

Boletim de Pesquisa 173

e Desenvolvimento ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2007

**Avaliação da estrutura dos segmentos
basais de *Brachiaria brizantha* para
utilização na transformação genética via
biobalística**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 173

**Avaliação da estrutura dos segmentos
basais de *Brachiaria brizantha* para
utilização na transformação genética via
biobalística**

Ana Luiza Machado Lacerda
Vera Tavares de Campos Carneiro
Ana Cristina Menezes Mendes Gomes
Rosana Falcão
Diva Maria de Alencar Dusi
Gláucia Barbosa Cabral

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-
3624 <http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Lara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 946 Avaliação da estrutura dos segmentos basais de *Brachiaria brizantha* para utilização na transformação genética via biobalística / Ana Luiza Machado Lacerda ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

15 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 173).

1. *Brachiaria brizantha* - segmentos basais - cultivo in vitro - explantes - transformação genética. 2. *Brachiaria brizantha* - transformação genética - biobalística. I. Lacerda, Ana Luiza Machado. II. Série.

631.5233 - CDD 21.

Avaliação da estrutura dos segmentos basais de *Brachiaria brizantha* para utilização na transformação genética via biobalística

Ana Luiza Machado Lacerda¹
Vera Tavares de Campos Carneiro²
Ana Cristina Menezes Mendes Gomes¹
Rosana Falcão³
Diva Maria de Alencar Dusi⁴
Glauca Barbosa Cabral⁵

RESUMO

Brachiaria é um gênero de gramíneas de grande importância econômica, com algumas espécies amplamente utilizadas no Brasil como forrageiras, em uma área de aproximadamente 70 milhões de hectares. A grande demanda no uso de *Brachiaria* como pastagem é devida à sua fácil adaptação a solos ácidos e pobres, resistência à seca e a pragas, e à sua qualidade nutricional adequada para alimentação bovina. Uma das limitações do melhoramento de *Brachiaria* é a presença da apomixia, modo de reprodução onde há clonagem através de sementes. A transformação genética de plantas de *Brachiaria* amplia a possibilidade de introdução de características de interesse nas espécies cultivadas, como também o estudo da expressão dos genes que controlam a apomixia. O sistema de regeneração desenvolvido para transformação genética de *Brachiaria* spp. é baseado em embriogênese somática utilizando sementes maduras como explantes, o que é limitante para plantas de baixa produção de sementes, como é o caso do acesso sexual de *B. brizantha*. A transformação genética destas plantas é principalmente importante em estudos de expressão ou supressão dos genes envolvidos com o tipo de reprodução apomítica ou sexual. Neste trabalho foi analisada a viabilidade da utilização dos segmentos basais de plantas cultivadas in vitro como explantes para a transformação genética. A análise estrutural dos segmentos basais por microscopia de luz e eletrônica de varredura indicou que apesar da grande proliferação de gemas nesses explantes em meio de micropropagação, suas regiões meristemáticas são protegidas por folhas, sendo de difícil acesso à transformação genética tanto pelas micropartículas durante o bombardeamento como por *Agrobacterium* durante a co-cultura.

¹ Bióloga, MSc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Eng Agr, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Eng Agr, MSc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

ABSTRACT

Brachiaria is widely used as a forage grass for beef cattle in Brazil, being cultivated in about 70 million hectares. Its economic value is due to its adaptability to poor and acid soil, spittlebug and drought resistance as well as its high nutritional quality. One limiting factor in *Brachiaria* breeding is apomixis, an asexual reproduction through seeds. Genetic transformation of *Brachiaria* plants increases the possibilities to introduce interesting characteristics in plants crops and also could be a tool for gene expression studies that control apomixis. *Brachiaria* spp. genetic transformation system is based on somatic embryogenesis and uses mature seeds as original explants, which is limiting in low seed production accessions, such as the sexual one from *B. brizantha*. Sexual *B. brizantha* genetic transformation is important for gene expression or suppression studies related to the apomictic or sexual reproduction system. In the present work, the usability of basal segments from in vitro cultivated plants for genetic transformation was analyzed. Light and scanning electronic microscopy analysis of the basal segments showed that besides the high bud proliferation of these segments, their shoot meristems were well protected by leaves, being inaccessible either to biolistic DNA coated particles nor *Agrobacterium*.

