

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**VALIDAÇÃO DO MARCADOR MOLECULAR p779/p780 PARA
A SELEÇÃO PRECOCE EM *Megathyrsus maximus***

Lucélia de Fátima Santos

Engenheira Agrônoma

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**VALIDAÇÃO DO MARCADOR MOLECULAR p779/p780
PARA A SELEÇÃO PRECOCE EM *Megathyrsus*
*maximus***

Discente: Lucélia de Fátima Santos

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro

Coorientador: Dr. Mateus Figueiredo Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

2021

S237v Santos, Lucélia de Fátima
Validação do marcador molecular p779/p780 para a seleção precoce em *Megathyrus maximus* / Lucélia de Fátima Santos. -- Jaboticabal, 2021
51 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Gustavo Vitti Môro
Coorientador: Mateus Figueiredo Santos

1. Melhoramento genético. 2. Marcadores genéticos. 3. Plantas forrageiras. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: VALIDAÇÃO DO MARCADOR MOLECULAR p779/p780 PARA A SELEÇÃO PRECOCE EM *Megathyrus maximus*

AUTORA: LUCÉLIA DE FÁTIMA SANTOS

ORIENTADOR: GUSTAVO VITTI MÔRO

COORDENADOR: MATEUS FIGUEIREDO SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Pesquisador Dr. MATEUS FIGUEIREDO SANTOS (Participação Virtual)
EMBRAPA/Gado de Corte / Campo Grande/MS



Pesquisador Dr. SANZIO CARVALHO LIMA BARRIOS (Participação Virtual)
EMBRAPA/Gado de Corte / Campo Grande/MS



Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO (Participação Virtual)
IAC - Centro de Cana / Ribeirão Preto/SP



Jaboticabal, 04 de fevereiro de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LUCÉLIA DE FÁTIMA SANTOS – Nascida em 22 de dezembro de 1993 em Januária – Minas Gerais, é filha de Lucia de Fátima Santos e José Teago dos Santos Filho. É Engenheira Agrônoma graduada pelo Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG), Câmpus Januária, com ingresso em 2012 e término em 2017. Em Agosto de 2018 ingressou no Programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), nível mestrado, área de concentração em Melhoramento de Forrageiras Tropicais pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP , sob orientação do Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro e co-orientação do Dr. Mateus Figueiredo Santos.

Aos meus pais, como retribuição ao amor,
dedicação e carinho recebido desde que nasci, bem como aos
esforços destinados à minha formação acadêmica.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que me proporcionou, por me abençoar sem medidas e me permitir alcançar tantos objetivos.

Aos meus pais Lucia e José e irmãos, por me apoiarem e acreditarem nas minhas escolhas, especialmente à minha mãe, por fazer seus, meus sonhos.

A todos os amigos que fiz em Jaboticabal, principalmente ao Gabriel, Joice, Jussara, Marina e Naiara, por terem sido presentes durante essa jornada e pelos bons momentos que passamos juntos.

Ao Augusto pelo carinho, companheirismo e incentivo.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp - em particular ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro pelos ensinamentos transmitidos, pela orientação e paciência.

À Embrapa Gado de Corte, pela infraestrutura e equipe, que possibilitaram o desenvolvimento desse estudo.

Ao Dr. Mateus Figueiredo Santos, pela oportunidade em trabalhar com melhoramento de *Megathyrus maximus*, por todo conhecimento transmitido e importante contribuição na minha formação profissional.

A Dr^a. Andréa Raposo que me auxiliou na condução de parte do experimento, sempre disposta em ensinar e promover a busca do conhecimento de maneira tão leve, descontraída e amorosa.

À Dr^a. Liana Jank, pelas valiosas contribuições e convívio, com toda minha admiração diante da dedicação em suas pesquisas e sucesso profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) número do processo: 134658/2018-3 pela bolsa de estudos.

Aos membros da banca Dr^a. Luciana Rossini e Dr. Sanzio Barrios pela disposição, presença e contribuições neste trabalho.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Importância da espécie <i>Megathyrus maximus</i>	2
2.2 Modo de Reprodução em <i>Megathyrus maximus</i>	4
2.3 Modo de Reprodução e Melhoramento de <i>Megathyrus maximus</i>	6
2.4 Técnicas de Identificação do Modo de Reprodução	7
2.4.1 Teste de Progênie.....	7
2.4.2 Análise Citoembriológica.....	8
2.4.3 Marcadores Moleculares.....	8
2.5 Seleção assistida por marcadores moleculares para o Modo de Reprodução em Forrageiras.....	10
2.5.1 Identificação de marcadores	10
2.5.2 Validação e Uso de Marcadores	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Material genético	12
3.2 Análises com marcador SCAR p779/p780.....	13
3.3 Análises citoembriológicas	16
3.4 Avaliações dos caracteres agronômicos do cruzamento C1.....	19
3.5 Estimação de parâmetros genéticos dos caracteres do cruzamento C1.....	20
3.6 Respostas à seleção com e sem o auxílio do marcador p779/p780	22
4. RESULTADOS	22
4.1 Eficiência do uso do marcador	22
4.2 Caracteres agronômicos	24
4.3 Comparação entre Estratégias de Seleção	27
5. DISCUSSÃO.....	28
5.1 Uso do marcador p779/p780	28
5.2 Avaliação dos caracteres agronômicos	30
6. CONCLUSÕES.....	32
7. REFERÊNCIAS	33
APÊNDICE.....	41

VALIDAÇÃO DO MARCADOR MOLECULAR p779/p780 PARA A SELEÇÃO PRECOCE EM *Megathyrus maximus*

RESUMO - A espécie *Megathyrus maximus* se reproduz de forma sexual e assexual, sendo esta última conhecida por apomixia, e técnicas específicas para identificar o modo reprodutivo são necessárias para seu melhoramento genético. Os objetivos deste estudo foram (i) verificar a coincidência entre a avaliação do modo de reprodução com o marcador e o método usual de análise citoembriológica em diferentes cruzamentos e (ii) determinar a relação entre o marcador e os caracteres agronômicos. Para compor este estudo, foram utilizados 50 híbridos selecionados em diferentes cruzamentos para representar híbridos de diferentes origens e que passaram pelo processo de seleção e oito parentais. Além destes, foram usados também 208 híbridos para representar uma população segregante não selecionada. O total, portanto foi de 262 híbridos, todos pertencentes ao programa de Melhoramento de *Megathyrus maximus* da Embrapa Gado de Corte. Os híbridos da população segregante não selecionada foram avaliados em condições de campo para diversos caracteres agronômicos. A identificação do modo reprodutivo foi realizada por meio do marcador SCAR p779/p780 e pela análise citoembriológica. Para estimar a associação do marcador com os caracteres e índices multicaracteres, foi realizada a correlação de Pearson entre BLUPs dos caracteres ou índices multicaracteres com os genótipos do marcador. A classificação do modo reprodutivo entre o uso marcador e da análise citoembriológica foi altamente compatível, com uma média geral de eficiência de 92%. A proporção entre os híbridos apomíticos e sexuais variou de 0:1 a 1:1 entre os cruzamentos. Não encontramos nenhuma diferença geral entre os híbridos apomíticos e sexuais para os caracteres agronômicos avaliadas. O marcador SCAR p779/p780 pode ser utilizado na seleção assistida para o modo reprodutivo nos programas de melhoramento de *Megathyrus maximus*, pois apresenta coincidência elevada com o método de análise citoembriológica. O marcador e os caracteres de importância agrônômica segregam de maneira independente na espécie.

Palavras-chaves: melhoramento genético, marcadores genéticos, plantas forrageiras, seleção

MOLECULAR MARKER VALIDATION p779/p780 FOR EARLY SELECTION IN *Megathyrus maximus*

ABSTRACT – The *Megathyrus maximus* species reproduces in a sexual and asexual way, the latter being known as apomixis, and specific techniques to identify the reproductive mode are necessary for its genetic improvement. The objectives of this study were (i) to verify the coincidence between the evaluation of the reproduction mode with the marker and the usual method of cytoembryological analysis in different crosses and (ii) to determine the relationship between the marker and the agronomic traits. To compose this study, 50 hybrids selected from different crosses were used to represent hybrids from different origins and that went through the selection process and eight parents. In addition, 208 hybrids were also used to represent an unselected segregating population. The total, therefore, was 262 hybrids, all belonging to the Embrapa Gado de Corte Breeding Program for *Megathyrus maximus*. The hybrids of the unselected segregating population were evaluated under field conditions for several agronomic traits. The identification of the reproductive mode was performed using the SCAR marker p779 / p780 and cytoembryological analysis. To estimate the association of the marker with the traits and multi- traits indexes, Pearson's correlation between BLUPs of the characters or multi-character indexes with the marker genotypes was performed. The classification of the reproductive mode between marker use and cytoembryological analysis was highly compatible, with an overall average efficiency of 92%. The ratio between apomitic and sexual hybrids varied from 0: 1 to 1: 1 between crosses. We did not find any general difference between apomitic and sexual hybrids for the evaluated agronomic traits. The SCAR marker p779 / p780 can be used in assisted selection for the reproductive mode in breeding programs of *Megathyrus maximus*, as it is highly coincident with the cytoembryological analysis method. The marker and the traits of agronomic importance segregate independently in the species.

Keywords: genetic breeding, marker genetic, forage plant, selection

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L. Jacobs (*sin. Panicum maximum* Jacq.) se reproduz assexuadamente, por meio de um processo denominado apomixia (Warmke, 1954), com raras formas sexuais encontradas no centro de diversidade (Chaume, 1985). Os genótipos apomíticos de *M. maximus* são tetraplóides ($2n=4x=32$) e os sexuais são diplóides ($2n=16$). Assim, para que fosse possível o cruzamento entre os diferentes genótipos, plantas sexuais tiveram a duplicação de seus cromossomos com colchicina. Dessa forma, as plantas sexuais tetraploidizadas recebem o pólen das plantas apomíticas permitindo a geração de variabilidade (Savidan, 1982). A herança do modo de reprodução na espécie é considerada monogênica, podendo ser um ou mais genes envolvidos na manifestação deste caráter, sendo que o alelo que condiciona a apomixia é dominante. Assim, a progênie gerada, a partir de um cruzamento entre um genitor sexual feminino (aaaa) e um doador de pólen apomítico (Aaaa), segregue para o modo reprodutivo na razão de 1:1 (Savidan, 1982).

