

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

ANNA CAROLINA BLUMA MARQUES

**Validação de marcadores moleculares ligados à apomixia em
Panicum maximum Jacq.**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2013

ANNA CAROLINA BLUMA MARQUES

**Validação de marcadores moleculares ligados à apomixia em
Panicum maximum Jacq.**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Suely Pagliarini.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2013

Aos meus pais, Gesaías Marques e Gisela de Moura Bluma Marques, por tudo o que sou, por tudo o que ainda posso ser.

À minha irmã, Nathália, pelo constante apoio, incentivo e compreensão.

Ao meu amor, Clóvis, pelo amor e incansável apoio afetivo.

Aos amigos, Kamilla, Francisco, Fernando e Bruno, por participarem da minha vida e tornarem meus dias mais felizes.

Com amor e carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de estudo concedida e apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Gado de Corte, pela oportunidade de realizar o projeto em suas instalações e pelo aprendizado com os pesquisadores e funcionários da instituição.

À minha Orientadora, professora doutora Maria Suely Pagliarini, pela confiança, dedicação, estímulo e orientação. Agradeço imensamente pela oportunidade de realizar este trabalho e pela liberdade científica que tive para conduzi-lo.

À minha Coorientadora, pesquisadora doutora Lucimara Chiari, pelas oportunidades que me ofereceu, desde o estágio da Graduação, sempre, pacientemente, disponibilizando-se a ajudar.

À minha Coorientadora, pesquisadora doutora Liana Jank, responsável pelo programa de melhoramento de *Panicum maximum*, que esteve comigo, desde a Graduação, sempre compreensível e disponível para esclarecer minhas dúvidas.

Aos amigos e colegas de laboratório de Campo Grande e de Maringá. Nunca me esquecerei da amizade e dos momentos de alegria que dividimos.

À amiga Lilian Janke, que sempre me acolheu de coração aberto em sua casa quando precisei.

À Gisele Olivas de Campos Leguizamon, pelos conselhos, apoio e momentos de descontração proporcionados nesses nossos anos de convivência.

À Débora Cristina Agnes, que, com excelência e competência, deu início à busca por marcadores moleculares ligados à apomixia, trabalho que possibilitou a realização desta tese.

Ao Cléber Eduardo Galvão Carvalho e à Mariane Vilela que, com

paciência e presteza, acompanharam-me durante todas as etapas de clonagem dos fragmentos e sequenciamento.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANNA CAROLINA BLUMA MARQUES, filha de Gesaías Marques e de Gisela de Moura Bluma Marques, nasceu em 4 de janeiro de 1990, na cidade de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul.

Em dezembro de 2003, concluiu o Ensino Fundamental, no Colégio Dom Bosco, na cidade de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul. Em 2006, na mesma Instituição de Ensino, concluiu o Ensino Médio.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas, em janeiro de 2007, na Universidade Católica Dom Bosco, na cidade de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul, obtendo o título de Bióloga em dezembro de 2010.

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vii
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. <i>Panicum maximum</i> Jacq.	4
2.1.1. Citogenética de <i>Panicum maximum</i>	6
2.1.2. Melhoramento genético	7
2.2. Modo de reprodução	11
2.2.1. Herança da apomixia	14
2.2.2. Métodos de identificação da apomixia	15
2.3. Marcadores moleculares	18
2.3.1. Marcadores moleculares ligados à apomixia	20
2.3.2. Seleção assistida por marcadores (SAM).....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Material	24
3.2. Extração de DNA	25
3.3. Quantificação de DNA.....	26
3.4. Reação de RAPD e eletroforese	26
3.5. Análises de dados.....	27
3.5.1. Análise de segregação	27
3.5.2. Análise de ligação.....	28
3.5.3. Eficiência de seleção	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÕES	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de primers potenciais à apomixia com suas respectivas sequências	27
Quadro 2 - Análise por qui-quadrado da segregação fenotípica da população A e dos marcadores RAPD de interesse ($P < 0,05$).....	29
Quadro 3 - Marcadores RAPD com a denominação dada às marcas encontradas ligadas à apomixia e o tamanho aproximado em pb dessas marcas	30
Quadro 4 - Estimativa das distâncias entre cada marca e o Apo <i>locus</i> para a população A, junto com a função de Kosambi e o LOD score obtidos pelo programa GQMOL 1.0.0 (Cruz e Schuster, 2007).....	31
Quadro 5 - Análise por qui-quadrado (χ^2) da segregação fenotípica da população DE e dos marcadores RAPD de interesse	35
Quadro 6 - Estimativa das distâncias entre cada marca e o Apo <i>locus</i> na população DE, junto com a função de Kosambi e o LOD score obtidos pelo programa GQMOL 1.0.0 (Cruz e Schuster, 2007).....	36
Quadro 7 - Eficiência de seleção das marcas ligadas ao gene Apo <i>locus</i> na população DE	37
Quadro 8 - Relação dos acessos apomíticos e sexuais do banco de germoplasma que amplificam as marcas de interesse.....	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa da primeira expedição de coleta de acessos de *P. maximum* realizada pelos franceses do Orstom. Fonte: Jank et al., 2008.....7
- Figura 2 - Mapa da segunda viagem de coleta de acessos de *P. maximum*. Fonte: Jank et al., 2008.8
- Figura 3 - Esquema do cruzamento utilizado na Embrapa Gado de Corte para a obtenção de novas cultivares de *P. maximum* por hibridação interpopulacional.10
- Figura 4 - Representação esquemática de sacos embrionários presentes em plantas com modo sexual de reprodução e em plantas apomíticas, ambos observados em *P. maximum*. Fonte: Karia et al., 2006.13
- Figura 5 - Esquema representativo de sacos embrionários apomítico (A) e sexual (B). A) Saco embrionário do tipo *Panicum* contendo uma oosfera (Oo) associada a duas sinérgides (Sy) e a célula central com um núcleo polar (Np). B) Saco embrionário do tipo *Polygonum* contendo uma oosfera (Oo) associada a duas sinérgides (Sy), a célula central com dois núcleos polares (Np) e seis antípodas (Ap). Fonte: Araújo et al., 2004.16
- Figura 6 - Ovários clarificados visualizados em microscópio óptico 20x para determinação do modo de reprodução. A) Saco embrionário apomítico; B) Saco embrionário sexual. (Oo= Oosfera, Np= Núcleo polar, Ap= Antípodas).....17
- Figura 7 - Perfil de RAPD com alguns híbridos da população A. As setas apontam as marcas de interesse. (A) *Primer* A-01. (B) *Primer* OP01. (C) *Primer* OP16. (D) *Primer* U07. M =Marcador 1 Kb plus DNA Ladder, Tz = Cultivar Tanzânia, S10 = planta sexual S1, Apomíticos = híbridos apomíticos, Sexuais = híbridos sexuais, Br = amostra negativa.....30
- Figura 8 - Mapa de ligação com indicação do posicionamento do *locus* da apomixia, em relação as marcas, na população A.32
- Figura 9 - Perfil de RAPD dos quatro marcadores com alguns híbridos da população DE. As setas apontam as marcas de interesse. (A) *Primer* A-01. (B) *Primer* OP01. (C) *Primer* OP16. (D) *Primer* U07. M =

Marcador 1 Kb plus DNA Ladder, Tz = Cultivar Tanzânia, S12 = planta sexual S12, Apomíticos = híbridos apomíticos, Sexuais = híbridos sexuais, Br = amostra negativa.34

Figura 10 - Mapa de ligação com indicação do posicionamento do *locus* da apomixia, em relação as marcas, na população DE.....36

RESUMO

BLUMA-MARQUES, Anna Carolina, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2013. **Validação de marcadores moleculares ligados à apomixia em *Panicum maximum* Jacq.** Orientadora: Maria Suely Pagliarini. Conselheiras: Lucimara Chiari e Liana Jank.

A apomixia é um modo de reprodução assexual que resulta em sementes geneticamente idênticas à planta mãe. No banco de germoplasma de *P. maximum* da Embrapa Gado de Corte, há acessos apomíticos, todos tetraplóides, e genótipos sexuais que foram tetraploidizados, o que possibilita a realização de cruzamentos. A segregação da apomixia nas progêneses F_1 da espécie é de 1:1, sendo os métodos disponíveis para a identificação da apomixia demorados, laboriosos e muitas vezes inviáveis para um grande número de amostras. Com isso, têm se buscado técnicas alternativas para determinar o modo de reprodução de forma rápida e fácil. Quatro potenciais marcadores RAPD ligados à apomixia foram identificados em uma população F_1 de *P. maximum*, utilizando a metodologia de análise de *bulks* segregantes (BSA). O objetivo deste trabalho foi validar esses marcadores em duas populações F_1 , determinando a frequência de recombinação entre eles e o *locus* da apomixia, objetivando confirmar se estão ligados a essa importante característica. Para tanto, o DNA dos indivíduos das populações e de seus parentais foram extraídos. Apenas híbridos com o modo de reprodução determinado foram usados. A população A foi constituída por 75 híbridos do cruzamento entre S10 (planta tetraplóide sexual) e a cv. Tanzânia (planta tetraplóide apomítica) e a população DE com 33 híbridos do cruzamento entre S12 (planta tetraplóide sexual) e a cv. Tanzânia. As quatro marcas foram amplificadas nas populações e apresentaram segregação mendeliana. A análise de ligação revelou co-segregação das marcas com a apomixia nas duas populações. Um mapa de ligação foi construído pela função de Kosambi e a distância das marcas ao *locus* da apomixia encontrada de 12.0, 20.8, 18.6 e 18.6 cM na população A, enquanto na população DE somente duas marcas foram utilizadas para gerar o mapa de ligação e a distância foi de 9.1 e 15.6 cM. Foi também calculada a eficiência de seleção das marcas, que variou de 90% a 72,2% nas duas populações. Esses

marcadores poderão ser utilizados na determinação do modo de reprodução em *P. maximum*, auxiliando nas etapas iniciais do melhoramento da espécie e agilizando o lançamento de cultivares no mercado.

Palavras-chave: Aposporia, ligação gênica, modo de reprodução.

ABSTRACT

BLUMA-MARQUES, Anna Carolina, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, February, 2013. **Validation of molecular markers linked to apomixis in *Panicum maximum* Jacq.** Adviser Professor: Maria Suely Pagliarini. Committee Members: Lucimara Chiari and Liana Jank.

Apomixis is an asexual form of reproduction that results in seeds genetically identical to the mother plant. In the genebank of *P. maximum* at Embrapa Beef Cattle there are apomitic plants, all tetraploids, and sexual genotypes that experienced tetraploidization and enable breeding. The segregation of apomixis in the F₁ progenies in the species is 1:1, and the techniques available to identify the mode of reproduction are time-consuming, laborious and often unviable for a big amount of samples. Searches have been made after techniques that can easily and quickly identify the mode of reproduction. Four potential RAPD markers linked to apomixis were identified in an F₁ population of *P. maximum*, using the bulked segregant analysis (BSA) method. The aim of this research was to validate these molecular makers in two F₁ populations determining their frequency of recombination between the markers and the apomixis locus to confirm if they are linked to this important characteristic. For this, the DNA of the hybrids and their genitors were extracted. Only hybrids with determined mode of reproduction were used. The population A had 75 hybrids obtained from the cross between the S10 (tetraploid sexual plant) and cultivar Tanzânia (tetraploid apomitic plant) and the population DE had 33 hybrids from the cross of S12 (tetraploid sexual plant) and cultivar Tanzânia. The four RAPD markers were amplified in the populations and presented mendelian segregation. The ligation analyses revealed co-segregation between the markers and apomixis in the two populations. A ligation map was constructed by the Kosambi function. The distance of the markers and the apomixis locus was of 12.0, 20.8, 18.6 and 18.6 cM in the population A, while for the population DE only two makers were used to create the map, their distance was of 9.1 and 15.6 cM. The selection efficiency of the markers was also calculated, and they varied from 90% to 72,2% in the two populations. These markers can be used in the determination of the mode of

reproduction in *P. maximum*, assisting in the initial stages of breeding in the species and speeding the release of new cultivars in the market.

Key words: Apospory, Genetic linkage, Mode of reproduction.

1. INTRODUÇÃO

No mercado internacional, o Brasil é o maior exportador mundial de carne bovina, sendo a pecuária nacional uma importante fonte de economia do País. A produção de gado de corte e leite é realizada sob sistemas de produção de dependência quase que exclusiva de pastagens de gramíneas e leguminosas forrageiras (Valle et al., 2007).

A utilização exclusiva dessa fonte de alimento, não só para bovinocultura como também equinocultura e ovinocultura, torna o melhoramento de forrageiras uma contribuição importante para a produção agropecuária de todo o país (Quadros, 2005).

Dentre as forrageiras cultivadas no Brasil, destaca-se a espécie de gramínea *Panicum maximum* Jacq., devido à boa qualidade da forragem, alta produção, ampla adaptabilidade e facilidade de estabelecimento, quando comparada a outras gramíneas forrageiras tropicais (Jank et al., 2008).

A forrageira *P. maximum* é de origem africana e foi introduzida no Brasil durante a época da escravatura quando era utilizada como cama nos navios negreiros (Martuscello, 2007; Jank et al., 2008).

Em 1982, a Embrapa Gado de Corte recebeu do ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour Le Développement en Coopération) uma coleção de *P. maximum* com 426 acessos apomíticos e 417 acessos sexuais. Esse banco de germoplasma passou por avaliações agronômicas e de pastejo que resultaram no lançamento de três cultivares: Tanzânia, Mombaça e Massai (Martuscello, 2007; Jank et al., 2008).

Para o lançamento de cultivares ainda mais produtivas, estão sendo realizadas hibridizações com o intuito de introduzir características agronômicas interessantes e aumentar a produtividade das pastagens (Jank, 1995).

O modo de reprodução de *P. maximum* é a apomixia apospórica facultativa, um tipo de reprodução assexuada que gera embriões sem fecundação, ou seja, as sementes são geneticamente idênticas a planta mãe. Neste caso, há necessidade da presença de plantas sexuais que apresentem o mesmo nível de ploidia para o intercâmbio gênico. No programa de melhoramento da espécie, os genótipos apomíticos são utilizados como doadores de pólen para genótipos tetraploidizados artificialmente que se reproduzem sexuadamente (Savidan et al., 1989; Jank, 1995).

As progênies híbridas resultantes incluem plantas sexuais e apomíticas na proporção mendeliana de 1:1, o que indica uma herança monogênica e dominante para a apomixia (Savidan et al., 1989).

Após a hibridização, para dar continuidade às etapas do programa de melhoramento, é necessária a identificação do modo de reprodução nessas progênies. Atualmente, o método utilizado é a determinação da anatomia de ovários clarificados em microscopia de contraste de interferência. Esse é um método laborioso e tardio, pois envolve a coleta de inflorescências em antese na planta adulta e a determinação da anatomia de suas estruturas só pode ser realizada após treinamento específico (Jank, 1995). Assim, torna-se extremamente importante o desenvolvimento de métodos alternativos em que o modo de reprodução em *P. maximum* possa ser acessado facilmente e precocemente.

Um método que tem se destacado pela sua rapidez e precisão é o uso de marcadores moleculares que co-segregam com a apomixia e que podem ser utilizados com precocidade, durante as etapas iniciais de desenvolvimento da planta, apenas com amostras de DNA extraídas de sementes ou plântulas (Bhat et al., 2005). Essa técnica têm se mostrado eficiente em espécies apomíticas, como *Brachiaria brizantha* (Pessino et al., 1997), *Pennisetum squamulatum* (Ozias-Akins et al., 1998), *Poa pratensis* (Barcaccia et al., 1998), *Paspalum simplex* (Labombarda et al., 2002; Gualtieri et al., 2006), *Panicum maximum* (Ebina et al., 2005), *Cenchrus ciliaris* (Gualtieri et al., 2006; Yadav et al., 2012), *Hypericum perforatum* (Barcaccia et al., 2007; Schallau et al., 2010), *Brachiaria humidicola* (Zorzatto et al., 2010), entre outras.

