUARÍN, C.L.; URBANI, N.H.; BLOUNT, A.R.; MERTÍNEZ, E.J.; HACK, C.M.; BURTON, G.W.; QUESENBERRY, K.H. Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of bahiagrass. **Crop Science**, Madison, v.43, p.745-746, 2003.

REBOZZIO, R.N.; RODRÍGUEZ, M.P.; STEIN, J.; ORTIZ, J.P.A.; QUARIN, C.L.; ESPINOZA, F. Validation of molecular markers linked to apospory in tetraploid races of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. **Molecular Breeding**, Berlin, v.29, p.189-198, 2012.

SAWASATO, J.T. **Caracterização agrônômica e molecular de *Paspalum urvillei* Steudel**. 2007. 109f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

STEIN, J.; QUARIN, C.L.; MARTÍNEZ, E.J.; PESSINO, S.C.; ORTIZ, J.P.A. Segregation analysis of AFLP markers indicates polysomic inheritance in tetraploid *Paspalum notatum* with preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. **Theoretical and Applied Genetics**, Germany, v.109, p.186-191, 2004.

STEINER, M.G. **Caracterização agrônômica, molecular e morfológica de acessos de *Paspalum notatum* Flüggé e *Paspalum guenoarum* Arech.** 2005. 138f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

VALLE, C.B. **Recursos genéticos de forrageiras para áreas tropicais.** I Conferência Virtual Global sobre Produção Orgânica de Bovinos de Corte. 02 de setembro a 15 de outubro de 2002 — Via Internet. Disponível em [www.cpap.embrapa.br](http://www.cpap.embrapa.br)

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

VALLE, C.B.; SAVIDAN, Y.H. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of Brachiaria, In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. (Eds). **Brachiaria: Biology, Agronomy and improvement.** Cali: CIAT; Brasília: EMBRAPA-CNPGC, 1996. p. 147-163.

VALLS, J.F.M. **Recursos genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil.** Encontro Internacional sobre melhoramento genético de *Paspalum*. **Anais...** Nova Odessa: IZ, 1987, p.3-13.

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

#### **4. CAPITULO IV**

**Duplicação do número cromossômico de *Paspalum notatum***

## Duplicação do número cromossômico de *Paspalum notatum*

Roberto Luis Weiler, Miguel Dall'Agnol, Carine Simioni, Divanilde Guerra, Karine Cristina Krycki, Maria Teresa Schifino-Wittmann, Emerson André Pereira e Juliana Medianeira Machado

### Resumo

Os campos do sul do Brasil são ecossistemas naturais que abrigam alta biodiversidade e têm sido a principal fonte forrageira para a pecuária. Entre as diversas espécies, destaca-se, como forrageira, *Paspalum notatum* Flüge (grama forquilha) uma das mais importantes espécies das pastagens nativas do sul do Brasil, Uruguai, nordeste da Argentina e sul do Paraguai. A maioria dos biótipos de *P. notatum* são autotetraplóides ( $2n=4X=40$ ) e se reproduzem através de apomixia do tipo aposporia (pseudogamia). O Capim Pensacola é uma raça diplóide sexual ( $2n=2X=20$ ), que permite a duplicação somática e a obtenção de tetraplóides sexuais, oferecendo novas possibilidades para os programas de melhoramento. O objetivo deste trabalho foi de poliploidizar plantas de *Paspalum notatum* var. *saurae* (cultivar Pensacola) visando a utilização de tetraplóides sexuais induzidos artificialmente em cruzamentos com genitores masculinos tetraploides e apomíticos. Para duplicação das plântulas diplóides, sementes de 'Pensacola' foram deglumadas e colocadas para germinar em placas de petri. Após a abertura do cotilédone e exposição do botão apical, foram tratadas por imersão com soluções de 0,01, 0,05, 0,08, 0,1 e 0,2% de colchicina por tempos entre duas e 24 horas. Para indução em sementes, 1000 sementes foram escarificadas; 500 foram colocadas em imersão em uma solução de 0,1% de colchicina e outras 500 foram submetidas a uma solução de 0,15% de colchicina, ambas por um tempo de 24 horas. Para verificar se houve duplicação cromossômica após a indução de poliploidia, foram utilizadas as técnicas de medida de quantidade de DNA através de um analisador de ploidia, contagem cromossômica em células somáticas de ponta de raiz (mitose) e através de análises meióticas em células mães de grãos de pólen. Um total 1761 plântulas e/ou sementes foram submetidas aos diversos tratamentos com colchicina. Destas, 713 sobreviveram e 370 plantas atingiram a fase adulta sendo analisadas quanto à efetividade do tratamento. Utilizando o analisador de ploidia foram avaliadas 259 plantas; destas, 53 plantas também tiveram o número cromossômico avaliadas em mitose e 58 plantas em meiose. Três plantas confirmaram número cromossômico tetraplóide, assim denominadas: k3, alfa 63 e delta 92. O número reduzido de plantas duplicadas comprova a dificuldade em atingir tal objetivo. As plantas poliploides obtidas serão avaliadas quanto ao modo de reprodução; se confirmarem ser sexuais, poderão ser utilizadas em cruzamentos com plantas nativas apomíticas com a finalidade de obter novos híbridos intraespecíficos para o programa de melhoramento.

Palavras-chave: Poliploidia, Duplicação cromossômica, Grama forquilha

## Doubling the chromosome number of *Paspalum notatum*

### Abstract

The southern fields in Brazil are natural ecosystems, which have a high biodiversity and also have been the main forage source for livestock. Among the various species, *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) stands out, been one of the most important species of native grasslands in southern Brazil, Uruguay, northeastern Argentina and southern Paraguay. Most biotypes of *P. notatum* are autotetraploid ( $2n = 4x = 40$ ) and reproduce through apomixis, apospory (pseudogamy). Pensacola is sexual and diploid ( $2n = 2x = 20$ ), which is amendable to somatic duplication and to the formation of sexual tetraploids, providing new possibilities for breeding programs. Thus, this study aimed to obtain polyploids of *P. notatum* var. *saurae* (Pensacola) and to use them in crosses with apomictic tetraploids. For doubling of diploid seedlings, seeds of 'Pensacola' were germinated in petri dishes and were immersed in a solution of 0.01, 0.05, 0.08, 0.1 and 0.2% of colchicine at times between two and twenty four hours. For seeds doubling, 1,000 seeds were scarified, 500 were placed in immersion in a solution of 0.1% colchicina and another 500 seeds in a 0.15% solution of colchicine, both for 24 hours. To verify success of chromosome doubling, three techniques were used: ploidy analyzer, counting chromosome in somatic cells (mitosis) and meiotic analysis. A total 1,761 seedlings/seeds were submitted to various treatments with colchicine. Of these, 713 survived and 370 plants reached the adult phase being analyzed for effectiveness of treatment. Using the ploidy analyzer, 259 plants were evaluated, whereas 53 plants had the chromosome number evaluated in mitosis (root tips cells) and 58 plants in meiosis (pollen grains mother cells). Three plants confirmed tetraploid chromosome number: k3 (0.08% treatment at 6 h in seedling), alpha 63 (0.1% treatment for 24 h in the seed) and delta 92 (0.15% treatment for 24 h in the seed). The reduced number of duplicated plants confirms the difficulties to achieve this objective. The polyploid plants will be evaluated in relation to the reproduction mode and those sexual can be used in crosses with native plants apomictic to obtain new intraspecific hybrids.

Key-words: Polyploidy, Chromosome doubling, Bahiagrass

## Introdução

Os Campos Sulinos são ecossistemas naturais que abrigam alta biodiversidade e têm sido a principal fonte forrageira para a pecuária. Nas últimas décadas, porém, mais da metade da superfície originalmente coberta com os Campos no Estado do Rio Grande do Sul foi transformada em outros tipos de cobertura vegetal e seu potencial forrageiro não tem sido devidamente valorizado. A produção animal tem sido substituída por outras atividades aparentemente mais rentáveis no curto prazo e a conservação dos campos tem sido ameaçada pela conversão em culturas anuais e silvicultura e pela degradação associada à invasão de espécies exóticas e uso inadequado (Behling et al., 2009).