Uma das grandes limitações nas etapas iniciais de desenvolvimento de novas cultivares em um programa de melhoramento de *M. maximus* é a confirmação do modo reprodutivo, com a identificação eficiente e confiável das plantas apomíticas e sexuais, pois somente os híbridos apomíticos são liberados no mercado como cultivares. A avaliação da morfologia dos sacos embrionários com o uso de técnicas citoembriológicas com clarificação de óvulos e análise em microscopia de interferência de contraste (Young et al., 1979) tem sido a principal estratégia para detecção do modo de reprodução no programa de melhoramento de *M. maximus*, sendo uma técnica eficiente e segura, porém é demorada, exige treinamento e experiência para a interpretação dos resultados. Além disso, só pode ser realizada no florescimento, pois requer a coleta de flores, exigindo que a planta seja adulta, o que restringe o número de plantas a serem avaliadas. Desta forma, existe a necessidade de um método que permita a avaliação precoce do modo de reprodução dos híbridos gerados nos

programas de melhoramento.

Neste sentido, estudos para identificação e/ou validação de marcadores genéticos ligados à apomixia podem proporcionar a realização de seleção assistida, proporcionando a seleção precoce de indivíduos apomíticos com base na presença dos marcadores moleculares, sem a necessidade de se avaliar o fenótipo adulto. Além de serem fáceis de utilizar, os marcadores moleculares fornecem resultados rápidos e apenas as mudas identificadas como apomíticas serão avaliadas em condições de campo nas próximas fases de desenvolvimento da cultivar, gerando uma redução no tempo e nos custos do programa de melhoramento.

Dentre os marcadores moleculares ligados ao modo de reprodução em espécies apomíticas, o SCAR p779/p780 (do inglês, *Sequence Characterized Amplified Region*), originalmente desenvolvido para *Pennisetum squamulatum*, mostrou-se amplamente útil para o diagnóstico do modo de reprodução em *Brachiaria* spp. e *Cenchrus ciliaries* (Akiyama et al., 2011; Worthington et al., 2016). Em seus estudos, Worthington et al. (2016) verificaram que o marcador SCAR também foi preditivo para a apomixia em *M. maximus*, porém, concluíram que mais pesquisas deveriam ser conduzidas para confirmar se o p779/p780 é diagnóstico para a espécie, o que nos instigou ao desenvolvimento desse trabalho.

Para a aplicação no melhoramento de *M. maximus*, o marcador p779/p780 deve ser validado em cruzamentos e fases do programa de melhoramento para avaliar a eficiência do uso deste na seleção assistida para o modo de reprodução na espécie. Desta forma, os objetivos deste estudo foram (i) verificar a coincidência entre a avaliação do modo de reprodução com o marcador SCAR p779/p780 e a análise citoembriológica em diferentes cruzamentos entre plantas sexuais e apomíticas em *M. maximus* e (ii) determinar a relação entre o marcador SCAR e os caracteres agronômicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da espécie *Megathyrsus maximus*

As pastagens brasileiras são classificadas como monoculturas extensas, por serem produzidas em larga escala. A diversificação das pastagens é uma forma de mitigar os problemas causados pelo monocultivo. O melhoramento genético de forrageiras tropicais e o lançamento de novas cultivares surgem como alternativas para a diversificação das pastagens brasileiras (do Valle et al., 2009). Entre as forrageiras tropicais, *M. maximus* (*Panicum maximum*), popularmente denominada Capim-colonião, destaca-se como uma das principais no mercado, conhecida mundialmente para alimentação animal.

A espécie *M. maximus* é de origem africana (África do Leste), mais especificamente das regiões do Quênia e da Tanzânia. Pertence à família *Poaceae* (*Gramineae*), subfamília *Panicoideae*, tribo *Panicea* (Combes e Pernès, 1970). O número básico de cromossomos é $x = 8$, sendo que predominam, nas populações naturais, plantas tetraplóides ($2n = 4x = 32$), seguidas das diplóides ($2n = 2x = 16$). Desempenha importante papel no crescimento do agronegócio da pecuária brasileira, por ser uma espécie forrageira produtiva, de alta qualidade e com grande capacidade de adaptação a vários tipos de clima e solos (Jank et al., 2008).

As cultivares de *M. maximus*, juntamente com as cultivares de *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. humidicola* respondem pela quase totalidade das áreas de pastagens e por 97,3% das sementes de forrageiras comercializadas no Brasil (Jank et al., 2014).

O melhoramento genético de *M. maximus* é coordenado no país principalmente pela Embrapa Gado de Corte. O germoplasma foi introduzido no Brasil, em 1982, por meio de um convênio entre a Embrapa e o institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), atualmente IRD (institut de recherche pour le développement) (Savidan et al., 1989), considerado o mais amplo e expressivo germoplasma já coletado. A coleção foi caracterizada e avaliada, o que demonstrou grande variabilidade genética (Jank, 1995). A partir da avaliação e seleção dos acessos do banco de germoplasma nas condições de bovinocultura brasileira, foram obtidas algumas cultivares, como: Tanzânia (1990), Mombaça (1993), Massai (2000) e a BRS Zuri (2014) (Jank et al., 2014).

A fim de aumentar a variabilidade dos genótipos disponíveis ao melhoramento e aumentar a eficiência na obtenção de genótipos promissores, o programa de melhoramento genético de *M. maximus* focou também em métodos de hibridação. Neste caso, são gerados híbridos por meio de cruzamentos entre plantas sexuais x apomíticas, os híbridos apomíticos podem ser fixados na primeira geração de cruzamento entre plantas sexuais x apomíticas em função da herança monogênica do modo de reprodução (Savidan, 1983). Já os híbridos sexuais, pelo processo de produção dos gametas, são utilizados para cruzamentos dentro do programa de melhoramento. Portanto, apenas os genótipos apomíticos são liberados no mercado como cultivares, garantindo assim a uniformidade das pastagens.

Por meio do método de hibridação, os primeiros híbridos foram avaliados e selecionados. Os apomíticos promissores seguiram todo o processo de seleção de cultivares da Embrapa, que deram origem a duas cultivares, denominadas BRS Tamani (2015) e BRS Quênia (Jank et al., 2017).

2.2 Modo de Reprodução em *Megathyrsus maximus*

A espécie *M. maximus* se reproduz de forma sexual e assexual, sendo esta última conhecida por apomixia. O termo apomixia no seu sentido mais amplo significa "longe do ato da mistura", pois apo quer dizer "longe de "e mixia, "mistura" (Asker e Jerling, 1992). É um fenômeno comum em 15% das angiospermas, sendo que 75% das espécies apomíticas estão nas famílias Gramineae (Poacea), Astereaceae e Rosaceae (Kumar e Saxena, 2016; Dall'Agnol; Schifino-Wittmann, 2005).

Nas populações naturais, têm-se tetraplóides apomíticos e diplóides sexuais, porém a apomixia não é relatada no nível diplóide (Savidan, 2000). A apomixia, nesta espécie, é do tipo apospórica, seguida de uma partenogênese (Savidan, 1982). Por divisões mitóticas, as células somáticas do óvulo dão origem a um saco embrionário não reduzido, que se desenvolve de uma célula nucelar somática adjacente (por apomeiose), que, por sua vez, desenvolve-se em um embrião viável sem fertilização (partenogênese), a partir de divisões mitóticas da oosfera, com posterior

desenvolvimento para constituir a semente (Dall'agnol e Schifino-Wittmann, 2005; Barcaccia e Albertini, 2013; Hand e Koltunow, 2014). A aposporia é uma forma comum de apomixia encontrada no gênero *Megathyrsus* e, também, nos gêneros *Brachiaria*, *Pennisetum* e *Paspalum*.

Segundo Koltunow (1993), o processo apomítico mimetiza muitos dos eventos da reprodução sexual e dá origem a sementes férteis. Há uma importante diferença entre o embrião apomítico e o zigótico que é o fato de que o primeiro é derivado somente das células do tecido materno enquanto o segundo é derivado da fusão de um gameta masculino com um feminino

Os genótipos apomíticos de *M. maximus* são tetraplóides ($2n=4x=32$) e os sexuais são diplóides ($2n=16$). Assim, para que fosse possível o cruzamento entre os diferentes genótipos, plantas sexuais tiveram a duplicação de seus cromossomos com colchicina. Dessa forma, as plantas sexuais tetraploidizadas recebem o pólen das plantas apomíticas permitindo a geração de variabilidade (Savidan, 1982).

A herança da apomixia é considerada monogênica, podendo ser um ou mais genes envolvidos na manifestação dessa característica, sendo que o alelo que condiciona a apomixia é dominante. Assim, a progênie gerada a partir de um cruzamento entre um genitor sexual feminino (aaaa) e um doador de pólen apomítico (Aaaa) segregue para o modo reprodutivo na razão de 1:1 (SAVIDAN, 1982). Subseqüentes estudos, em outras espécies das famílias *Ranunculaceae*, *Poaceae* e *Compositae* também têm obtido resultados concordantes com este modelo genético de herança, em que os genes responsáveis pela apomixia podem estar localizados na região genômica específica da aposporia (Grossniklaus et al., 2001).

A apomixia é controlada por genes com herança simples, apresenta dominância, expressão obrigatória, possui estabilidade ambiental e formação normal do embrião e endosperma (Hanna e Bashaw 1987; Hand e Koltunow, 2014). O melhor entendimento do seu mecanismo genético irá proporcionar avanços no melhoramento genético de espécies apomíticas, principalmente nas gramíneas que necessitam do desenvolvimento de novas cultivares, como *M. maximus*, a fim de promover aumento da diversificação e produtividade das pastagens.

