

Otimização de Protocolo para Análise de AFLP em *Lolium multiflorum* Lam.

Adriana Pires Bresolin_Soares¹
Caroline Marques Castro²
Antonio Costa de Oliveira³
Andréa Mittelman⁴
Denilson Anthonisen⁵
Graziela Da Silva Nolasco⁶
Vanessa Neumann Silva⁷

Introdução

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma planta rústica, vigorosa, de excelente estabelecimento, que perfilha em abundância e possui ressemeadura natural, sendo, uma das poaceas de maior importância no ramo pecuário do Sul do Brasil (PUPO, 1979). Produz alimento com elevado teor de proteína, de fácil digestão e bastante palatável aos ruminantes (FONTANELI, 1991). No Sul do País, o azevém encontra-se naturalizado, devido à grande capacidade de ressemeadura natural da espécie, que após uma intensa seleção natural, conquistou a condição de espécie espontânea, com enorme adaptação e disseminação (MITTELMANN, 2005).

Devido à grande importância desta forrageira no Brasil, no ano de 1999 iniciaram-se na Embrapa Clima Temperado atividades voltadas ao melhoramento do azevém anual, através da

realização de coletas de germoplasma. As coletas deram origem a experimentos pioneiros, que detectaram a existência de variabilidade genética entre as distintas populações (DIAS et al., 2001; CASTRO et al., 2003; VARGAS et al., 2006; VIEIRA et al., 2004). Em 2003, foi criado o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Azevém e o Programa de Melhoramento de Azevém, através de uma parceria entre Embrapa Gado de Leite, Embrapa Clima Temperado e Embrapa Pecuária Sul (MITTELMANN, 2005).

No entanto, a simples coleta e a conservação do germoplasma, sem as informações sobre suas características, torna os bancos de germoplasma simples depósitos de materiais (ABADIE; BERRETA, 2001). Os recursos genéticos vegetais desacompanhados de sua caracterização são de pouca utilidade (FAO, 1998). Em um programa de melhoramento, é de fundamental importância que se conheçam

¹ Eng. Agrôn., mestrandia da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL (spadri@pop.com.br)

² Dr^a, Eng. Agrôn., Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS (caroline@cpact.embrapa.br)

³ PhD., Eng. Agrôn. Prof. da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL (acostol@terra.com.br)

⁴ Dr^a, Eng. Agrôn., Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil (andream@cpact.embrapa.br)

⁵ Bacharel em química, analista da Embrapa Clima Temperado, CPACT, Pelotas, RS (denilson@cpact.embrapa.br)

⁶ Estagiária da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS (grazielanolasco@hotmail.com)

⁷ Graduanda do Curso de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, (vnpele@yahoo.com.br)

as populações de trabalho, tanto em termos da variabilidade presente nas constituições genéticas, como em termos de qualidade destes materiais (ALLARD, 1999). Segundo Auler et al. (2002), o conhecimento do nível de diversidade e da estrutura genética das populações é crucial para a definição das estratégias de melhoramento e conservação a serem empregadas.

A estrutura genética das populações de azevém é similar a de outros organismos de fecundação cruzada, em que cada indivíduo é altamente heterozigoto e apresenta uma grande variabilidade potencial (DALL'AGNOL et al., 1989). Para Breese e Hayward (1972), a detecção de grande variabilidade dentro das populações, com ampla diversidade e adaptação natural, como é o caso de populações de azevém, fornece ferramentas de grande valor aos melhoristas.

O uso de marcadores moleculares no manejo de bancos de germoplasma tem sido cada vez mais expressivo, fato que se deve ao rápido desenvolvimento de um grande número de técnicas para analisar a variação genética (SCHLÖTTERER, 2004). Nenhum tipo de marcador é superior a todos os demais para um grande número de aplicações. O tipo de marcador molecular mais apropriado para um determinado estudo vai depender de uma série de fatores como: o grau de polimorfismo pressuposto; a disponibilidade de reagentes e equipamentos para uso; pessoal qualificado e limitações de recursos financeiros e de tempo para execução (SPOONER et al., 2005).

Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares, o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados), técnica que foi desenvolvida por Vos et al. (1995), apresenta algumas vantagens para uso na caracterização de recursos genéticos, como a detecção de grande número de bandas informativas por reação, com ampla cobertura do genoma e considerável reprodutibilidade e principalmente por não necessitar de dados de seqüenciamento prévio da espécie para a construção de primers (SPOONER et al., 2005; VUYLSTEKE et al., 2007).

O AFLP é uma técnica na qual fragmentos de DNA, entre 80 e 500pb, são obtidos a partir

digestão do DNA com enzimas de restrição, normalmente uma de corte raro e uma de corte freqüente. Os fragmentos digeridos são ligados a adaptadores de oligonucleotídeos específicos, os quais se anelarão com primers pré-seletivos, cuja seqüência é complementar a dos adaptadores, acrescido de um nucleotídeo arbitrário na sua extremidade 3'. Os fragmentos pré-amplificados são então submetidos às reações de amplificação seletiva, utilizando primers com a mesma seqüência dos primers pré-seletivos acrescida de dois nucleotídeos arbitrários na sua extremidade 3'. As amplificações ocorrem via PCR (Polymerase Chain Reaction - reação em cadeia da polimerase). Os fragmentos amplificados (em torno de 50-100 fragmentos por reação) são, então, separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (VOS et al., 1995).

Embora a análise de AFLP seja freqüentemente utilizada em estudos de variabilidade genética em espécies alógamas como *Lolium perenne* (ROLDÁN-RUIZ et al., 2001; GUTHRIDGE et al., 2001), *Trifolium repens* (KÖLLIKER et al., 2001), *Daucus carota* (BRADEEN et al., 2002) e *Trifolium pratense* (HERMANN et al., 2005). A utilização da técnica em *Lolium multiflorum* ainda é incipiente (ROLDÁN-RUIZ et al., 2000).

Com a finalidade de estabelecer um protocolo para o emprego da técnica de AFLP, visando explorar a diversidade genética de populações de azevém, foi conduzido este trabalho.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado - Pelotas, RS – Brasil.

Amostras de DNA

O material biológico consistiu de duas populações de azevém do banco ativo de germoplasma da Embrapa Clima Temperado, CNPGL 136, coletado em Pelotas, RS e CNPGL Coqueiros do Sul, RS. Foi extraído o DNA de 30 indivíduos de cada população, a partir de 0,4 g de tecido vegetal jovem e utilizando o tampão CTAB, conforme descrita por Saghai-Marroof (1984) com

pequenas modificações, adaptando o protocolo à quantidade menor de tecido, permitindo a obtenção de um volume de DNA suficiente para a aplicação da técnica. O precipitado DNA/RNA foi ressuscitado em tampão Tris-EDTA, pH 8,0 e quantificado em

gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (Figuras A e B). Através da intensidade da banda, foi estimada a quantidade de DNA em ng/ml, por comparação visual com o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

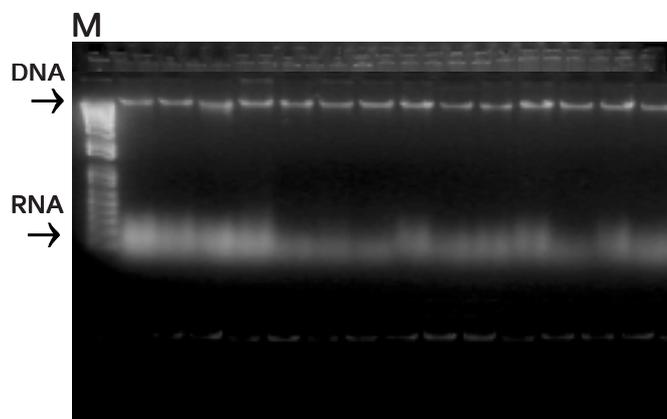


Figura A. População CNPGL 136 (amostras de DNA), **M** = marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder.

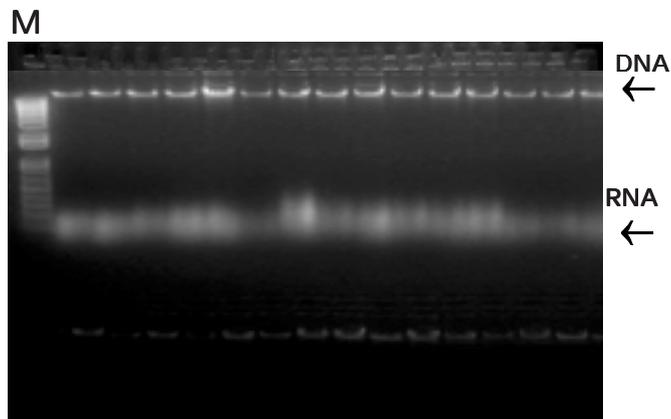


Figura B. População CNPGL 188 (amostras de DNA), **M** = marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder.