Entre as diversas espécies, destaca-se, como forrageira, *Paspalum notatum* Flüggé (grama forquilha) que é uma das mais importantes espécies das pastagens nativas do sul do Brasil, Uruguai, nordeste da Argentina e sul do Paraguai (Quarín et al., 1984). Constitui-se no principal extrato herbáceo da maior parte dos campos do Rio Grande do Sul (Nabinger e Dall’Agnol, 2008) e tende a aumentar gradativamente pela resistência ao pisoteio e crescimento estimulado pelo pastejo (Barreto, 1974; Pozzobon & Valls, 1997). Esta espécie tem ciclo perene e é de estação quente, se dispersando através de rizomas característicos (supraterrâneos) e por sementes (Barreto, 1974).

A maioria dos biótipos de *P. notatum* são autotetraplóides ( $2n=4X=40$ ) e se reproduzem através de apomixia do tipo aposporia (pseudogamia) (Forbes & Burton, 1961). Uma raça diplóide sexual ( $2n=2X=20$ ), Capim Pensacola (*Paspalum notatum* var. *saurae*), nativa do nordeste e centro-oeste da Argentina foi também descrita. A forma diplóide se reproduz sexualmente, é meioticamente estável, alógama e autoincompatível (Burton, 1946; Forbes & Burton, 1961).

O Capim Pensacola é de estação quente e apresenta a maior produção de forragem em temperaturas médias superiores a 15°C. Seu hábito de crescimento é rasteiro com rizomas curtos e firmemente presos à superfície

do solo formando uma cobertura densa (Mislevy,1985). Esta cultivar é comercializada na região sul do país. Sua utilização e difusão merecem destaque, principalmente nas criações de eqüinos onde se tornou uma alternativa para o pastejo desses animais, devido a características como: tolerância a intenso e freqüente pisoteio, baixa altura da planta, ausência de estruturas vegetais contundentes e princípios anti-nutricionais não relatados (Haddad et al.,1999). No Rio Grande do Sul, o Capim Pensacola se destaca principalmente na região do Planalto, daí a importância de ser comparada, sob ponto de vista de produção e valor forrageiro, com os ecótipos nativos da espécie (Dall’Agnol et al., 2006).

Para que a diversidade genética conservada pela apomixia seja plenamente explorada, é necessário viabilizar cruzamentos por meio de plantas sexuais compatíveis, com a finalidade de gerar novas combinações gênicas e selecionar indivíduos que solucionem os problemas relacionados com a estreita base genética das espécies apomíticas. A duplicação e posterior utilização de plantas diplóides sexuais de populações naturais de Capim Pensacola em esquemas de cruzamentos intraespecíficos oferece novas possibilidades para os programas de melhoramento (Burton & Forbes, 1960).

No gênero *Paspalum* há uma estreita correlação entre nível de ploidia e modo de reprodução, onde diploidia está correlacionada com reprodução sexuada e alogamia e poliploidia está correlacionada com apomixia (Adamowski et al., 2005). Os genótipos tetraplóides apomíticos usualmente mostram associações de cromossomos quadrivalentes na meiose. Porém, a maior parte das espécies apomíticas tetraplóides tem, em contrapartida, co-específicos sexuais, diplóides e auto-incompatíveis (Quarín & Norrmann, 1990).

A duplicação e posterior utilização de plantas diplóides sexuais de populações naturais de Capim Pensacola em esquemas de cruzamentos intraespecíficos oferece novas possibilidades para os programas de melhoramento (Burton & Forbes, 1960).

Para confirmação da efetiva duplicação cromossômica podem ser utilizadas as técnicas de contagem cromossômica em células somáticas de pontas de raiz (mitose) e em células mães de grãos de pólen (análises meióticas) ou a citometria de fluxo. A citometria de fluxo envolve a análise das propriedades óticas de partículas em fluxo, movendo-se em relação ao ponto

de medida. As partículas estão hidrodinamicamente contidas no centro de um fluxo estreito de líquido e passam por um foco de luz intenso, o que permite a excitação dos fluorocromos presentes nas partículas. Os pulsos de luz e de fluorescência são colhidos por um sistema de detecção ótica, separados por filtro e convertidos em pulsos elétricos por sensores óticos, transcritos em gráficos (Dolezel, 1997).

A poliploidia é um importante processo na evolução cromossômica dos eucariotos, onde três ou mais conjuntos cromossômicos compartilham o mesmo núcleo. Nas plantas, a poliploidia representa o maior mecanismo de adaptação e especiação (Ramsey & Schemske, 1998). Cerca de 80% das angiospermas são poliplóides, evidenciando que a poliploidia tem um papel relevante na evolução de plantas superiores (Leitch & Bennet, 1997).

Poliplóides formados por conjuntos genômicos idênticos são referidos como autopoliplóides (duplicação de cromossomos dentro de uma população) e aqueles que surgem por hibridação interespecífica, seguido de duplicação cromossômica, são denominados alopoliplóides (Ramsey & Schemske, 1998; Otto & Whitton, 2000).

A poliploidia em *Paspalum* é estimada em aproximadamente 80% das espécies, na qual predomina o nível tetraplóide (Quarín, 1992). Isto evidencia a importância da poliploidia na evolução destas gramíneas tropicais sul-americanas e demonstra a maior adaptabilidade das espécies tetraplóides.

A indução somática de poliploidia consiste basicamente em utilizar uma substância antimitótica, das quais a mais utilizada é a colchicina. A aplicação pode ser nas sementes, plantas jovens ou partes vegetativas com tecidos meristemáticos ativos, como afilhos e estolhos (Silva et al., 2000). Entre as vantagens de se utilizar colchicina, há a facilidade de aplicação e relativa baixa toxicidade. Entre as desvantagens, são citadas a baixa porcentagem de plantas duplicadas e a alta frequência de surgimento de tecidos mixaplóides (ou quimeras) (Taylor & Quesenberry, 1996).

A duplicação somática é muito utilizada em diversas culturas, por várias razões, entre elas: (a) obtenção de autopoliplóides artificiais de culturas diplóides; (b) síntese de culturas alopoliplóides de espécies ancestrais diplóides; (c) produção de alopoliplóides para usar como uma ponte fértil para transferência de genes dentro de variedades; (d) facilidade de cruzamentos



entre pais com diferentes níveis de ploidia por igualar o número cromossômico (Hermsen, 1984). Este último fator é o de maior relevância na proposta do presente trabalho, onde no Programa de Melhoramento Genético do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da UFRGS, espera-se a duplicação do número cromossômico de ecótipos diplóides para igualar o nível de ploidia dos acessos nativos de *P. notatum* que serão utilizados nas hibridações intraespecíficas para a produção de híbridos férteis e com base genética ampliada.

O objetivo deste trabalho foi realizar a indução artificial de poliploidia em plântulas e sementes de *P. notatum* var. *saurae* (cultivar Pensacola), visando a utilização dos tetraplóides sexuais obtidos em esquemas de cruzamentos intraespecíficos, utilizando o germoplasma nativo apomítico como genitores masculinos.

### **Material e métodos**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Para duplicação das plântulas diplóides, sementes de 'Pensacola' foram deglumadas, escarificadas com auxílio de uma lixa e colocadas para germinar em placas de petri previamente desinfestadas com álcool etílico e forradas com papel filtro umedecido.

