

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

KELLY DOS SANTOS PEDROSO

**OTIMIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DE UM MARCADOR SCAR LIGADO A
A POMIXIA PARA SELEÇÃO PRECOCE EM HÍBRIDOS DE *UROCHLOA* SSP.
(POACEAE)**

CAMPO GRANDE

2022

KELLY DOS SANTOS PEDROSO

**OTIMIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DE UM MARCADOR SCAR LIGADO A
A POMIXIA PARA SELEÇÃO PRECOCE EM HÍBRIDOS DE *UROCHLOA* SSP.
(POACEAE)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado à Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Dra. Aline Pedroso Lorenz

Coorientadora: Dra. Andréa Raposo

CAMPO GRANDE

2022

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Aline Pedroso Lorenz, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos;

À Dra. Andrea Raposo, pela oportunidade, orientação e apoio na condução deste trabalho;

À Dra. Mariane Mendonça Vilela, pelo suporte e ensinamentos passados;

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela oportunidade de fazer o curso;

À Embrapa Gado de Corte, pela oportunidade de pesquisa e estrutura oferecida;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa;

À Unipasto (Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras), pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

O Brasil, seguido da China, possui o maior rebanho bovino mundial com aproximadamente 226 milhões de cabeças de gado. As gramíneas do gênero *Urochloa* são oriundas da África e são as mais utilizadas em solos brasileiros para a alimentação do gado devido a sua resistência ao pisoteio, facilidade de dispersão e reprodução e alto valor nutritivo. Para atender a elevada demanda agropastoril, torna-se de suma importância o melhoramento genético desta forrageira. Este é realizado através do cruzamento de genótipos sexuais com apomíticos, seguido da seleção de híbridos apomíticos na F1. Plantas com reprodução apomítica geram clones, desta forma, assegura-se que a característica de interesse seja fixada para o lançamento de novas cultivares. A utilização de marcadores moleculares para identificação de características de interesse é conhecida como SAM (seleção assistida por marcadores moleculares). Esses marcadores permitem a seleção precoce dos híbridos apomíticos gerados, proporcionando maior eficiência no programa de melhoramento, reduzindo custos e tempo no processo de seleção. Neste trabalho, objetivou-se otimizar a amplificação de um marcador SCAR ("Sequence-Characterized Amplified Region") p779/p780, uma região cromossômica ligada à aposporia, denominada região genômica específica apospórica (ASGR). Dois tipos de PCR (Reação em cadeia da polimerase) foram avaliadas, tradicional e *touchdown*. Para isso, avaliou-se os resultados com temperaturas de anelamento de 56 a 57°C na PCR tradicional e de 60 a 56°C e 61 a 57°C na PCR *touchdown*. Os resultados mostraram que o melhor parâmetro da PCR para o marcador SCAR p779/p780 foi a PCR *touchdown* a de 61 a 57°C. Das 43 plantas testadas, esse marcador foi eficiente para identificar o tipo de reprodução (sexual ou apomítica) em 95% delas, sendo, portanto, uma promissora ferramenta para a identificação precoce de híbridos apomíticos de *Urochloa* ssp.

PALAVRAS CHAVES: Apomixia, forrageiras, marcadores moleculares, PCR, *Urochloa*.

ABSTRACT: Brazil, followed by China, has the world's largest cattle herd, with approximately 226 million heads of cattle. Grasses of the genus *Urochloa*, from Africa, are the most forage used in Brazilian soils for cattle feed due to their resistance to trampling, ease of dispersion and reproduction, and high nutritional value. To supply the high agropastoral demand, the genetic improvement of this forage becomes extremely important. Genetic improvement can be achieved by crossing sexual with apomictic genotypes and selecting apomictic hybrids in F1. Plants with apomictic reproduction generated clones, thus ensuring that the characteristic of interest is fixed for the launch of new cultivars. The use of molecular markers to identify traits of interest is known as SAM (molecular marker-assisted selection). These markers allow the previous selection of the generated apomictic hybrids, providing greater efficiency in the breeding program, assistance, and time in the selection process. The objective of this work was to optimize the amplification of a SCAR marker ("Sequence-Characterized Amplified Region") p779/p780, a chromosomal region linked to apospory, called aposporic specific genomic region (ASGR). Two types of PCR (Polymerase Chain Reaction) were evaluated, traditional and *touchdown*. We evaluated the results of traditional PCR with annealing temperatures of 56°C and 57°C and touchdown PCR with annealing temperatures of 60 to 56°C and 61 to 57°C. The results revealed that the best PCR products were obtained with the 61 to 57°C touchdown PCR. Of the 43 plants tested, this marker efficiently identified the type of reproduction (sexual or apomictic) in 95% of them, being, therefore, a promising tool for the precocious identification of apomictic *Urochloa* ssp. hybrids.