INTRODUÇÃO

Brachiaria é um gênero de gramíneas proveniente da África que foi introduzido na América do Sul no século XVIII. Esse gênero apresenta cerca de 100 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais (RENVOIZE et al., 1996). Atualmente, algumas espécies de *Brachiaria* são largamente utilizadas no Brasil como forrageira tropical por sua ampla adaptação a diferentes condições edafo-climáticas, sendo cultivadas em uma área com extensão entre 30 e 70 milhões de hectares, sendo que 85% desse total são compostos de *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Marandu (MILES et al., 1996). A *B. brizantha* cv. Marandu, também conhecida como Braquiarião ou Brizantão, tornou-se a partir da década de 80, a forrageira mais plantada no Brasil (http://www.abrasem.com.br/materia_tecnica/2004/0008_parceria_embrapa_unipastos.htm). A grande demanda do uso de *Brachiaria* como pastagem é devida à sua fácil adaptação a solos ácidos e pobres, resistência à seca e a pragas, e à sua qualidade nutricional adequada para a alimentação bovina (LAPOINTE e MILES, 1992; KELLER-GREIN et al., 1996).

Em *Brachiaria* a apomixia é predominante, principalmente nas variedades comerciais (VALLE, 1991), como *B. brizantha*. A apomixia é observada em mais de 35 famílias de plantas, incluindo mais de 300 espécies de angiospermas (HANNA e BASHAW, 1987). Esse modo de reprodução é caracterizado pela formação de embrião autônomo sem a fertilização da oosfera não reduzida.

O programa de melhoramento de *Brachiaria* visa selecionar plantas ou obter híbridos que reúnam características desejáveis como adaptação a solos ácidos, alta produtividade, bom valor nutritivo e resistência à cigarrinha-das-pastagens (VALLE et al., 2004a). Uma das limitações destes programas é a diferença de ploidia entre plantas sexuais e apomíticas que não permite cruzamentos com obtenção de progênie (VALLE et al., 2004b; ARAÚJO et al., 2005).

Se por um lado a reprodução apomítica tem a desvantagem de não gerar variabilidade genética em plantas naturalmente apomíticas, por outro lado, o uso controlado da apomixia na agricultura permitirá fixar genótipos elite e híbridos de qualidade e propagá-los por sementes (CARNEIRO e DUSI, 2002). Essas sementes poderão ser produzidas por muitas gerações sem perder o vigor ou ter alteração de genótipo (KOLTUNOW et al., 1995). Isso seria importante para a redução dos custos de produção, principalmente para pequenos agricultores, uma vez que boa parte dos gastos iniciais da implantação de uma cultura refere-se à aquisição de sementes.

Para a obtenção de uma metodologia eficiente de transformação genética, é importante a escolha do explante adequado à regeneração, assim como à transformação. Na transformação, a natureza e estrutura do explante devem ser consideradas uma vez que o

DNA exógeno deve penetrar nas células, para posteriormente ser incorporado ao genoma, exercendo, portanto, grande influência na obtenção de plantas transgênicas. Análises por microscopia de luz e eletrônica de varredura podem ser utilizadas para determinar a estrutura do explante e sua adequação ao processo de transformação. Na otimização da transformação de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), por biobalística Aragão e Rech (1997) investigaram as características morfológicas dos eixos embrionários e a exposição dos meristemas apicais, por microscopia eletrônica de varredura. A avaliação, feita em 15 cultivares da variedade Carioca, revelou que, sete apresentavam o meristema apical dos eixos embrionários expostos, entre essas, duas cultivares mostraram maior aptidão à transformação.