Logo após a abertura do cotilédone e exposição do botão apical das plântulas postas a germinar, estas foram tratadas por imersão com soluções de 0,01, 0,05, 0,08, 0,1 e 0,2% de colchicina {(S)-N-(5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo [a]heptalen-7-yl)}, por períodos de duas há 24 horas. Após a aplicação da droga, as plântulas foram bem lavadas com água corrente e transplantadas, primeiramente para bandejas de isopor alveoladas. Após terem alcançado de cinco a sete centímetros, as plantas jovens foram transplantadas para vasos com terra e seu desenvolvimento foi acompanhado, registrando-se as alterações morfológicas que ocorreram e a taxa de mortalidade (FIGURA 1). Para indução em sementes, 1000 sementes foram escarificadas, destas, 500 foram colocadas em imersão em uma solução de

0,1% de colchicina e outras 500 foram submetidas a uma solução de 0,15% da droga, ambas por um período de 24 horas.

Para verificar se houve duplicação cromossômica foi utilizada a técnica de medida da quantidade de DNA através de um analisador de ploidia e as técnicas de contagem cromossômica em células somáticas de pontas de raiz (mitose) e em células mães de grãos de pólen (análises meióticas).

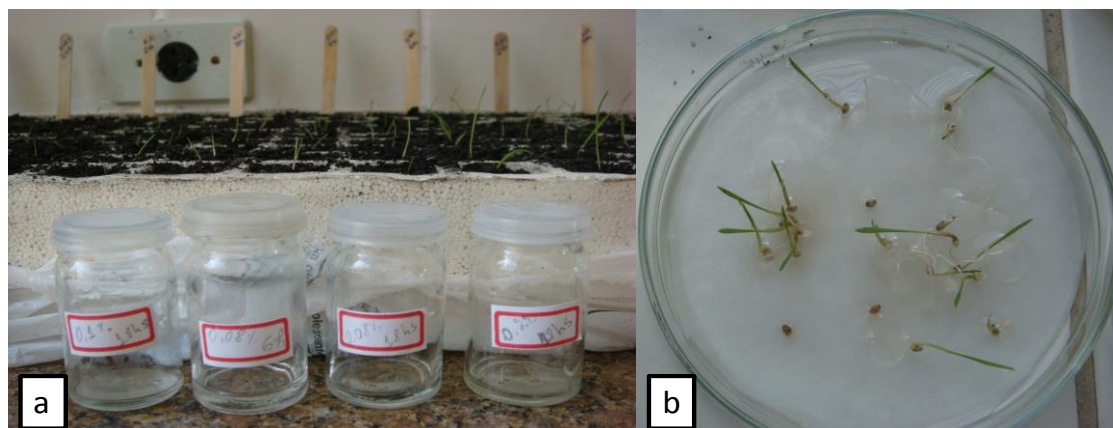


FIGURA 1. (a) Frascos para tratamento de plântulas com colchicina: (b) plântulas de *Paspalum notatum* tratadas com colchicina no momento de serem transplantadas para bandejas alveoladas. Departamento de Plantas Forrageiras – Faculdade de Agronomia, UFRGS (2009).

As análises de medida de quantidade de DNA foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, utilizando um analisador de ploidia da marca Partec.

Para realizar as análises, amostras de cerca de 0,5 cm<sup>2</sup> de uma folha de cada planta foram maceradas em 200 microlitros de tampão de extração (CyStain UV Solution A – Partec, Münster, Germany). Esta solução foi filtrada e os núcleos foram corados com a solução corante num volume de 400 microlitros extração (CyStain UV Solution B – Partec, Münster, Germany). O equipamento faz um comparativo de um exemplo conhecido e a amostra que se deseja determinar quanto à ploidia. Como padrões tetraplóides foram utilizados os ecótipos ‘Bagual’ e ‘André da Rocha’ e como padrão diplóide foi utilizado a cultivar ‘Pensacola’. Os resultados são mostrados em gráficos, onde é possível visualizar a quantidade de DNA contida por núcleo celular. As plantas que apresentaram padrões de DNA compatíveis com o nível tetraplóide de ploidia foram submetidas a uma análise citogenética (contagem

cromossômica em ponta de raiz ou em células mães de grãos de pólen) para comprovar a duplicação cromossômica.

Para avaliar o nível de ploidia através da contagem cromossômica em células somáticas (mitose), as análises foram realizadas em células de pontas de raiz, que foram removidas das plantas adultas, pré-tratadas com uma solução saturada de paradiclorobenzeno e mantidas, por 24h, a 4°C. Após este período, as pontas de raiz foram fixadas em uma solução 3:1 (álcool etílico: ácido acético) por 24h e depois estocadas em álcool etílico 70% sob refrigeração até a realização das análises. No momento das análises, as pontas foram hidrolisadas em HCl 1N (ácido clorídrico normal) por dez minutos à 60°C, seguidas de coloração pela técnica Feulgen mais carmim propiônico 1% e observadas em microscópio óptico. No mínimo 20 células por planta foram conferidas para contagem do número de cromossomos (Dahmer et al., 2008; Simioni et al., 2006; Pozzobon & Valls, 1997).

Para verificar a efetividade da duplicação cromossômica em análises meióticas, inflorescências jovens, envoltas pela folha bandeira, nos estágios iniciais de desenvolvimento foram coletadas. Após, foram fixadas em uma solução de etanol absoluto: ácido acético (3:1) por 24h, transferidas para álcool etílico 70% e estocadas sob refrigeração (Araújo et al., 2005). Para as análises, os microsporócitos foram esmagados e corados com carmim propiônico 1%. As contagens foram feitas nas associações em diacinese e metáfase I, principalmente, porque estes estágios possuem uma configuração de pareamento cromossômico que pode ser facilmente observada (Dahmer et al., 2008; Simioni et al., 2006; Pozzobon & Valls, 1997). No mínimo 20 células por planta foram conferidas para contagem do número de cromossomos.

## **Resultados e discussão**

Um total 1761 plântulas e/ou sementes foram submetidas aos diversos tratamentos com colchicina. Destas, 713 sobreviveram e 370 plantas atingiram a fase adulta e foram analisadas quanto à efetividade do tratamento. (FIGURA 2; TABELA 1).

No analisador de ploidia foram avaliadas 241 plantas. Não foi possível analisar todas as plantas, pois nem todas tinham porte suficiente que

possibilitasse a remoção de um ou mais afilhos. As análises foram realizadas no Mato Grosso do Sul, sendo necessário remover parte das plantas com estruturas de reservas (rizomas), com a finalidade de garantir a sobrevivência por mais tempo. Doze destas plantas apresentaram quantidades de DNA compatíveis com o nível tetraplóide de ploidia (FIGURA 3). Porém, as análises citogenéticas não confirmaram o nível tetraplóide de ploidia, sendo que somente duas dessas plantas confirmaram a duplicação cromossômica.

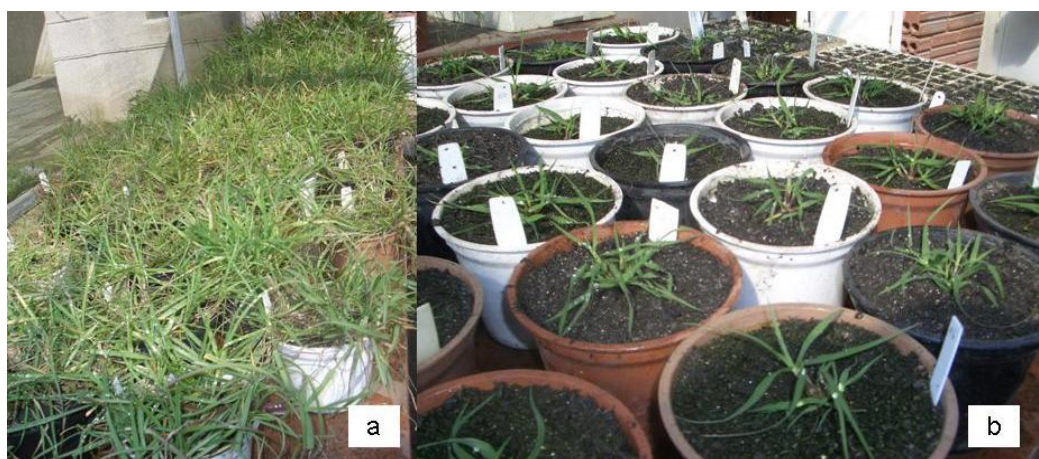


FIGURA 2. Aspectos das plantas tratadas para duplicação cromossômica em casa de vegetação. (a) visão geral; (b) detalhe das plantas nos vasos. Departamento de Plantas Forrageiras – Faculdade de Agronomia, UFRGS (2009).