Em 2010, a Embrapa Gado de Corte iniciou projetos visando à prospecção de marcadores moleculares ligados à apomixia em *P. maximum*, para facilitar a identificação do modo de reprodução nas progênies, usando a técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) associada à metodologia de BSA (Bulked Segregant Analyses). Foram encontrados quatro marcadores RAPD cada um, com uma marca potencialmente ligada à apomixia numa progênie de *P. maximum* (Agnes et al., 2011). Apesar da importância desse achado, ainda era preciso confirmar se as marcas estavam realmente ligadas e determinar se esses marcadores poderiam ser aplicados em populações diferentes da qual foram encontrados, pois um marcador molecular identificado em uma população não necessariamente co-segrega em uma população diferente da primeira, mesmo dentro da mesma espécie (Bhat et al.,

2005).

Neste trabalho, o objetivo foi validar os quatro marcadores moleculares RAPD encontrados em duas populações F_1 segregantes de *P. maximum*. A primeira população trata-se daquela na qual as marcas foram identificadas e a segunda população foi utilizada para avaliar a aplicação dessas marcas em populações diferentes, a fim de determinar o uso desses marcadores moleculares para a seleção assistida de marcadores (SAM). Isso permitirá ao melhoramento a seleção precoce do modo de reprodução de híbridos apomíticos com potencial ao lançamento e de híbridos sexuais para futuros cruzamentos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Panicum maximum* Jacq.

Panicum maximum Jacq. (= *Megathyrsus maximus* (Jacq) R. D.Webster; guineagrass) pertence à família Poaceae (gramíneas), subfamília Panicoideae e tribo Paniceae. O gênero *Panicum* é considerado o mais diverso dessa família. Possui aproximadamente 400 espécies distribuídas por todo o mundo nas regiões tropicais e subtropicais (Guglieri et al., 2006; Valdés-Reyna et al., 2009).

O gênero *Panicum* inclui algumas espécies de importância econômica, tais como, *P. miliaceum*, *P. virgatum* L., *P. purpurascens* Raddi e *P. maximum*. O uso e interesse no gênero *Panicum* deve-se ao seu potencial de produção de matéria seca por unidade de área, ampla adaptabilidade, boa qualidade da forragem e facilidade de estabelecimento (Karam et al., 2009).

No Brasil, ocorrem cerca de 114 espécies de *Panicum*. Apesar de possuir várias espécies, o banco de germoplasma de *Panicum* no Brasil é restrito à espécie *P. maximum* (Valls e Peñaloza, 2004).

A forrageira *P. maximum* é originária da África tropical e encontrada em diversas paisagens, como solos recém-desmatados, margens florestais e locais sombreados. Seu centro de origem, entretanto, é a África do leste, mais especificamente, o Quênia e a Tanzânia (Jank, 1995).

A introdução do *Panicum* no Brasil não é bem documentada e existem controvérsias em relação à forma de sua introdução e à época em que ocorreu. A hipótese mais difundida é a de que a introdução desse capim, assim como de outras espécies de gramíneas africanas, deu-se durante a escravatura, trazidas pelos navios negreiros para serem utilizadas como camas para os escravos. No Brasil, a espécie se adaptou e dispersou-se tão bem que é considerada nativa em diversas regiões do país. A sua distribuição aumentou ainda mais pela sua alta produtividade e ampla adaptabilidade, o que despertou grande interesse dos agropecuaristas por (Jank, 1995; Jank et al., 2008).

Panicum maximum é amplamente utilizada no cultivo de pastagens na Ásia, Austrália, África e sul da América. No Brasil, é a forrageira propagada por sementes mais produtivas do mercado e uma das mais difundidas (Jank, 1995; Jank et al.,

2008), sendo conhecida popularmente por diversos nomes, como capim colômbio, capim-da-colômbia, capim-guiné, entre outros (Guglieri et al., 2006).

Em relação às características agrônômicas, *Panicum maximum* é de fácil implantação, adaptada a solos leves, de média a alta fertilidade e, por sua alta produtividade, é recomendada para sistemas mais intensivos de exploração pecuária, (Jank, 1995; Valle et al., 2009).

A altura dos acessos de *P. maximum* varia de 0,28 a 1,78m. A largura das folhas varia de 0,6 a 4,7cm e as suas inflorescências são do tipo panícula com florescimento predominante no mês de maio (Jank, 1995).

A espécie reproduz-se por apomixia, um modo de reprodução assexuada onde a meiose é suprimida e sacos embrionários são gerados por divisão mitótica de células somáticas, em vez de megásporos, como na reprodução sexual. Nesta espécie, a apomixia é considerada facultativa, pois na natureza há plantas sexuais.

O número básico de cromossomos na espécie é de $x = 8$ e, praticamente, todas as plantas são tetraplóides ($2n = 32$). Entretanto, todas as plantas sexuais encontradas na natureza são diploides ($2n = 16$) e algumas dessas plantas coletadas tiveram seu número de cromossomos duplicado com colchicina, para serem utilizadas em cruzamentos para intercâmbio gênico (Savidan, 2000). Assim, novas cultivares podem resultar de cruzamentos ou de seleção direta do banco de germoplasma (Martuscello, 2007).

O complexo agâmico de *P. maximum* inclui também o *P. infestum* e *P. trichocladum* que, por apresentarem o mesmo número de cromossomos e mesmo nível de ploidia, se inter cruzam naturalmente (Jank et al., 2008). No cruzamento entre *P. infestum* e *P. maximum*, seus híbridos exibem inflorescências intermediárias entre os tipos rácemo e panícula. Nos híbridos de *P. maximum* com *P. trichocladum*, suas folhas são curtas e abundantes e possuem uma boa aptidão de emitir estolões. A cultivar Massai e a cultivar Embu são exemplos de híbridos obtidos desse complexo agâmico. A primeira é híbrido natural de *P. maximum* e *P. infestum* e a segunda de *P. maximum* e *P. trichocladum* (Jank et al., 2008).

Grande parte das cultivares lançadas no mercado tem sido selecionada do banco de germoplasma. A Embrapa Gado de Corte e parceiros contribuíram com o lançamento de três cultivares: Tanzânia, Mombaça e Massai (Jank et al., 2008; Karam et al., 2009; Valle et al., 2009).

2.1.1. Citogenética de *Panicum maximum*

A espécie *Panicum maximum* apresenta número básico de cromossomos de $x = 8$ e, assim como a maioria das forrageiras, é apomítica tetraplóide ($2n = 4x = 32$). Entretanto, todas as plantas sexuais encontradas na África do Leste são diplóides ($2n = 2x = 16$). A apomixia só é encontrada em poliplóides, sendo ausente no nível diplóide (Savidan, 2000).

Além de acessos tetraplóides, uma pequena porcentagem de outros números cromossômicos foi relatada por Combés (1975) e Bogdan (1977): triplóides ($2n = 24$), pentaplóides ($2n = 40$), hexaplóides ($2n = 48$), octaplóides ($2n = 64$), nonaplóides ($2n = 72$) e plantas com números irregulares de cromossomos ($2n = 30, 31, 34, 36, 37, 38$).

As plantas sexuais diplóides foram tetraploidizadas artificialmente com colchicina, por Nakagawa e Hanna (1992), no Japão e Savidan (2000), na Costa do Marfim, para a obtenção de plantas tetraplóides sexuais. A disponibilidade de plantas sexuais com o mesmo número cromossômico das apomíticas torna possível o melhoramento genético da espécie por meio de cruzamentos entre plantas sexuais e apomíticas.

A produção de híbridos é uma tentativa de explorar a variabilidade genética existente nos acessos do banco de germoplasma. Todavia, a hibridação em espécies poliplóides aumenta a frequência de anormalidades meióticas, o que compromete a produção de sementes (Singh, 1993), afetando esta característica de seleção das plantas para o seu lançamento (Jank, 1995).

Para determinar a viabilidade da obtenção das plantas híbridas e a capacidade de produção adequada de sementes, é imprescindível avaliar citogeneticamente os progenitores e híbridos em relação ao comportamento dos cromossomos durante a meiose e sua relação com a fertilidade do pólen (Jank et al., 2008). Assim, as análises citogenéticas são uma ferramenta essencial ao pré-melhoramento da gramínea.

Em parceria com a Embrapa Gado de Corte, o Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Estadual de Maringá realiza análises do comportamento meiótico de híbridos e progenitores de *P. maximum*. Os dados citogenéticos obtidos por Pessim et al. (2010) em quatro híbridos demonstraram de 6,7% a 14,2% de anormalidades meióticas, valores baixos e que não comprometem a produção de

sementes.

A frequência de anormalidades meióticas encontradas nos híbridos intraespecíficos de *P. maximum* mostra-se muito menores que a reportada em outras espécies forrageiras, como *Brachiaria* (Pessim et al., 2010).

2.1.2. Melhoramento genético

Os acessos de *P. maximum* foram coletados, basicamente, por dois grupos de pesquisadores que realizaram expedições até a África do Leste, exclusivamente, para coletas de acessos dessa espécie. O primeiro grupo, formado por franceses do Institut Français de Recherche Scientifique pour Le Développement en Coopération (ORSTOM), atualmente Institut Français de Recherche pour Le Développement (IRD), em 1967, fez a primeira expedição, com início em Nairobi e Quênia, coletando 249 acessos nos dois países (Figura 1). Após a coleta, descobriram uma planta diplóide sexual entre as tetraplóides apomíticas.

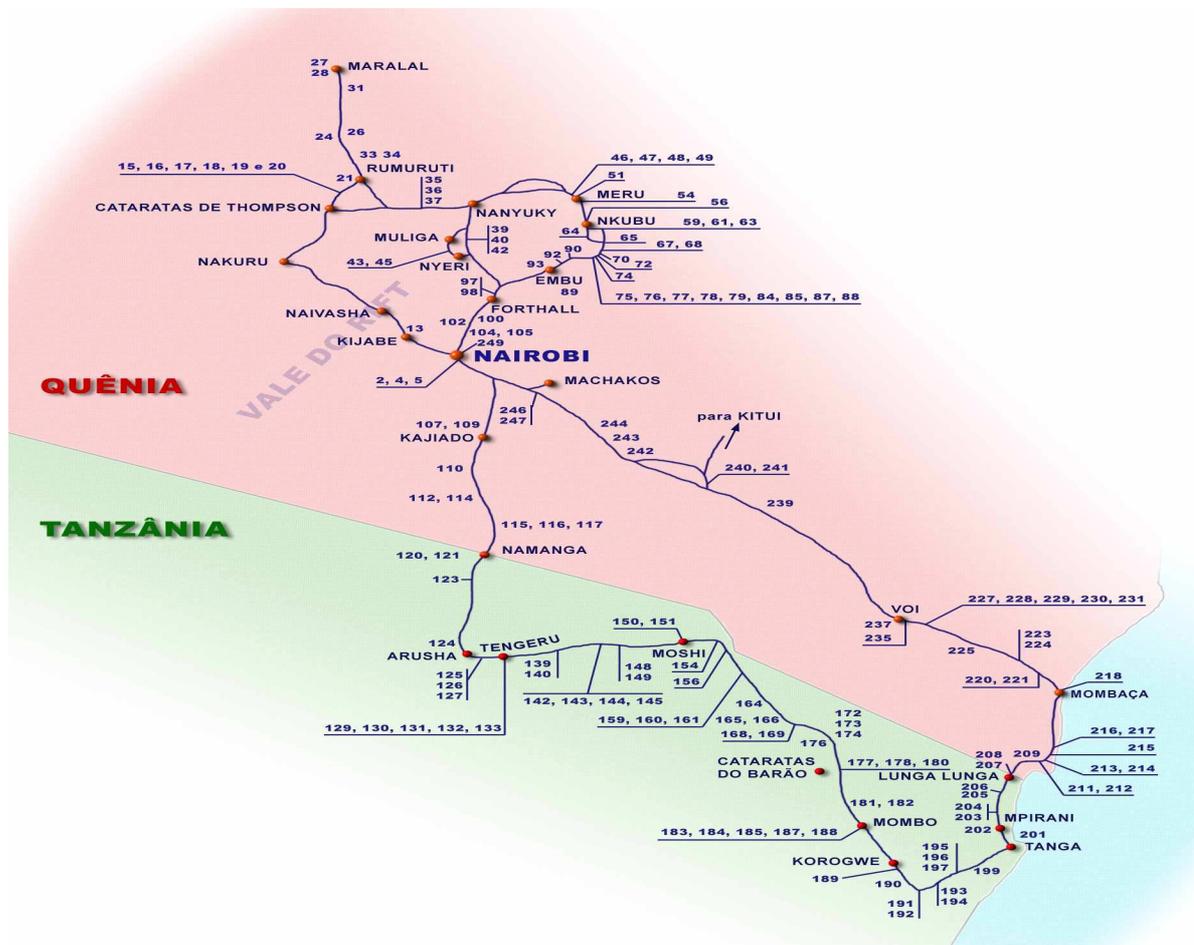


Figura 1 - Mapa da primeira expedição de coleta de acessos de *P. maximum* realizada pelos franceses do Orstom. Fonte: Jank et al., 2008.

A descoberta levou a uma segunda expedição em 1969 (Figura 2), quando encontraram mais 22 plantas sexuais na região de Korogwe e 135 acessos apomíticos de baixo porte e folhas curtas em Meru-Embu (Jank, 1995; Martuscello, 2007; Jank et al., 2008).

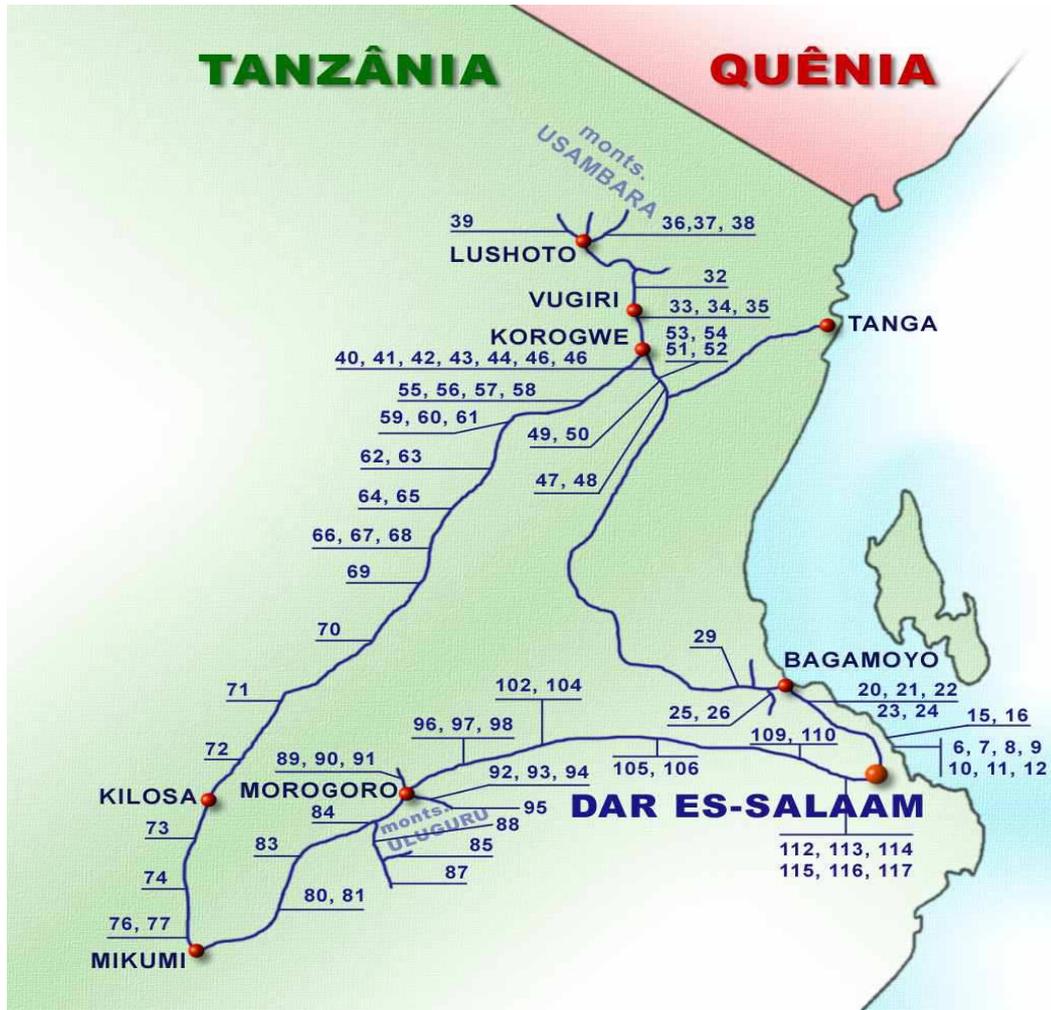


Figura 2 - Mapa da segunda viagem de coleta de acessos de *P. maximum*. Fonte: Jank et al., 2008.