Neste trabalho foi analisada a estrutura dos segmentos basais das plantas de *B. brizantha* cultivadas in vitro pela análise em microscopia de luz e eletrônica de varredura, visando avaliar a viabilidade de utilização destes segmentos como explantes para a transformação genética.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Plantas de *B. brizantha* cv. Marandu apomítica, acesso na Embrapa BRA 000591 – aqui identificado como B30, e do acesso sexual BRA 002747 – B105, foram introduzidas (CABRAL et al., 2003) e cultivadas in vitro em sala de cultura com temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, sob luz fluorescente ($10\text{-}15 \mu\text{mE}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo de 12 horas, de onde foram retirados os segmentos basais para análise estrutural.

Micropropagação

Plantas de *Brachiaria brizantha* cultivadas in vitro com tamanho entre 5 e 7 cm foram selecionadas como fonte de segmento basal, base estolonífera das monocotiledôneas. O segmento basal foi cortado transversalmente num segmento de 1 cm, tendo sido subdividido em 3 partes: corte basal, mediano e apical (Figura 1). Os cortes foram cultivados em meio LS para micropropagação (MS, caseína hidrolisada 100 mg/L, BAP 3 mg/L, ANA 1 mg/L, cinetina 3 mg/L, tiamina 100 mg/L, inositol 100 mg/L, sacarose 3%, ágar 0,7%). Desses, 5 cortes foram inoculados em cada frasco de vidro do tipo *baby food*, numa amostragem de 15 explantes para cada tipo de corte. As amostras foram mantidas em sala de cultura com temperatura de $27^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob luz fluorescente ($10\text{-}15 \mu\text{mE}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 12 horas.

Dois explantes de cada tratamento em diferentes dias de cultivo, dias 0 (explante antes da cultura em meio de micropropagação), 7 e 14, foram coletados em cada tipo de fixador adequado para microscopia de luz e para microscopia eletrônica de varredura.

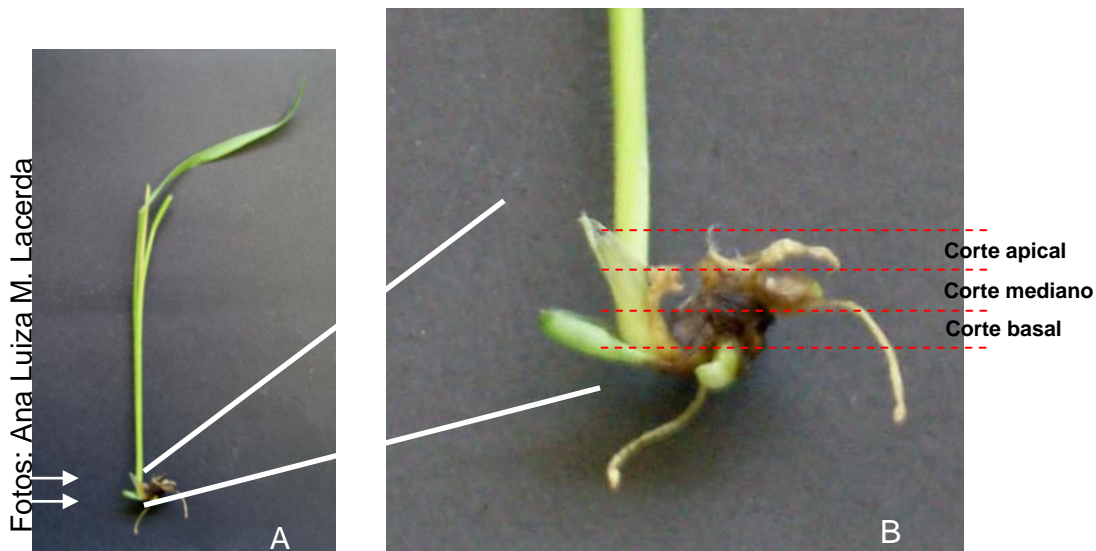


Figura 1 - A - Planta de *Brachiaria brizantha* cultivada in vitro. As setas indicam o segmento basal. **B** - Esquema dos cortes apical, mediano e basal feitos nos segmentos basais da plantas cultivadas in vitro.