Quesenberry & Smith (2003) induziram artificialmente a duplicação cromossômicas *in vitro* de *P. notatum* e levaram as plantas induzidas à campo para uma avaliação de vigor. Destas plantas, Acunã et al. (2007) selecionaram as 20 mais vigorosas e utilizaram um analisador de ploidia avaliar o número cromossômico. Todas as 20 plantas analisadas confirmaram a duplicação.

Reyno et al. (2012) realizaram análises de nível de ploidia em *P. notatum* utilizando citômetro de fluxo, citando que, nas análises onde os picos de conteúdo de DNA não correspondiam ao esperado, era feita a contagem do número cromossômico em mitose em pontas de raiz; neste caso, pelo menos três células de três raízes diferentes eram analisadas por planta. Neste trabalho, as análises no analisador de ploidia foram preliminares para reduzir o trabalho e o tempo despendido com as análises citogenéticas. Das plantas que

foram analisadas preliminarmente, somente foram avaliadas em meiose ou mitose as que demonstravam algum indício de duplicação.

TABELA 1. Resumo dos resultados obtidos na etapa de indução de poliploidia em sementes e plântulas: concentrações de colchicina, tempo de exposição à droga, número de plantas sobreviventes, plantas adultas em vasos, porcentagem de plantas sobreviventes e plantas avaliadas.

Concentrações da droga	Tempo de exposição	Nº plântulas tratadas	Nº sementes tratadas	Nº sobreviventes ao tratamento	Plantas adultas em casa de vegetação	% de plantas sobreviventes	Plantas avaliadas
0,01%	3h	10	-	10	3	30	1
	4h	65	-	31	18	28	17
	5h	73	-	52	29	40	27
	6h	14	-	12	8	57	7
	18	20	-	0	0	0	-
	24h	39	-	20	13	33	10
0,05%	2h	20	-	11	8	40	8
	3h	20	-	14	11	55	10
	4h	120	-	46	41	34	38
	18	20	-	12	0	0	-
	24h	27	-	7	0	0	-
0,08%	6h	89	-	42	13	15	11
	18	17	-	5	0	0	
	24h	17	-	4	1	6	1
0,10%	6h	88	-	63	12	14	12
	8h	20	-	12	0	0	-
	18h	17	-	9	0	0	-
	24h	13	-	0	0	0	-
	24h	-	500	103	28	6	28
0,15%	24h	-	500	248	181	36	178
0,20%	6h	39	-	12	4	10	4
	18h	16	-	0	0	0	-
	24h	17	-	0	0	0	-
<b>Total</b>		<b>761</b>	<b>1000</b>	<b>713</b>	<b>370</b>	<b>49</b>	<b>352</b>

Na determinação do número cromossômico através de contagem em microscópio óptico foram avaliadas 53 plantas em mitose (células de pontas de raiz) e 58 plantas em meiose (células mães de grãos de pólen). Análises citogenéticas são muito trabalhosas, demandam muito tempo, por isso, as análises em analisador de ploidia foram necessárias para agilizar o processo de verificação da efetividade da duplicação cromossômica. A dificuldade é maior devido ao tamanho cromossômico reduzido e a baixa taxa de células em divisão, normalmente observado em gramíneas C4, incluindo a grama forquilha (Quesenberry et al. 2010).

Três plantas confirmaram número cromossômico tetraplóide, indicando as dificuldades de atingir tal objetivo. As plantas poliplóides obtidas neste trabalho foram assim nominadas: k3 (tratamento 0,08% por 6h na plântula) analisada em meiose; alfa 63 (tratamento 0,1% por 24h na semente) verificado com analisador de ploidia e confirmado em meiose e delta 92 (tratamento 0,15% por 24h na semente) também verificado com analisador de ploidia e confirmado em meiose (FIGURA 4). A eficácia da duplicação foi obtida com concentrações maiores e por mais tempo quando o tratamento ocorreu nas sementes. Na indução em plântulas com as mesmas concentrações da droga (0,1% ou mais num tempo de 24h) houve morte de 100% das plântulas tratadas.

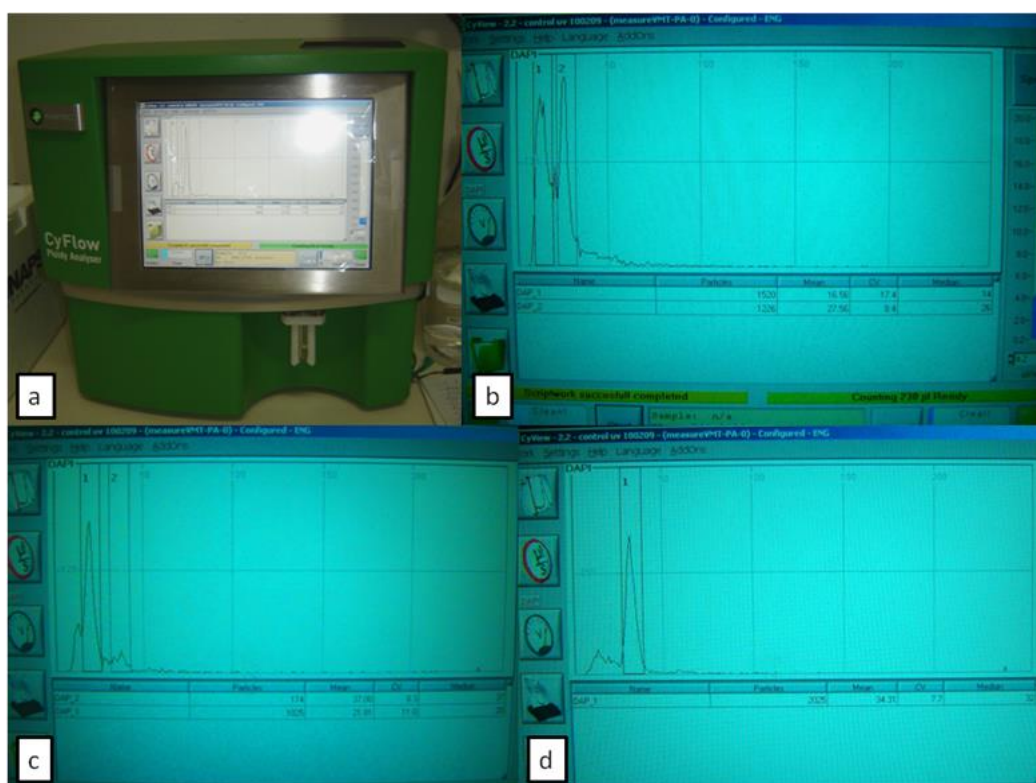


FIGURA 3. (a) Analisador de ploidia utilizado nas análises de nível de ploidia. (b) Gráfico com dois picos formado quando foram misturadas plantas diplóide e tetraplóides. (c) Gráfico com um pico na altura que indica ser uma planta diplóide. (d) Gráfico com um pico na altura indicando que a planta é tetraplóide.

Em quatro plantas deste experimento não foi possível distinguir o nível de ploidia devido ao surgimento de raízes quiméricas. A ocorrência de quimeras e, conseqüentemente o surgimento de indivíduos mixaplóides são

comuns, porque somente células mitoticamente ativas no momento do tratamento têm chances de duplicar seu número cromossômico. O tecido afetado é desorganizado, conduzindo a irregularidades no número cromossômico (Sybenga, 1992), com isso, alguns tecidos ou plantas apresentam setores duplicados e outros não duplicados (Taylor & Quesenberry, 1996).