KEY WORDS: Apomixis, foragers, molecular markers, PCR, *Urochloa*.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de carne bovina no mundo, ficando atrás apenas da China (IBGE, 2021). Sendo assim, é evidente a relevância do estudo e desenvolvimento de plantas forrageiras que além de serem utilizadas para formação de pastagens, delas são produzidas o feno, a silagem, a adubação verde e a biomassa para biocombustível. No mundo, as gramíneas mais utilizadas como pastagens nas regiões tropicais são as do gênero *Urochloa* P. Beauv. [syn. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.] e a espécie *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K. Simon & S.W.L. Jacobsas [syn. *Panicum maximum*], oriundas da África (DOMINGUES, 2009; LIMA; CUNHA, 2008). São gramíneas que resultam em maior produtividade animal, apresentam facilidade de cultivo, e ainda apresentam resistência a estresses bióticos e/ou abióticos específicos de cada região. Porém, o número de cultivares utilizados ainda é muito restrito, apesar da grande diversidade de espécies dentro desses gêneros, o que torna as pastagens brasileiras vulneráveis ao estresse biótico e abiótico (EMBRAPA, 2022). Conseqüentemente gera uma grande demanda para o desenvolvimento de novas cultivares via melhoramento genético (VALLE et al., 2009).

Nos gêneros *Urochloa* e *Megathyrsus* prevalece a reprodução por apomixia, onde a progênie possui o mesmo material genético da planta mãe (KUMAR, 2017). Sendo assim, nas estratégias de melhoramento de espécies apomíticas ocorre o cruzamento de um genitor sexual feminino com um genitor apomítico masculino. Após o cruzamento ocorre análise da progênie F1 para determinar o modo de reprodução da progênie gerada. Esta irá segregar (1:1) em sexuais e apomíticas. Se a característica desejada se encontrar na progênie apomítica, ela estará fixada, e as plantas com as características desejadas podem ser lançadas como novas cultivares (BARCACCIA; ALBERTINI, 2013).

A identificação do sistema reprodutivo destes híbridos gerados, tradicionalmente é realizada via análise de sacos embrionários ou com a utilização de descritores morfológicos em teste de progênie. Porém, o uso desses métodos apresenta limitações, pois sua avaliação só pode ser realizada na planta adulta (SILVA et al., 2005) (SILVA et al., 2005).

Já a utilização de marcadores moleculares permite que as análises sejam realizadas em sementes ou plântulas. Por ser um método relativamente novo, em

muitas espécies, ainda é necessário gerar protocolos para a utilização destes marcadores moleculares, mas eles têm se mostrado promissores em programas de melhoramento onde existe a necessidade de análise de um grande número de indivíduos (KUMAR et al., 2017).

Uma estratégia que permite identificar um indivíduo apomítico com maior agilidade e confiabilidade é a SAM (seleção assistida por marcadores moleculares) (BASTIANEL et al., 2006). Uma série de marcadores moleculares ligados a apomixia já foram desenvolvidos ou estão em processo de desenvolvimento para espécies do grupo das gramíneas (OZIAS-AKINS et al., 1998; DWIVEDI et al., 2007; ZORZATTO et al., 2010; BITENCOURT, et al., 2012; KUMAR, et al., 2017; DEO et al., 2020).

Entende-se por marcador molecular toda e qualquer característica presente no DNA que diferencia dois ou mais indivíduos e é herdada geneticamente (MILACH, 1998). Os marcadores moleculares detectam o polimorfismo diretamente ao nível de DNA, não sofrendo qualquer tipo de influência ambiental ou gênica e podem ser analisados em qualquer estágio de desenvolvimento do indivíduo (SOUZA, 2001; CAIXETA et al., 2009).