Microscopia de Luz

Os explantes foram fixados em solução de FAA contendo formol 40%, ácido acético e álcool 70%, 1:1:18 v/v, e submetidos ao vácuo por 1 hora. Após esta etapa, o fixador foi renovado e os explantes ficaram por 48 horas a 4°C. O material foi desidratado em uma série crescente de etanol, 70% e 90% por 30 minutos, e de 100% por duas vezes de 30 minutos. Em seguida o etanol foi substituído por xilol puro, com três trocas de 30 minutos cada uma. Na última passagem pelo xilol, pastilhas à base de parafina no composto Paraplast® foram adicionadas aos poucos à solução em temperatura ambiente, até o ponto de saturação. Posteriormente, os tubos foram incubados a 65°C, e a partir desse ponto foi usada a parafina líquida para as demais trocas. Três vezes ao dia, metade do volume da solução xilol/paraplast foi retirada e o volume completado com parafina líquida. No segundo dia o tubo ficou aberto para que o restante de xilol evaporasse ficando só a parafina. Foram feitas mais duas trocas de parafina. As amostras foram preparadas em formas de alumínio em placa aquecedora a 55°C, e colocadas para polimerizar em temperatura ambiente por 24 horas. Para desemblocar o material, as formas foram colocadas a -20° C por 5 minutos. O material foi montado em blocos de madeira onde permaneceu por 24 horas para fixação da parafina nos mesmos.

Preparo das lâminas

As lâminas de vidro para microscopia foram tratadas em solução de TESPA (3-trietaxilano – aminopropil) 2% em etanol. O material emblocado foi cortado em micrótomo rotativo manual Leits 1512 na espessura de 8 µm. Os cortes incluídos em parafina foram esticados nas

lâminas sobre uma fina camada de água em banho-maria a 42°C. As lâminas depois de secas foram guardadas a 4°C até serem deparafinadas.

As lâminas com os cortes foram tratadas com xilol em três trocas por 35 minutos para remoção da parafina e depois colocadas em solução de xilol: etanol (1:1) por 15 minutos, seguido de uma série decrescente de etanol, 100%, 90% e 70%, por dez minutos cada, e 50% e 30% por 5 minutos. Após a hidratação, os cortes foram passados rapidamente em água destilada. A coloração foi feita com safranina 1% (aquosa) por 40 minutos, seguida de lavagem rápida com água para tirar o excesso de corante. Foi feita a desidratação com passagens rápidas em séries crescentes de etanol 30%, 50%, 70%, 95%, para a coloração com fast green 1% (alcoólico 95%) por 1 minuto. O material foi passado rapidamente por etanol 95% e 100%, depois em solução de xilol:etanol (1:1) e apenas xilol. Depois de secas sob fluxo de capela de exaustão, as lâminas foram montadas com Permount[®]. A visualização dos cortes foi feita em Microscópio Zeiss – Axiophot.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Os explantes dos segmentos basais foram fixados em paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 6,8 e colocados sob vácuo por uma hora. Após a fixação, o material foi lavado com tampão cacodilato 0,05 M pH 7.2 - dez minutos, duas vezes; - pós fixado em tetróxido de ósmio 2% por duas horas no escuro; e lavado com água bidestilada por dez minutos, duas vezes. O material foi desidratado em série crescente de etanol, por 20 minutos cada: 10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, sendo por duas vezes em etanol 90% e 100%.

Após a desidratação foi feita a secagem ao ponto crítico (K 851 Emitech) e montagem nos discos metálicos - porta espécime – com o uso de fita de carbono, seguida da metalização em ouro (K 550 Emitech) e da observação no microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 962.