Posteriormente, em 1971 e 1973, o segundo grupo formado por japoneses, realizou uma expedição de coleta no Quênia e na Tanzânia, onde foram coletadas 140 plantas apomíticas tetraplóides e uma sexual diplóide (Jank et al., 2008).

O ORSTOM também recebeu, na época, os acessos disponíveis em diferentes instituições de pesquisa no mundo para completar o acervo genético (Combés e Pernès, 1970). O objetivo da coleta realizada pelos franceses foi estudar

a apomixia, muito evidente nesta espécie. Após o término das pesquisas, a espécie possuía um abrangente banco de germoplasma com acessos de características forrageiras promissoras (Martuscello, 2007). Com o interesse do governo francês de compartilhar esse banco de germoplasma com outros países de clima tropical, surgiu o convênio entre a Embrapa e o ORSTOM.

Em 1982, o Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte da Embrapa (CNPGC), localizado em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, recebeu todo o banco de germoplasma do ORSTOM. A Embrapa recebeu uma coleção de 426 acessos apomíticos e 417 plantas sexuais tetraploidizadas com colchicina (Savidan et al., 1989; Jank, 1995; Jank et al., 2008; Valle et al., 2009).

Atualmente, estas plantas constituem a base do programa de melhoramento de *P. maximum* realizado na Embrapa Gado de Corte, tanto para o lançamento de cultivares selecionadas diretamente do banco de germoplasma, como para a realização de cruzamentos controlados para a obtenção de híbridos com heterose (Savidan et al., 1989; Jank, 1995; Valle et al., 2009).

O programa de melhoramento de *P. maximum* na Embrapa Gado de Corte iniciou-se em 1984, a partir de avaliações agronômicas da coleção recebida do ORSTOM. Foram selecionados 25 acessos, os quais foram avaliados em sete regiões do país (Jank, 1995; Jank et al., 2008; Valle et al., 2009). Os resultados destas avaliações levaram ao lançamento da cultivar Tanzânia, em 1990, da cultivar Mombaça, em 1993 (Jank, 1995), e da cultivar Massai, em 2001, que, juntas, têm elevado significativamente os índices de produtividades da pecuária nacional (Jank et al., 2008). Essas três cultivares ocupam atualmente cerca de 20 milhões de hectares no país (Valle et al., 2009).

Entretanto, devido às numerosas cultivares disponíveis no mercado, os futuros lançamentos só são justificáveis se o novo material for diferente das cultivares existentes ou adaptado a determinadas características de interesse e não encontradas no mercado (Muir e Jank, 2004). Com esse intuito, nos últimos anos, o programa de melhoramento da espécie baseia-se na hibridização, no qual genótipos apomíticos são utilizados como doadores de pólen a genótipos que se reproduzem sexuadamente (Jank et al., 2008; Valle et al., 2009).

Para a realização dos cruzamentos controlados, o método mais eficiente é o de blocos de cruzamento no campo. Neste método, a planta sexual é plantada no meio dos acessos apomíticos, para que seja polinizada pelo vento com pólen das

plantas vizinhas apomíticas (Savidan et al., 1989; Jank, 1995; Valle et al., 2009).

A estratégia de realizar cruzamentos controlados é uma alternativa viável para a obtenção de cultivares superiores, em relação à produtividade vegetal e, conseqüentemente, à produção animal, uma vez que o aumento da produtividade vegetal resulta em aumento da produção animal. (Martuscello, 2007). A progênie F₁ pode ser utilizada em novos cruzamentos e retrocruzamentos, até que seja atingido o objetivo do programa de melhoramento (Figura 3) (Jank et al., 2008). Para isso, é necessário, primeiramente, determinar o modo de reprodução da progênie, uma vez que os cruzamentos entre plantas apomíticas e sexuais resultam em 50% de híbridos apomíticos e 50% de híbridos sexuais.

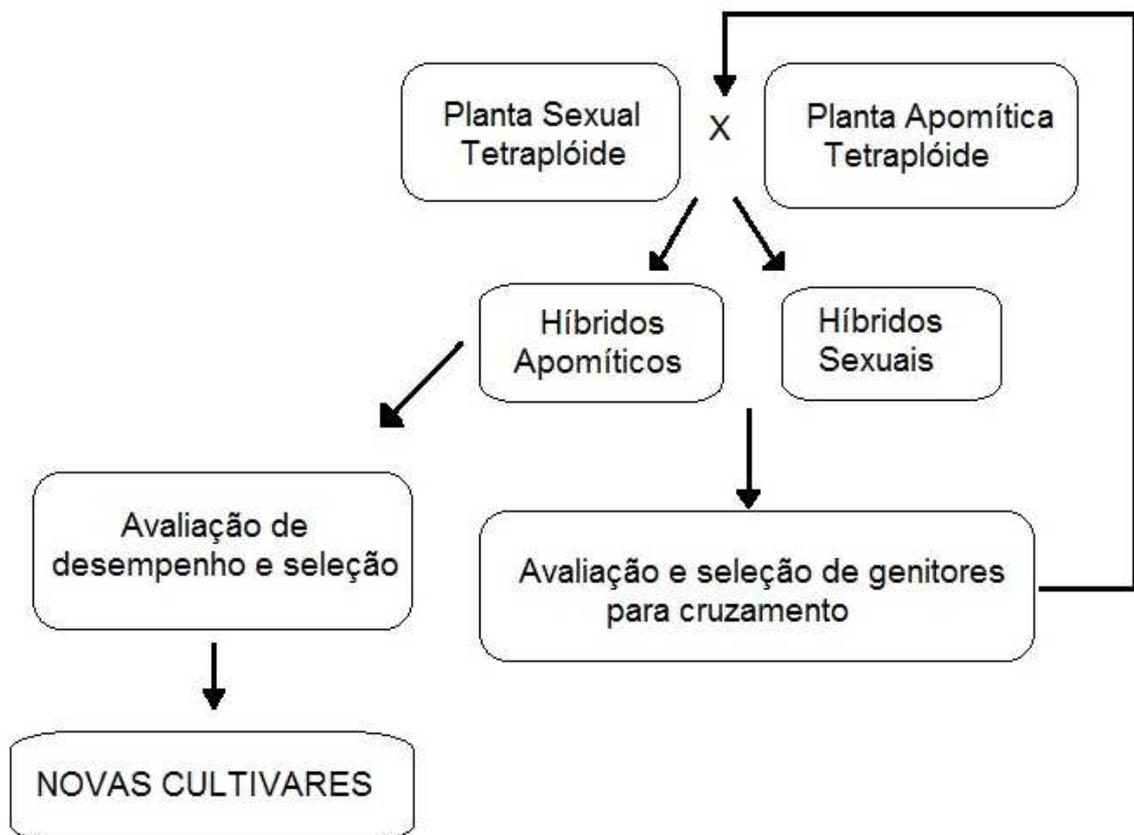


Figura 3 - Esquema do cruzamento utilizado na Embrapa Gado de Corte para a obtenção de novas cultivares de *P. maximum* por hibridação interpopulacional.

Dessa forma, a determinação do modo de reprodução dos híbridos é essencial para dar continuidade ao processo de obtenção de cultivares superiores. Atualmente, essa identificação é realizada por meio de análises citoembriológicas de ovários clarificados.

2.2. Modo de reprodução

As plantas em geral evoluíram reprodutivamente com considerável flexibilidade, desenvolvendo alternativas e estratégias que intrigam pesquisadores de diversas áreas (Nogler, 1984). Comumente, a produção de sementes requer a união de gametas, porém a evolução em algumas plantas estabeleceu mecanismos onde a contribuição do gameta masculino não é necessária para a geração de progênie. Esse modo de reprodução é chamado de apomixia (Nogler, 1984). O que diferencia a apomixia dos outros mecanismos de reprodução vegetativa é o fato de as sementes se formarem no órgão reprodutivo feminino (Karasawa et al., 2009).

Alguns trabalhos apontam que o sucesso nesse tipo de reprodução envolve a ausência de alguns fatores desvantajosos existentes na reprodução sexual, como gasto de tempo, de energia e o risco de introdução de elementos genéticos negativos (Otto e Lenormand, 2002).

A apomixia provavelmente evoluiu como um sistema alternativo de reprodução, por meio de um rearranjo de genes e/ou seu funcionamento, que levam à via sexual normal (Carman, 1997; Savidan, 2000).

Atualmente, pesquisadores apoiam a teoria de que os genes que controlam a formação embrionária celular, a estrutura e as rotas de formação do embrião apomítico, provavelmente, sejam os mesmos envolvidos no desenvolvimento do embrião sexual (Albertini et al., 2004). Alguns estudos recentes sugerem a presença de um mecanismo de silenciamento do gene da apomixia nas plantas sexuais (Laspina et al., 2008). Apesar da extensa documentação sobre os processos de desenvolvimento da apomixia, pouco é conhecido sobre seu controle genético.

As análises genéticas da apomixia são dificultadas pela natureza poliplóide das plantas apomíticas (Nogler, 1984). Na maioria dos casos, a apomixia está relacionada à poliploidia. Uma possível explicação para esse mecanismo é que a hibridização e o aumento do nível de ploidia afetam a metilação do DNA e assim causam dessincronização na expressão dos genes reguladores da reprodução (Matzk et al., 2003).

Apomixia é o modo de reprodução assexual por meio de sementes, que ocorre em 35 famílias de angiospermas e em mais de 300 espécies de plantas. A apomixia é predominante em membros das famílias Gramineae, Rosaceae, Compositae e Rutaceae (Hanna e Bashaw, 1987).

A principal diferença entre a apomixia e a reprodução sexual é o fato de o embrião apomítico desenvolver-se a partir de divisões mitóticas de células tetraplóides do óvulo, sem haver a união do gameta feminino com o masculino, conforme ocorre na reprodução sexual. Dessa forma, na apomixia há ausência de redução dos cromossomos, resultando em indivíduos geneticamente idênticos a planta mãe.

A apomixia geralmente é resultado de três componentes: a formação do gametófito feminino ou saco embrionário na ausência do processo de redução meiótica (apomeiose); desenvolvimento do embrião independentemente da fertilização (desenvolvimento autônomo ou partenogênese), e formação do endosperma dependente (pseudogamia) ou não da fertilização (Karasawa et al., 2009).

Existem duas classificações para a apomixia, as quais dependem da origem do embrião: a apomixia esporofítica e a gametofítica (Nogler, 1984). Na apomixia esporofítica, comum nas espécies de *Citrus* e *Poncirus*, o desenvolvimento do embrião acontece a partir de células somáticas do tegumento ou do nucelo, sem a formação do saco embrionário (Koltunow, 1993). A mais amplamente distribuída é a apomixia gametofítica, comum nos gêneros forrageiros *Panicum*, *Brachiaria*, *Paspalum*, *Poa*, *Cenchrus*, entre outros. Nela, há formação do saco embrionário por duas vias diferentes: a diplosporia ou a aposporia. Na diplosporia, a célula-mãe do megásporo não sofre divisão meiótica ou sofre uma meiose incompleta, levando à formação de um saco embrionário não reduzido. Na aposporia, a meiose ocorre, porém, os gametas se degeneram e, assim, o embrião se desenvolve a partir de células nucleares somáticas do óvulo que entram em mitose (células iniciais apospóricas ou apósporos), dando origem a sacos embrionários não reduzidos (Figura 4) (Nogler, 1984; Asker e Jerling, 1992).

Todos esses processos são oriundos de divisões mitóticas de células somáticas. Assim, o embrião possui o mesmo complemento cromossômico e constituição genética da planta mãe. Devido a isso, a troca de genes é suprimida, levando à fixação do genótipo (Bashaw, 1980), mas o pólen, entretanto, continua sendo reduzido e viável.

A reprodução apomítica em *P. maximum* é do tipo apospórica e envolve a pseudogamia, onde ocorre a fecundação dos núcleos polares do saco embrionário sem a fecundação da oosfera (Bashaw, 1980).

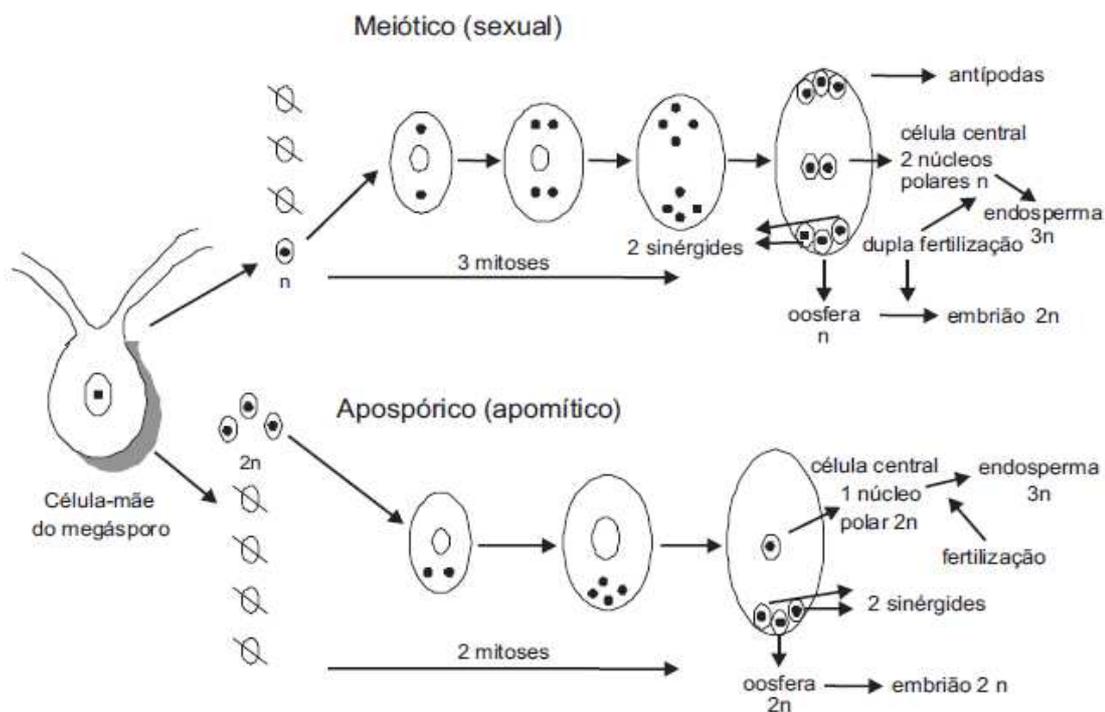


Figura 4 - Representação esquemática de sacos embrionários presentes em plantas com modo sexual de reprodução e em plantas apomíticas, ambos observados em *P. maximum*. Fonte: Karia et al., 2006.

Apesar da espécie *P. maximum* ser considerada apomítica, são encontrados tanto acessos com modo de reprodução apomítico quanto com modo de reprodução sexual. Sendo assim, há presença de intercâmbio gênico nas plantas sexuais (Savidan et al., 1989; Jank, 1995; Jank et al., 2008).

A reprodução sexuada acontece na espécie da mesma forma que na maioria das angiospermas (Figura 4). A redução do número de cromossomos ocorre por meio da meiose para a formação de gametas. Em seguida, acontece a união dos gametas, ou seja, a fecundação do óvulo pelo grão de pólen, cujo produto final é a semente.

A reprodução sexuada promove a variabilidade por meio da recombinação, segregação e fusão sexual (singamia) e a migração gênica pela troca e pela incorporação de genes, sendo de grande interesse nos programas de melhoramento (Karasawa et al., 2009).

Quando acessos apomíticos são utilizados nos cruzamentos controlados, uma vez que a sua oosfera desenvolve-se sem fecundação, eles são utilizados apenas como doadores de pólen a plantas sexuais (Savidan et al., 1989; Jank, 1995; Jank et al., 2008).

2.2.1. Herança da apomixia

A lei da segregação, formulada por Mendel durante seu trabalho com ervilhas (*Pisum*), postula sobre a transmissão dos alelos dos pais para a progênie. Durante a formação dos gametas, os alelos pareados se separam e segregam individualmente de forma aleatória e são transmitidos para a próxima geração.