Análise de AFLP

Após testes iniciais, seguindo protocolo descrito por Vos et al. (1995), utilizando o Kit *AFLP^o Analysis System I* (Invitrogen), os resultados das ampliações não se mostraram satisfatórios, não apresentando quantidade de fragmentos condizentes com a capacidade de detecção oferecida pela técnica, nem tampouco com a qualidade de visualização esperada, portanto, ajustes tiveram que ser feitos na metodologia original.

Etapas da análise de AFLP

i) Digestão: Foram realizadas seis distintas reações de digestão, onde foram alterados o tempo de digestão, a quantidade de DNA e de enzimas de digestão e os volumes de reação, conforme descrito na Tabela 1. Os reagentes utilizados em cada reação de digestão foram: DNA genômico, Enzimas *EcoRI* e *MseI* (Invitrogen); Tampão 5x [Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM, Acetato Mg 10 mM, Acetato K 50 mM] e H₂O MilliQ^o suficiente para completar o volume final de reação.

Tabela 1. Reações de digestão do DNA genômico, testadas em azevém.

Digestão	Tempo	T °C	DNA	Tampão 5X	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>	Volume Final
1	3h	37° C	250 (ng)	5 µl	1,25 U	1,25 U	25 µl
2	6h	37° C	250 (ng)	5 µl	1,25 U	1,25 U	25 µl
3	12h	37° C	250 (ng)	5 µl	1,25 U	1,25 U	25 µl
4	3h	37° C	100 (ng)	2 µl	1 U	1 U	10 µl
5	6h	37° C	100 (ng)	2 µl	1 U	1 U	10 µl
6	12h	37° C	100 (ng)	2 µl	1 U	1 U	10 µl

Tempo = total de horas de digestão; **T °C** = temperatura indicada para ativar a enzima; **DNA** = concentração de DNA utilizada em cada reação; **Tampão (5X)** = concentração de tampão em cada reação; **Volume Final** = volume final de cada reação; ***EcoRI*** = unidades da enzima *EcoRI* em cada reação e ***MseI*** = unidades da enzima *MseI* utilizada em cada reação.

ii) Ligação de adaptadores: A reação de ligação de adaptadores foi realizada no mesmo tubo onde previamente ocorreu a digestão, sendo adicionado, na relação 1:1 v/v com os produtos da digestão, solução de ligação de adaptadores do Kit *AFLP^o Analysis System I* (Invitrogen) e 0,4 U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). O material foi incubado por 2h a 20°C.

iii) Pré-amplificação: Foram testadas quatro distintas concentrações da solução resultante da ligação dos adaptadores: solução sem diluição; diluída 1:5; 1:10 e 1:20 em H₂O MilliQ^o. As reações de PCR foram desenvolvidas em um volume final de 11 µL, sendo composta por 1,0 µL da solução resultante da ligação dos adaptadores, 8 µL da solução pre-amp primer mix do Kit *AFLP^o Analysis System I* (Invitrogen), 1X PCR buffer [Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM], BSA 0,03 %, 1,8 mM de MgCl₂ e 1 U de *Taq* DNA polymerase. O programa de PCR utilizado foi o sugerido por Vos et al. (1995). O produto da reação de pré-amplificação foi diluído nas seguintes proporções: 1:25 e 1:50 em H₂O MilliQ^o para serem submetidos à amplificação seletiva.

iv) Amplificação seletiva: A amplificação seletiva foi realizada em um volume final de 10 µL sendo composta por: 2,5 ml da solução de DNA pré-amplificado, diluída 1:25 e 1:50; 1X PCR buffer [Tris-HCl (pH 8,4) 20 mM, KCl 50 mM], BSA (0,03%), 1U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 2,25 µL do *primer* M-CAG e 0,09 µL do *primer* E-ACA do Kit *AFLP^o Analysis System I* (Invitrogen).