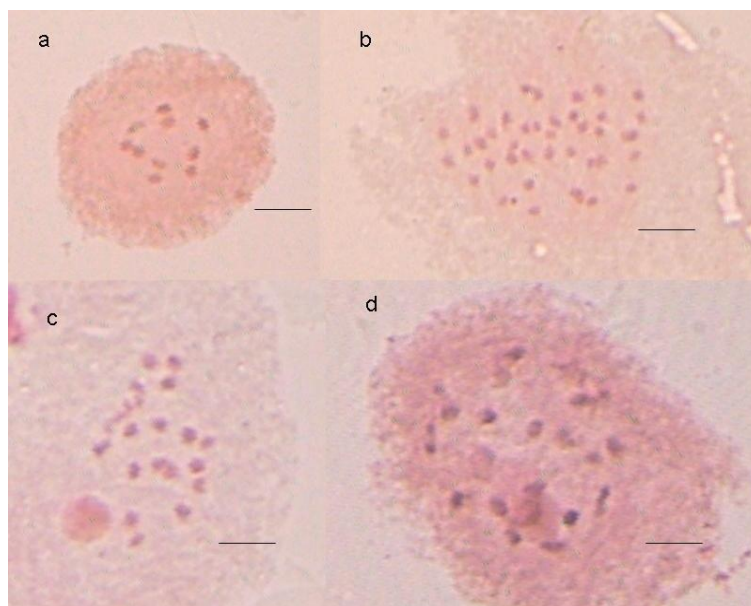


FIGURA 4. Aspectos da meiose (configurações cromossômicas) comprovando a duplicação cromossômica. (a) Testemunha: *P. notatum* cv Pensacola: 20 cromossomos (10 bivalentes em diacinese); (b) planta alfa 63: 40 univalentes em início de anáfase I; (c) planta delta 92: 40 cromossomos (20 bivalentes em diacinese); (d) planta k3: 40 cromossomos (20 bivalentes em diacinese). Barra: 10  $\mu$ m.

O reduzido número de plantas duplicadas obtidas neste estudo corroboram com Quarín et al. (2001) que induziram a duplicação cromossômica em 24 plântulas diplóides de *P. notatum*, onde somente uma apresentou efetiva confirmação de tetraploidização e outra apresentou setores da planta octaplóides e setores tetraplóides. Neste mesmo trabalho foram duplicados os cromossomos de *P. notatum* com a aplicação de colchicina diretamente no meio de cultura em plântulas. Os autores registraram que duas plantas efetivamente duplicaram o número cromossômico, as quais foram submetidas a uma dose de 0,2 g/l da droga. Os mesmos autores induziram artificialmente calos de cultura de tecido jovem de inflorescências de *P. notatum* com colchicina. Os calos foram submetidos a análises de confirmação de duplicação

cromossômica utilizando um citômetro de fluxo e somente a região de calos que se mostrava duplicada foi utilizada para regeneração de plantas. De 40 inflorescências, 37 regeneraram calos; destes, 74% mostraram regiões tetraploidizadas e a dose mais eficaz foi de 0,2 g/l da droga por 72 horas.

Quesenberry et al. (2010) induziram a duplicação cromossômica de *P. notatum* em calos, utilizando os agentes antimitóticos colchicina, oryalin e trifluralina. Os autores verificaram a eficácia da poliploidização através de três análises: tamanho dos estômatos, determinação do número cromossômico em mitose em pontas de raiz e análises com citômetro de fluxo. Os tratamentos com trifluralina e colchicina foram os mais eficazes. Os autores citam que a avaliação através do tamanho dos estômatos pode ser utilizada para uma *screening* inicial quando há muitas plantas induzidas para serem analisadas. Foram encontrados 12% de discordância entre as análises de tamanho estomático e as análises utilizando citômetro de fluxo. Os autores relatam ainda que houve dificuldades na análise mitótica em pontas de raiz, sendo difícil separar e contar os cromossomos, demandando muito tempo nesta análise. Dificuldades semelhantes foram encontradas neste trabalho, onde, na maioria das células em diacinese, os cromossomos não estavam bem espalhados, dificultando a contagem dos mesmos.

O tratamento com a droga colchicina foi eficiente, mesmo que em baixa porcentagem, sendo possível obter plantas poliplóides através desta técnica. Cabe ressaltar que foi possível obter duas plantas poliploidizadas no tratamento direto das sementes, uma técnica inédita para *P. notatum*. As análises de mitose e/ou meiose são mais confiáveis se comparado com a análise com analisador de ploidia e as análises neste demandam um recurso maior em reagentes e treinamento de mão de obra.

O tratamento em sementes pode ser realizado em um maior número e com isso aumentar as chances de sucesso, porém com mais plantas induzidas, maior será a mão de obra para análises da efetividade da poliploidização. A dose e o tempo de exposição à colchicina deve ser aumentada no tratamento de sementes, pois neste trabalho obteve-se sucesso com doses de 1,0 e 1,5% por 24 horas, se comparado com tratamento em plântulas numa dose de 0,08% por seis horas.



Ainda que neste trabalho apenas 0,85% das plantas avaliadas foram duplicadas, as três plantas poliploidizadas representam um grande avanço no Programa de Melhoramento de Plantas Forrageiras da UFRGS, pois abre novas perspectivas de estratégias de cruzamentos nesta espécie, ampliando a variabilidade genética e permitindo o registro de novas variedades.

As plantas duplicadas serão mantidas em casa de vegetação, clonadas e avaliadas quanto ao modo de reprodução para confirmar se são sexuais. Em etapas posteriores, estas serão avaliadas citogeneticamente para verificar se mantém a viabilidade/fertilidade (regularidade de meiose e viabilidade de pólen), para validá-las como genitores femininos em futuros cruzamentos com a finalidade de obter híbridos intraespecíficos desta importante espécie forrageira.

### **Conclusões**

Três plantas de *P. notatum* tiveram o número cromossômico duplicado neste trabalho, sendo efetivamente confirmados como tetraplóides ( $2n=4X=40$ ) e denominadas K3, alfa 63 e delta 92.

O agente antimitótico colchicina é eficiente no tratamento de plantas diplóides com o objetivo de obter plantas poliplóides de *P. notatum* var. *saurae*.

As concentrações de 0,08% por 6h na plântula, 0,1% por 24h na semente e 0,15% por 24h na semente mostraram-se eficientes na duplicação número cromossômico em *P. notatum*.

Foi possível duplicar plantas de *P. notatum* tratando-se sementes e plântulas, porém com doses e tempo maior de exposição à colchicina quando utilizado tratamento nas sementes.

### **Agradecimentos e conflitos de interesses**

Agradecemos ao suporte financeiro da SULPASTO, CNPq e CAPES.

Ao IBONE (Instituto de Botânica del Nordeste da Argentina) em especial aos pesquisadores Camilo Luiz Quarín e Carlos Acunã.

A EMBRAPA Gado de Corte – Campo Grande (MS), em especial a pesquisadora Cacilda Borges do Valle.

O presente trabalho não apresenta conflitos de interesses que sejam do conhecimento dos autores.