Em 1868, Mendel tentou reproduzir os resultados obtidos em *Pisum* com *Hieracium*, mas os híbridos obtidos não apresentavam os mesmos resultados de hereditariedade observados no trabalho anterior. As progênies dos cruzamentos não apresentavam transmissão de características paternas e muitas plantas pareciam ser oriundas de autofecundação. Na época, Mendel não sabia, mas estava trabalhando com plantas que se reproduziam por apomixia (Carneiro e Dusi, 2002).

Na apomixia, a meiose não ocorre ou não é funcional e a oosfera contém os mesmos cromossomos somáticos maternos. Assim, o embrião é uma planta idêntica à planta mãe. Porém, em *P. maximum*, a apomixia é considerada facultativa, pois há formação de sacos apospóricos e sacos sexuais (Jank et al., 2008).

O mecanismo genético da apomixia ainda é pouco conhecido, apesar de anos de estudos terem resultado em uma sólida documentação sobre os tipos de apomixia e os seus processos de desenvolvimento serem descritos para *P. maximum* e para uma ampla variedade de espécies.

O estudo genético de determinada característica é sempre de interesse do pesquisador. Alguns estudos indicam que a aposporia é controlada por um único gene dominante, enquanto outros especulam a probabilidade de um pequeno número de genes extremamente ligados. Em *P. maximum*, todos os estudos e observações sempre relatam a presença de um único gene como modelo para a herança da apomixia (Savidan, 1983; Savidan et al., 1989; Chen et al., 1999; Savidan, 2000; Ebina et al., 2005).

O principal indício desse modelo são as observações da herança da apomixia realizadas em híbridos obtidos a partir de cruzamentos controlados. Existem vários relatos na literatura, sobre hibridização, nos quais são obtidas progênies 50% apomíticas e 50% sexuais. Estas observações, na qual a herança da apomixia encontra-se na razão de 1:1, sugerem que, em *P. maximum*, a herança da aposporia é determinada por um único *locus* genético dominante. No modelo de herança citado, o gene A induz à aposporia, sendo os apomíticos Aaaa e os

tetraplóides sexuais aaaa, com a aposporia sendo dominante sobre a sexualidade. Dessa maneira, os cruzamentos entre plantas sexuais e apomíticas resultariam em 50% de híbridos apomíticos e 50% de híbridos sexuais, como os observados no programa de melhoramento (Savidan, 1983; Jank, 1995; Ebina et al., 2005).

2.2.2. Métodos de identificação da apomixia

Várias técnicas envolvendo análises morfológicas, citológicas, genéticas, histoquímicas, entre outras são utilizadas para identificar os mecanismos e a presença da apomixia na progênie. As mais utilizadas são teste de progênie, teste de auxina, técnicas citoembriológicas como a análise de ovários clarificados em microscopia, métodos bioquímicos (isoenzimas) e moleculares (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Carneiro e Dusi, 2002; Bhat et al., 2005).

As análises morfológicas são tradicionalmente as mais simples, como o teste de progênie, onde várias plantas obtidas por polinização aberta podem fornecer informações sobre o modo de reprodução dos indivíduos. Essa análise baseia-se na ocorrência ou não de segregação gênica entre os indivíduos irmãos (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Carneiro e Dusi, 2002). Por exemplo, uniformidade fenotípica dos indivíduos indica apomixia, enquanto heterogeneidade denota recombinação. A presença de característica maternas nos híbridos também é outra indicação de sexualidade (Bhat et al., 2005). Porém, a técnica é limitada pela ocorrência de apomixia facultativa ou homozigose entre os progenitores, o que pode levar a erros na determinação do grau de apomixia (Zorzatto, 2008).

O teste de auxina envolve a aplicação de auxina nas oosferas. Aquelas que conseguem se desenvolver sem fertilização se mostram capazes de sofrer partenogênese, ou seja, de reproduzir-se assexuadamente (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Carneiro e Dusi, 2002).

As técnicas citoembriológicas da estrutura do ovário, como análise do número cromossômico e comportamento meiótico, também são indicativos de apomixia. O comportamento meiótico dos cromossomos e o grau de fertilidade na espécie indicam o seu modo de reprodução (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Carneiro e Dusi, 2002). Essa técnica é menos empírica e extremamente laboriosa e inviável em análises de grandes populações (Zorzatto, 2008).

Em contrapartida, uma das técnicas mais utilizadas no estudo da apomixia é

a análise citológica da megasporogênese e do desenvolvimento do saco embrionário (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Carneiro e Dusi, 2002; Bhat et al., 2005). Esse é um dos métodos mais clássicos e seguros (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Carneiro e Dusi, 2002) e consiste basicamente na coleta de ovários em antese, extração dos ovários, sua clarificação com salicilato de metila e posterior análise por microscopia de contraste de interferência.

Na análise por microscopia, são montadas lâminas com cerca de 30 ovários/planta e são observados sacos embrionários com diferentes estágios de desenvolvimento, desde o início do megásporo até a formação do saco embrionário maduro.

Na aposporia, o saco embrionário se desenvolve a partir de células somáticas. Assim, a presença de sacos apospóricos simples (Figura 5A e 6A) ou múltiplos indica apomixia (Araújo et al., 2004). Os sacos embrionários múltiplos são muito observados no início do desenvolvimento do saco embrionário apomítico. Uma das células apospóricas amadurece em um saco embrionário que contém quatro núcleos e dois formam as sinérgides, uma forma a oosfera e a outra forma o núcleo polar. Esse tipo de saco embrionário é chamado de tipo *Panicum*. Dessa forma, a ausência de antípodas no saco embrionário constitui diagnóstico de aposporia (Figuras 4, 5A e 6).

O saco embrionário sexual é do tipo *Polygonum* e contém 8 núcleos, sendo duas sinérgides, uma oosfera, dois núcleos polares e três antípodas (Figura 5B e 6B).

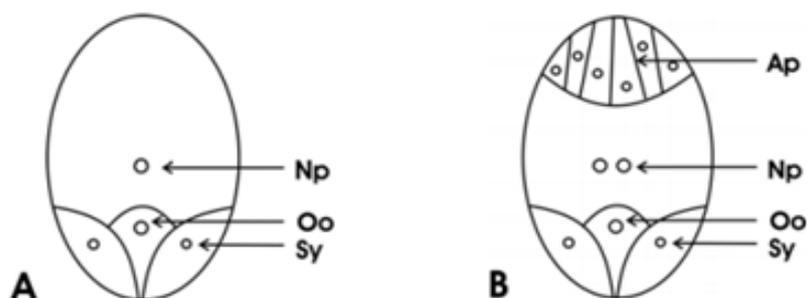


Figura 5 - Esquema representativo de sacos embrionários apomítico (A) e sexual (B). A) Saco embrionário do tipo *Panicum* contendo uma oosfera (Oo) associada a duas sinérgides (Sy) e a célula central com um núcleo polar (Np). B) Saco embrionário do tipo *Polygonum* contendo uma oosfera (Oo) associada a duas sinérgides (Sy), a célula central com dois núcleos polares (Np) e seis antípodas (Ap). Fonte: Araújo et al., 2004.

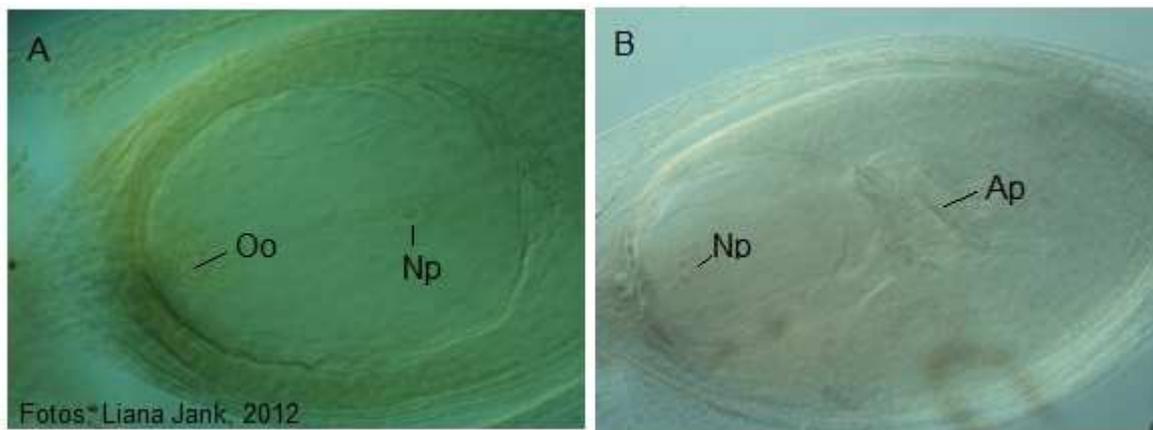


Figura 6 - Ovários clarificados visualizados em microscópio óptico 20x para determinação do modo de reprodução. A) Saco embrionário apomítico; B) Saco embrionário sexual. (Oo= Oosfera, Np= Núcleo polar, Ap= Antípodas).

O método da análise citológica da megasporogênese e do desenvolvimento do saco embrionário é utilizado na Embrapa Gado de Corte para identificação da apomixia em *P. maximum* e *Brachiaria* sp. Porém, esse método é considerado laborioso e demorado, pois envolve a espera do ciclo de desenvolvimento completo da planta, uma vez que os ovários só podem ser coletados em plantas adultas com inflorescência com flores recém-abertas. Em seguida, é realizada a extração, a clarificação dos ovários com diversas soluções e, após todas essas etapas, é efetuada a análise microscópica, a qual é de difícil interpretação de dados e só pode ser realizada por pessoas devidamente treinadas. A identificação da anatomia dos sacos embrionários por microscopia é demorada e trabalhosa, pois algumas vezes os ovários não apresentam estruturas bem definidas, podendo apresentar anormalidades ou até mesmo estar no início do seu desenvolvimento.

Os marcadores moleculares surgiram com os avanços nas técnicas de biologia molecular e podem ser utilizados no estudo de variação genética entre indivíduos e para detectar a presença da apomixia no nível de DNA. Esses métodos oferecem as vantagens de serem rápidos, fáceis e precisos (Bhat et al., 2005).

Os marcadores moleculares, quando relacionados ao *locus* da apomixia, podem ser utilizados como técnica de *screening* para o modo de reprodução. Em *Pennisetum* e *Cenchrus ciliaris*, foram identificados dois marcadores que co-segregam com o modo de reprodução (Ozias-Akins et al., 1993) e se mostraram eficientes como método de identificação da apomixia em populações segregantes (Bhat et al., 2005). Marcadores moleculares que co-segregam com apomixia

também foram encontrados em *Brachiaria brizantha* (Pessino et al., 1997), *Pennisetum squamulatum* (Ozias-Akins et al., 1998), *Poa pratensis* (Barcaccia et al., 1998), *Paspalum simplex* (Labombarda et al., 2002) e *Hypericum perforatum* (Barcaccia et al., 2007; Schallau et al., 2010). Entretanto, após a identificação do marcador, ainda é necessário determinar a aplicação destes em populações diferentes. A descoberta de marcadores moleculares associados ao gene da apomixia facilitaria não somente a transferência deste gene, como também o acompanhamento da segregação desta característica nas gerações seguintes (Gauer e Cavalli-Molina, 2000).

2.3. Marcadores moleculares

Os primeiros marcadores a serem utilizados no melhoramento de plantas foram os marcadores morfológicos e citológicos. Na década de 80, a biologia molecular sofreu grandes avanços e houve o desenvolvimento dos marcadores de DNA. O potencial de uso dos marcadores moleculares reside no fato de serem praticamente ilimitados em número, de fácil detecção e têm a vantagem de não sofrerem influência ambiental em relação a marcadores morfológicos e citológicos e, além disso, não oferecem vantagem seletiva à planta, ou seja, são seletivamente neutros (Carneiro e Vieira, 2002).

Os marcadores moleculares são basicamente segmentos de DNA, fisicamente ligados a segmentos de DNA herdados geneticamente e que servem como base para diferenciar um ou mais indivíduos da mesma ou de diferentes espécies. O uso dos marcadores de DNA pode revelar variabilidades em nível genômico de uma forma rápida, simples e eficaz.

Marcadores que revelam diferenças genéticas são chamados de polimórficos e podem ser codominantes ou dominantes. Os marcadores codominantes apresentam todos os alelos presentes em um determinado *lócus*, discriminando os indivíduos heterozigotos dos homozigotos. Entretanto, os marcadores dominantes apresentam somente a presença ou ausência do alelo, não sendo possível a discriminação entre heterozigotos e homozigotos (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Dentre as variações da técnica de análise de polimorfismos no DNA, as mais utilizadas, tanto por motivos de maior confiabilidade quanto por um menor custo,

tempo reduzido, dentre outras particularidades, estão: *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) (Kruglyak, 1997), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) (Zabeau; Vos, 1993); *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Welsh; McClelland, 1990; William et al., 1990); *Sequence-Characterized Amplified Regions* (SCAR) (Paran; Michelmore, 1993); *Restriction Fragment Length Polymorphism DNA* (RFLP) (Grodzicker et al., 1974); Minissatélites ou *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) (Jeffreys et al., 1985) e Microssatélites ou *Short Tandem Repeats* (STRs) (Litt; Luty, 1989).

No melhoramento de plantas, os marcadores de DNA começaram a ser utilizados no início da década de 80 e, até o momento, o seu uso já permitiu a identificação de genes para a resistência à antracnose (Faleiro et al., 2003, Lacanallo, 2008; Beraldo et al., 2009), à mancha-angular e à ferrugem em *Phaseolus vulgaris* L. (Faleiro et al., 2003). Também possibilitou a identificação de genes deletérios responsáveis por anomalias em *Eucalyptus grandis* (Lourenção, 2010), de genes recessivos reguladores da esterilidade masculina em melão (*Cucumis melo* L.) (Pitrat, 2002) e do fungo responsável pela malformação em *Mangifera indica* L. (Zaccaro et al., 2007), entre outros.

Com a variedade de técnicas moleculares existentes, a seleção de um marcador para desenvolver uma pesquisa envolve a sua aplicação de acordo com as características e limitação únicas de cada tipo de marcador e os objetivos da pesquisa (Alzate-Marin et al., 2005).

Marcadores moleculares, como RFLPs, AFLPs e RAPDs, permitiram a identificação e o mapeamento da região do genoma que contém o gene de que regula a apomixia (Bhat et al., 2005; Darrigues et al., 2002). Esses marcadores têm sido os mais utilizados nos estudos da apomixia em forrageiras de interesse econômico (Ozias-Akins et al., 1993; Pessino et al., 1997; Barcaccia et al., 1998; Pupilli et al., 2001; Lombarda et al., 2002; Albertini et al., 2004; Ebina et al., 2005; Stein et al., 2007; Zorzatto et al., 2010; Agnes et al., 2011; Rebozzio et al., 2012).

O RFLP foi o primeiro marcador a ser utilizado no melhoramento de plantas. No RFLP, o DNA é isolado e clivado com enzimas de restrição. Os fragmentos obtidos são separados por eletroforese e transferidos para uma membrana. Em seguida, a membrana é incubada com uma sonda radioativa ou a frio, onde os fragmentos específicos serão detectados e pareados com sequência de DNA da sonda. As dificuldades da técnica, o grande número de etapas, o custo elevado e o

tempo necessário na geração destes marcadores restringem drasticamente o seu uso de forma freqüente (Alzate-Marin et al., 2005).

O AFLP e o RAPD são marcadores dominantes derivados da PCR (Polymerase Chain Reaction) e ambos foram propostos como métodos mais rápidos, sensíveis e relativamente simples na detecção de polimorfismo no DNA. O AFLP envolve a clivagem de fragmentos de DNA com enzimas de restrição e a amplificação desses fragmentos por PCR. O DNA do indivíduo é clivado com enzimas de restrição que deixam as extremidades coesivas de sequência conhecida, as quais servem de sítio de ligação para iniciadores na reação de PCR. O seu uso no melhoramento de plantas tem sido limitado pelas dificuldades da técnica e o seu elevado custo (Alzate-Marin et al., 2005).