Os marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) são derivados dos marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), utilizando-se primers estendidos com sequências de aproximadamente 20 bases. (PARAN; MICHELMORE, 1993). Eles mantêm as características funcionais do marcador RAPD, possibilitando aumentar sua confiabilidade e também sua repetibilidade. São muito utilizados para a caracterização reprodutiva de gramíneas como foi comprovado por Calderini et al. (2011), Cidade et al. (2009; 2010; 2013) e Oliveira et al. (2016). O marcador é amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) e é analisado por meio de eletroforese em gel. A PCR convencional promove, *in vitro*, por meio de artifícios de variação de temperatura, o que o organismo realiza naturalmente, em condições fisiológicas – a duplicação de cadeias de DNA, envolvendo nucleotídeos, sequências iniciadoras (*primers*) e a enzima DNA polimerase. Assim, é possível a obtenção de muitas cópias de uma sequência específica de ácido nucleico, a partir de uma fita molde (KOLMODIN & BIRCH, 2002; KRAMER & COEN, 2001).

A amplificação por PCR é uma etapa essencial para acessar a variabilidade genética de diversos tipos de marcadores moleculares. Existem muitas variações da

técnica de PCR que buscam maximizar o sucesso da amplificação das amostras e modular a especificidade do processo. A PCR *touchdown* consiste em uma alteração no processo da PCR, na qual os primeiros ciclos são feitos com temperatura de anelamento mais altas que garantem que ocorra apenas o pareamento de bases mais específico entre o DNA-alvo e o primer, portanto, a primeira sequência a ser amplificada provavelmente será a sequência de interesse. Após, há a diminuição gradual da temperatura de anelamento, aumentando a eficiência da reação. As regiões que foram originalmente amplificadas durante os ciclos iniciais (altamente específicos) serão amplificadas ainda mais e competirão com qualquer amplificação não específica que possa ocorrer em temperaturas mais baixas. Desta forma tem-se aumento da especificidade, sensibilidade e rendimento da PCR (KORBIE & MATTICK, 2008).

O marcador SCAR P779/P780 está localizado entre o quarto e sétimo éxon da região ASGR-BBM-like2. Foi desenvolvido para identificar uma região cromossômica ligada à aposporia, denominada região genômica específica apospórica (ASGR) em *Cenchrus ciliaries* e *Pennisetum squamulatum* (AKIYAMA et al., 2011). Portanto, o objetivo deste estudo foi otimizar o protocolo de amplificação do marcador molecular SCAR p779/p780 ligado à apomixia, possibilitando um aumento na eficiência no programa de melhoramento dos indivíduos do gênero *Urochloa* spp. por permitir a identificação precoce do modo reprodutivo das progênies geradas.

MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental do projeto foi executada nas dependências da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande (MS). As plantas utilizadas para o estudo fazem parte do banco de germoplasma de populações base do melhoramento de *Urochloa* spp. e cultivares já lançadas. Todos os indivíduos deste estudo (Tabela 1) possuem o seu modo de reprodução conhecido através de estudos citoembriológicos, que foram realizados no Laboratório de Citogenética da Embrapa Gado de Corte e cedidos para a realização deste estudo.

Tabela 1. Indivíduos do gênero *Urochloa* utilizados neste estudo e seus respectivos modos de reprodução.

Acessos	Modo de reprodução
<i>U. decumbens</i> 1	APO
2	APO
3	APO
4	APO
5	APO
6	APO
7	APO
8	APO
9	SEX
10	SEX
11	SEX
12	SEX
13	SEX
14	SEX
15	SEX
16	SEX
17	SEX
18	SEX
19	SEX
Híbridos <i>U. ssp</i> 20	APO
21	APO
22	APO
23	APO
24	APO
25	SEX
26	SEX
27	SEX
28	SEX

APO = apomítico; SEX= sexual

Acessos	Modo de reprodução
Híbridos <i>U. ssp</i> 29	SEX
30	SEX
31	SEX
46	SEX
47	SEX
<i>U. ruzizensis</i> 32	APO
33	APO
34	APO
35	SEX
36	SEX
37	SEX
Cultivares	
38 Basilisk	APO
39 Marandu	APO
40 Piatã	APO
41 Ipyporã	APO
42 Paiaguas	APO
43 Xaraes	APO
44 Tupi	APO

O DNA genômico de folhas jovens de 43 indivíduos de *Urochloa ssp.* foi extraído usando o protocolo descrito por Bonato et al. (2002). Após extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm, tendo a pureza avaliada pela razão de leitura nos comprimentos de onda de 260/280 nm, e sua qualidade e concentração verificada em gel de agarose 0,8% com o uso do DNA fago λ como padrão em concentrações de 30 a 300 ng.