RESULTADOS

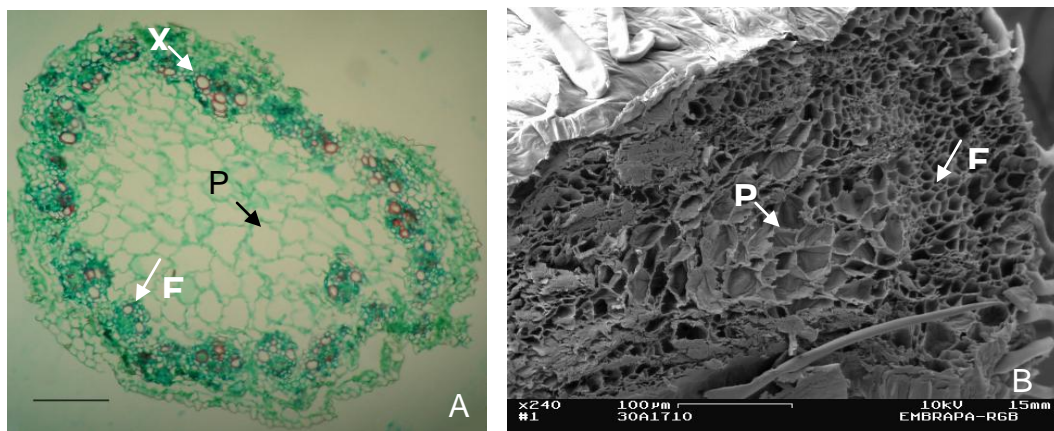
Estrutura dos segmentos basais de plantas cultivadas in vitro

Em secções dos cortes apicais dos segmentos basais das plantas in vitro (Figura 1) analisadas em microscópio Zeiss – Axiophot, foi observada a estrutura do colmo com predominância de feixes vasculares, mais externamente xilema e floema e internamente células do parênquima (Figura 2). Como apresentado na tabela 1, tanto na planta sexual quanto na apomítica, nos cortes apicais, não foi observada a presença de gema ou primórdio no dia zero ou com 14 dias em meio de micropropagação. Os cortes basais e medianos antes da cultura (dia zero) apresentaram gema e primórdio, indicando a existência de meristemas adventícios pré-formados (Figura 3A e B). Nos cortes basais e medianos em cultura por sete e 14 dias foram

observadas mais gemas do que primórdios, indicando a quebra da dominância apical resultando no crescimento de gemas adventícias (Tabela 1, Figura 3C e D).

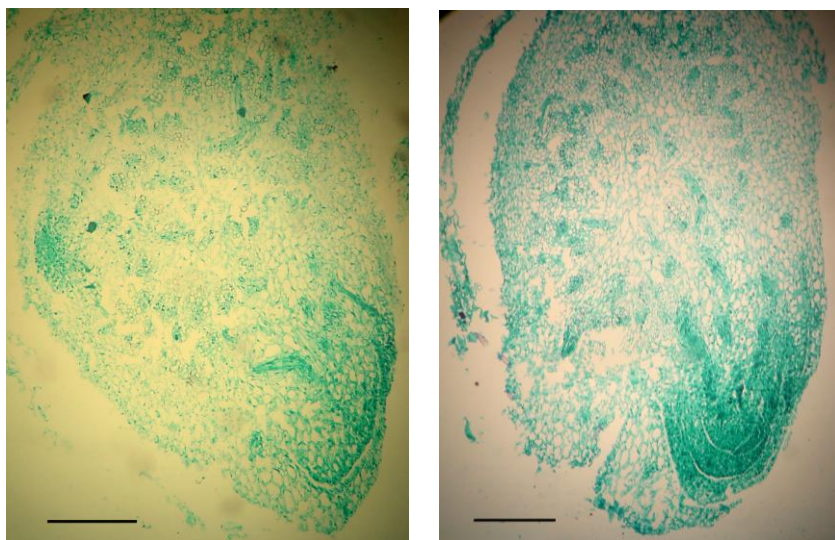
Pode-se observar na tabela 1 que a planta apomítica responde mais rapidamente à presença de citocininas do que a planta sexual, pois em sete dias de cultivo ocorreu maior número de gemas e primórdios, enquanto na planta sexual apenas com 14 dias foi observado o maior número de gemas e primórdios.