2.3 Modo de Reprodução e Melhoramento de *Megathyrsus maximus*

A apomixia é uma característica importante a ser explorada para fins de melhoramento de plantas, permitindo a fixação de combinações genotípicas superiores, por meio da clonagem via sementes, garantindo a uniformidade almejada pelos produtores (Cruz et al., 1998). Desta forma, as cultivares de *M. maximus* lançadas no mercado são clones apomíticos, sendo os genótipos superiores sexuais utilizados como genitores em cruzamentos (Jank et al., 2008).

Segundo Kumar e Saxena (2016), a apomixia possui grande potencial para ser aplicada na agricultura particularmente na produção de sementes híbridas para a manutenção do vigor híbrido ao longo das gerações. Este modo de reprodução pode ser uma ferramenta importante para o melhorista. A utilização da reprodução por apomixia é altamente desejável na agricultura, podendo trazer um grande impacto na produção agrícola, reduzindo o custo e o tempo de reprodução, e evitando complicações típicas da reprodução sexual (Barcaccia e Albertini, 2013). De uma perspectiva de melhoramento de plantas, a apomixia fornece um mecanismo único para desenvolver cultivares superiores e preservá-los indefinidamente. Portanto, a análise de sua herança é de grande interesse nesta espécie.

Por apresentar reprodução assexual, a presença de genótipos com reprodução sexual no programa de melhoramento dessa espécie é fundamental, uma vez que, para que ocorra o cruzamento, é necessário um genitor sexual feminino (diplóide geralmente poliploidizado) polinizado por um genitor tetraplóide apomítico masculino. O método mais eficiente é o de blocos de cruzamento no campo, no qual uma planta sexual portadora de algum caráter de interesse é plantada no meio de uma área do acesso apomítico, para que seja polinizada pelo vento, com o pólen das plantas vizinhas apomíticas (Savidan, 1982). Uma vez que elas estão disponíveis, as espécies apomíticas são consideradas as ideais sob o ponto de vista do melhoramento, pois sua hibridação com plantas sexuais oferece a oportunidade de produzir novas combinações gênicas e permanentemente fixar uma progênie heterozigota para imediata avaliação como candidatos a cultivares que apresentam a conveniência da propagação por

semente (Savidan et al., 1989).

2.4 Técnicas de Identificação do Modo de Reprodução

Após o cruzamento ocorre a análise da progênie F_1 para determinar o modo de reprodução do híbrido gerado. A progênie irá segregar em sexuais e apomíticas. Se o caráter desejado se encontrar na progênie apomítica, ele estará fixado, e as plantas com as caracteres desejados podem ser lançadas como novas cultivares ou podem ser utilizadas em novos cruzamentos e ciclos de seleção.

Segundo Valle et al. (2004), as técnicas empregadas no estudo da identificação do modo reprodutivo variam de acordo com o gênero ou a espécie estudada. Podem compreender: 1) testes de progênie, 2) análise citoembriológica e 3) métodos moleculares.

2.4.1 Teste de Progênie

Os testes de progênie podem fornecer informações sobre o modo de reprodução de uma espécie, determinando a ocorrência de reprodução sexual, parcialmente sexual (facultativa) ou assexual (Bashaw, 1980). Essa análise baseia-se na ocorrência ou não de segregação gênica entre os indivíduos irmãos (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Carneiro e Dusi, 2002) plantando-se fileiras dos descendentes e observando se estes segregam fenotipicamente, indicando comportamento sexual da mãe; caso contrário, indica comportamento assexual, isto é, apomixia ocorrendo na planta mãe.

Entretanto, esta técnica demanda a presença de um número populacional elevado e o tempo necessário para um ciclo de crescimento completo. O uso desse teste implica em montar campos de observação com ao menos 20 plantas por genitor e esperar o pleno crescimento e, se necessário, o florescimento da progênie para classificá-la em segregante ou não, já que às vezes é mais fácil verificar segregação observando-se as inflorescências. O procedimento ainda pode sofrer fortes efeitos ambientais, gerando dúvidas sobre a expressão fenotípica das plantas na parcela (Silva et al., 2005).

2.4.2 Análise Citoembriológica

A técnica citoembriológica de estudo da estrutura do conjunto de óvulos consiste basicamente na coleta das flores em antese, extração dos óvulos, sua clarificação com salicilato de metila e posterior análise por microscopia de contraste de interferência. Esse é um dos métodos mais clássicos e seguros (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Carneiro e Dusi, 2002).

No entanto, esta técnica demanda muito tempo de preparo de amostras e só pode ser realizada na fase reprodutiva da planta, além da análise microscópica ser de difícil interpretação e só poder ser realizada por pessoas devidamente treinadas (Silva et al., 2005). O uso de técnicas citoembriológicas para o estudo da estrutura do óvulo usando microscopia é muito laborioso para ser empregado como análise em larga escala. Desta forma existe a necessidade de um método que permita a avaliação precoce dos híbridos gerados nos programas de melhoramento.

2.4.3 Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares surgiram com o desenvolvimento da tecnologia de biologia molecular e podem ser usados para estudar a variação genética entre indivíduos e detectar a presença da apomixia no nível de DNA. Esse método oferece vantagem de ser rápido, fácil de usar e preciso (Bhat et al., 2005).

Marcadores moleculares constituem um conjunto de técnicas para detectar variações genômicas, aumentando assim a capacidade de análise genética em plantas. Eles são seqüências de DNA derivadas de genes expressos, (como isoenzimas), mas esses marcadores também podem estar relacionados a regiões não expressas do genoma. Além disso, quando se descobre que o seu comportamento está de acordo com as leis básicas da herança mendeliana, os marcadores moleculares também podem ser chamados de marcadores genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

As principais vantagens do uso de marcadores moleculares são i) obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, II) baixa influência de

variações ambientais, e iii) utilização em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Além desses aspectos, quando os marcadores são codominantes há possibilidade de gerar maior informação por marcador polimórfico, o que os tornam adequados para diversos tipos de análise genética, incluindo estudos relativos à divergência e diversidade genética, construção de mapas de ligação, testes de paternidade e seleção assistida por marcadores (Faleiro, 2007).

Existe o interesse em se localizar o loco relacionado à apomixia. Mapas genéticos de locos apomíticos têm sido obtidos em várias espécies por análises com marcadores genéticos de populações derivadas de cruzamentos entre plantas sexuais e apomíticas (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). O primeiro relato de co-segregação de apomixia apospórica e marcadores moleculares foi em *Pennisetum*. Dois marcadores foram encontrados: um RFLP e um RAPD ligados à aposporia (Ozias-Akins et al., 1993). Bluma-Marques et al. (2014) verificaram com a utilização de RAPD que o marcador estava 8.63 cM de distância do apo-locus, em *M. maximus*.

Alternativamente, marcadores moleculares SCAR (do inglês, *Sequence Characterized Amplified Region*) têm sido utilizados com êxito na identificação da apomixia em plantas, diferentemente do marcador RAPD, o SCAR possui maior reprodutibilidade e, em alguns casos, pode ser de natureza co-dominante. Desenvolvido pela primeira vez na década de 90 (Paran e Michelmore, 1993), é um tipo de marcador genético-molecular amplificado com *primers* específicos, desenvolvidos com base em sequências já caracterizadas. Muitos desses marcadores são desenvolvidos a partir da conversão de marcadores RAPD (Faleiro, 2007). Após a seleção da marca RAPD, o fragmento é clonado e sequenciado, e é sintetizado um par de oligonucleotídeos (15 a 30 pares de bases) que é utilizado para amplificar as regiões específicas do DNA genômico (Faleiro, 2007). Desta forma, o polimorfismo pode ser detectado diretamente pela presença ou ausência da banda, após migração por eletroforese em substrato específico (agarose ou acrilamida).

O marcador SCAR, potencialmente ligado ao gene da apomixia foi previamente desenvolvido para a espécie apomítica *Pennisetum squamulatum* por Akiyama et al.

(2011) em trabalhos de pesquisa conduzidos na Universidade da Geórgia, a partir de sequências de 4 e 7 exons do gene ASGR-BBML (região genômica apospórica específica *Baby Boom Like*) e amplifica uma região incluindo três introns de 95 pb, 266 pb e 154 pb (Akiyama et al., 2011). Posteriormente, mostrou-se um amplo diagnóstico para apomixia em *Brachiaria* spp. (Worthington et al., 2016). Worthington et al. (2016) utilizaram 6 tipos de marcadores para ASGR e analisaram o modo de reprodução em *M. maximus* e em 4 cultivares híbridas de *Brachiaria* (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. humidicola*) do programa de recursos genéticos do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).

2.5 Seleção assistida por marcadores moleculares para o Modo de Reprodução em Forrageiras

2.5.1 Identificação de marcadores

A utilização de marcadores moleculares fortemente associados ao gene da apomixia em programas de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) representa, sem dúvidas, um recurso valioso para o desenvolvimento de novas cultivares de *M. maximus*. A busca de marcadores moleculares ligados ao traço da aposporia pode ser realizada pela metodologia de análise de bulk segregante (BSA) proposta por Michelmore et al. (1991). Esta metodologia consiste na análise de um conjunto equimolar de DNA (bulks) que contém a mesma característica, ou seja, o mesmo modo reprodutivo. Outra metodologia de grande interesse para a associação entre a apomixia e uma determinada região gênica é a SAM. Segundo Cavalcanti (2009) a metodologia de SAM consiste em integrar a genética molecular com a seleção fenotípica, por meio da procura de alelos desejáveis indiretamente por meio do uso de marcadores ligados a uma dada característica (no caso ligação com o modo de reprodução). Assim, quanto mais próximo o marcador encontra-se do gene, mais eficiente será o processo.

A seleção para o modo de reprodução assistida por marcadores moleculares pode eliminar certos aspectos indesejáveis da seleção fenotípica, melhorando a eficiência do processo. Com os avanços na caracterização de novos marcadores e das

técnicas em biologia molecular, que possibilitaram o avanço das pesquisas em larga escala, os marcadores têm sido cada vez mais incorporados em programas de melhoramento como geradores de informações valiosas aos melhoristas, tais como a identificação e distinção de genótipos, avaliação da variabilidade genética de uma população, e a aceleração do lançamento de novos genótipos no mercado (Borém e Caixeta, 2004).