As análises de PCR foram realizadas utilizando os primers SCAR p779/p780 (5' TATGTCACGACAAGAATATG; 3' TGTAACCATAACTCTCAGCT) (Worthington et al., 2016), em um volume final de 15 μ L, contendo 2 ng/ μ L de DNA genômico; 1X

Tampão de PCR; 1,5 mM MgCl₂; 0,125 mM dNTPs; 0,5 μM *Primers Forward e Reverse*; 0,5 U* Taq DNA polimerase e água Milli-Q estéril.

As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), testando-se quatro protocolos diferentes (Tabelas 2 e 3). As variações na temperatura de anelamento (TA) testadas visaram a obtenção de bandas específicas claras e a ausência de bandas inespecíficas. Para isso, os seguintes parâmetros da PCR foram executados: PCR a 56 e 57°C (Tabela 2) e PCR *touchdown* de 60 a 56°C e 61 a 57°C (Tabela 3). Após a PCR, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (1,5 g de agarose; 100 ml TBE 1X - 93 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA), corado com Gel Red (1:1000), visualizados em luz UV no Gel Doc XR+ Bio Rad e, posteriormente, analisadas. A presença de uma banda de 900 a 950pb indicou que o indivíduo era apomítico e a ausência que era sexual.

Tabela 2. Especificações de temperatura, tempo e repetições da PCR convencional para o marcador SCAR P779/P780 com a variação na TA a 56 e a 57°C.

PCR convencional SCAR p779/p780 56°C		
Temperatura	Tempo	Repetição
Desnaturação		
94 °C	5 minutos	1X
Anelamento		
94 °C	30 segundos	
56 °C	30 segundos	30X
72 °C	60 segundos	
Extensão		
72 °C	10 minutos	1X
PCR convencional SCAR p779/p780 57°C		
Temperatura	Tempo	Repetição
Desnaturação		
94 °C	5 minutos	1X
Anelamento		
94 °C	30 segundos	
57 °C	30 segundos	30X
72 °C	60 segundos	
Extensão		
72 °C	10 minutos	1X

Tabela 3. Especificações de temperatura, tempo e repetições da PCR *touchdown* para o marcador SCAR p779/p780 com a variação na TA de 60 a 56°C e de 61 a 57°C.

PCR *touchdown* SCAR p779/p780 56°C

Temperatura	Tempo	Repetição
Desnaturação		
94 °C	5 minutos	1X
Anelamento		
94 °C	30 segundos	
60 °C	30 segundos	1X
72 °C	60 segundos	
94 °C	30 segundos	
59 °C	30 segundos	1X
72 °C	60 segundos	
94 °C	30 segundos	
58 °C	30 segundos	1X
72 °C	60 segundos	
94 °C	30 segundos	
57 °C	30 segundos	1X
72 °C	60 segundos	
94 °C	30 segundos	
56 °C	30 segundos	1X
72 °C	60 segundos	
94 °C	30 segundos	
56 °C	30 segundos	35X
72 °C	60 segundos	
Extensão		
72 °C	5 minutos	1X

PCR *touchdown* SCAR p779/p780 57°C

Temperatura	Tempo	Repetição
Desnaturação		
94 °C	5 minutos	1X
Anelamento		
94 °C	30 segundos	
61 °C	30 segundos	1X
72 °C	60 segundos	
94 °C	30 segundos	
60 °C	30 segundos	1X
72 °C	60 segundos	
94 °C	30 segundos	
59 °C	30 segundos	1X
72 °C	60 segundos	
94 °C	30 segundos	
58 °C	30 segundos	1X
72 °C	60 segundos	

94 °C	30 segundos	
57 °C	30 segundos	1X
72 °C	60 segundos	
94 °C	30 segundos	
57 °C	30 segundos	35X
72 °C	60 segundos	
Extensão		
72 °C	5 minutos	1X

Para verificar a Eficiência (E) do marcador para a detecção da apomixia foi utilizada a seguinte relação:

$$E = N_{coin}/NT$$

N_{coin} é o número de coincidência entre os resultados moleculares e o modo de reprodução já conhecido (por métodos citoembriológicos), e *NT* é o número total de indivíduos analisados.