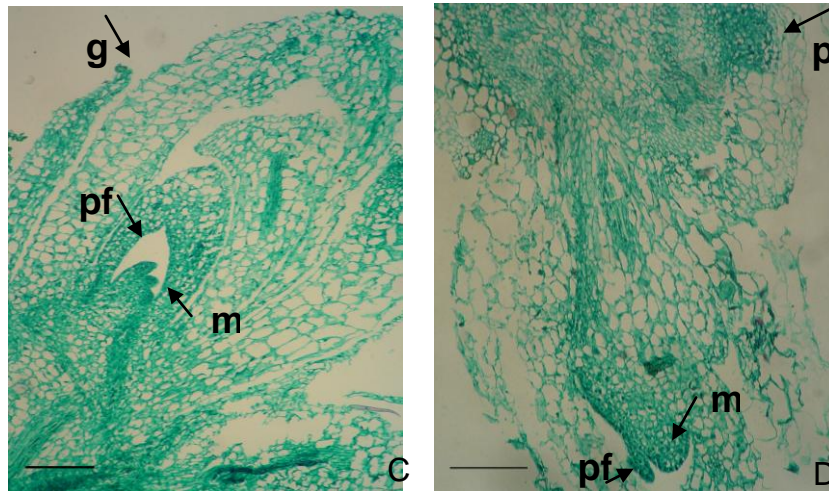
Em microscopia de luz e eletrônica de varredura foi visualizado que os meristemas apicais das gemas da base estolonífera das plantas cultivadas in vitro não são expostos, sendo bastante protegidos por folhas (Figuras 3 e 4).



Fotos: Ana Luiza M. Lacerda

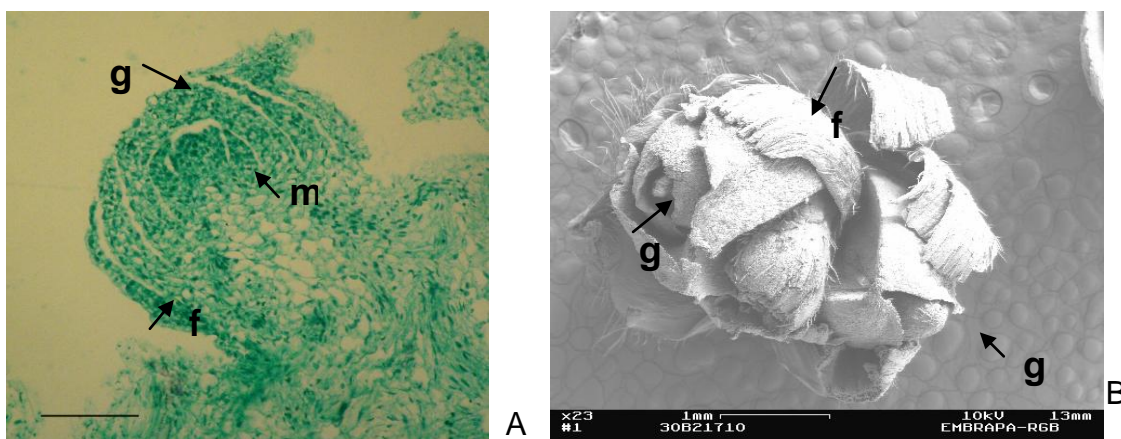
Figura 2 - Corte apical dos segmentos basais de *B. brizantha* cv. Marandu (B 30) e sexual (BRA 002747 – B 105) de plantas cultivadas in vitro e inoculados em meio de micropropagação. **A** - Secção transversal do corte apical de B 105 após 14 dias de cultura. barra \approx 300 μ m. **B** – Micrografia eletrônica de varredura de corte apical de B 30 com vista transversal após 11 dias de cultura. Barra = 100 μ m. F: floema, P: parênquima, X: xilema.





Fotos: Ana Luiza M. Lacerda

Figura 3 - Corte basal dos segmentos basais de *B. brizantha* cv. Marandu (B 30) de plantas cultivadas in vitro e inoculados em meio de micropropagação. Visualização em microscopia de luz. **A** - Secção transversal mais interna do corte basal de B 30 no dia zero de cultura evidenciando a presença de primórdio e gema. barra \approx 600 μ m. **B** - Secção transversal mais externa do corte basal de B 30, mostrado na figura A, no dia zero de cultura evidenciando a presença de gema adventícia pré-formada, com vários primórdios foliares protegendo o meristema. barra \approx 600 μ m. **C** - Secção longitudinal do corte basal de B 30 com sete dias de cultura mostrando o crescimento de gema adventícia. barra \approx 520 μ m. **D** - Secção longitudinal do corte basal de B 30 após 14 dias de cultura mostrando um primórdio de gema e uma gema em brotação com meristema bem evidente. barra \approx 520 μ m. pr: primórdio de gema, g: gema, m: meristema, pf: primórdio foliar.