O RAPD é uma técnica que utiliza a PCR para detectar fragmentos específicos de DNA, porém utiliza apenas um iniciador curto (cerca de 10 nucleotídeos). A amplificação de um fragmento acontece quando duas sequências de DNA complementares ao iniciador se ligam às fitas opostas do DNA, a uma distância de 200 a 2.000 pares de nucleotídeos. As grandes vantagens do RAPD incluem a simplicidade e a rapidez na obtenção de dados, o custo reduzido e o fato de ser desnecessário o conhecimento do genoma em estudo. No entanto, a técnica requer padronização e cuidado nas condições de amplificação, pois é sensível a alterações (Alzate-Marin et al., 2005).

2.3.1. Marcadores moleculares ligados à apomixia

Os marcadores moleculares têm facilitado a realização de vários estudos genéticos, por apresentarem rapidez e precisão na manipulação gênica. Alguns dos usos dos marcadores moleculares permitem o mapeamento de *locus* que controlam características quantitativas, poligênicas ou de herança complexa (Quantitative Trait Loci). Os marcadores também são usados em estudos de sintenia, mapas comparativos, clonagem de genes (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Carneiro e Vieira, 2002) e na seleção assistida por marcadores, tornando rápido e eficiente o processo de melhoramento.

O mapeamento genético é baseado na presença de ligação gênica, fenômeno descoberto em estudos com *Drosophila* (Morgan et al., 1915) que mostraram desvios na segunda Lei de Mendel, indicando que pares de genes não

segregavam de forma independente. Dessa forma, alguns genes estariam localizados no mesmo cromossomo e ocasionalmente, durante a meiose, ocorreriam *crossing-over* ou permutas entre os homólogos. Os mapas genéticos surgiram em 1913, quando Sturtevant sugeriu usar a porcentagem de recombinantes como indicador da distância entre genes na construção dos mapas. Desde então, estudos de mapa de ligação têm sido amplamente utilizados nos estudos moleculares sobre apomixia em diversas espécies, como *B. humidicola* (Zorzatto, 2008), *P. squamulatum* (Gualtieri et al., 2006), *Paspalum notatum* (Stein et al., 2007), *C. ciliaris* (Gualtieri et al., 2006; Yadav et al., 2012) e *P. maximum* (Ebina et al., 2005).

Uma vez detectados os genes de interesse com marcadores moleculares, é possível selecionar indivíduos com base no fenótipo do marcador. Essa abordagem é conhecida como seleção assistida por marcadores, sendo uma ferramenta bastante útil, particularmente nas etapas iniciais e intermediárias do melhoramento, principalmente, nos casos em que a característica de interesse é de difícil avaliação, o que pode significar redução no tempo e nos custos do programa de melhoramento (Carneiro e Vieira, 2002).

Uma das etapas mais importantes no uso de marcadores moleculares é o estabelecimento da relação entre um dado marcador e um *locus* de interesse. Trata-se de uma etapa trabalhosa e que exige bastante critério (Alzate-Marin et al., 2005).

O procedimento '*Bulked Segregant Analysis*' ou BSA (Michelmore et al., 1991) em conjugação com a PCR é uma alternativa eficiente de mapear genes específicos e selecionar genótipos desejados. Nessa técnica, indivíduos contrastantes de uma população segregante são agrupados em dois "*bulks*" de amostras de DNA (Alzate-Marin et al., 2005; Ferreira e Grattapaglia, 1998). Esses *bulks* são construídos em relação à característica ou gene de interesse e são analisados quanto à presença de polimorfismo. O agrupamento dos indivíduos, teoricamente, iguala o "background" genético dos dois *bulks*, menos dos *loci* envolvidos com o caráter de interesse. Dessa forma, um marcador polimórfico entre os *bulks* possui uma forte probabilidade de estar associado ao(s) alelo(s) que governa(m) o caráter de interesse (Alzate-Marin et al., 2005).

Após a identificação dos marcadores polimórficos, todos os indivíduos da população usada na construção do *bulk* devem ser verificados com esse marcador para verificar se há ligação entre o marcador e o gene de interesse.

Essa técnica já foi utilizada eficientemente para estudos em apomixia em

diversas espécies de forrageiras: *Brachiaria ruziziensis* (Pessino et al., 1997), *B. brizantha* (Pessino et al., 1997), *B. humidicola* (Zorzato et al., 2010) e *P. maximum* (Agnes et al., 2011).

A identificação de marcadores moleculares ligados à apomixia pode facilitar muito o processo de identificação do modo de reprodução, pois permite discriminar de forma precisa e precoce, ainda nos estágios iniciais de desenvolvimento das plantas, se as mesmas são apomíticas ou sexuais (Chiari et al., 2007).

Por se tratar de uma característica de interesse de difícil determinação, a Embrapa Gado de Corte tem buscado técnicas alternativas que possam determinar, facilmente e precocemente, o modo de reprodução em *P. maximum* (Agnes et al., 2011) e *B. humidicola* (Zorzato et al., 2010).

Em *P. maximum*, Agnes et al. (2011) utilizou o método de análise de segregantes agrupados para construir dois *bulks*, sendo um *bulk* formado por 10 híbridos de fenotipagem apomítica e outro *bulk* formado por 10 híbridos de fenotipagem sexual, para identificar marcadores RAPDs que os distinguíssem pelo modo de reprodução. Os *bulks* foram amplificados com 184 *primers*, dos quais dezessete iniciadores segregaram na proporção mendeliana de 1:1. Quando os *bulks* foram abertos, ou seja, esses 17 marcadores RADP foram amplificados com os 10 híbridos apomíticos e os 10 híbridos sexuais, somente quatro desses marcadores apresentaram cada um uma marca com a segregação da herança da apomixia.

Apesar da importância desse achado, deve-se estabelecer a relação desses marcadores moleculares e o *locus* da apomixia, amplificando esses marcadores em toda a população de híbridos em que foi descoberta e determinar a sua transferibilidade a outras populações de híbridos.

2.3.2. Seleção assistida por marcadores (SAM)

Os marcadores moleculares, quando estreitamente ligados a uma característica de interesse, qualitativa ou quantitativa, tornam-se uma ferramenta útil na seleção de indivíduos com base no fenótipo do marcador, sem que haja a necessidade de avaliar o fenótipo da característica (Chiari; Cançado, 2008).

Essa abordagem, conhecida como SAM (Seleção Assistida por Marcadores) ou SAMM (Seleção Assistida por Marcadores Moleculares), pode ter grande impacto

nos casos em que a característica de interesse seja de difícil e/ou onerosa avaliação, nos estudos de espécies perenes de ciclo longo (Souza, 2001; Chiari; Cançado, 2008) e para a avaliação das características fenotípicas de herdabilidade baixa, o que pode significar redução de custo e de tempo, particularmente nas etapas iniciais e intermediárias do melhoramento (Souza, 2001).

A seleção assistida por marcadores moleculares é realizada mediante a conversão de marcadores elaborados em um tipo simples, representando uma forma de seleção indireta, na qual o caráter indireto (o marcador molecular) apresenta herdabilidade próxima a 100%, uma vez que a seleção poderá ser conduzida independentemente do ambiente (Chiari; Cançado, 2008).

O emprego da seleção assistida para identificação de genótipos superiores em populações segregantes é o maior impacto dos marcadores moleculares no melhoramento vegetal (Federizzi, 1998). Entretanto, a expectativa dos melhoristas não se limita apenas à seleção de genótipos, segundo Lee (1995), o grande interesse no uso do SAM está em reduzir o tempo necessário para a transferência de genes de interesse, especialmente transgenes, por retrocruzamento. Nesse caso, os marcadores podem ser úteis, tanto para selecionar os indivíduos com o maior número de marcadores semelhantes aos do progenitor recorrente quanto para selecionar os que possuam o gene ou transgene de interesse. Esse processo pode ser denominado de introgressão assistida por marcadores (Marker Assisted Introgression - MAI) (Chiari; Cançado, 2008).

Os exemplos de SAM mais conhecidos são a transferência de genes favoráveis de acessos silvestres para a espécie cultivada de tomate, visando ao aumento do tamanho do fruto (Tansley et al., 1996) e dois *loci* de resistência à ferrugem em cevada (Toojinda et al., 1998). Acredita-se que as impressas privadas que possuem programas de melhoramento são grandes utilizadores da técnica SAM, no entanto, esses dados não são publicados, por isso o número de exemplos de SAM na literatura é escasso (Milach, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado entre dezembro de 2011 e janeiro de 2013, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e no Laboratório de Sanidade Animal, da Embrapa Gado de Corte, no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

3.1. Material

A pesquisa envolveu duas populações de híbridos F_1 segregantes de *P. maximum* Jacq. Os híbridos utilizados já haviam sido submetidos a estudos anteriores para determinação do seu modo de reprodução. A primeira população, nomeada de população A, foi a população parcialmente utilizada por Agnes et al. (2011) na construção dos *bulks* e para a qual foram encontrados os quatro *primers* ligados à apomixia. A segunda população, nomeada de população DE, foi a progênie utilizada para avaliar se os marcadores são aplicáveis a populações diferentes daquela em que foram ligados à apomixia.

A população A é constituída por 116 indivíduos, sendo que, desses, 75 híbridos já foram fenotipados. Essa população foi obtida do cruzamento entre a planta sexual tetraplóide S10 e a cultivar apomítica e tetraplóide Tanzânia. A população contém 40 híbridos apomíticos: A4, A5, A10, A13, A14, A18, A23, A26, A33, A34, A36, A40, A46, A48, A51, A62, A64, A65, A68, A75, A77, A78, A80, A83, A85, A87, A93, A97, A100, A105, A106, A109, A112, A113, A116, A117, A120, A124, A125, A57 e 35 híbridos sexuais: A3, A6, A17, A24, A25, A27, A28, A30, A35, A42, A43, A44, A45, A47, A49, A50, A52, A54, A56, A69, A70, A71, A74, A 76, A94, A96, A99, A101, A102, A111, A114, A115, A59, A72 e A73.

A segunda população, população DE, é constituída por 36 indivíduos, sendo que, desses, 33 híbridos estão fenotipados. Essa população é resultante do cruzamento entre a planta sexual tetraplóide S12 e a cv. Tanzânia. Nessa população, 12 híbridos são apomíticos: D1, D8, D14, D15, D16, D23, DE3, DE5, DE6, E7, E8, E11 e 21 são sexuais: D2, D3, D4, D5, D9, D12, D17, D18, D20, D21, DE1, E5, E9, E12, E13, E17, E18, E19, E20, E22, E25.

Além dos híbridos e seus respectivos parentais, os marcadores também foram testados em parte do banco de germoplasma de *P. maximum* para analisar a

segregação das marcas em quatorze acessos sexuais e vinte e dois acessos apomíticos. Os acessos sexuais escolhidos foram: S7, S8, S9, S10, S11, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19, S20 e S23. Os acessos apomíticos escolhidos foram: Mombaça, T21, T24, T46, T60, T62, T68, T72, T77, T84, T91, T95, T97, T108, T110, T200, KK8, KK33, K187B, K191, K193 e K249.

Os híbridos e os acessos apomíticos e sexuais do germoplasma são mantidos em campo nas instalações da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande-MS.

3.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte. De cada genótipo, foram coletadas de três a quatro folhas jovens, com a ajuda de tesoura esterilizada com álcool 70%, as quais foram colocadas em tubos de ensaio contendo água destilada, identificadas individualmente e, em seguida, transportadas ao laboratório para a realização da extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Bonato et al. (2002). O tecido foliar foi pulverizado com nitrogênio líquido com o uso de cadinhos de porcelana até a obtenção de um pó bem fino. Em seguida, foi adicionado às amostras o tampão de extração CTAB (2% CTAB; 1,4 mM NaCl; 0,2% 2 β-mercaptoetanol; 20mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1% PVP 40), durante uma hora. As amostras foram vortexadas e incubadas em banho-maria, a 65°C, por 60 minutos, invertendo as amostras a cada 10 minutos. Após 60 minutos, as amostras foram retiradas do banho-maria e deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos para esfriar.

Na sequência, o material foi submetido ao processo de purificação do DNA, com duas lavagens, com adição de 450µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e invertido gentilmente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4.500 g por 10 minutos, em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi coletado e transferido a novos tubos identificados.

As amostras foram precipitadas, usando 600µL de isopropanol (-20°C) e foram gentilmente agitadas para homogeneizar as amostras. Em seguida, as amostras foram levadas ao freezer, onde ficaram incubadas por 30 minutos a 20°C.

As amostras, em seguida, foram centrifugadas a 10.000g, por 5 minutos, em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado, permanecendo no tubo apenas o pellet. O pellet foi suspenso em 400µL do tampão TE (Tris-EDTA). Nessa etapa, o processo de extração foi interrompido e as amostras foram armazenadas a 4°C durante a noite.

O DNA das amostras foi precipitado com a adição de um sal e um álcool: 20µL de NaCl 5M e 800µL de etanol absoluto. Os tubos foram invertidos gentilmente até ser observada a precipitação do DNA. Em seguida, os tubos foram precipitados a 10.000g, por 5 minutos, em temperatura ambiente, e o pellet foi lavado com 400µL de etanol 70% a 20°C. O etanol foi descartado e as amostras ficaram na capela até que o etanol secasse por completo em temperatura ambiente.

As amostras de DNA foram suspensas com 100µL de tampão TE e adicionou-se 3µL de RNase (10 mg/mL) aos tubos, que foram homogeneizados e incubados por 30 minutos, a 37°C em banho-maria. Em seguida, as amostras foram armazenadas em -20°C.

3.3. Quantificação de DNA

A concentração e a verificação da qualidade do DNA das amostras foram estimadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), comparando-se as bandas obtidas com padrões de lambda DNA (Invitrogen) de concentrações conhecidas em ng/µL (100 e 300 ng). No Laboratório de Sanidade Animal, as amostras de DNA foram submetidas ao espectrofotômetro, NanoDrop (Thermo) a 260 nm para um resultado mais preciso das concentrações.

3.4. Reação de RAPD e eletroforese

As reações de amplificação foram preparadas com 1x tampão da Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 mM dNTPs (Invitrogen), 0,4 µM *primer* (Operon), 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 30 ng de DNA e H₂O para completar o volume final de 25 µL.

As amplificações foram realizadas nos termocicladores MyCycler da BioRAD e Veriti 96 Well Thermal Cycler da Applied Biosystems, programado para uma

desnaturação inicial a 94°C, por cinco minutos; 40 ciclos de desnaturação a 94°C, por um minuto; pareamento dos *primers* a 35°C, por um minuto; e extensão a 72°C, por dois minutos; e uma extensão final a 72°C por sete minutos.

Foram utilizados os quatro *primers* decâmeros randômicos estabelecidos por Agnes et al. (2011) (Quadro 1) e para cada amplificação foi incluído nas amostras um controle negativo, que é uma reação sem DNA, mas com todos os reagentes, com o objetivo de verificar a ocorrência de contaminação dos reagentes e promover maior confiabilidade aos resultados. Todas as reações foram repetidas pelo menos duas vezes para determinar a reprodutibilidade dos resultados.

Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 2,0% e corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese foi realizada, por cerca de três horas, a 100 a 120 V. Após as eletroforeses, os géis foram visualizados em luz ultravioleta por meio do transiluminador e fotodocumentados pelo sistema digital L. Pix Image (Loccus Biotecnologia). O tamanho de cada marca foi estimado por meio de comparação com o marcador “1 Kb plus DNA Ladder” da Invitrogen.

Quadro 1 - Lista de *primers* potencialmente ligados à apomixia com suas respectivas sequências de nucleotídeos

<i>Primer</i> RAPD	Sequência
OP A01	CAG GCC CTT C
OP 01	ACA ACG CCT C
OP 16	CCG TCC ATC C
OP U07	CCT GCT CAT C

3.5. Análises de dados

As amplificações das marcas de interesse foram analisadas em dados binários, sendo 1 para presença do fragmento, 0 para ausência e 9 para falha na amplificação. Os dados obtidos dos géis de agarose foram utilizados para calcular a razão de segregação das marcas, gerar as análises de ligação, construir os mapas de ligação e calcular a eficiência de seleção das marcas.