RESULTADOS

Para otimização do marcador SCAR p779/ p780 foi realizado um teste preliminar com sete indivíduos nos quatro protocolos (Figura 1).

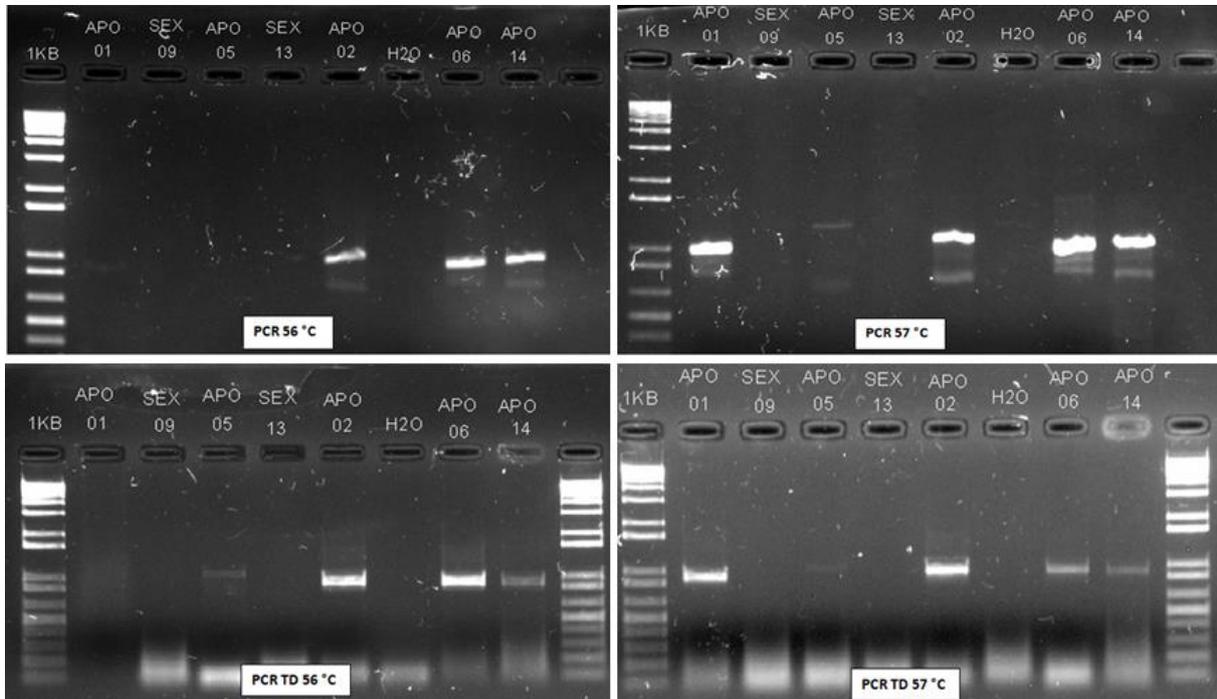


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,5% com produtos de PCR convencional (acima) e PCR *touchdown* (TD) testando o marcador SCAR p779/p780 em indivíduos apomíticos (APO) e sexuais (SEX)

Analisando as PCR convencionais, verifica-se que nas duas temperaturas testadas ocorreram bandas inespecíficas no gel. Com uma TA 56 °C não ocorreu amplificação esperada da banda em dois indivíduos apomíticos (01 e 05), já para as TA de 57°C observa-se que ocorreu amplificação dos mesmos. Agora observando as PCRs *touchdown*, verifica-se que não ocorreram bandas inespecíficas, e que na PCR com TA final de 56°C o indivíduo 01 não amplificou. A PCR *touchdown* com TA final de 57°C possibilitou amplificação de todos os indivíduos apomíticos sem a presença de bandas inespecíficas.