Fotos: Ana Luiza M. Lacerda

Figura 4 – Corte basal dos segmentos basais de plantas cultivadas in vitro de *B. brizantha* cv. Marandu (B 30) inoculados em meio de micropropagação mostrando gemas protegidas por folhas. **A** - Secção longitudinal do corte basal de B 30 com um dia de cultura, mostrando a presença de gemas por microscopia de luz. barra \approx 260 μ m. **B** - micrografia eletrônica de varredura de corte basal de B 30 com dez dias de cultura, mostrando duas gemas em brotação. barra = 1 mm. g: gema, f: folhas, m: meristema.
Créditos fotos: Ana Luiza M. Lacerda

Tabela 1: Descrição das secções dos cortes apical, mediano e basal de segmentos basais de plantas cultivadas in vitro de *B. brizantha* mostrando o número de primórdios de gemas e gemas encontrados. APO: plantas apomíticas, SEX: acesso sexual

EXPLANTES	PRIMÓRDIO	GEMA
APO Odia basal 1 transversal	1	1
APO Odia basal 2 longitudinal	----	1
APO Odia mediano1 transversal	1	----
APO Odia mediano 2 longitudinal	----	----
APO Odia apical 2 transversal	Presença de feixes vasculares, sem primórdios ou gemas	
Total	2	2
APO 7dias basais 1 longitudinal	1	4
APO 7dias basais 2 transversal	----	3
APO 7dias mediano 1 longitudinal	----	3
APO 7dias mediano 2 transversal	----	----
APO 7dias apical 1 transversal	----	----
APO 7dias apical 2 longitudinal	----	----
Total	1	10
APO 14dias basal 1 longitudinal	1	1
APO 14dias mediano 1 transversal	----	1
APO 14dias mediano 2 transversal	1	1
APO 14dias apical 1 longitudinal	----	----
Total	2	3
SEX Odia basal 1 transversal	----	1
SEX Odia basal 2 transversal	1	----
SEX Odia mediano 2 transversal	Presença de folhas, sem primórdios ou gemas	
SEX Odia apical 1 transversal	Presença de folhas, sem primórdios ou gemas	
SEX Odia apical 2 longitudinal	----	----
Total	1	1
SEX 7dias basais 1 transversal	1	2
SEX 7dias basal 2 longitudinal	1	1
SEX 7dias mediano 1 transversal	1	1
SEX 7dias mediano1 transversal	----	----
SEX 7dias apical 1 transversal	----	----
SEX 7dias apical 2 longitudinal	----	----
Total	3	4
SEX 14dias basal 1 transversal	----	2
SEX 14dias basal 2 longitudinal	----	3
SEX 14dias mediano1 longitudinal	1	2
SEX 14dias apical 1 transversal	Presença de feixes vasculares, sem primórdios ou gemas	
Total	1	7