### Referências bibliográficas

- ACUÑA, C.A.; BLOUNT, A.R.; QUESENBERRY, K.H.; HANNA, W.W.; KENWORTHY, K.E. Reproductive characterization of bahiagrass germplasm. **Crop Science**, Madison, v.47, p.1711-1717, 2007.
- ADAMOWSKI, E.V.; PAGLIARINI, M.S.; MENDES-BONATO, A.B.; BATISTA, L.A.R.; VALLS, J.F.M. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.4, p.773-780, 2005.
- ARAÚJO, A.C.G.; NÓBREGA, J.M.; POZZOBON, M.T.; CARNEIRO, V.T. de C. Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, Wageningen, v.144, p.39-50, 2005.
- BARRETO, I.L. **O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul**. 1974. 258 f. Dissertação (Livre Docência-Fitotecnia). Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1974.
- BEHLING, H.; JESKE-PIERUSCHKA, V.; SCHULER, L.; PILLAR, V. DE P. In: Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário Tardio. Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade / Valério De Patta Pillar... [et al.]. Editores. – Brasília: MMA, 2009.403 p.
- BURTON, G.W. Bahiagrass types. **Journal of American Society of Agronomy**, Madison, v.38, p.273-281, 1946.
- BURTON, G.W.; FORBES, I. Genetics and manipulation of obligate apomixis in common Bahia grass (*Paspalum notatum* Flüggé). In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 8., Reading, 1960. **Proceedings...** Reading: International Grassland Society, 1960. p.66-71.
- DAHMER, N.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M.; CASTRO, B. de. Cytogenetic data for *Paspalum notatum* Flüggé accessions. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.65, n.4, p.381-388, 2008.
- DALL'AGNOL, M.; STEINER, M. G.; BARÉA, K.; SCHEFFER-BASSO, S.M. **Perspectivas de lançamento de cultivares de espécies forrageiras nativas: o gênero *Paspalum***. In: Simpósio de Forrageiras e Produção Animal. Ênfase Importância e Potencial Produtivo da Pastagem Nativa, 1º, **Anais...** Porto Alegre: Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia UFRGS, p.147-160, 2006.

DOLEZEL, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. In: LELLEY, T. **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna : WUV-Universitätsverlag, 1997, p. 80-90

FORBES, I.; BURTON, G. W. Induction of tetraploid and rapid field method of detecting induced tetraploidy in *Pensacola bahiagrass*. **Crop Science**, Madison, v.1, p.383-384, 1961.

HADDAD, C.M.; DOMINGUES, J.L.; CASTRO, F.G.F.; TAMASSIA, L.F.M. Características de produção e valor nutritivo do capim *Pensacola* (*Paspalum notatum* Flüggé var. *saurae* Parodi) em função da idade de corte. **Scientia Agricola**, Piracicaba, vol.56, n.3, p.753-761, 1999.

HERMSEN, J.G. Nature, evolution, and breeding of polyploids. **Iowa State Journal of Research**, Ames, v.58, n.4, p.411-420, 1984.

LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. Polyploidy in angiosperms. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 12, p.470-476, 1997.

MISLEVY, P. Forages for grazing systems in warm climates. In: McDOWELL, L.R. (Ed.). **Nutrition of grazing ruminants in warm climates**. Orlando: Ademic Press, 1985, Cap.5, p. 73-102.

NABINGER, C.; DALL'AGNOL, M. Principais gramíneas nativas do RS: características gerais, distribuição e potencial forrageiro. In: DALL'AGNOL, M.; NABINGER, C.; SANTOS, R. J. (Eds.). Simpósio de Forrageiras e Produção Animal, 3º, Porto Alegre, 2008. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, p.7-54, 2008.

OTTO, S.P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, n.34, p.401-437, 2000.

POZZOBON, M.T; VALLS, J.M. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). **Brazilian Journal Genetics**, Ribeirão Preto, v.20, n.1, p.29-34, 1997.

QUARÍN, C. L. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. **Apomixis Newsletter**, México, v.5, p.8-15. 1992.

QUARÍN, C.L.; BURSON, B.L.; BURTON, G.W. Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. **Botanical Gazette**, Chicago, v.145 n.3. p.420-426, 1984.

QUARÍN, C.L.; ESPINOZA, F.; MARTINEZ, E.J.; PESSINO, S.C.; BOVO, O. A. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction**, Norman, v.13, p.243-249, 2001.

QUARÍN, C.L.; NORRMANN, G.A. Interspecific hibryds between five *Paspalum* species. **Botanical Gazette**. Chicago, v. 151. n. 3. p. 366-369, 1990.

QUESENBERRY, K.H.; DAMPIER, J.M.; LEE, Y.Y.; SMITH, R.L.; ACUÑA, C.A. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. **Euphytica**, Wageningen, v.175, p.43-50, 2010.

QUESENBERRY, K.H.; SMITH, R. Production of sexual tetraploid bahiagrass using in vitro chromosome doubling agents. p. 145. *In* HOPKINS, A.; BARKER, R. (ed.) **Molecular Breeding of forage and turf**. Abstracts, Third International Symposium. Dallas, Texas, p.18-22, 2003

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. annual review of ecology evolution and systematic. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, Palo Alto, v.29, p.467-501, 1998.

REYNO, R.; NARANCIO, R.; SPERANZA, P.; DO CANTO, J.; LÓPEZ-CARRO, B.; HERNÁNDEZ, P.; BURGUEÑO, J.; REAL, D.; RIZZA, M.D. Molecular and cytogenetic characterization of a collection of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) native to Uruguay. **Genetic research and Crop Evolution**, Dordrech, v.59, p.1823-1832, 2012.

SILVA, P.A.K.X.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, p.105-111, 2000.

SIMIONI, C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Sexual polyploidization in red clover, **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.63, n.1, p.26-31, 2006.

SYBENGA, J. Manipulation of genome composition. B. Gene Dose: duplication, polyploidy and gametic chromosome number. *In*: Springer-Verlag (Eds.) **Cytogenetics and Plant Breeding**. Editora Springer-Verlag, Berlim, p.327-371 (469p.). 1992.

TAYLOR, N.L.; QUESENBERRY, K. H. **Red Clover Science**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1996. 226p.

## **5. CAPITULO VI**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONCLUSÕES GERAIS

Dos híbridos gerados e avaliados quanto à produção de massa seca, foram encontrados genótipos com uma grande amplitude para essa variável, com alguns destes apresentando produtividades superiores ao melhor genitor.

Não foi possível encontrar uma relação entre o grau de coloração ocasionado pelo acúmulo de antocianinas com o efeito de geada e nem com a retomada de crescimento pós-inverno. Assim como também não houve correlação entre hábito de crescimento e produção de massa seca. No entanto, houve correlação entre a tolerância ao frio e o rebrote após o inverno.

O genitor masculino ecótipo 'Bagual' e o genitor feminino 'Q4205' apresentam a melhor capacidade geral de combinação entre os pais avaliados.

A família "E" ('C44X' x 'André da Rocha') apresentou os menores valores de produção de massa seca na média, seguido da família "A" ('Q4188' x 'André da Rocha'), enquanto que as famílias "B" ('Q4188' x 'Bagual'), "C" ('Q4205' x 'André da Rocha'), "D" ('Q4205' x 'Bagual') e "F" ('C44X' x 'Bagual') apresentaram desempenho semelhante com produção superior às duas anteriores.

Através de análises citoembriológicas foi possível a determinação do modo de reprodução da maioria das plantas híbridas avaliadas.

A avaliação do modo de reprodução através de análises citoembriológicas e com uso de marcadores moleculares do tipo RAPD mostrou alguns resultados em desacordo.

A poliploidização em *P. notatum* foi efetiva e obteve-se três plantas tetraplóides, nominadas K3, alfa 63 e delta 92, utilizando o agente antimitótico colchicina.

As concentrações de 0,08% por 6h na plântula, 0,1% por 24h na semente e 0,15% por 24h na semente mostraram eficiência na duplicação do número cromossômico em *P. notatum*.

Foi possível duplicar plantas de *P. notatum* tanto com tratamento de sementes como com tratamento de plântulas, porém com doses e tempo maior de exposição à colchicina quando o tratamento foi nas sementes.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados coletados aqui deram suporte para a seleção dos melhores materiais da progênie híbrida intraespecífica avaliada, já que alguns destes destacaram-se por serem mais produtivos.

Os híbridos obtidos neste estudo serão avaliados quanto à produção de sementes, focando em produtividade, porcentagem de sementes viáveis e dormência. Estes híbridos também passarão por avaliações de produtividade de massa seca quando conduzidos em parcelas, avaliando seu comportamento em condições de competição.

Os melhores híbridos produzidos precisarão ser testados em diferentes ambientes, objetivando selecionar materiais adaptados as diferentes condições ambientais.