Após verificar quais as melhores condições de amplificação, foram realizadas PCRs *touchdown* com TA final de 57°C com o DNA de todos os indivíduos

selecionados para esse estudo para verificar a eficiência do marcador molecular SCAR p779/p780 (Figura 2). Comparando-se os resultados moleculares com os resultados fenotípicos, obtivemos uma eficiência de 95% na identificação dos indivíduos apomíticos.

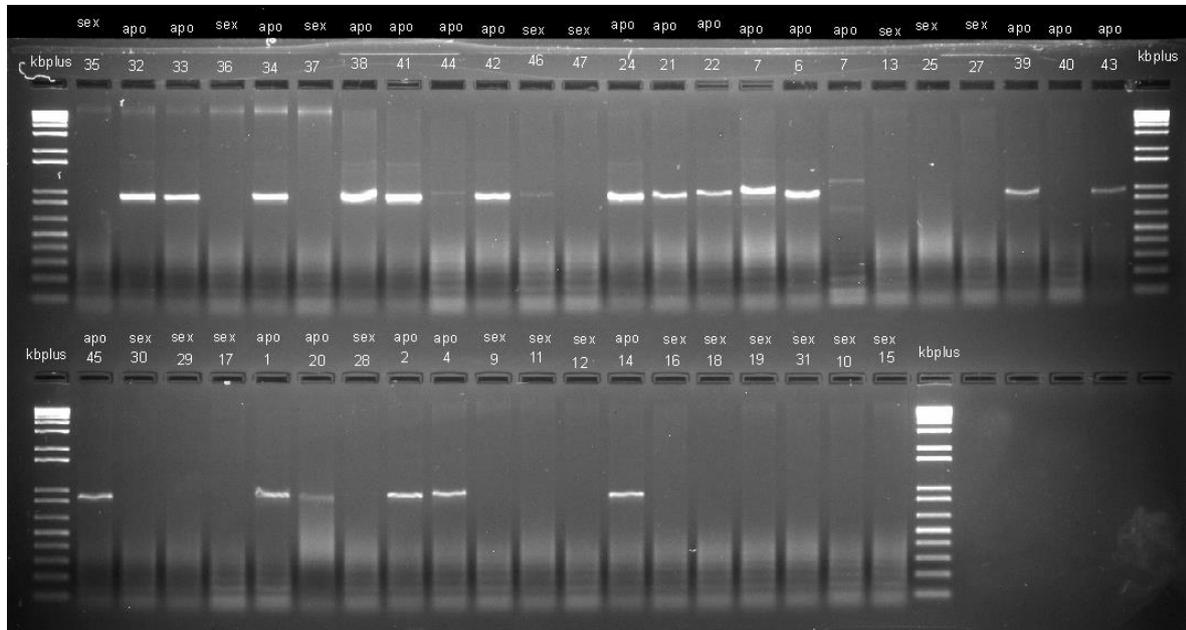


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % mostrando resultado de PCR *touchdown* com TA final de 57°C para testar o marcador SCAR p779/p780 em indivíduos de *Urochloa* spp., apomíticos (apo) e sexuais (sex).

DISCUSSÃO

Atualmente é possível encontrar uma série de marcadores moleculares ligados a apomixia que foram desenvolvidos e que estão em processo de desenvolvimento (OZIAS-AKINS et al., 1998; DWIVEDI et al., 2007; ZORZATTO et al., 2010; BITENCOURT, et al., 2012; KUMAR et al., 2017; DEO et al., 2020). Para unidades da Embrapa que trabalham com melhoramento genético de forrageiras, onde a identificação da apomixia é uma importante ferramenta para fixação de características para lançamento de novas cultivares, tornou-se extremamente necessário a melhoria da eficiência de alguns marcadores que já estão sendo usados, como por exemplo o SCAR p779/p780 que é usado pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).

Em um estudo realizado previamente pela Embrapa Gado de Corte foi constatada uma eficiência de 83% com o marcador molecular SCAR p779/p780. No estudo atual, com a PCR touchdown a 57°C obtivemos uma melhora de 12% na eficiência do marcador. Este marcador, juntamente com o SCAR N14, já vem sendo usado pelo CIAT para a identificação precoce de indivíduos apomíticos em híbridos de *Panicum* e *Urochloa*. Como já possuímos uma eficiência satisfatória (99%) para o marcador SCAR p779/ p780 em *Panicum*, objetivou-se atingir um número satisfatório para o uso em híbridos de *Urochloa* também.