3.5.1. Análise de segregação

A hipótese de segregação 1:1 das marcas foi testada, utilizando o teste qui-

quadrado (χ^2), pela fórmula: $\chi^2 = \sum (O - E)^2/E$, na qual O é o número de eventos observados e E é o número de eventos esperados. O teste do qui-quadrado (χ^2) baseia-se na comparação das frequências observadas das diversas classes genótípicas com as esperadas, sob a condição de segregação independente. O nível de significância estabelecido para este teste foi de $\alpha = 5\%$, sendo rejeitada a hipótese de nulidade, quando a probabilidade de significância (valor p) foi menor que $\alpha = 5\%$.

3.5.2. Análise de ligação

A análise de ligação e a construção do mapa foram geradas com o auxílio do software GQMOL versão 1.0.0 (Cruz e Schuster, 2007). O mapa de ligação (centimorgan, cM) entre o *locus* da marca e o gene da apomixia foi calculado usando a Distância de Kosambi. O critério de ligação estabelecido foi A distância máxima de 30 cM e um LOD score igual ou maior que 3, que faz o estabelecimento dos grupos de ligação.

3.5.3. Eficiência de seleção

A eficiência de seleção (ES) das marcas foi calculada pela fórmula proposta por Silva et al. (2007), onde $ES = 100 [(MFMF + mfmf)/(MM + mm)]$, sendo MFMF o número de plantas selecionadas como apomíticas, com base nos marcadores e na análise fenotípica; mfmf, o número de plantas selecionadas como sexuais, com base nos marcadores e na análise fenotípica; MM e mm o número total de plantas apomíticas e sexuais, respectivamente, com base apenas nos marcadores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 75 híbridos da população A, na microscopia de contraste de interferência, 40 foram analisados como acessos apomíticos e 35 como sexuais. A proporção observada foi testada para verificar a conformidade com a proporção mendeliana esperada de 1:1. O valor do qui-quadrado (χ^2) igual a 0,33 (Quadro 2) confirma, satisfatoriamente, a segregação esperada.

No cruzamento avaliado, a segregação de 1:1, assim como em todos os trabalhos descritos na literatura, confirma a existência de um *locus* único para a apomixia, com dominância completa (Savidan, 1983; Jank, 1995; Ebina et al., 2005).

Quadro 2 - Análise por qui-quadrado da segregação fenotípica da população A e dos marcadores RAPD de interesse (P<0,05)

Reprodução	Proporção observada		Teste qui-quadrado (χ^2)	
	Apomítica	Sexual	Segregação	χ^2
Avaliação fenotípica	40	35	1:1	0,33 ^{ns}
Marcador	Apomítica	Sexual	Segregação	χ^2
OP A01	43	32	1:1	1,61 ^{ns}
OP 01	31	41	1:1	2,25 ^{ns}
OP 16	36	39	1:1	0,12 ^{ns}
OP U07	27	40	1:1	3,10 ^{ns}

ns= não significativo ao nível de p<0,05 de probabilidade.
s= significativo ao nível de p<0,05 de probabilidade.

Todas as quatro marcas segregaram na razão 1:1 nessa progênie (Figura 7) e, portanto, podem ser consideradas marcadores genéticos e a segregação foi demonstrada pelo teste do qui-quadrado (χ^2) nos valores de $\chi^2_{0,05}= 1,61$, com o *primer* A01; $\chi^2_{0,05}= 2,25$, para o *primer* 01; $\chi^2_{0,05}= 0,12$, com o *primer* 16; e $\chi^2_{0,05}= 3,10$ para o *primer* U07 (Quadro 2).

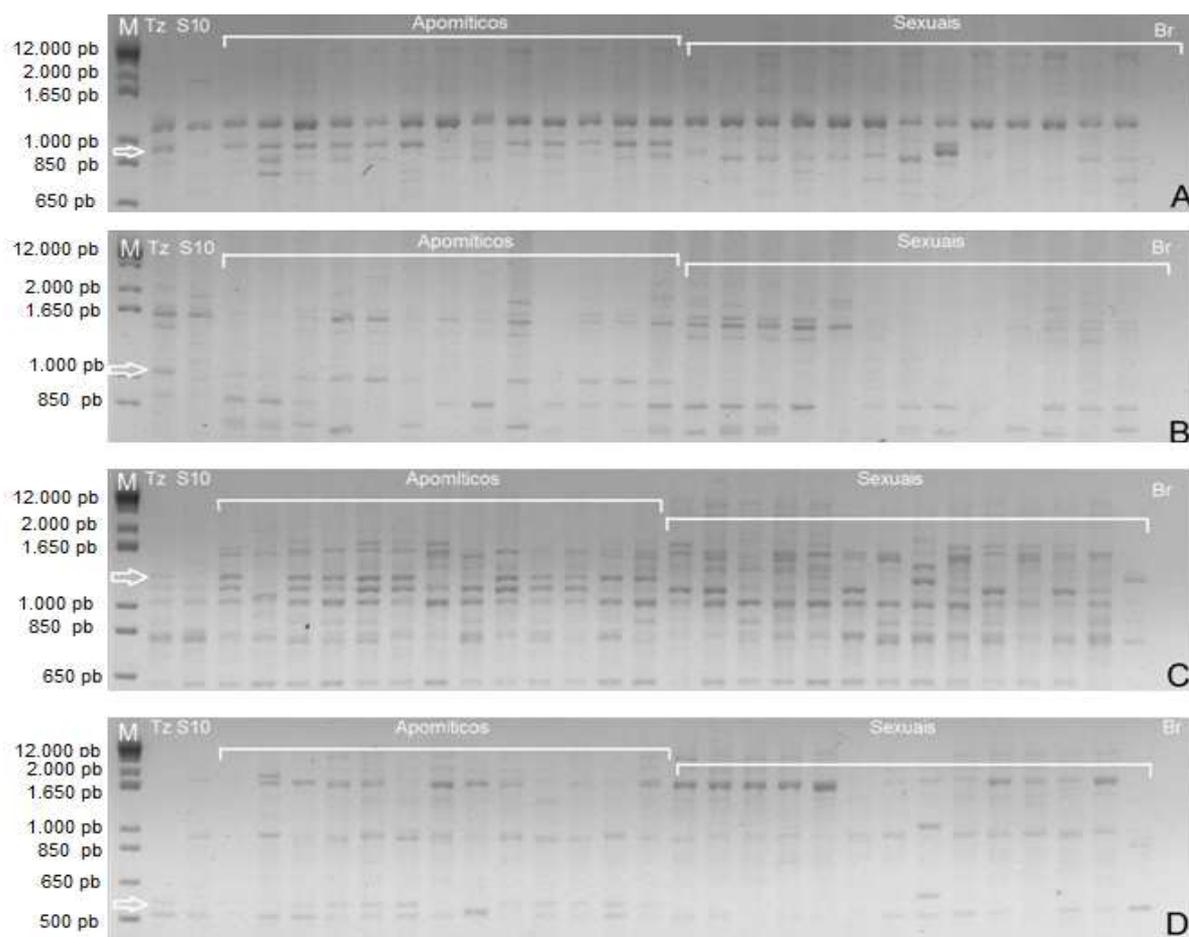


Figura 7 - Perfil de RAPD com alguns híbridos da população A. As setas apontam as marcas de interesse. (A) *Primer A-01*. (B) *Primer OP01*. (C) *Primer OP16*. (D) *Primer U07*. M = Marcador 1 Kb plus DNA Ladder, Tz = Cultivar Tanzânia, S10 = planta sexual S1, Apomíticos = híbridos apomíticos, Sexuais = híbridos sexuais, Br = amostra negativa.

O *primer A01* amplificou uma marca de aproximadamente 950 pares de bases (PB) e foi denominada PM_A01. A marca gerada pelo *primer OP01* foi de aproximadamente 1050 pb e foi denominada PM_01. O *primer OP16* gerou uma marca de 1200 pb, denominada PM_16, enquanto o *primer U07* amplificou uma marca de aproximadamente 620 pb, nominada de PM_U07 (Figura 7, 9 e Quadro 3).

Quadro 3 - Marcadores RAPD com a denominação dada às marcas ligadas à apomixia e o tamanho aproximado em pb dessas marcas

Marcador	Denominação da marca	Tamanho da marca (pb)
OP A01	PM_A01	950
OP01	PM_01	1050
OP16	PM_16	1200
OP U07	PM_U07	620

Com o auxílio do software GQMOL 1.0.0 (Cruz e Schuster, 2007), foram estimadas as distâncias entre cada marca e o *locus* para a apomixia (apo *locus*) e os valores de LOD score (Quadro 4).

A função de Kosambi assume que a ocorrência de permutas próximas são eventos não independentes, sendo os valores decrescentes para *loci* mais distantes (Carneiro e Vieira, 2002). Nas análises, nenhuma das marcas apresentou valor igual a zero. Admite-se, assim, que as marcas em relação ao *locus* da apomixia são dependentes.

Quadro 4 - Estimativas das distâncias entre cada marca e o Apo *locus* para a população A, junto à função de Kosambi e o LOD score obtidos pelo programa GQMOL 1.0.0 (Cruz e Schuster, 2007)

Marcas	Distância (cM)	Kosambi	LOD
PM_A01	12,0	12,23	10,62
PM_01	20,8	22,14	5,67
PM_16	18,6	19,53	6,89
PM_U07	18,6	19,53	6,48

A marca PM_A01 amplificou, dos 75 híbridos, sendo 40 apomíticos e 35 sexuais, em 37 indivíduos apomíticos e em seis indivíduos sexuais; a marca PM_01 amplificou em 28 apomíticos e em três sexuais; a marca PM_16 amplificou em 31 apomíticos e em cinco sexuais; e a marca PM_U07 amplificou em 25 apomíticos e em dois sexuais. Os híbridos apomíticos que não apresentaram as bandas e os híbridos sexuais que apresentaram as bandas são indivíduos que apresentam *crossing over*, ou seja, durante a formação deles, houve troca de material genético entre os cromossomos homólogos.

Na maioria dos organismos, a quantidade e a distribuição de *crossing overs* ao longo dos cromossomos parece ser rigidamente controlada. Nesses híbridos, já foi relatado, por Pessim et al. (2010), em análise citológica, a ocorrência de alta taxa de recombinação entre os genomas parentais.

Esses dados e o fato de nenhuma marca apresentar distância de 0 cM com o Apo *locus*, demonstram que, em todas as marcas estudadas, há ocorrência de recombinação entre elas com o *locus* da apomixia. Entretanto, se a distância for menor que 50 cM, as marcas e o gene estão no mesmo cromossomo e formam um grupo de ligação (“linkage group”) (Zorzatto, 2008). Estatisticamente, grupo de

ligação pode ser definido como um conjunto de *loci* herdados juntos (Liu, 1998).

Os mapas genéticos se tornaram uma ferramenta muito útil, uma vez que permitem a visualização, mesmo que de forma relativa, da organização dos genes nos cromossomos. Nos estudos moleculares sobre a apomixia em híbridos segregantes, os mapas têm sido amplamente utilizados em *P. maximum* (Ebina et al., 2005), *P. squamulatum* (Gualtieri et al., 2006), *P. notatum* (Stein et al., 2007), *B. humidicola* (Zorzatto et al., 2010), *C. ciliaris* (Gualtieri et al., 2006; Yadav et al., 2012), entre outras forrageiras.

O cariótipo de *P. maximum* ainda não é bem conhecido e, por isso, assim não é possível atribuir genes a um determinado cromossomo, embora com a presença de quatro marcas no mapa de ligação foi possível observar uma posição do gene da apomixia em relação aos *primers* co-segregantes (Figura 8 e 10).

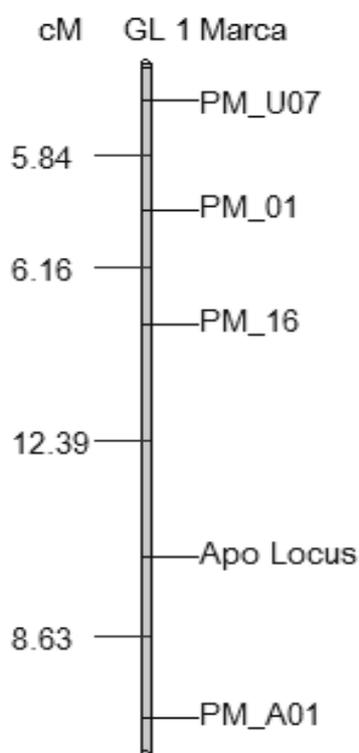


Figura 8 - Mapa de ligação com indicação do posicionamento do *locus* da apomixia, em relação às marcas, na população A.

A distância entre as marcas é medida pela frequência de recombinação. No entanto, essa medida não é aditiva e, assim, não é realizada a detecção de permutas duplas em segmentos adjacentes (Carneiro e Vieira, 2002). Com isso, é

necessário que as distâncias já mapeadas sejam ajustadas com a inclusão de novas marcas no mapa. Observa-se que a frequência de recombinação das marcas no Quadro 4 não é igual aos valores encontrados no mapa de ligação.

Uma vez detectados marcadores moleculares ligados a uma característica de interesse, torna-se possível selecionar indivíduos com base no fenótipo do marcador. Essa abordagem é conhecida como seleção assistida por marcadores (SAM), uma técnica muito importante, principalmente quando a característica de interesse é de difícil avaliação, como o caso da apomixia, e pode levar a significativa redução de tempo nos programas de melhoramento (Chiari; Cançado, 2008).

Dessa forma, foi calculada a eficiência de seleção de cada marca identificada como ligado ao gene da apomixia, visando a avaliar a utilização desses marcadores como SAM no programa de melhoramento da espécie.

Isoladamente, as eficiências de seleção para PM_A01, PM_01, PM_16 e PM_U07 foram de 88%, 80%, 81,3% e 77,3%, respectivamente. A marca com maior eficiência individual de seleção foi o PM_A01, mapeado a 12 cM do gene da apomixia (Quadro 4).

A utilização das quatro marcas que flanqueiam o Apo *locus* resultou numa eficiência de seleção de 81,3%, um valor relativamente alto, demonstrando que o uso desses marcadores para a seleção assistida é válida. Essa porcentagem representa todos os acessos apomíticos que amplificaram as quatro marcas e os acessos sexuais que não amplificaram nenhuma das marcas, sendo corretamente fenotipados pelo uso dos quatro marcadores. Com essa abordagem, seria necessária a realização da microscopia ótica de interferência em apenas 18,7% da população, ou seja, em apenas 14 indivíduos da população, uma redução significativa das progênies a serem submetidas à clarificação dos ovários e do tempo para a fenotipagem do modo de reprodução.

As marcas demonstraram a segregação esperada da proporção mendeliana (1:1) na população A, indicativo de que é possível selecionar híbridos apomíticos utilizando esses marcadores. Com essa informação, os quatro marcadores foram amplificados na segunda população, nos 33 híbridos fenotipados DE, para verificar a segregação das marcas em uma população diferente daquela em que foram encontrados (Figura 9).

Segundo Alzate-Marin et al. (2005), devido ao fenômeno de recombinação, as regiões que circunvizinham o *locus* de interesse podem ser distintas, mesmo em

genótipos aparentados. Dessa forma, nem sempre um marcador encontrado em uma população se aplica a outra derivada de cruzamentos diferentes.

Nessa segunda população, 12 acessos são apomíticos e 21 são sexuais. No valor do Qui-quadrado (χ^2) de 2,44, a segregação de 1:1 esperada na herança da apomixia foi confirmada (Quadro 5).