2.5.2 Validação e Uso de Marcadores

A seleção assistida por marcador (SAM) é uma técnica eficiente para minimizar o tempo e o trabalho em um programa de melhoramento que envolve caracteres de difícil avaliação, como o modo de reprodução em espécies apomíticas. Algumas das condições para SAM incluem (i) herança genética simples da característica sob seleção e (ii) disponibilidade de marcadores intimamente ligados à característica (Albertini et al., 2001). Os dados disponíveis sobre o modo de reprodução por apomixia indicam controle genético simples não apenas em *M. maximus* (Savidan, 1983), mas também em *Pennisetum squamulatum* (Gustine et al., 1997), *Cenchrus ciliaris* (Goel et al., 2003; Yadav et al., 2012), *Poa pratensis* (Barcaccia et al., 1998), *Tripsacum dactyloides* (Leblanc et al., 1995), *Paspalum notatum* (Martinez et al., 2003) e *Brachiaria decumbens* (Pessino et al., 1997). A análise molecular mostra que apenas alguns genes dominantes são necessários para a transmissão genética da apomixia (Yadav et al., 2012).

Em estudos com a espécie *C. ciliaris* utilizando cinco marcadores SCAR (quatro específicos para apomixia e um marcador sexual SCAR) a seleção assistida de híbridos F_1 resultou na identificação de 10 híbridos (de 34 progênes) como apomíticas. E a seleção com marcador sexual SCAR, seguido da análise do saco embrionário, confirmou que os 24 híbridos restantes eram facultativos (Kumar et al., 2017). Nesse mesmo estudo, o uso de mais de um marcador rendeu fidelidade suficiente a SAM para selecionar indivíduos apomíticos. Na verdade, a ausência do próprio marcador SCAR sexual indicava o modo apomítico de reprodução na planta,

mas a amplificação com marcadores SCAR específicos para apomixia confirmou o resultado. Marcadores moleculares ligados ao modo de reprodução seriam muito úteis para a seleção da população segregante, mapeamento de genes responsáveis pelo modo de reprodução e sua caracterização por meio de abordagem genética (Kumar, 2014). Seu uso é particularmente importante quando o fenótipo selecionável se manifesta no final do ciclo de vida da planta (Albertini et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

Os híbridos utilizados neste estudo originaram-se de cruzamentos biparentais entre cinco genótipos inteiramente sexuais (S-1, S-2, S-3, S-4 e S-5) e três genótipos apomíticos (AP-1, AP-2 e AP-3) de *M. maximus*, pertencentes ao Programa de Melhoramento da Embrapa Gado de Corte. Os cruzamentos foram realizados na Estação Experimental da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, em 2013, em blocos de 150 m² de cada parental apomítico, em que cada planta sexual foi plantada dentro de dois sub-blocos de 25 m² do parental apomítico, para garantir o cruzamento exclusivo entre eles (Savidan, 1982)(Figura 1).



Figura 1. Esquema ilustrando bloco de cruzamento de *Megathyrus maximus*, considerando um parental sexual, cercado pelo parental apomítico.

A partir de novembro de 2014, híbridos obtidos dos diferentes cruzamentos foram avaliados visualmente a campo e selecionados com base no vigor, mérito da planta, resistência a viroses e manchas foliares, e rebrota após eventuais cortes. Para compor este estudo, foram utilizados 50 híbridos selecionados nos diferentes cruzamentos (incluindo quatro híbridos do C1) para representar híbridos de diferentes origens e que passaram pelo processo seletivo descrito e oito parentais. Além destes, foram usados também 208 híbridos do cruzamento S-1 x AP1 (C1), para representar uma população segregante não selecionada. O total, portanto foi de 262 híbridos. Para o estudo do marcador molecular (item 3.2) foram utilizados 262 híbridos. Para a análise citoembriológica (item 3.3), 102 híbridos e para o estudo dos caracteres agrônômicos (item 3.4), foram utilizados 208 híbridos, todos pertencentes ao Programa de melhoramento da espécie *M. maximus* da Embrapa Gado de Corte (Tabela 1).

Tabela 1. Parentais e número de híbridos obtidos por cruzamento de *Megathyrus maximus*.

Origem	Nome	Nº de Híbridos
Sexual	S	5
Apomítico	AP	3
S-1 x AP1	C1	208
S-1 x AP2	C2	8
S-1 x AP3	C3	11
S-2 x AP1	C4	10
S-2 x AP2	C5	9
S-3 x AP2	C6	3
S-4 x AP2	C7	4
S-5 x AP2	C8	1
Total		262

AP: parentais apomíticos; par S: parentais sexuais.

3.2 Análises com marcador SCAR p779/p780

O DNA genômico de folhas jovens dos 262 híbridos de *M. maximus* foi extraído usando o protocolo descrito por Bonato et al. (2002) (Figura 2). Nesta metodologia utiliza-se CTAB 2% (brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB, 1,4 M de NaCl, 0,2 M de

EDTA, 1% de PVP, 0,1 M de Tris-HCl pH 8, acrescido de 2% de β -mercaptoetanol) a partir de 300 mg de tecido fresco. 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.

A análises de PCR foram realizadas utilizando os primers SCAR p779/p780 (5' TATGTCACGACAAGAATATG; 3' TGTAACCATAACTCTCAGCT), descrito como completamente ligados à aposporia em *B. decumbens* (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 $MgCl_2$; 0,125 mM dNTP; 0,5 μ M *Primers Forward* e *Reverse*; 0,5 U* Taq DNA polimerase e água Milli-Q estéril.

As amplificações foram realizadas nos termocicladores 9600 e 9700 (Applied Biosystems) com as seguintes condições: um ciclo de 94°C por 5 minutos; trinta e cinco ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e terminando com um ciclo de 72°C por 10 minutos. 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), visualizados em luz UV no Gel Doc XR+ Bio Rad e, posteriormente, analisadas. A presença da banda indicou que o indivíduo era apomítico e a ausência era sexual. Para controle positivo e negativo foram utilizados genitores do programa de melhoramento.

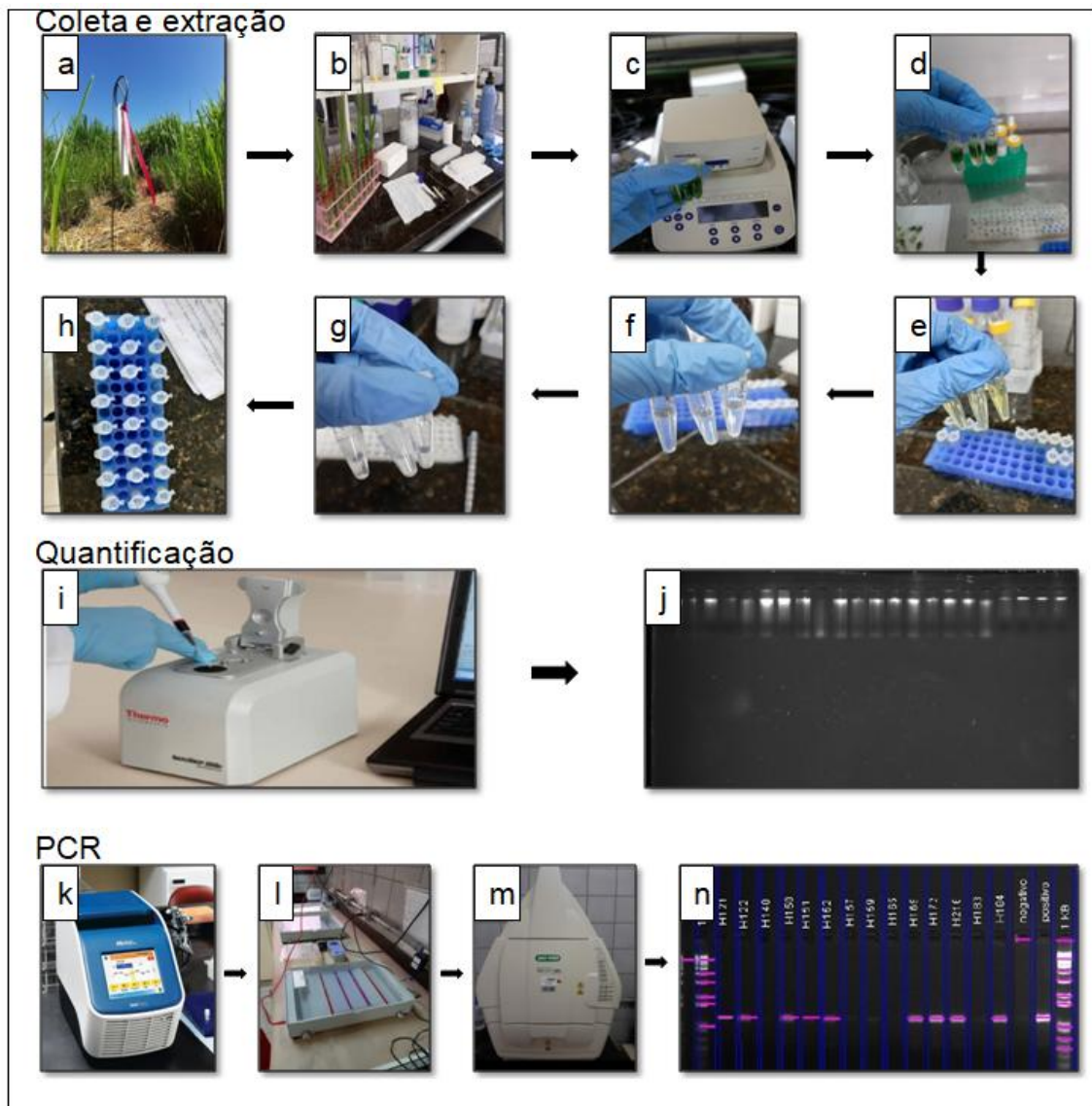


Figura 2. Esquema representativo da técnica do marcador molecular ligado a apomixia em híbridos de *Megathyrus maximus*. Legenda: a) híbridos de *P. maximum* em campo experimental, b) folhas a serem maceradas em moinho para extração de DNA, c) rompimento das membranas celulares com CTAB, d) lavagem do DNA com CIA, e) precipitação do DNA com isopropanol gelado f) lavagem do DNA em etanol 100%, g) pellet de DNA no fundo do microtubo, h) amostras de DNA de *P. maximum* acondicionadas e identificadas em rack. Quantificação i) em espectrofotômetro Nanodrop, j) gel de agarose 0,8%. PCR: k) amplificações em termociclador (Applied Biosystems), l) eletroforese em gel de agarose 1,5%, m) visualização em luz UV no Gel Doc XR+ Bio Rad n) bandas. Fonte: autora.