Em outro estudo feito com a forrageira *Cenchrus ciliaris* L., foram utilizados três marcadores SCAR: OPF08-600, 19G e 20G, os quais amplificaram fragmentos de tamanho 600, 300 e 100pb respectivamente (Brandão, 2016). O marcador SCAR 20G nesse estudo, revelou que 97% (29 acessos) são apomíticos e 3 sexuais. Sendo assim, nota-se que marcadores SCARs a associados a apomixia em forrageiras vem sendo desenvolvidos para o uso no programa de melhoramento genético e apresentam bons resultados, assim como o SCAR p779/p780.

Além disso, ainda sobre o desenvolvimento de marcadores ligados a apomixia, sabe-se que o marcador SCAR4HS*, desenvolvido por Yadav et al. (2012) mostrou-se eficiente para identificação da apomixia em indivíduos de *C. ciliaris*. Em outro estudo de Araujo et. al. (2017) o marcador 4HS* também se mostrou eficiente em identificar genótipos sexuais no BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido.

Apesar do desenvolvimento de vários marcadores para identificação da apomixia, muitos são os desafios em relação a este tema, como mostra o estudo realizado por Gonçalves et. (2019), onde utilizaram-se 73 marcadores moleculares (1 p779/p780; 2 RAPD; 19 SCAR e 51 SSR) com potencial para identificação precoce de indivíduos apomíticos, para a análise em *Paspalum* spp. Porém nenhum desses marcadores apresentou ligação com apomixia utilizando a abordagem BSA (*Bulk Segregant Analysis*) nas espécies estudadas. Apesar de terem utilizado uma gramínea que apresenta certa similaridade na questão de ploidia com *Urochloa*, sendo também tetraplóides, o marcador p779/p780 mostrou-se eficiente apenas para os gêneros *Megathyrsus* e *Urochloa*.

CONCLUSÃO

A melhor PCR para o marcador molecular SCAR p779/p780 ligado a apomixia em híbridos de *Urochloa* spp. foi a PCR touchdown à 57°C, com uma eficiência de 95%. Com isso, foi possível o aumento da eficiência do SCAR p779/p780 para o uso na identificação precoce em híbridos de *Urochloa* spp. apomíticos, o que irá ser de grande ajuda para a otimização de tempo no programa de melhoramento de forrageiras, possibilitando o lançamento, num menor tempo, de cultivares que atenderão as necessidades dos produtores agropecuários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, Lucas Sampaio et al. **Identificação de genótipos apomíticos ou sexuais por meio de marcadores moleculares em acessos de capim-buffel.** 2017.
- BARCACCIA, Gianni; ALBERTINI, Emidio. **Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma.** Plant reproduction, v. 26, n. 3, p. 159-179, 2013.
- BASTIANEL, Marinês et al. **Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor'Murcott'avalida por fAFLP e RAPD.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, p. 779-784, 2006.
- DE ARAUJO BITENCOURT, Gislayne; CHIARI, Lucimara; DO VALLE, Cacilda Borges. **Avaliação de híbridos por meio de marcadores RAPD e identificação do modo de reprodução pela anatomia de sacos embrionários em *Brachiaria humidicola*.** Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde, v. 16, n. 2, 2012.
- BONATO, Ana Lidia Variani et al. **Extração de DNA genômico de *Stylosanthes* spp.** Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2002.
- BRANDÃO, Livia Pinto. **Caracterização molecular e citogenética de acessos de capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.).** 2016.
- CAIXETA, Eveline et al. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Org.). **Marcadores moleculares.** 2. ed. Viçosa: Editora Jard, v. 1, p. 11-101, 2009