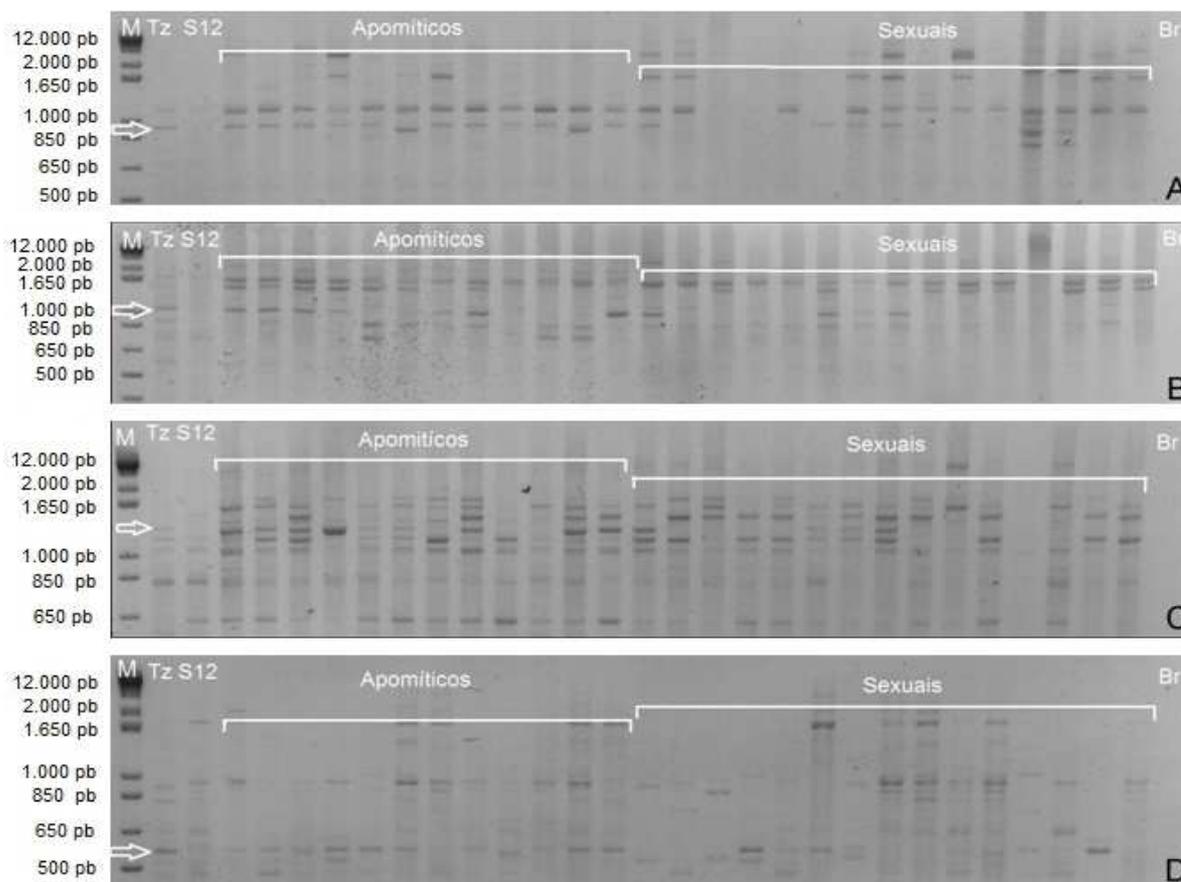


Figura 9 - Perfil de RAPD dos quatro marcadores com alguns híbridos da população DE. As setas apontam as marcas de interesse. (A) *Primer* A-01. (B) *Primer* OP01. (C) *Primer* OP16. (D) *Primer* U07. M = Marcador 1 Kb plus DNA Ladder, Tz = Cultivar Tanzânia, S12 = planta sexual S12, Apomíticos = híbridos apomíticos, Sexuais = híbridos sexuais, Br = amostra negativa.

Todas as marcas de interesse amplificadas confirmaram a segregação esperada, com exceção do *primer* OP16 ($\chi^2_{0.05} = 5,12$). Pelo teste do qui-quadrado (χ^2) as segregações foram confirmadas nos valores de $\chi^2_{0.05} = 1,61$ com o *primer* A01; $\chi^2_{0.05} = 0,27$ com o *primer* A-01; $\chi^2_{0.05} = 3,66$ para o *primer* OP01; e $\chi^2_{0.05} = 0,27$ para o *primer* U07 (Quadro 5).

Quadro 5 - Análise por qui-quadrado (χ^2) da segregação fenotípica da população DE e dos marcadores RAPD de interesse (arrumado, ele é um símbolo, isso acontece quando muda a fonte)

Reprodução	Proporção observada		Teste qui-quadrado (χ^2)	
	Apomítica	Sexual	Segregação	χ^2
Avaliação fenotípica	12	21	1:1	2,44 ^{ns}
Marcador	Apomítica	Sexual	Segregação	χ^2
A01	15	18	1:1	0,27 ^{ns}
OP 01	11	22	1:1	3,66 ^{ns}
OP 16	10	23	1:1	5,12 ^s
U07	15	18	1:1	0,27 ^{ns}

ns= não significativo ao nível de $p < 0,05$ de probabilidade.

s= significativo ao nível de $p < 0,05$ de probabilidade.

A distorção de segregação apresentada pelo *primer* OP16 possivelmente aconteceu, pois o número de indivíduos na população DE é pequeno. Embora a segregação de 1:1 tenha sido rejeitada, a co-segregação dessa marca em relação à avaliação fenotípica foi aceita. O teste do qui-quadrado é utilizado com a finalidade de testar a hipótese nula de segregação. De acordo com Sanglard e Melo (2011), quando são detectadas distorções de segregação, essas podem ter uma base genética ou ser apenas um reflexo de uma amostra pequena de indivíduos genotipados.

Nas duas populações, a marca mais próxima ao *locus* da apomixia foi a PM_A01, distante em 12,0 cM na população A (Quadro 4), e em 9,1 cM na população DE (Quadro 6). Zorzatto et al. (2010) encontrou uma marca RAPD a 4,61 cM do *locus* da apomixia em *B. humidicola*. Essa marca foi convertida em um marcador SCAR que foi testado em *P. maximum*, porém não amplificou bandas.

No Japão, em *P. maximum*, Ebina et al. (2005) utilizaram marcadores para o polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e RAPD em busca de marcas que co-segregassem com aposporia, porém apenas nove marcadores AFLP foram encontrados na distância de 1,4 cM a 4.2 cM do *locus* da aposporia.

No mapa de ligação (Figura 10), um dos critérios foi o $LOD \geq 3$, o qual determina que a possibilidade de ligação da marca com o *locus* de interesse seja mil vezes maior que o de segregação independente. Admitir valores abaixo de 3 pode gerar espúrias nos resultados. Ambos, PM_16 e Pm_U07, apresentaram $LOD < 3$ e por esse motivo não foram utilizados pelo programa Gqmol 1.0.0 (Cruz e Schuster,

2007) na obtenção do mapa de ligação na população DE. Segundo Schuster e Cruz (2004), um grande número de marcadores não ligados é sinal de amostragem insuficiente de indivíduos, por não conter uma amostra suficientemente grande de eventos meióticos. Outro fator a ser considerado é o tipo de marcador. Os marcadores dominantes, como o RAPD, levam a um menor LOD.

Quadro 6 - Estimativas das distâncias entre cada marca e o Apo *locus* na população DE junto com a função de Kosambi e o LOD score obtidos pelo programa GQMOL 1.0.0 (Cruz e Schuster, 2007)

Marcadores	Distância (cM)	Kosambi	LOD
PM_A01	9,1	9,20	5,5
PM_01	15,6	16,13	3,60
PM_16	24,3	26,54	1,99
PM_U07	27,2	30,49	1,53

As eficiências de seleção também foram calculadas para a população DE, apresentando resultados semelhantes aos encontrados na população A. As eficiências de seleção nessa segunda população variaram de 90% a 72,2% (Quadro 7). Assim como na população A, a marca PM_A01 foi a que apresentou maior eficiência de seleção, com 90%. A marca PM_01 teve uma eficiência de seleção de 84,8%; a marca PM_16 apresentou 75,7%; e a marca PM_U07 apresentou 72,2% de eficiência.

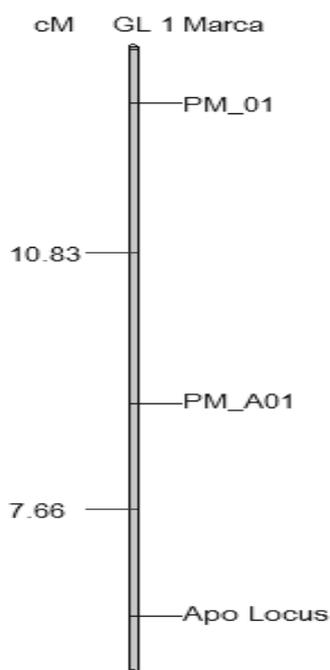


Figura 10 - Mapa de ligação com indicação do posicionamento do *locus* da apomixia, em relação às marcas, na população DE.

Nessa população, a eficiência de seleção do uso das quatro marcas juntos foi de 77%, evidenciando que os híbridos com as quatro bandas são apomíticos e os híbridos sem nenhuma das quatro bandas são sexuais. Dessa forma, levando-se em conta a porcentagem de eficiência, a realização da microscopia de contraste de interferência seria necessária para confirmar o modo de reprodução em apenas 23% da população, ou seja, em 8 híbridos.

Quadro 7 - Eficiência de seleção das marcas ligadas ao gene *Apo locus* na população DE

Marcas	Plantas apomíticas selecionadas	Eficiência de seleção (%)
PM_A01	12	90%
PM_01	9	84,8%
PM_16	7	75,7%
PM_U07	9	72,2%

Em relação aos 22 acessos apomíticos e os quatorze acessos sexuais do banco de germoplasma, os dados de amplificação encontram-se descritos no Quadro 8.

Com as informações de amplificação, é possível selecionar acessos apomíticos com um ou mais marcas e sexuais sem as marcas dos apomíticos para a realização de futuros cruzamentos. Dessa forma, os marcadores moleculares que amplificam as marcas de interesse podem ser utilizados na identificação do modo de reprodução de suas progênies. É recomendável primeiramente pré selecionar a fenotipagem do modo de reprodução dos híbridos com o uso do *primer* OP A-01 que apresentou a maior eficiência de seleção e utilizar um segundo marcador para confirmar o modo de reprodução.

Os marcadores RAPD apresentam inúmeras vantagens, mas possuem baixa reprodutibilidade, sendo sensíveis a alterações nas condições de amplificação (Ferreira e Grattapaglia, 1998). O recomendável é que convertam os marcadores RAPD de interesse em marcadores do tipo SCAR, que amplificam regiões específicas do DNA genômico e possuem maior especificidade e repetibilidade (Paran e Michelmore, 1993).

Quadro 8 - Relação dos acessos apomíticos e sexuais do banco de germoplasma que amplificam as marcas de interesse

Marcas	Apomíticos	Sexuais
PM_A01, PM_01, PM_16 e PM_U07	Tanzânia, T91, T95, T108 e KK8	S14
PM_A01, PM_01 e PM_16	T97, T200 e K191	-
PM_01, PM_16 e PM_U07	KK33	-
PM_A01, PM_16 e PM_U07	T84	-
PM_A01, PM_01 e PM_U07	-	S19
PM_A01 e PM_16	T60	S11
PM_01 e PM_16	T24, T62 e T72	-
PM_01 e PM_U07	-	S7 e S23
PM_A01 e PM_U07	T21	S9
PM_A01	T110, T77 e T46	S17 e S18
PM_16	-	S15
PM_U07	T68	S20
Nenhuma	Mombaça, K187B, K193 e K249	S8, S10, S12, S13 e S20

Marcadores SCARs ligados à determinação do sexo foram desenvolvidos com sucesso a partir de fragmento de RAPD em *Pistacia vera* (Hormaza et al., 1994), *Asparagus officinalis* L. (Jiang e Sink, 1997), *Actinidia chinensis* (Gill et al., 1998), *Cannabis sativa* (Mandolino et al., 1999), *Eucommia ulmoides* (Xu et al., 2004), *Rumex nivialis* (Stehlik e Blantner, 2004) e *Ginkgo biloba* L. (Liao et al., 2009). Em gramíneas, também foram desenvolvidos SCARs ligados à aposporia em *P. squamulatum* (Ozias-Akins et al., 1998), *P. simplex* (Pupilli et al., 2001; Calderini et al., 2010), *P. pratensis* L. (Albertini et al., 2001), *C. ciliaris* L. (Dwivedi et al., 2007; Yadav et al., 2012).

Portanto, a próxima etapa será converter esses marcadores RAPDs em marcadores SCAR e testar a sua transferibilidade dentro da espécie *P. maximum* e em outras espécies forrageiras de interesse econômico. Estudos recentes têm demonstrado regiões cromossômicas com sintonia entre diferentes espécies da família Poaceae. A transferibilidade desses marcadores será de extrema relevância aos programas de melhoramento, permitindo a identificação da apomixia rapidamente.

Pessino et al. (1998) reportou dois marcadores AFLP ligados à apomixia em híbridos de *B. ruziziensis* e com a mesma região bem conservada em arroz (*Oryza sativa*) e milho (*Zea mays*).

Em *P. notatum*, a região controladora da aposporia apresentou sintonia com

regiões dos cromossomos 2 e 12 de *O. sativa* (Pupilli et al., 2004). Resultados semelhantes foram encontrados em *P. simplex* e *P. malacophyllum* em relação ao cromossomo 12 (Pupilli et al., 2001; Pupilli et al., 2004). Ainda com *O. sativa*, os apomíticos de *P. squamulatum* e *C. ciliaris* apresentaram um segmento específico da aposporia presente no cromossomo 11 de arroz (Gualtieri et al., 2006).

5. CONCLUSÕES

a) Quatro marcas avaliadas estão ligadas à apomixia em *P. maximum*, apresentando frequências de recombinação menores que 30% em relação ao *locus* da apomixia. As quatro marcas aparecem ligadas na população A e apenas duas delas na população DE.

b) As marcas individuais ou em conjunto podem ser utilizados com alta eficiência na seleção dos híbridos apomíticos nas duas progênes.

c) A análise do germoplasma revela que esses marcadores podem ser também validados em outras progênes, oriundas de diferentes parentais apomíticos que apresentem pelo menos uma marca, e de progênes sexuais sem as marcas.

d) Para uso em outras populações de *P. maximum*, esses marcadores devem ser validados conforme foi realizado neste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNES, D.C.; CHIARI, L.; JANK, L.; LEGUIZAMÓN, G.O.C. Identificação de quatro marcadores moleculares potencialmente ligados à apomixia em *Panicum maximum* Jacq. In: III INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE BREEDING. Bonito, 2011. **Proceedings...** Bonito: Embrapa Gado de Corte. CD-ROM.

ALBERTINI, E.; BARCACCIA, G.; PORCEDDU, A.; SORBOLINI, S.; FALCINELLI, M. Mode of reproduction is detected by Parth 1 and Sex1 SCAR markers in a wide range of facultative apomictic Kentucky bluegrass varieties. **Molecular Breeding**, 7:293-300, 2001.

ALBERTINI, E.; MARCONI, G.; BARCACCIA, G.; RAGGI, L.; FALCINELLI, M. Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis* L. **Plant Molecular Biology**, 56:879-894, 2004.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, 30:333-342, 2005.

ARAÚJO, A.C.; FALCÃO, R.; SIMÕES, K.C.; CARNEIRO, V.T.C. **Identificação de acessos de *Brachiaria* com interesse ao estudo da apomixia facultativa**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 29p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 74).

ASKER, S.E.; JERLING, L. **Apomixis in Plants**. London: CRC Press, Boca Raton Ann Arbor, 1992. 298p.

BARCACCIA, G.; BAUMLEIN, H.; SHARBEL, T.F. Apomixis in St. John's wort: an overview and glimpse towards the future. In: HORANDL, E.; GROSSNIKLAUS, U.; VAN DIJK, P.; SHARBEL, T.F. (eds.) **Apomixis: Evolution, mechanisms and perspectives**. Vienna: International Association of Plant Taxonomy. Koeltz Scientific Books, 2007. p. 259–280.

BARCACCIA, G.; MAZZUCATO, A.; ALBERTINI, E.; ZETHOF, J.; PEZZOTTI, M.;

GERATS, A.; FALCINELLI, M. Inheritance of parthenogenesis in *Poa pratensis* L.: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. **Theoretical and Applied Genetics**, 97:74–82, 1998.

BASHAW, E.C. Apomixis and its application in crop improvement. In: FEHR, W.R.; HADLEY, H.H. **Hybridization of crop plants**. Madison: American Society of Agronomy and Crop Science Society of America Publ., 1980. p. 45-63.

BERALDO, A.L.A.; COLOMBO, C.A.; CHIORATO, A.F.; FUMILOITO, M.; CARBONELL, S.A.M. Aplicação de marcadores SCARs para seleção de linhagens resistentes à antracnose em feijoeiro. **Bragantia**, 68:53-61, 2009.

BHAT, V.; DWIVEDI, K.K.; KHURANA, J.P.; SOPORY, S.K. Apomixis: An enigma with potential applications. **Current Science**, 89:1879-1893, 2005.