DISCUSSÃO

O sistema que tem sido desenvolvido e utilizado para transformação genética de *Brachiaria* spp. é baseado em embriogênese somática a partir de sementes maduras (MANZANO, 1998; LENTINI et al., 1999; SILVEIRA et al.; 2003). O uso de sementes maduras como explante inicial limita os trabalhos com as plantas de baixa produção de sementes, como no caso do acesso sexual de *B. brizantha* (BRA 002747). A transformação genética do acesso sexual é importante para estudos de expressão ou repressão dos genes envolvidos com a reprodução. Assim, existe a necessidade de buscar explantes alternativos, que viabilizem a transformação genética destas plantas. Por isto, foi analisada a viabilidade de utilização dos segmentos basais das plantas in vitro. Estes explantes além de viabilizar a pesquisa com acessos de baixa produção de sementes têm a vantagem de ser disponíveis ao longo do ano. Segmentos basais de *B. brizantha* foram anteriormente usados com sucesso em experimentos de duplicação cromossômica na presença de colchicina em *B. brizantha* diplóide sexual, BRA 002747 e BRA 003417 (PINHEIRO et al., 2000) e de micropropagação (CABRAL et al., 2003). Os meristemas das gemas, presentes em grande número nesses segmentos basais em meio de micropropagação, pareciam ser um alvo adequado para a transformação. No entanto, as análises da estrutura desses explantes apresentadas neste trabalho, indicaram restrições físicas pelo acesso restrito aos meristemas apicais das gemas. Suas regiões meristemáticas encontram-se envolvidas por muitas folhas, limitando o acesso às partículas durante o bombardeamento, ou à *Agrobacterium* durante a co-cultura. Sendo a exposição dos meristemas em explantes da base estolonífera das plantas um fator limitante para o processo de transformação genética, esta fonte de explante para os acessos estudados de *Brachiaria brizantha* não é adequada ao desenvolvimento de metodologias para a transformação. Outras alternativas para trabalhos de regeneração e transformação genética com o acesso sexual devem ser desenvolvidas. O uso de folhas jovens para cultura de calos, vem sendo feito em milho com resultados positivos (AHMADABADI et al., 2007) está sendo testado para braquiária.

REFERÊNCIAS

- AHMADABADI, M.; RUF, S.; BOCK, R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). **Transgenic Research**. Dordrecht, v. 16, n. 4, p. 437-448, 2007.
- ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of a Carioca cultivar. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 158, n. 2, p. 157-163, 1997.
- ARAÚJO, A. C. G.; NOBREGA, J. M.; POZZOBON, M. T.; CARNEIRO, V. T. C. Evidence of sexuality in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) artificial tetraploid plants and progeny. **Euphytica**, Wageningen, NL, v. 144, n. 1-2, p. 39-50, 2005.
- CABRAL, G. B.; PIRES, M. V. V.; LACERDA, A. L.; CARNEIRO, V. T. de C. **Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de Brachiaria sp.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 101).

CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. Apomixia: em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 25, mar./abr., p. 36-42, 2002.

DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica**, Krakow, v. 41, p. 151-162, 1999.

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

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p.258. (CIAT. Publication, 259).

KOLTUNOW, A. M.; BICKNELL, R. A.; CHAUDHURY, A. M. Apomixis: molecular strategies for the Generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 108, p. 1345-1352, 1995.

LAPOINTE, S. L.; MILES, J. W. Germplasm case study: *Brachiaria* species. In: CIAT. **Pastures for the tropical lowlands**. Cali, 1992. p. 43-55.

LENTINI, Z.; CARNEIRO, V. T. C.; MANZANO, S. J. L.; GALINDO, L. **Processo de regeneração de plantas e transformação genética de espécies de Brachiaria**. Cali: CIAT; Brasília, DF: Embrapa, [1999]. PI 9903700-9 1999.

MANZANO, S. J. L. **Desenvolvimento de um método de transformação genética de *Brachiaria* spp, por bombardeamento de partículas**. 1998. 131 p. Mestrado (Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1996. v. 1, 258 p. (CIAT. Publication, 259).

PINHEIRO, A. A.; POZZOBON, M. T.; VALLE, C. B.; PENTEADO, M. I. O.; CARNEIRO, V. T. C. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants, using colchicine. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 3, p. 274-278, 2000.

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1996. (CIAT. Publication, 259).

SILVEIRA, E. D.; RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; LEITE, J. A.; COSTA, S. S.; CARNEIRO, V. T. C. Evaluation of exogenous promoters for use in *Brachiaria brizantha* transformation. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2003.

VALLE, C. B. D. Avaliação de germoplasma e melhoramento genético de braquiárias. In: ENCONTRO PARA DISCUSSAO SOBRE CAPINS DO GÊNERO BRACHIARIA, 2., 1991, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1991. p. 301-342

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

VALLE, C. B. D.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; CANÇADO, L. J. O papel da biotecnologia de forrageiras para a produção animal. In: REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande, MS. **A produção animal e a segurança alimentar: anais**. Campo Grande: SBZ: Embrapa Gado de Corte, 2004b.