O programa utilizado para o PCR foi o recomendado por Vos et al. (1995). Todas as etapas das reações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ao produto da amplificação final (10 ml) foram adicionados 4 ml da solução tampão de carregamento (formamida deionizada 99%, EDTA 10 mM, 0,025% de xileno-ciano e 0,025% de azul de bromofenol) e procedida a desnaturação das amostras a 94°C por 5min. Foram aplicados 4,0 µl desta solução em gel de seqüenciamento (poliacrilamida 6% p/v, uréia 7 M). Os fragmentos foram separados em gel de acrilamida a 6% em uma corrida a 60 w durante 2:30h. Os fragmentos amplificados foram visualizados após coloração do gel com nitrato de prata, seguindo protocolo descrito por Creste et al. (2001). O tamanho dos alelos foi estimado em comparação visual com o marcador de peso molecular de DNA de 100 pb (InvitroGen Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA).

Embora os resultados obtidos a partir da digestão de 100 ng de DNA por 12h a 37°C e com as diluições de 1:5 após a ligação de adaptadores e 1:25 após a pré-amplificação tenham sido satisfatórios, os perfis genotípicos resultantes, detectados a partir da coloração com nitrato de prata, ainda mostravam algumas amplificações um pouco fracas (Figura C – 6A). Por esse motivo, foi testada uma amplificação seletiva, na qual foi aumentada a concentração do *primer EcoRI* na reação de 0,25 ng/µL, para 10 ng/µL. A concentração do *primer MSel* permaneceu 1,5 ng/µL.