BOGDAN, A.V. *Panicum maximum*. In: BOGDAN, A.V. **Tropical pasture and fodder plants**. London: Longman, 1977. p. 181-191.

BONATO, A.L.V.; VALLE, C.B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S.; LEGUIZAMON, G. O.C. **Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum maximum***. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4p. (Comunicado Técnico, 79).

CALDERINI, O.; DONNISON, I.; POLEGRI, L.; PANAGRA, F.; THOMAS, A.; ARCIONI, S.; PUPILLI, F. Partial isolation of genomic region linked with apomixis in *Paspalum simplex*. **Molecular Breeding**, 28:265-276, 2010.

CARMAN, J.G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory and polyembryony. **Biological Journal of the Linnean Society**, 61:51–9, 1997.

CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, 61:89-100, 2002.

CARNEIRO, V.T.C.; DUSI, D.M.A. Apomixia: Em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 25:36-42, 2002.

CHEN, L.; MIYAZAKI, C.; KOJIMA, A.; SAITO, A.; ADACHI, T. Isolation and

characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic Guinea Grass (*Panicum maximum*). **Journal of Plant Physiology**, 154:55-62, 1999.

CHIARI, L.; CANÇADO, L.J. Marcadores genéticos no melhoramento de forrageiras. In: RESENDE, R.M.S.; VALLE, C.B.; JANK, L. (eds.) **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008. p. 163-193.

CHIARI, L.; RESENDE, R.M.S.; JANK, L.; VALLE, C.B.; JUNGSMANN, L. **A biotecnologia nos programas de melhoramento de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2007. 33p. (Comunicado Técnico).

COMBES, D. **Polymorphisme et modes de reproduction dans la section dès Maximae du genre *Panicum* (Graminées) em Afrique**. Paris: Orstom, 1975. 99p.

COMBES, D.; PERNÈS, J. Variations dans le nombres chromosomiques du *Panicum maximum* Jacq. en relation avec le mode de reproduction. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Séries D.**, 270:782-785, 1970.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **QQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 1.0.0. Viçosa: UFV, 2007.

DARRIGUES, A.; DAUB, J.; MCCORD, K.; RASMUSSENS, C.; ROUSE, J. **Genetic analysis of apomixis**. Disponível em: < <http://www.public.iastate.edu/~mbhattac/bhattacharyya/Genetics.pdf>>. Acesso em: 15, novembro, 2012.

DWIVEDI, K. K.; BHAT, S. R.; BHAT, V.; BHAT, B. V.; GUPTA, M. G. Identification of a SCAR marker linked to apomixis in buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) **Plant Science**, 172:788-795, 2007.

EBINA, M.; NAKAGAWA, H.; YAMAMOTO, T.; ARAYA, H.; TSURUTA, I.; TAKAHARA, M.; NAKAJIMA, K. Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). **Grassland Science**, 51:71-78, 2005.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; SGHUSTER, I.; CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P. I.; BROMMONSHENKEL, S.H.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 28:59-63, 2003.

FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S.C.K. (ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 3-15.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220p.

GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Apomixia: um método alternativo para a produção de sementes em plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, 6:157-170, 2000.

GILL, G.P.; HARVEY, C.F.; GARDNER, R.C.; FRASER, L.G. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*. **Theoretical and Applied Genetics**, 97:439–445, 1998.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. Cold Spring Harbor Symp. **Quantitative Biology**, 39:439-446, 1974.

GUALTIERI, G.; CONNER, J. A.; MORISHIGE, D.T.; MOORE, D.; MULLET, J.E.; OZIAS-AKINS, P. A Segment of the Apospory-specific genomic region is highly microsyntenic not only between the apomicts *Pennisetum squamulatum* and Buffelgrass, but also with a Rice chromosome 11 Centromeric-proximal genomic region. **Plant Physiology**, 140:963-971, 2006.

GUGLIERI, A.; LONGHI-WAGNER, H.M.; ZULOAGA, F.O. *Panicum* L. subg. *Panicum* sect. *Panicum* (Poaceae) no Brasil. **Hoehnea**, 33:185-217, 2006.

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

HORMAZA, J.I.; DOLLO, L.; POLITO, V.S. Identification of a RAPD marker linked to

sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, 89:9-13, 1994.

JANK, L. Melhoramento e seleção de variedades de *Panicum maximum*. In: XII SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM. Piracicaba 1995, **Resumos...** Piracicaba: FEALQ, 1995. p. 21-58.

JANK, L.; RESENDE, R.M.S.; VALLE, C.B.; RESENDE, M.D.V.; CHIARI, L.; CANÇADO, L.J.; SIMIONI, C. Melhoramento genético de *Panicum maximum*. In: RESENDE, R.M.S.; VALLE, C.B.; JANK, L. (eds.) **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008. p. 55-87.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, 314:67-73, 1985.

JIANG. C.; SINK, K.C. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus. **Euphytica**, 94:329–333, 1997.

KARAM, D.; SILVA, J.A.A.; MAGALHÃES, P.C.; OLIVEIRA, M.F.; MOURÃO, S.A. **Manejo das forrageiras dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum* consorciadas com o milho em sistemas de Integração Lavoura-Pecuária**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 7p. (Comunicado Técnico, 130).

KARASAWA, M.M.G.; DORNELAS, M.G.; ARAÚJO, A.C.G.; OLIVEIRA, G.C.X. Biologia e genética dos sistemas reprodutivos. In: KARASAWA, M.M.G. (org.) **Diversidade reprodutiva de plantas: Uma perspectiva evolutiva e bases genéticas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2009. p. 26-47.

KARIA, C.T.; DUARTE, J.B.; ARAÚJO, A.C.G. **Desenvolvimento de cultivares do Gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. 58p. (Comunicado Técnico).

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

KRUGLYAK, L. The use of a map of biallelic markers in linkage studies. **Nature genetics**, 17:21-24, 1997.

LABOMBARDA, P.; BUSTI, A.; CACERES, M.E.; QUARIN, C.L.; PUPILLI, F.; ARCIONI, S. An AFLP marker tightly linked to apomixis reveals hemizygoty in a portion of the apomixis-controlling *locus* in *Paspalum simplex*. **Genome**, 45:513-519, 2002.

LACANALLO, G.F. **Identificação e mapeamento de marcador RAPD associado ao gene Co-13 de resistência à antracnose em feijoeiro comum**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 2008. 58p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

LASPINA, M.V.; VEGA, T.; SEIJO, J.G.; GONZÁLES, A.M.; MARTELOTTO, L.G.; STEIN, J.; PODIO, M.; ORTIZ, J.P.A.; ECHENIQUE, V.C.; QUARIN, C.L.; PESSINO, S.C. Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. **Plant Molecular Biology**, 67:615-628, 2008.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, 55:265-343, 1995.

LIAO, L.; LIU, J.; DAI, Y.; LI, Q.; XIE, M.; CHEN, Q.; YIN, H.; QIU, G.; LIU, X. Development and application of SCAR markers for sex identification in the dioecious species *Ginkgo biloba* L. **Euphytica**, 169:49-55, 2009.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac-muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44:397-401, 1989.

LIU, B.H. **Statistical genomics**. New York: CRC, 1998. 610p.

LOURENÇÃO, J.C. **Caracterização de uma região genômica relacionada a uma anomalia de viveiro em *Eucalyptus***. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. 2010. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Genética).

MANDOLINO, G.; CARBONI, A.; FORAPANI, S.; FAETI, V.; RANALLI, P. Identification of DNA markers linked to the male sex idioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 98:86-92, 1999.

MARTUSCELLO, J. **Repetibilidade e seleção em *Panicum maximum* Jacq.**

Viçosa: UFV. 2007. 111p. Tese (Doutorado em Zootecnia).

MATZK, F.; HAMMER, K.; SCHUBERT, I. Coevolution of apomixis and genome size within the genus *Hypericum*. **Sexual Plant Reproduction**, 16:51-58, 2003.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings National Academy of Science**, 88:9828-9832, 1991.

MILACH, S.C.K. **Marcadores de DNA em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.

MORGAN, T.H.; STURTEVANT, A.H.; MULLER, H.J.; BRIDGES C.B. **The mechanism of Mendelian heredity**. New York: Henry Holt and Company, 1915. 262p.

MUIR, J.P.; JANK, L. Guineagrass. In: SOLLENBERGER, L.E.; MOSER, L.E.; BURSON, B.L. (eds). **Warm-Season (C4) Grasses**: Madison: ASA, CSSA, SSSA, 2004, p. 589-621.

NAKAGAWA, H.; HANNA, W. Induced sexual tetraploids for breeding guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). **Journal of the Japanese Society of Grassland Science**, 38:152-158, 1992.

NOGLER, G.A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, B.M. **Embryology of Angiosperms**. Springer-Verlag, 1984. p. 475–518.

OTTO, S.P.; LENORMAND, T. Resolving the paradox of sex and recombination. **Nature Reviews Genetics**, 3:252-261, 2002.

OZIAS-AKINS, P.; LUBBERS, E.L.; HANNA, W.W.; MCNAY, J.W. Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:632–638, 1993.

OZIAS-AKINS, P.; ROCHE, D.; HANNA, W.W. Tight clustering and hemizygosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent *locus* that may have no allelic form in sexual

genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 95:5127-5132, 1998.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:985-993, 1993.

PESSIM, C.; PAGLIARINI, M.S.; JANK, L.; KANESHIMA, A.M.S.; BONATO, A.B.M. Meiotic behavior in *Panicum maximum* Jacq. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae): hybrids and their genitors. **Acta Scientiarum Agronomy**, 32:417-422, 2010.

PESSINO, S.C.; EVANS, C.; ORTIZ, J.P.A.; ARMSTEAD, I.; VALLE, C.B.; HAYWARD, M.D. A genetic map of the apospory-region in Brachiaria hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. **Hereditas**, 128:153-158, 1998.

PESSINO, S.C.; ORTIZ, J.P.A.; LEBLANC, O.; VALLE, C.B.; HAYWARD, M.D. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. **Theoretical and Applied Genetics**, 94:439-444, 1997.

PITRAT, M. Gene list for melon. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, 25:76-93, 2002.

PUPILLI, F.; BUSTI, A.; QUARIN, C.L.; ARCIONI, S. The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. **Molecular Breeding**, 8:53-61, 2001.

PUPILLI, F.; MARTINEZ, E.J.; BUSTI, A.; CALDERINI, O.; QUARIN, C.L.; ARCIONI, S. Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. **Molecular Genetic Genomics**, 270:539-548, 2004.

QUADROS, D.G. **Sistemas de produção de bovinos de Corte**. Disponível em:> http://www.neppa.uneb.br/textos/publicacoes/cursos/sistemas_producao_gado_corte.pdf>. Acesso em: 01, outubro, 2012.

REBOZZIO, R.M.; RODRÍGUEZ, M.P.; STEIN, J.; ORTIZ, J.P.A.; QUARIN, C.L.; ESPINOZA, F. Validation of molecular markers linked to apomixis in tetraploid races

of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. **Molecular Breeding**, 29:189-198, 2012.

SALGADO, C.C. **Integração de mapas genéticos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008. 142p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento).

SANGLARD, D.A.; MELO, G.G. **Construção de mapas genéticos**: Uma das Aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares. Disponível em: <http://cdsa.ufcg.edu.br/portal/outras_paginas/artigos/Construcao_Mapas_Geneticos_Contexto_Marcadores_Moleculares.pdf>. Acesso em: 23, novembro, 2012.

SAVIDAN, Y.H. Genetics and Utilization of Apomixis for the Improvement of Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). In: XIV INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS. Boulder, 1983. **Resumos...** Boulder: Westview, 1983, p. 182-184, 1983.

SAVIDAN, Y.H. Apomixis: genetics and breeding. **Plant Breeding Reviews**, 18:10-86, 2000.

SAVIDAN, Y.H.; JANK, L.; COSTA, J.C.G.; VALLE, C.B. Breeding *Panicum maximum* in Brazil: Genetic resources, modes of reproduction and breeding procedures. **Euphytica**, 41:107-112, 1989.

SCHALLAU, A.; ARZENTON, F.; JOHNSTON, A.J.; HAHNEL, U.; KOSZEGI, D.; BLATTNER, F.R.; ALTSCHMIED, L.; HABERER, G.; BARCACCIA, G.; BAUMLEIN, H. Identification and genetic analysis of the AOSPORY *locus* in *Hypericum perforatum* L. **Plant Journal**, 62:773-784, 2010.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: UFV, 2004. 568p.

SILVA, M.F.; SCHUSTER, I.; SILVA, J.F.V.; FERREIRA, A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Validation of microsatellite markers for assisted selection of soybean resistance to cyst nematode races 3 and 14. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42:1143-1150, 2007.

SINGH, R.J. **Plant Cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 463p.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 939-965.

STEHLIK, I.; BLANTNER, F.R. Sex-specific SCAR markers in the dioecious plant *Rumex nivalis* (Polygonaceae) and implications for the evolution of sex chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, 108:238-242, 2004.

STEIN, J.; PESSINO, S.C.; MARTÍNEZ, E.J.; RODRIGUEZ, M.P.; SIENA, L.A.; QUARIN, C.L.; ORTIZ, J.P.A. A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flugge (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. **Molecular Breeding**, 20:153-166, 2007.

TANKSLEY, S.D.; GRANDILLO, S.; FULTON, T.M.; ZAMIR, D.; ESHED, Y.; PETIARD, V.; LOPEZ, J.; BECKBUNN, T. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. **Theoretical and Applied Genetics**, 92:213-224, 1996.

TOOJINDA, T.; BAIRD, E.; BOOTH, A.; BROERS, L.; HAYES, P.; POWELL, W.; THOMAS, W.; VIVAR, H.; YOUNG, G. Introgression of quantitative trait *loci* (QTLs) determining stripe rust resistance in barley: an example of marker-assisted line development with limited resources. **Theoretical and Applied Genetics**, 96:123-131, 1998.

VALDÉS-REYNA, J.; ZULOAGA, F.O.; MORRONE, O.; ARAGÓN, L. El género *Panicum* (Poaceae: Panicoideae) en El Noroeste de México. **Boletín de La Sociedad Botánica de México**, 84:59-84, 2009.

VALLE, C.B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Ceres**, 56:460-472, 2009.

VALLE, E.R.; LIMA, A.A.; ESCALANTE, A.V.; CESCINETTO, A.O.; DACAL, E.M.R.S.; COSTA, F.P.; FIFLIOLINI, H.J.; SANTOS, H.J.; BANDINI, O. Formação e Manejo de pastagens. In: VALLE, E.R. (ed.). **Boas práticas agropecuárias: Gado de Corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2007. p. 37-39.

VALLS, J.F.M.; PEÑALOZA, A.P. Recursos genéticos de gramíneas forrageiras para

a pecuária. In: 41º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Campo Grande, 2004. **Resumos...** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2004. CD-ROM.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 18:7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990.

XU, W.J.; WANG, B.W.; CUI, K.M. RAPD and SCAR markers linked to sex determination in *Eucommia ulmoides* Oliv. **Euphytica**, 136:233–238, 2004.

YADAV, C.B.; ANUJ; KUMAR, S.; GUPTA, M.G.; BHAT, V. Genetic linkage maps of the chromosomal regions associated with apomictic and sexual modes of reproduction in *Cenchrus ciliaris*. **Molecular Breeding**, 30:239-250, 2012.

ZABEAU, M.; VOS, P. **Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting**. European Patent Application, Publication 0534858-A1, bulletin 93/13, Office européen des brevets, Paris, 1993.

ZACCARO, R.P.; CARARETO-ALVES, L.M.; TRANSOLO, R.F.; WICKERT, E.; LEMOS, E.G.M. Utilização de marcador molecular SCAR na identificação de *Fusarium subglutians*, agente causal da malformação da mangueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 29:563-570, 2007.

ZORZATTO, C. **Prospecção de marcadores moleculares RAPD e SSR ligados à apomixia em *Brachiaria humidicola***. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2008. 69p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento).

ZORZATTO, C.; CHIARI, L.; BITENCOURT, G.A.; VALLE, C.B.; LEGUIZAMÓN, G. O.C.; SCHUSTER, I.; PAGLIARINI, M.S. Identification of molecular marker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Plant Breeding**, 129:734-736, 2010.