- CALDERINI, Ornella et al. **Partial isolation of the genomic region linked with apomixis in *Paspalum simplex***. *Molecular Breeding*, v. 28, n. 2, p. 265-276, 2011.
- CIDADE, F. W. et al. **Isolation and characterization of microsatellite loci in *Paspalum notatum* Flüggé (Poaceae)**. *Conservation Genetics*, v. 10, n. 6, p. 1977-1980, 2009.
- CIDADE, F. W. et al. **Microsatellite loci for *Paspalum atratum* (Poaceae) and cross-amplification in other species**. *American Journal of Botany*, v. 97, n. 11, p. e107-e110, 2010.
- CIDADE, Fernanda W. et al. **Genetic variation in polyploid forage grass: Assessing the molecular genetic variability in the *Paspalum* genus**. *BMC genetics*, v. 14, n. 1, p. 1-19, 2013.
- DEO, Thamiris G. et al. **High-resolution linkage map with allele dosage allows the identification of regions governing complex traits and apospory in guinea grass (*Megathyrsus maximus*)**. *Frontiers in plant science*, v. 11, p. 15, 2020.
- DOMINGUES, J.L. **Uso de volumosos conservados na alimentação de equinos**. *R. Bras. Zootec.*, v.38, p.259-269, 2009.
- DWIVEDI, K. K. et al. **Identification of a SCAR marker linked to apomixis in buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.)**. *Plant Science*, v. 172, n. 4, p. 788-795, 2007.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Technologies. Cultivars. Embrapa's Brachiaria Cultivars*. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/cultivar/brachiaria>
- GONÇALVES, Tiago Maretti. **Modo reprodutivo de acessos de *Paspalum* spp.(grupo informal plicatula) e busca de marcadores moleculares associados a apomixia**. Embrapa Pecuária Sudeste-Tese/dissertação (ALICE), 2019.
- HOJSGAARD, D.H.; MARTÍNEZ, E.J.; QUARIN, C.L. **Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality**. *New Phytologist*, v. 197, p. 336-347, 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção **Pecuária: Primeiros resultados.** Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3087/epp_pr_2021_1tri.pdf>

KOLMODIN, L.A. & BIRCH, D.E. Polymerase chain reaction. **Basic principles and routine practice. Methods Mol. Biol.** 192, 3–18, 2002.

KORBIE, Darren J.; MATTICK, John S. **Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification.** Nature protocols, v. 3, n. 9, p. 1452-1456, 2008.

KRAMER, Martha F.; COEN, Donald M. **Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization.** Current protocols in molecular biology, v. 56, n. 1, p. 15.1. 1-15.1. 14, 2001.

KUMAR, S. **Epigenetic Control of Apomixis: A New Perspective of an Old Enigma.** Adv Plants Agric Res, v. 7, n. 1, p.243-247, 2017.

KUMAR, Suresh; SAXENA, Sheena; GUPTA, Madan G. **Marker-assisted screening of breeding populations of an apomictic grass *Cenchrus ciliaris* L. segregating for the mode of reproduction.** Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 17, p. 10-17, 2017.

LIMA, J.A. de; CUNHA, E.A. da **Produção de feno de capim-elefante em pequena escala.** 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/FenoElefante/index.htm>. Acesso em: 29/06/2022

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas.** Porto Alegre: UFRGS, p. 140, 1998.

OLIVEIRA, Fernanda A. et al. **First microsatellite markers for *Paspalum plicatulum* (Poaceae) characterization and cross-amplification in different *Paspalum* species of the *Plicatula* group.** BMC research notes, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2016.

OZIAS-AKINS, Peggy; ROCHE, Dominique; HANNA, Wayne W. **Tight clustering and hemizyosity 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, v. 95, n. 9, p. 5127-5132, 1998.

DA SILVA, Marlon Peres et al. **Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem.** Acta Scientiarum. Agronomy, v. 27, n. 3, p. 531-539, 2005.

SOUZA, AP de. **Biologia molecular aplicada ao melhoramento.** Recursos genéticos e melhoramento–plantas. Rondonópolis: Fundação MT, p. 939-965, 2001.

DO VALLE, Cacilda Borges; JANK, Liana; RESENDE, Rosangela Maria Simeão. **O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil.** Revista Ceres, v. 56, n. 4, p. 460-472, 2009.

WORTHINGTON, Margaret et al. **A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*.** Genetics, v. 203, n. 3, p. 1117-1132, 2016.

ZORZATTO, C. et al. **Identification of a molecular marker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae).** Plant breeding, v. 129, n. 6, p. 734-736, 2010.