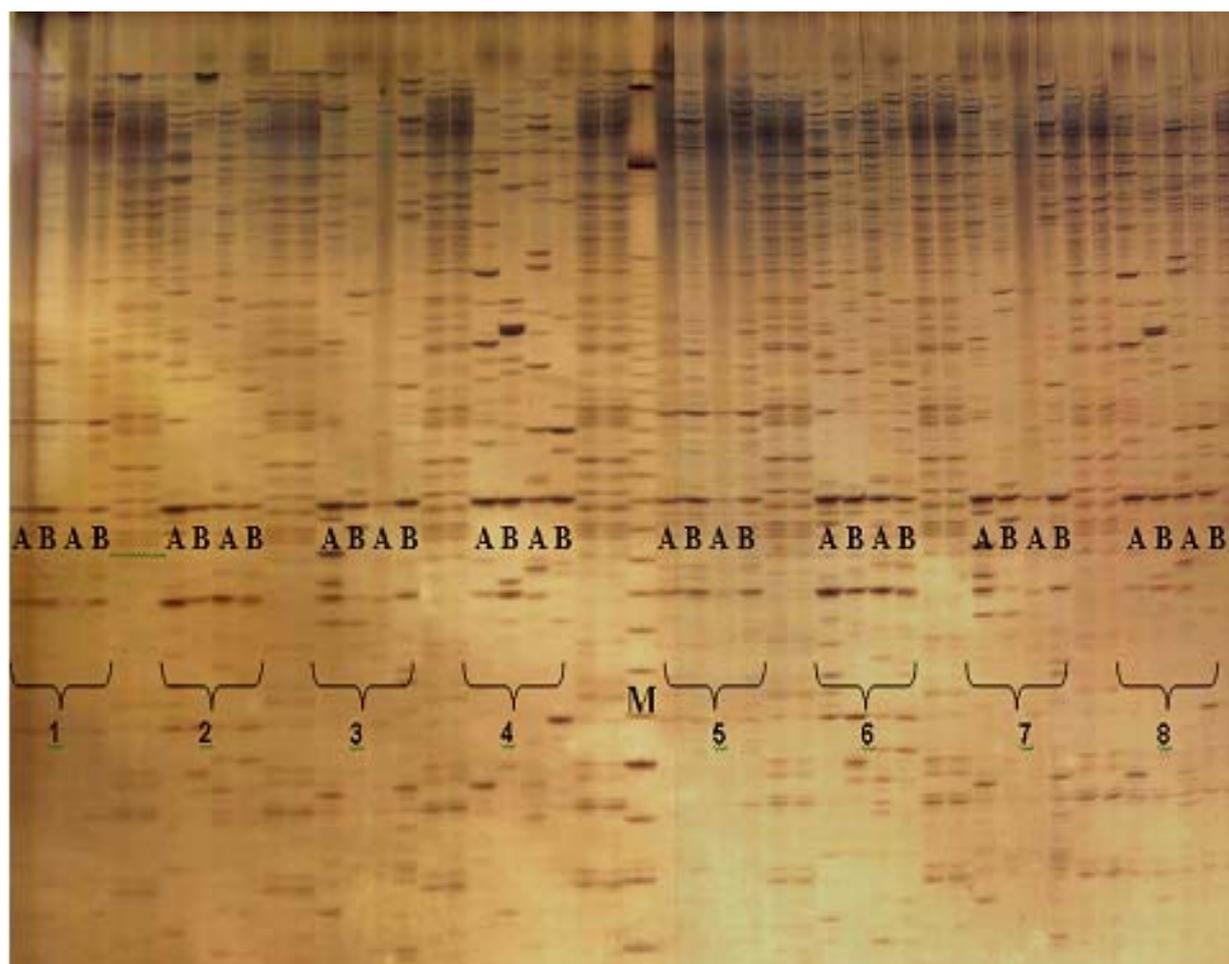


Figura C. Resultado da amplificação seletiva. Gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata. A: 250 ng DNA; B: 100 ng DNA; 1: adapters sem sofrer diluição e diluição 1:50 após a pré-amplificação; 2: adapters com diluição de 1:5 e diluição 1:50 após a pré-amplificação; 3: adapters com diluição de 1:10 e diluição 1:50 após a pré-amplificação; 4: adapters com diluição de 1:20 e diluição 1:50 após a pré-amplificação; M: marcador 10 bp DNA Ladder (Cat.no. 10821-015) - Invitrogen; 5: adapters sem diluição e diluição 1:25 após pré-amplificação; 6: adapters com diluição de 1:5 e diluição 1:25 após pré-amplificação; 7: adapters com diluição de 1:10 e diluição 1:25 após pré-amplificação; 8: adapters com diluição de 1:20 e diluição 1:25 após pré-amplificação.

Resultados e Discussão

A reação de digestão do DNA genômico que proporcionou a melhor qualidade de amplificação dos fragmentos foi a digestão 6 (Tabela 1), na qual foi utilizada a concentração inicial de DNA genômico de 100 ng, num volume final de reação de digestão 10 ml, com 1U de cada enzima *EcoRI* e *MseI* e tempo de reação de 12h a 37°C.

Das diluições testadas após a ligação dos adaptadores e após a pré-amplificação, foram melhor sucedidas respectivamente as diluições de 1:5 e 1:25 (Figura C-6A).

Na amplificação seletiva que teve a concentração do *primer EcoRI* aumentada,

foram evidenciados melhores resultados em termos de qualidade no padrão de bandas amplificadas, permitindo aos marcadores AFLP demonstrarem um alto poder de detecção de polimorfismo (Figura D e E). Uma única combinação de *primers* (M-CAG / E-ACA) permitiu identificar 58 bandas polimórficas na população CNPGL 188 e 54 na população CNPGL 136 (entre 80 pb e 330 pb), resultado bastante satisfatório. Kölliker et al. (2001), obtiveram 50 bandas polimórficas com a melhor combinação de *primers* (M-CAG / E-AAG) ao analisar populações de trevo branco. Estudando a diversidade genética em populações de trevo vermelho, Kölliker et al. (2005) detectaram 39 bandas polimórficas com a combinação M-CAC / E-