As plantas híbridas de reprodução apomítica selecionadas serão direcionadas para compor os ensaios de VCU (Valor de Cultivo e Uso), juntamente com os ensaios de Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE), que são uma exigência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) para registro e proteção.

As plantas híbridas de reprodução sexual que foram geradas no primeiro ciclo de cruzamentos poderão ser utilizadas para formar a segunda geração de híbridos, criando novos ciclos de melhoramento e seleção.

As plantas tetraploidizadas obtidas neste trabalho serão avaliadas quanto ao seu modo de reprodução e, caso confirmem o modo de reprodução sexual, serão utilizadas em cruzamentos futuros como genitores femininos, possibilitando assim o acesso a novas combinações gênicas.

A obtenção de novas combinações gênicas, em cruzamentos intraespecíficos, selecionando genótipos que atendam às demandas de aumento da produtividade pecuária e a conservação de características superiores na apomixia permite aumentar a produção forrageira. A grande vantagem é minimizar a utilização de materiais forrageiros exóticos já que estes, embora possam ter potencial produtivo, muitas vezes não são adaptados às condições edafoclimáticas locais e podem gerar competição e degradação dos campos sulinos como importantes ecossistemas brasileiros.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOWSKI, E. V. et al. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. **Genetics Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 4, p. 773-780, 2005.

ADAMS, K.; WENDEL, J. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 135–141, 2005.

ARAÚJO, A. C. G. et al. Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, Dordrecht, v. 144, p. 39-50, 2005.

ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 298 p.

BARRETO, I. L. **O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul**. 1974. 258 f. Dissertação (Livre Docência-Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1974.

BATISTA, L. A. R. Representatividade taxonômica e caracterização morfológica e agronômica dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum*. (Palestra e Workshop sobre plantas forrageiras). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Gramado. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA Trigo: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2005.

BENNETT, H.W.; BURSON, B.L.; BASHAW, E.C. Intraespecific hybridization in dallisgrass, *Paspalum dilatatum* Poir. **Crop Science**, Madison, v. 9, p. 807-809, 1969.

BICKNELL, R. A.; KULTONOW, A. M. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 228-245, 2004.

BIRCHLER, J. A. et al. Heterosis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 22, p. 2105–2112, 2010.

BLOUNT, A. R. et al. Photoperiod Response in Pensacola Bahiagrass. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, Rio de Janeiro. **Proceedings...** São Pedro, 2001. p. 487-488.



BURTON, G. W. A search for the origin of Pensacola bahiagrass. **Economy Botanic**, New York, v. 21, n. 2, p. 379-82, 1967.

BURTON, G. W. Artificial fog chamber facilitates *Paspalum* emasculation. **Journal America Society Agronomy**, Madison, v. 40, p. 281-282, 1948.

BURTON, G. W. Bahiagrass types. **Agronomy Journal**, Madison, v. 38, p. 273-281, 1946.

BURTON, G. W.; FORBES, I. Genetics and manipulation of obligate apomixis in common Bahia grass (*Paspalum notatum* Flügge). In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 8., 1960, Reading. **Proceedings...** Reading: International Grassland Society, 1960. p. 66-71.

CANTO-DOROW, T. S. **Revisão taxonômica das espécies sul-riograndenses de *Paspalum* I. (Grupo Notata) Poaceae – Panieae, com ênfase na análise da variação intra-específica de *Paspalum notatum* Flügge.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

CARNEIRO, V. T. de C.; DUSI, D. M. A. Apomixia. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, n. 25, p. 36-42, 2002.

CHASE, A. The North American species of *Paspalum*. **Contributions from the United States National Herbarium**, v. 28, p. 1-310, 1929.

CLARK, L. V.; JASIENIUK, M. Spontaneous hybrids between native and exotic *Rubus* in the Western United States produce offspring both by apomixis and by sexual recombination. **Journal Heredity**, Oxford, v. 109, n. 5, p. 320-328, 2012.

COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 836–846, 2005.

DAHMER, N. et al. Cytogenetic data for *Paspalum notatum* Flügge accessions. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 4, p. 381-388, 2008.

DALL'AGNOL, M.; GOMES, K. E. Avaliação inicial da matéria seca de espécies do gênero *Paspalum*. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO PASPALUM, 1987, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: IZ, 1987. p. 51-55.

DALL'AGNOL, M. et al. Perspectivas de lançamento de cultivares de espécies forrageiras nativas: o gênero *Paspalum*. In: SIMPÓSIO DE FORRAGEIRAS E PRODUÇÃO ANIMAL. ÊNFASE IMPORTÂNCIA E POTENCIAL PRODUTIVO DA PASTAGEM NATIVA, 1., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia UFRGS, 2006. p. 147-160.

DE WET, J. M. J. Origins of polyploids. In: LEWIS, W. H. (Ed.). **Polyploidy, biological relevance**. New York : Plenum Press, 1980. p. 3-16.

DICKINSON, T. A. Taxonomy of agamic complexes in plants: a role for metapopulation thinking. **Folia Geobotanica**, Praga, v. 33, p. 327–332, 1998.

FACHINETTO, J. M. **Caracterização agronômica, molecular, morfológica e determinação do nível de ploidia em uma coleção de acessos de *Paspalum notatum* Flüggé**. 2010. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development: theory and technique**. New York: Macmillan Publishing Company, 1987. 536 p.

FERREIRA, R. P.; PEREIRA, A. V. Melhoramento de forrageiras. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa : UFV, 1999. 817 p.

FERRER, M. E.; CLAUSEN, A. M. Variabilidad genetica en los recursos vegetales de importancia para la agricultura del Cono Sur. In: BERRETA, A. et al. (Org.) **Estrategia en recursos filogenéticos para los países del Cono Sur**. Montevideo: PROCISUR, 2001. p. 43-58.

FORBES, I.; BURTON, G. W. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intra-species hybrids of Bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. **Crop Science**, Madison, v. 1, p. 402-406, 1961b.

FORBES, I.; BURTON, G. W. Induction of tetraploid and rapid field method of detecting induced tetraploidy in Pensacola bahiagrass. **Crop Science**, Madison, v. 1, p. 383-384, 1961a.

GU, Z. et al. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. **Nature**, London, v. 421, p. 63–66, 2003.

HADDAD, C. M. et al. Características de produção e valor nutritivo do capim Pensacola (*Paspalum notatum* Flüggé var. *saurae* Parodi) em função da idade de corte. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 3, p. 753-761, 1999.

HADLEY, H. H.; OPENSHAW, S. J. Interspecific and intergeneric hybridization. In: FEHER, W. R., HADLEY, H. H. (Ed.). **Intererspecific 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**, Madison, v. 27, p. 1136-1139, 1987.

HORANDL, E. Species concepts in agamic complexes: Applications in the *Ranunculus auricomus* complex and general perspectives. **Folia Geobotanica**, Praga, v. 33, p. 335–348, 1998.

INTERRANTE, S. M. et al. Defoliation Management of Bahiagrass Germplasm Affects Cover and Persistence-Related Responses. **Agronomy Journal**, Madison, v. 101, n. 6, p. 1381-1387, 2009.

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

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Polyploidy in angiosperms. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 12, p. 470-476, 1997.

MABLE, B. K. Polyploids and hybrids in changing environments: winners or losers in the struggle for adaptation? **Journal Heredity**, Oxford, v. 110, p. 95–96, 2013.

MADLUNG, A. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. **Journal Heredity**, Oxford, v. 110, p. 99–104, 2013.

MARASCHIN, G. E. A planta forrageira no sistema de produção: grama batatais, forquilha e bahiagrass. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 17., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. 393 p.

MARTÍNEZ, E. J. et al. Inheritance of apospoy in bahiagrass, *Paspalum notatum*. **Hereditas**, Lund, v. 135, p. 19-25, 2001.

MARTÍNEZ, E. J. et al. Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. **Molecular Breeding**, Berlin, v. 12, p. 319-327, 2003.

MATZK, F. New efforts to overcome apomixis in *Poa pratensis* L. **Euphytica**, Dordrecht, v. 55, p. 65-72, 1991.