3.3 Análises citoembriológicas

Para comparação com a análise molecular, realizou-se a análise de sacos embrionários por microscopia nos oito parentais e em 94 híbridos dos diferentes cruzamentos (Figura 3). Para isso, foram coletados entre 40 a 60 flores em estágio de antese apresentando estigmas túrgidos e visíveis, e as flores dissecadas foram fixadas em solução de FAA na proporção 40:14:3:3 (Formalina 40%:Água destilada:Álcool etílico 95%:Ácido acético glacial) por 24 horas em temperatura ambiente (Raposo et al., 2019).

Após esse período, o fixador foi substituído por álcool etílico 70% (v/v) e as flores foram armazenadas a 4°C até a extração dos óvulos. Em seguida, os óvulos extraídos foram clarificados seguindo o protocolo proposto por Young et al. (1979). Os óvulos clarificados foram armazenados sob refrigeração a 4°C em salicilato de metila (100%) até a montagem das lâminas para análises.

Para as análises, 30 óvulos de cada genótipo foram dispostos em lâminas e mantidos umidificados em salicilato de metila. Cada lâmina continha três fileiras com 10 óvulos, os quais foram analisados para determinar o modo de reprodução utilizando-se um microscópio com contraste diferencial de interferência (DIC – *differential interference contrast*). Óvulos com um único saco meiótico contendo célula ovo, uma célula central binucleada e células antípodas no polo chalazal foram caracterizados como meióticos, enquanto óvulos com sacos embrionários único ou múltiplos, com célula ovo, uma célula central com dois núcleos e nenhuma célula antípoda foram classificados como apospóricos (Nakagawa, 1990). Além da classificação dos óvulos meióticos ou apospóricos, foram observados também, óvulos estéreis (E), em que não ocorreu a meiose no saco embrionário (SE), atrofiados (AT), em que o desenvolvimento do SE foi estacionado, e óvulos anormais (AN), quando as estruturas internas do SE estão distorcidas ou em formato tumeroso. Sacos embrionários sem a presença de núcleos ou antípodas, ou estruturas que não permitam sua classificação são denominados como indefinidos ou duvidosos. Pode ainda acontecer de ter um saco meiótico bem localizado na micrópila, mas rodeado de outros sacos apospóricos e para esses

anotou-se: S+Sm, ou S+A se foi um único saco apospórico associado ao meiótico. Se o Sm ou A estivessem na micrópila e o meiótico mais para a região da chalaza, a anotação foi: Sm+S ou A+S (Raposo et al., 2019). Na análise dos 30 óvulos, a presença de todos os sacos meióticos classificou a planta em sexual, e a presença de um ou mais sacos apospóricos simples ou múltiplos, indicou apomixia.

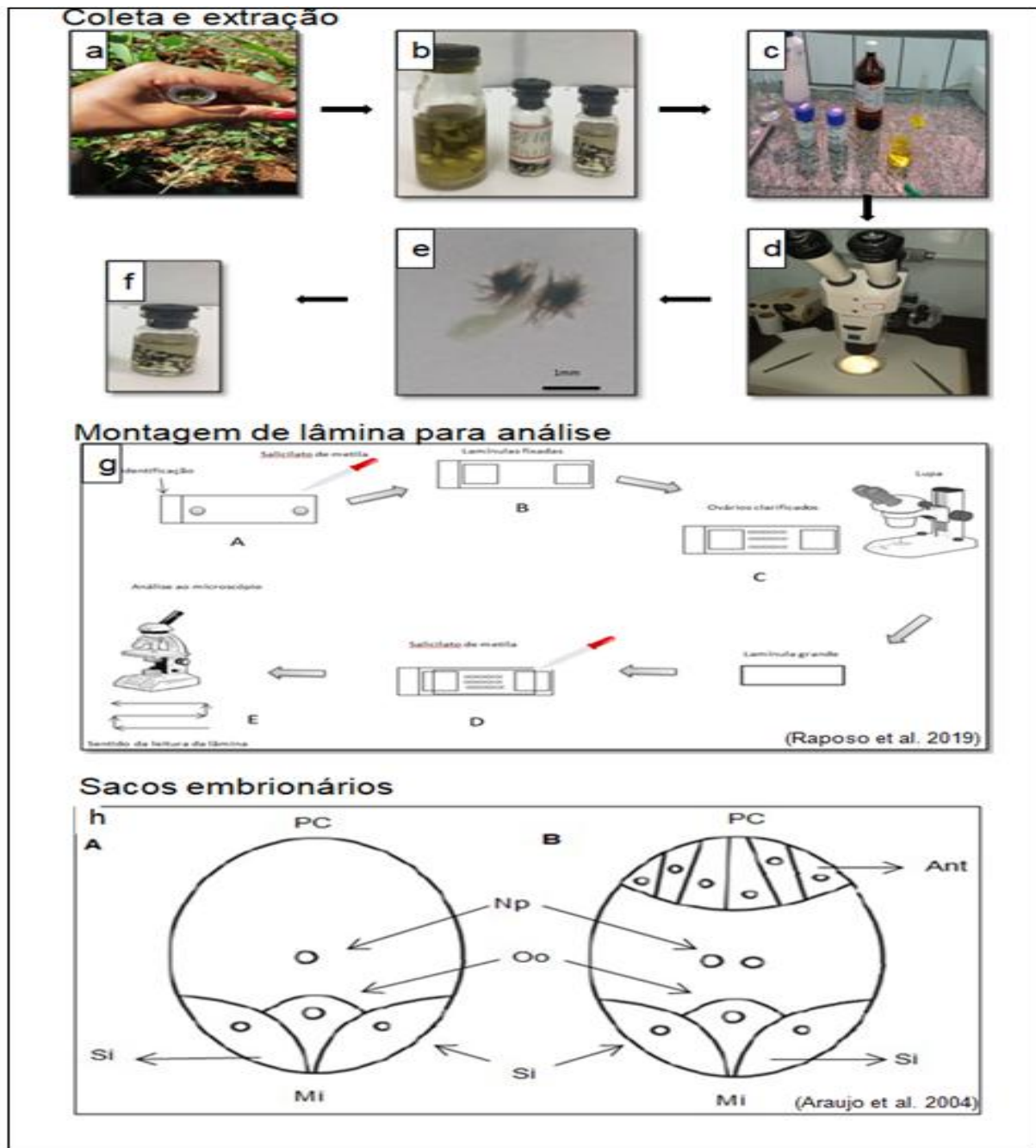


Figura 3. Esquema representativo da utilização da técnica citoembriológica de óvulos clarificados nos híbridos de *Megathyrsus maximus*. Legenda: a) Coleta de espiguetas em campo, b) espiguetas fixadas em solução FAA durante 24 horas, c) álcool etílico 70%, d) extração dos óvulos em estereoscópio binocular e) óvulo clarificado com salicilato de metila, f) armazenamento em salicilato de metila (100%) g) Montagem de lâmina para análises dos óvulos clarificados (Raposo et al. 2019). h) Esquema de sacos embrionários h.a) saco embrionário tipo *Panicum*, h.b) saco embrionário tipo *Polygonum*. Si – sinérgides Oo – oosfera, Np – núcleo polar; Ant – antípoda, Mi –

micrópila, PC – polo chalazal. (adaptado de Araujo et al., 2004).

Para verificar a coincidência da determinação do modo de reprodução entre a análise molecular e citoembriológica, os resultados obtidos a partir da genotipagem e fenotipagem dos óvulos dos parentais e dos híbridos dos diferentes cruzamentos que foram avaliados pelas duas técnicas, foram relacionados por meio da porcentagem de coincidência (%C):

$$\%C = \frac{N_{coin}}{NT} \times 100$$

Em que: Ncoin é o número de coincidência entre as análises citoembriológicas e moleculares, ou seja, os indivíduos que apresentaram mesmo sistema reprodutivo pelos dois métodos avaliados; NT é o número total de indivíduos analisados.

3.4 Avaliações dos caracteres agronômicos do cruzamento C1

Os 208 híbridos de C1 foram submetidos a avaliações agronômicas na Estação Experimental da Embrapa Gado de Corte (20°25' de longitude, 54°40' de latitude e altitude 565 m). Os híbridos foram avaliados em plantas individuais no delineamento de blocos aumentados com cinco blocos, 208 híbridos considerados como tratamentos regulares e as testemunhas S-1, APO-1 e a cv. Mombaça como tratamentos comuns. O espaçamento entre plantas foi de 1,5 x 1,5 m.

As avaliações foram realizadas durante quatro cortes, no período da seca de 2019 (1º corte 24/10/2019) e no período das águas 2019/2020 (2º-06/12/2019, 3º-10/01/2020, 4º-13/02/2020). Antes dos cortes avaliou-se a altura do dossel, medida da base da planta até a altura média do dossel (cm); a severidade do *Johnsongrass mosaico virus* (JGMV) foi avaliada por meio de notas que variaram de 1 a 5 (1 = plantas sem sintomas aparentes, parecendo saudáveis, sem descoloração, deformação de tecidos ou nanismo e 5 = todos os sintomas muito fortes com necrose e morte da planta em estágios mais avançados) (Fernandes et al., 2011); e durante os cortes, o material verde de cada parcela foi pesado a campo com o auxílio de um dinamômetro analógico para determinação do peso da matéria verde total (PMVT) (kg.planta⁻¹).