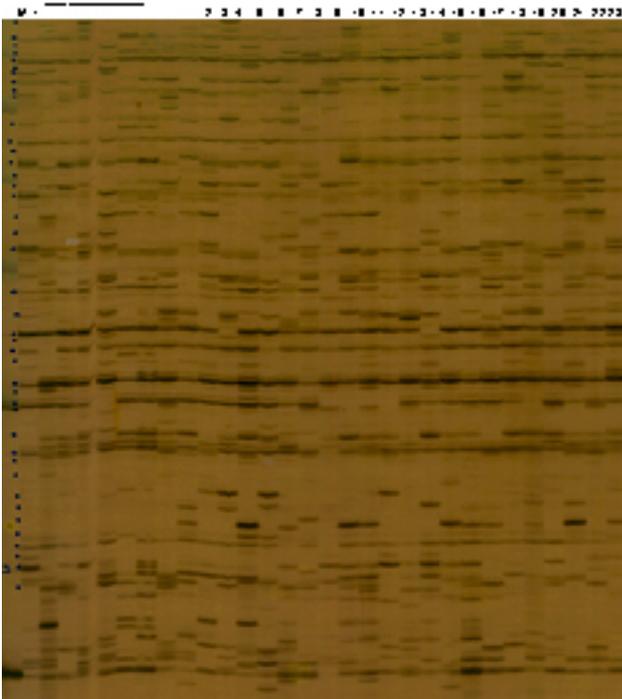


Figura D. População CNPGL 136, amostras de 1-30, amplificadas em gel de poliacrilamida 6%, combinação de *primers* E-ACA / M-CAG.

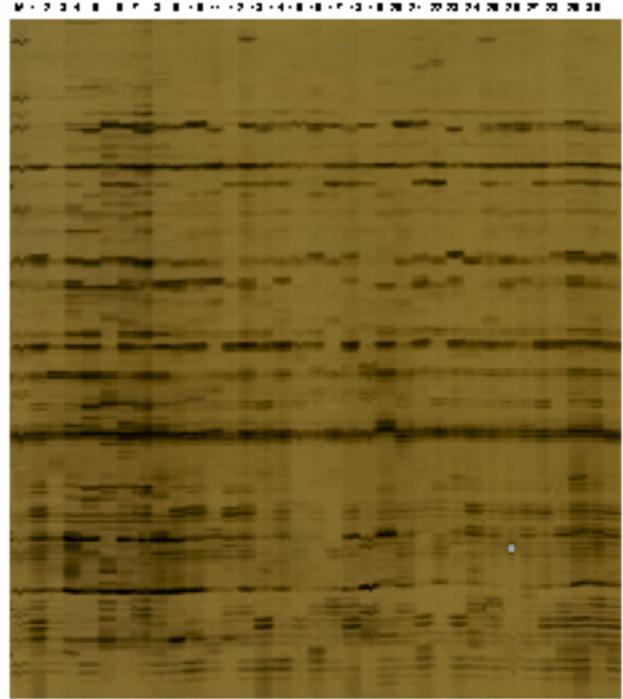


Figura E. População CNPGL 188, amostras de 1-30, amplificadas em gel de poliacrilamida 6%, combinação e *primers* E-ACA / M-CAG.

Conclusões

O protocolo adaptado otimiza o emprego da técnica de AFLP para azevém, viabilizando sua utilização na realização de estudos de diversidade genética em *Lolium multiflorum*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Projeto FINEP/ EPROGGIA – Estratégias de prospecção de genes em gramíneas de interesse agrônomo e à CAPES, pela bolsa de mestrado à primeira autora.

Referências

ABADIE, T.; BERRETA, A. Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos. In: BERRETA, A.; RIVAS, M. (Ed.). Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. Montevideo: IICA - PROCISUR, 2001. 99 p.

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**, 2nd ed. New York: J. Wiley & Sons, 1999. 254 p.

AULER, N. M. F.; REIS, M. S., GUERRA, M. F. NODARI, R. O. The genetics and conservatio

of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 3, p. 329-338, 2002.

BRADEEN, J. M.; BACH, I. C.; BRIARD, M.; LE CLERC, V.; GRZEBELUS, D.; SENALIK, D. A., SIMON, P. W. Molecular diversity analysis of cultivated carrot (*Daucus carota* L.) and wild daucus populations reveals a genetically nonstructured composition **Jornal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 127, n. 3, p. 383-391, 2002.

BREESE, E. L.; HAYWARD, M. D. The genetic basis of present breeding methods in forage crops. **Euphytica**, Wageningen, n. 21, p. 336, 1972.

CASTRO, C. M.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. ... IA, M. S.; MATTOS, L. A. FREITAS, F. ... biological and molecular characterization in rygrass populations. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, n. ... 5-254, 2003.

- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, n. 19, p. 306, 2001.
- DALL'AGNOL, M.; GOMES, K. E.; VIDOR, M. A. Competição de cultivares de azevém anual. In: REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 26., 1989, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1989. p. 36.
- DIAS, J. C. .A.; GOMES, J. F.; INFELD, J. A. Avaliação de genótipos de azevém anual em solos hidromórficos. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001. 3 p. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico, 42).
- FAO.** The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 1998. 510 p.
- FONTANELI, R. S.; FREIRE JÚNIOR, N. Avaliação de consorciações de aveia e azevém anual com leguminosas de estação fria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 5, p. 623-630, 1991.
- GUTHRIDGE, K. .M.; DUPAL, M. P.; KÖLLIKER, R.; JONES, E. S.; SMITH; FORSTER, J. W. AFLP analysis of genetic diversity within and between populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) **Euphytica**, Wageningen, v. 122, n. 1, p. 191-201, 2001.
- HERRMANN, D.; BOLLER, B.; WIDMER, F.; KÖLLIKER, R. Optimization of bulked AFLP analysis and its application for exploring diversity of natural and cultivated populations of red clover. **Genome**, Ottawa, n. 48, p. 474-486, 2005.
- KÖLLINER, R.; JONES, E. S.; JAHUFER, M. Z. Z.; FORSTER, J. W. Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.). **Euphytica**, Wageningen, n. 21, p. 305-315, 2001.
- MITTELMANN, A. O melhoramento de azevém na Embrapa. In: SEMINÁRIO CAMINHOS DO MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS E DIA DE CAMPO DE MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS, 1., 2004, Pelotas. **Palestras...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 80 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 140).
- PUPO, N. I. H. **Manual de pastagens e forrageiras**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1979. 343 p.
- ROLDÁN-RUIZ, I.; DENDAUW, J.; Van BOCKSTAELE, E.; DEPICKER, A.; De LOOSE, M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, Netherlands, v. 6, p. 125-134, 2000.
- ROLDÁN-RUIZ, I.; EEUWIJK van, F.A.; GILLILAND, T.J.; DUBREUIL, P.; DILLMANN, C.; LALLEMAND, J.; LOOSE De, M.; BARIL, C.P. Comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, p. 1138-1150, 2001.
- SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, Publicação on-line, v. 5, p. 63-69, 2004.
- Disponível em: < <http://www.nature.com/nrg/journal/v5/n1/pdf/nrg1249.pdf> >.
- Acesso em: 19 dez. 2007.
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. .M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 89, n. 2, p. 1477-1481, 1984.
- SPOONER, D., van TREUREN, R. and VICENTE de, M. C. **Molecular markers for genebank management**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2005. 126 p. (IPGRI Technical Bulletin 10).
- VARGAS, L.; ROMAN, E. S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Alteração das características biológicas dos biótipos de *Lolium multiflorum* ocasionada pelo uso do herbicida glyphosate. **Plant Breeding**, v. 23, n. 1, p.153-160, 2004.

VIEIRA, E. A.; CASTRO, C. M.; COSTA DE OLIVEIRA, A.; CARVALHO, F. I. F. de.; ZIMMER, P. D., MARTINS, L. F. Genetic structure of annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations estimated by rapd. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 4, p. 407-413, 2004.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.Vande.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KULPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA

fingerprinting. **Nucleic Acid Research**, Oxford, n. 23, p. 4404 - 4414, 1995.

VUYLSTEKE, M.; PELEMAN, J. D.; EIJK, M. JT. V. AFLP technology for DNA fingerprinting. **Nature Protocols**, Publicação on-line, v. 2, n. 6, 2007. p. 1387-1398.

Disponível em: <<http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n6/abs/nprot.2007.175.html>>.

Acesso em: 20 ago. 2007.

Comunicado Técnico, 179

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: Caixa Postal 403

Fone/fax: (53) 3275-8199

E-mail: sac@cpact.embrapa.br



1ª edição

1ª impressão 2007: 50 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Walkyria Bueno Scivittaro

Secretário-Executivo: Joseane M. Lopes Garcia

Membros: Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena Verneti Azambuja, Luís Antônio Suíta de Castro. **Suplentes:** Daniela Lopes Leite e Luís Eduardo Corrêa Antunes

Expediente

Revisão de texto: Sadi Sapper

Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Editoração eletrônica: Oscar Castro

Composição e Impressão: Embrapa Clima Temperado

Fotos: Adriana Pires Bresolin_Soares