MENDES-BONATO, A. B. et al. **Caracterização citogenética de acessos de *Brachiaria brizantha* (Gramineae)**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 31 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 15).

MISLEVY, P. Forages for grazing systems in warm climates. In: McDOWELL, L. R. (Ed.). **Nutrition of grazing ruminants in warm climates**. Orlando: Ademic Press, 1985. Cap. 5, p. 73-102.

MORAES-FERNANDES, M. I. B.; BARRETO, I. L.; SALZANO, F. M. Cytogenetic, ecologic and morphologic studies in Brazilian forms of *Paspalum notatum*. **Can Canadian Journal Genetics Cytology**, Ottawa, v. 15, p. 523-531, 1973.

- NABINGER, C.; DALL'AGNOL, M. Principais gramíneas nativas do RS: características gerais, distribuição e potencial forrageiro. In: SIMPÓSIO DE FORRAGEIRAS E PRODUÇÃO ANIMAL, 3., 2008, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2008, p. 7-54.
- NOGLER, G. A. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. **Botanica Helvetica**, Zurich, v. 94, p. 411–422, 1984.
- OZIAS-AKINS, P.; VAN DIJK, P. J. Mendelian genetics of apomixis in plants. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 509-37, 2007.
- PAGLIARINI, M. S. et al. Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. **Hereditas**, Lund, v. 135, p. 27-34, 2001.
- PARODI, L. R. Gramineas del genero *Paspalum*. **Revista del Museo de la Plata**, Buenos Aires, v. 1, n. 4, p. 211-244, 1937.
- PILLAR, V. P. et al. **Campos sulinos – conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2009. 403 p.
- POZZOBON, M. T.; VALLS, J. M. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). **Brazilian Journal Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, p. 29-34, 1997.
- PRESTES, P. J. Q.; FREITAS, E. A. G.; BARRETO, I. L. Hábito vegetativo e variação estacional do valor nutritivo das principais gramíneas da pastagem do Rio Grande do Sul. **Anuário Técnico do Instituto de Pesquisas Zootécnicas “Francisco Osório”**, Porto Alegre, v. 3, p. 516-531, 1976.
- QUARÍN, C. L. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. **Apomixis Newsletter**, México, v. 5, p. 8-15, 1992.
- QUARÍN, C. L.; BURSON, B. L.; BURTON, G. W. Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 145, n. 3, p. 420-426, 1984.
- QUARÍN, C. L. et al. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction**, Norman, v. 13, p. 243-249, 2001.
- QUARÍN, C. L.; NORRMANN, G. A. Interspecific hybrids between five *Paspalum* species. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 151, n. 3, p. 366-369, 1990.
- QUARÍN, C. L.; NORRMANN, G. A.; URBANI, M. H. Polyploidization in aposporous *Paspalum*. **Apomixis Newsletter**, Ciudad de México, v. 1, p. 28-29. 1989.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. annual review of ecology evolution and systematic. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 467-501, 1998.

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, Berlin**, v. 23, p. 522-527, 2005.

RIVAS, M. Modo de reproducción y estructura genética de poblaciones de *Bromus auleticus* Trinius ex Nees (Poaceae) I. Biología reproductiva y variación fenotípica. In: LOS RECURSOS filogenéticos del género *Bromus* em el Cono Sur. Montevideo: PROCISUR, 2001. p. 51-58.

ROSENGURT, B.; MAFFEI, B. A.; ARTUCIO, P. I. **Gramíneas uruguayas**. Montevideo: Universidad de la Republica. Departamento de Publicaciones, 1970. 489 p.

SAVIDAN, Y. H. et al. Breeding *Panicum maximum* in Brazil. 1. Genetic resources, modes of reproduction and breeding procedures. **Euphytica**, Dordrecht, v. 41, p. 107-112, 1989.

SCHIFINO, M. T.; MORAES-FERNADES, M. I. B. Cytological comparison of diploid and autotetraploid *Trifolium riograndense* Burkart. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 4, p. 637-643, 1986.

SCHIFINO, M. T.; MORAES-FERNADES, M. I. B. Induction of polyploidy and cytological characterization of autotetraploids of *Trifolium riograndense* Burkart (Leguminosae). **Euphytica**, Dordrecht, v. 36, p. 863-872, 1987.

SEBRAE; SENAR; FARSUL. **Diagnóstico de sistemas de produção de bovinocultura de corte no estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: SENAR, 2005. 265 p. Relatório.

SILVA, P. A. K. X. M.; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 105-111, 2000.

SIMIONI, C.; VALLE, C. B. **Protocolos para assepsia de meristemas e cultura de tecidos para o gênero Brachiaria (Trin.) Griseb e melhor tratamento para duplicação de número cromossômico**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2007. p. 1-28. (Documento, 169).

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

SINCLAIR, T. R.; MISLEVY, P.; RAY, J. D. Short photoperiod inhibits winter growth of subtropical grasses. **Planta**, Heidelberg, v. 213, p. 488-491, 2001.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends in Ecology Evolution**, Amsterdam, v. 14, p. 348–352, 1999.

SOSTER, M. T. B. **Caracterização morfológica e citogenética de acessos de acessos de *Paspalum* coletados no sul do Brasil**. 2009. 95 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal d Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

STEINER, M. G. **Caracterização agrônômica, molecular e morfológica de acessos de *Paspalum notatum* Flüggé e *Paspalum guenoarum* Arech.** 2005. 138 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SYBENGA, J. Manipulation of genome composition. B. Gene Dose: duplication, polyploidy and gametic chromosome number. In: CYTOGENETICS and plant breeding. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 327-371.

TALIAFERRO, C. M.; BASHAW, E. C. Inheritance and control of obligate apomixis in breeding buffelgrass, *Pennisetum ciliare*. **Crop Science**, Madison, v. 6, p. 473-476, 1966.

VALLE, C. B. Recursos genéticos de forrageiras para áreas tropicais. In: CONFERÊNCIA VIRTUAL GLOBAL SOBRE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BOVINOS DE CORTE, 1., 2002. **Anais...** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. Via internet.

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

VALLE, C. B. et al. Melhoramento genético de *Brachiaria* In: MELHORAMENTO de forrageiras tropicais. Campo Grande: Embrapa, 2008. v. 1, p. 13-53.

VALLS, J. F. M. Melhoramento de plantas forrageiras nativas, com ênfase na situação do *Paspalum*. (Palestra e Workshop sobre plantas forrageiras). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Gramado. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA Trigo: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2005.

VALLS, J. F. M. Recursos genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE *PASPALUM*, 1987, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: IZ, 1987. p. 3-13.

VALLS, J. F. M.; POZZOBON, M. T. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE *PASPALUM*. São Paulo, Nova Odessa: **Anais...** Instituto de Zootecnia, 1987, p. 15-21.

ZULOAGA, F. O.; PENSIERO, J.; MORRONE, O. Systematics of *Paspalum* Groups *Notata* (Poaceae – panicoideae – Paniceae). **Systematic Botany Monographs**, Laramie, v. 71, p. 1-75, 2004.

## **9. VITA**

Roberto Luis Weiler, nasceu em 05 de julho de 1978 no município de Lajeado (RS), filho de Elaine Weiler e Lirio Weiler. Realizou seus estudos de ensino fundamental na Escola Estadual de Ensino Fundamental Helena Bohn no interior de Venâncio Aires e ensino médio na Escola Agrotécnica Federal Presidente Juscelino Kubitschek na cidade de Bento Gonçalves. Em 1998 ingressou na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde em abril de 2004, graduou-se Engenheiro Agrônomo. Durante o curso de graduação, desenvolveu atividades como estudante de iniciação científica na Faculdade de Agronomia/(UFRGS). Em 2004 iniciou o curso de Mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRGS na área de concentração Horticultura como bolsista CAPES. Em março de 2009 iniciou o curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS, área de concentração Plantas Forrageiras como bolsista do CNPq.