Amostras de aproximadamente 300 g de cada uma das parcelas, em cada corte, foram obtidas para separação morfológica em lâminas foliares, bainha+colmo e material morto, e levadas à estufa com ventilação forçada a 65°C por 72 horas para a secagem até peso constante. A produção de matéria seca de folhas (PMSF), matéria seca de colmo+bainha (PMSC) e do material morto (PSMM) foram calculadas e convertidas em kg.planta⁻¹. A produção de matéria seca total correspondeu ao somatório dos seus componentes (PMST=PMSF+PMSC+PSMM). A porcentagem de folhas foi calculada como $[PMSF / (PMSF+PMSC)] \times 100$.

As densidades volumétricas de folhas (DVF) e total (DVT) foram calculadas pela razão entre PMSF e PMST com a altura do dossel em kg/cm.planta⁻¹, respectivamente. A área da touceira foi estimada como $\pi (d/2)^2$, em que d é a mensuração do diâmetro das touceiras (cm), medida com régua colocada horizontalmente ao solo. A densidade de rebrota foi avaliada por meio de nota visual de porcentagem (0, 10, 20 até 100%) dos perfilhos rebrotados após sete dias dos cortes. Para o cálculo da taxa de alongamento foliar, foram avaliadas as alturas de rebrota de uma folha da borda e outra mais ao centro da touceira, e, posteriormente, foi calculada a taxa de alongamento foliar média (cm.dia⁻¹), dividindo-se a altura média da rebrota das folhas pelo número de dias de rebrote.

3.5 Estimação de parâmetros genéticos dos caracteres do cruzamento C1

Para testar a segregação do marcador p779/p780 no cruzamento C1 foi realizado o teste de χ^2 para verificar a aderência dos dados à segregação 1:1 da seguinte forma:

$$\chi^2_c = \sum \frac{(FO - FE)^2}{FE}$$

em que: FO e FE representam as frequências observadas e esperadas, respectivamente, para cada classe genotípica (sexual ou apomítica). O valor de χ^2 calculado foi comparado com o χ^2 tabelado para 5% de probabilidade (3,84).

Análises estatístico-genéticas para os caracteres agronômicos foram realizadas utilizando o pacote sommer do software R versão 4.0.2 Core Team (2020),

considerando o modelo linear misto a seguir:

$$y_{ijk} = \mu + h_k + b_j + t_i + ht_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

em que: y_{ijk} é o valor fenotípico do tratamento i , no bloco j , no corte k ; μ é o intercepto do modelo; h_k é o efeito fixo do corte k ; b_j é o efeito fixo do bloco j ; t_i efeito aleatório do híbrido i ; ht_{ik} efeito aleatório da interação entre o tratamento j e o corte k ; ε_{ijk} efeito residual, sendo $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \mathbf{R})$, em que $\mathbf{R}$ é a matriz de variâncias e covariâncias residuais. Os tratamentos foram separados entre regulares (n_r) e comuns (n_c), satisfazendo a equação $n = n_r + n_c$. Assim, o efeito t_i foi decomposto em: efeito fixo do tratamento comum ou testemunhas (c_i), e efeito aleatório do tratamento regular ou híbridos (r_i), sendo $r_i \sim N(0, \sigma^2_g)$.

O modelo foi ajustado considerando diferentes estruturas de variâncias e covariâncias para a matriz $\mathbf{R}$, sendo selecionado o modelo que apresentou os menores valores de AIC (*Akaike Information Criterion* - akaike1974new) e BIC (*Bayesian Information Criterion* - Schwarz1978a). Após ajuste do modelo fenotípico, foram estimados os componentes de variância pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) e as predições dos efeitos aleatórios de híbridos (BLUPs), que representam os seus valores genotípicos.

Com base nas estimativas dos componentes de variâncias, foram obtidas as estimativas das herdabilidades de plantas individuais no sentido amplo para os caracteres agrônômicos, de acordo com a fórmula:

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \sigma_e^2}$$

em que: σ_g^2 é a variância genotípica e σ_e^2 é a variância do erro.

Para cada híbrido de C1 foi obtido um índice multicaráter compreendendo a soma entre os BLUPs para cada indivíduo considerando todos os caracteres, devidamente padronizados para o desvio padrão igual a 1, de acordo com a seguinte fórmula:

$$Z_k = \sum_{1}^t r_k^t$$

em que Z_k representa o índice de seleção do indivíduo k , e r_k^t representam o BLUP do indivíduo k para o caractere t .

A correlação de Pearson entre os BLUPs dos caracteres ou índices multicares com os genótipos do marcador foi utilizada para estimar a associação do marcador com os caracteres e índices multicares.

3.6 Respostas à seleção com e sem o auxílio do marcador p779/p780

A seleção foi realizada de três formas: 1 – somente com base no índice multicares ordenando os valores dos índices de forma decrescente e selecionado 10 híbridos superiores; 2 – seleção com índice multicares como na estratégia 1, seguido de seleção assistida dos genótipos apomíticos; 3 - seleção com índice multicares como na estratégia 1, seguido da seleção assistida de genótipos sexuais. Após a seleção dos híbridos superiores com base nas estratégias utilizadas, estimou-se a resposta à seleção (R_s) para cada caráter que compôs o índice de acordo com a seguinte expressão:

$$R_s = \mu_s - \mu_0$$

em que μ_s é média dos BLUP para um determinado caráter das dez plantas selecionadas com base no índice multicares;

μ_0 valor do intercepto para cada caráter considerado.

Posteriormente, calculou-se a relação entre as respostas à seleção estimadas por caráter entre as três estratégias de seleção.

4. RESULTADOS

4.1 Eficiência do uso do marcador

Para a análise de comparação entre métodos, noventa e quatro híbridos dos diferentes cruzamentos e oito parentais foram classificados quanto ao modo de reprodução por meio do marcador molecular e pela análise citoembriológica. Um total de 52 híbridos foram identificados como apomíticos e 42 sexuais pelo marcador. Na

análise citoembriológica, 51 híbridos foram classificados como apomíticos e os 43 restantes como sexuais. Ambas as técnicas confirmaram o modo reprodutivo dos parentais (Apêndice A). A proporção média de segregação entre os cruzamentos foi de 1:0,8 (apomítica:sexual) (Tabela 2).

A classificação do modo de reprodução pelo marcador e pela análise citoembriológica correspondeu em 92% dos casos, uma diferença de 8%, representada por cinco híbridos de C1, um híbrido de C2 e um híbrido de C4. As técnicas coincidiram perfeitamente na análise dos parentais, e para todos os híbridos dos cruzamentos C3, C5, C6, C7, C8. Os cruzamentos com maior e menor número de híbridos, C1 e C8, apresentaram coincidência de 89% e 100% respectivamente.

Tabela 2. Identificação do modo de reprodução por cruzamento, parentais, número de híbridos avaliados pela análise citoembriológica e pelo marcador SCAR, porcentagem de coincidência entre as técnicas e proporção entre plantas em *Megathyrus maximus*.

Cruzamento	Parentais	F	G	Nº Híbridos	Híbridos				%Coinc	Proporção	
					Apo		Sex			Apo:Sex	
					F	G	F	G		F	G
C1	S-1	Sex	Sex	48	25	26	23	22	89	1:0,9	1:0,9
C2	S-2	Sex	Sex	8	5	6	3	2	88	1:0,6	1:0,3
C3	S-3	Sex	Sex	11	7	7	4	4	100	1:0,5	1:0,5
C4	S-4	Sex	Sex	10	6	5	4	5	90	1:0,6	1:1
C5	S-5	Sex	Sex	9	6	6	3	3	100	1:0,5	1:0,5
C6	AP1	Apo	Apo	3	2	2	1	1	100	1:0,5	1:0,5
C7	AP-2	Apo	Apo	4	0	0	4	4	100	0:1	0:1
C8	AP-3	Apo	Apo	1	0	0	1	1	100	0:1	0:1
Total	8			94	51	52	43	42	92	1:0,8	1:0,8

par S: parentais sexuais, AP: parentais apomíticos; F: fenótipagem, G: genótipagem, Sex: sexual, Apo: apomítico

O cruzamento C1 gerou 207 híbridos, 109 com presença da marca (apomíticos) e 98 com ausência da marca (sexuais), a diferença entre o número de híbridos com e sem a marca não foi estatisticamente significativa, representando a proporção de segregação de 1:1 (apomítica:sexual) (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de qui-quadrado da segregação pelo marcador SCAR p779/p780 no cruzamento C1 de *Megathyrsus maximus*.

Marcador	Proporção observada		Teste qui-quadrado	
	Apomítico	Sexual	Segregação	χ^2
p779/p780	109	98	1:1	0,58 ^{ns}

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

4.2 Caracteres agronômicos

A altura média do cruzamento C1 foi de 60,1 cm. Os caracteres PMST, PMSF e porcentagem de folha (%F) apresentaram média geral de 0,40 kg.planta⁻¹, 0,28 kg.planta⁻¹ e 86,3%, respectivamente (Tabela 4).

Em geral, para todos os caracteres avaliados, os valores de herdabilidade foram de baixa a alta magnitude, a %F exibiu uma herdabilidade no sentido amplo baixa (0,15), seguida pela densidade de rebrota (0,35) e de média a alta para PMSF (0,53), altura do dossel (0,54) e PMST (0,56).

Tabela 4. Estimativas de parâmetros genéticos dos caracteres agronômicos avaliados nos híbridos de C1 de *Megathyrsus maximus*.

Caráter	Média	Herdabilidade
ALT	60,14	0,55 ± 0,06
SV	2,21	0,44 ± 0,05
PMVT	1,35	0,57 ± 0,06
PMSF	0,28	0,53 ± 0,06
PMST	0,40	0,56 ± 0,06
%F	86,32	0,15 ± 0,04
DVF	4,64	0,40 ± 0,07
DVT	6,57	0,42 ± 0,07
AT	0,12	0,42 ± 0,06
DR	78,52	0,35 ± 0,08
TAF	7,00	0,30 ± 0,06

ALT – altura (cm), SV – severidade de vírus, PMVT – peso da matéria verde total (kg.planta⁻¹), PMSF - produção de matéria seca de folhas (kg.planta⁻¹), PMST – produção da matéria seca total (kg.planta⁻¹), %F - porcentagem de folhas, DVF - densidade volumétrica de folha (kg/cm.planta), DVT - densidade volumétrica de folha total (kg/cm.planta), AT - área da touceira (cm), DR - densidade de rebrota, TAF – taxa de alongamento foliar (cm.dia⁻¹).

Conforme a Figura 4, os caracteres foram agrupados com base nos coeficientes de correlações genéticas da seguinte forma: caracteres de produção de matéria seca, densidade de rebrota, porcentagem de folhas; e grupos independentes como, a severidade da doença e o marcador molecular. Uma forte correlação positiva foi verificada para os caracteres de produção PMSF, ALT, PMST, DVF, DVT e PMVT. Em contrapartida, a %F exibiu uma correlação negativa e baixa a eles e positiva a DR. Em nosso trabalho, obtivemos ausência de correlação entre o marcador p779/p780 com os caracteres agronômicos.

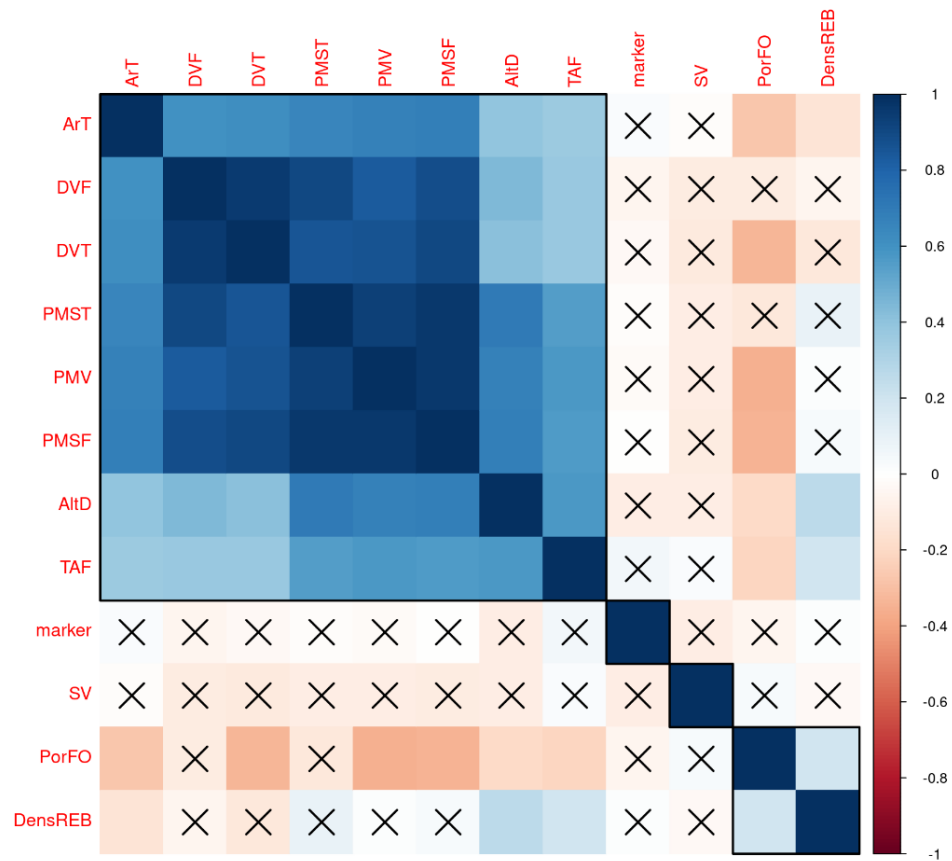


Figura 4. Heatmap da correlação de Pearson entre os caracteres avaliados nos híbridos de C1 de *Megathyrus maximus*. X: ausência de correlação significativa ao nível de 5% de probabilidade.

É possível notar no Gráfico 1 que não houve diferença significativa quando considerada as marcas 0 (sexual) e 1 (apomítico) no índice de seleção para cada genótipo do cruzamento C1. Reforçando ainda mais a ausência de correlação do marcador com os caracteres agronômicos avaliados (Figura 4 e Gráfico 1).

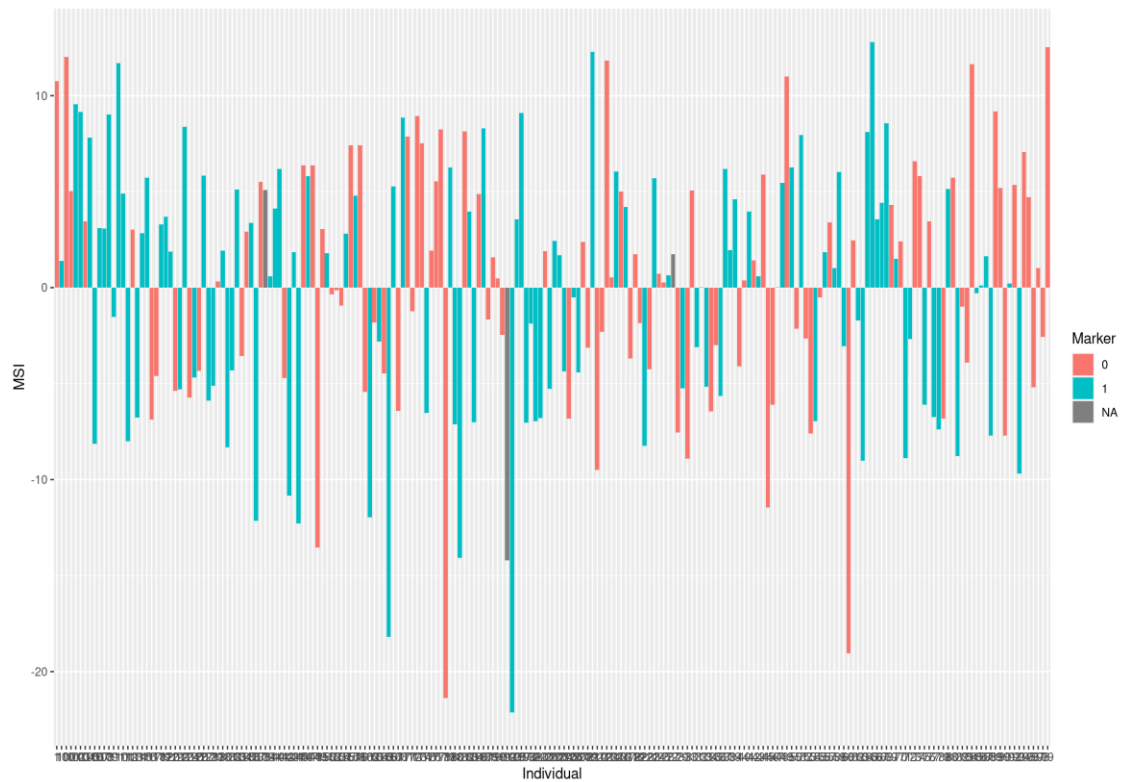


Gráfico 1. Barplot do índice de seleção categorizado pelo marcador molecular SCAR p779/p780 nos híbridos do cruzamento C1 de *Megathyrus maximus*. Marca 0: sexuais. Marca 1: apomíticos. NA: Híbrido sem informação do marcador.

4.3 Comparação entre Estratégias de Seleção

Dez híbridos superiores foram selecionados em cada estratégia. As respostas à seleção para os caracteres agronômicos PMVT, PMSF e PMST apresentaram uma baixa variação quando aplicada a seleção para o modo reprodutivo pelo marcador. Na relação entre estratégias, não houve alteração do modo de reprodução sobre os caracteres agronômicos analisados.

Tabela 5. Respostas à seleção com e sem o uso do marcador SCAR p779/p780 e a relação entre as estratégias de seleção nos híbridos C1 de *Megathyrus maximus*.

Estratégias	N° de Genótipos	ALT	SV	TAF	PMVT	PMSF	PMST	%F	DVF	DVT	AT	DR
Rs Ind (1)	10	66	2	7	2,76	0,48	0,67	86	6	9	0	76
Rs M+Ind Apo (2)	10	64	2	7	2,47	0,44	0,62	86	6	8	0	82
Rs M+Ind Sex (3)	10	67	2	7	2,51	0,46	0,63	87	6	8	0	79
Relação entre estratégias												
(2) / (1)	1	0,9	1	1	0,9	0,9	0,9	1	1	0,9	1	1,1
(3) / (1)	1	1	1	1	0,9	1	0,9	1	1	0,9	1	1
(3) / (2)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,9

Rs Ind: resposta à seleção pelo índice, Rs M+Ind Apo: resposta à seleção com marcador + índice para apomixia, Rs M+Ind Sex: resposta à seleção com marcador + índice para sexuais, ALT: altura (cm), SV: severidade de vírus, PMVT: peso da matéria verde total (kg.planta⁻¹), PMSF: produção de matéria seca de folhas (kg.planta⁻¹), PMST: produção da matéria seca total (kg.planta⁻¹), %F: porcentagem de folhas, DVF: densidade volumétrica de folha (kg/cm.planta), DVT: densidade volumétrica de folha total (kg/cm.planta), AT: área da touceira (cm), DR: densidade de rebrota, TAF: taxa de alongamento foliar (cm.dia⁻¹).

5. DISCUSSÃO

5.1 Uso do marcador p779/p780

A apomixia por aposporia em *M. maximus* tem sido alvo de muitos estudos desde o início dos programas de melhoramento para a espécie, pois exige estratégias de seleção adaptadas para seu modo reprodutivo, o que torna extremamente essencial o conhecimento genético sobre a biologia reprodutiva. Uma série de *primers* vem sendo testados para identificar possíveis marcadores intrinsecamente ligados a aposporia em *M. maximus* a uma baixa taxa de recombinação, para garantir maior eficiência e rapidez na identificação do modo reprodutivo de plantas obtidas pelo programa de melhoramento (Ebina et al., 2005; Bluma-Marques et al., 2014; Worthington et al., 2016). Uma vez que o método de óvulos clarificados por microscopia é uma análise onerosa e dispendiosa de tempo, pois depende do estágio de desenvolvimento da planta (floração) e diversas etapas estão envolvidas para tornar possível distinguir

visualmente o formato dos ovócitos (Kumar et al., 2017). Em *C. ciliares* e *P. squamulatum* (Akiyama et al., 2011) identificaram uma região cromossômica fortemente ligada a aposporia, o qual denominaram de região genômica específica apospórica (ASGR), que levou o desenvolvimento de *primers* para essa região. Dentre as marcas validadas, o par de *primer* p779/p780, localizado entre o quarto e sétimo éxon da ASGR-BBM-like2, foi satisfatório ao amplificar somente para plantas com modo apospórico.

Nesse estudo, verificando o SCAR p779/780 em híbridos de oito cruzamentos, nomeadamente C1 a C8, demonstramos que esse marcador pode ser usado para a identificação eficiente de híbridos apomíticos e inclusive, até o momento, pode ser considerado o mais promissor marcador para identificar híbridos apomíticos de *M. maximus*. A classificação do modo reprodutivo pelo marcador e pela análise citoembriológica foi altamente compatível. Até, então, o único trabalho que havia testado a relação entre marcadores e a análise citoembriológica em progênies da espécie em estudo, obtiveram uma eficiência que variou conforme os *primers* testados de 71,3 a 88%, utilizando marcadores RAPD (Bluma-Marques et al., 2014). Notoriamente, o SCAR p779/p780 apresentou uma maior eficiência entre as técnicas utilizadas, com 89% e 92% de coincidência, para o cruzamento com maior número de híbridos e para a média geral entre híbridos analisados, respectivamente. A elevada eficiência desse marcador demonstra sua forte ligação com o modo reprodutivo para a espécie em estudo. Diferentemente do marcador RAPD, o SCAR possui maior reprodutibilidade e, em alguns casos, pode ser de natureza co-dominante. Por esse marcador amplificar em várias espécies, entende-se que entre as gramíneas a mesma região ASGR-BBML seja conservada.

Worthington et al. (2016) testaram o par de *primers* em algumas plantas de *Brachiaria* spp. e em *M. maximus* e obtiveram resultado positivo, entretanto, os acessos de *M. maximus* analisados, não foram fenotipados para o modo reprodutivo, concluindo que mais pesquisas deveriam ser conduzidas para confirmar se o p779/p780 é diagnóstico para essa espécie. O marcador usado no presente estudo foi testado em híbridos de uma população não selecionada e em uma população que passou pelo

processo seletivo, além disso, os resultados foram comparados com a técnica usual, indicando uma alta eficiência independentemente da população usada, com ou sem seleção, sugerindo alavancar o uso deste marcador diretamente para a seleção assistida por marcadores.

De maneira interessante, os primeiros trabalhos evidenciaram que em um cruzamento entre genitores apomíticos versus sexuais, a segregação obtida para os híbridos é de 1:1, ou seja, 50% da progênie gerada são de plantas sexuais e 50% de apomíticos. Dessa forma, um alelo é determinante para a aposporia (Warmke, 1954; Savidan, 1981; Savidan, 1982; Savidan et al., 1989; Savidan, 2000). Nossos resultados moleculares corroboraram para a segregação 1:1 do caráter, sob o cruzamento de C1 analisado. Nos demais cruzamentos as diferentes proporções podem ser explicadas devido a esses cruzamentos serem constituídos por um baixo número de híbridos nos cruzamentos.

5.2 Avaliação dos caracteres agrônômicos

A magnitude da herdabilidade pondera o grau de dificuldade em melhorar um determinado caráter (Resende et al., 2004). Valores semelhantes aos encontrados nesse trabalho foram observados em outras gramíneas que também estão em processo de domesticação, como *Brachiaria decumbens*, que apresentou resultado para PMST (0,57) e PMSF (0,53), enquanto %F e DR obtiveram uma alta magnitude, 0,60 e 0,77, respectivamente (Mateus et al., 2015). Da mesma forma, Deo et al. (2020) trabalhando com uma progênie de irmãos-completos de *M. maximus*, relataram valores semelhantes para %F (0,19), DR (0,36), PMSF (0,58) e PMST (0,57).

Recentemente, Deo et al., (2020) por meio da análise de QTL (loci de caracteres quantitativos), verificaram PMST, PMSF e DR presentes nas mesmas regiões dos três grupos de ligação em que foram identificados e a %F foi averiguada em uma região distinta a eles, corroborando com nossos resultados. Os caracteres associados à produção são derivadas da matéria verde ou da matéria seca, com isso, a alta correlação entre esse grupo de caracteres, já era esperada. Dessa forma, os caracteres

que foram correlacionados positivamente são melhorados simultaneamente. Análises genéticas a campo sobre a doença do mosaico foliar em *M. maximus* não haviam sido anteriormente descritas. A herdabilidade média estimada para o *Johnsongrass mosaico virus* (JGMV) (0,44) e nenhuma correlação verificada com os caracteres agrônômicos revela que a busca por genótipos resistentes pode ser eficaz para o controle do patógeno. Esse vírus infecta as plantas da família *Poaceae*, tendo sido relatada sua presença em folhas da cv. Mombaça em 2012 (Camelo-García et al., 2016). Estudos que visem avaliações sobre a interação genótipo x ambiente x patogenicidade do vírus ainda são necessários.

A aplicação de marcadores como ferramenta do melhoramento genético tem sido buscada há algumas décadas (Russell & Eberhart, 1970; Yamada et al., 1989; Ortiz et al., 1997; Forster et al., 2004; Lara et al., 2019; Matias et al., 2019), onde programas de melhoramento para plantas diplóides estão avançados em seu uso e tem obtido sucesso (Cerrudo et al., 2018; Hagely et al., 2020). Porém, em plantas poliplóides há várias incógnitas há serem respondidas, desde o conhecimento mais aprofundado do próprio modo reprodutivo, como a apomixia nas gramíneas forrageiras. Para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho em *M. maximus* que verificou a eficiência de um marcador na distinção do modo reprodutivo, atuando diretamente na seleção de genótipos superiores.

Em programas de melhoramento, a seleção simultânea ou por índices de seleção é a mais adequada para o intuito de obter maiores ganhos genéticos para vários caracteres simultaneamente (Figueiredo et al., 2012). O auxílio de marcadores junto às metodologias de seleção pode proporcionar uma maior rapidez e eficiência na identificação de genótipos superiores. Até o momento, estudos haviam restringido o uso de marcadores ligados ao modo reprodutivo somente a identificação das plantas em sexuais e apomíticas nos programas. Por exemplo, Kumar et al. (2017) aplicaram a seleção assistida por marcadores (SAM) ao programa de *C. ciliaries*, através de um SCAR na identificação de plantas sexuais e quatro SCARs para aquelas apomíticas em progênies F₁ e F₂, que se mostraram concordantes aos fenótipos e garantiram uma maior fidelidade ao modo reprodutivo dos genótipos. A ausência de correlação entre o

marcador p779/p780 com os caracteres agronômicos e, mais especificamente, a diferença não significativa quando considerada a marca no índice de seleção para cada genótipo da progênie C1, sugere uma hipótese: o modo reprodutivo (sexual/apomítico) não influencia nos caracteres agronômicos desse cruzamento, ou até mesmo na espécie, ou seja, o modo reprodutivo e o marcador molecular são independentes.

Na relação entre as estratégias de seleção empregadas com e sem o auxílio do marcador SCAR, verificamos que não houve impacto do modo reprodutivo sobre os caracteres analisados neste trabalho, pois tanto híbridos apomíticos quanto sexuais possuem uma variabilidade genética elevada, que tem permitido cruzamentos que garantam o vigor híbrido dos genótipos. De maneira semelhante, em progênies de *Paspalum simplex*, não foi encontrada nenhuma diferença geral entre os híbridos sexuais e apomíticos perante os caracteres avaliados com o uso de um marcador (Brugnoli et al., 2019), somente para a rebrota no outono do primeiro ano que híbridos apomíticos foram superiores.

Com isso, o marcador p779/p780 se mostrou eficiente para distinção entre híbridos sexuais e apomíticos em *M. maximus*. Todavia, o desempenho agronômico possivelmente não está relacionado ao modo reprodutivo. Este foi o primeiro passo da aplicação de um marcador diretamente na seleção de genótipos superiores para o melhoramento genético de *M. maximus*, diversos estudos podem ser elaborados para a aplicação de seleção assistida com marcadores que estejam ligados a caracteres de importância produtiva e nutricional para a espécie.

6. CONCLUSÕES

O marcador SCAR p779/p780 pode ser utilizado na SAM no programa de melhoramento de *M. maximus*, pois apresenta coincidência elevada com o método de análise citoembriológica. O marcador e os caracteres de importância agronômica segregam de maneira independente na espécie.

7. REFERÊNCIAS

Araújo AC, Falcão R, Simões KC, Carneiro VTC (2004) **Identificação de acessos de *Brachiaria* com interesse ao estudo da apomixia facultativa.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 29p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 74).

Asker S, Jerling L (1992) **Apomixis in plants.** Boca Raton: CRC Press. 298 p.

Albertini E, Barcaccia G, Porceddu A, Sorbolini S, Falcinelli M (2001) Mode of reproduction is detected by Parth1 and Sex1 SCAR markers in a wide range of facultative apomictic *Kentucky bluegrass* varieties. **Molecular Breeding** 7:293-300.

Akiyama Y, Goel S, Conner JA, Hanna WW, Yamada-Akiyama H, Ozias-Akins P (2011) Evolution of the apomixis transmitting chromosome in *Pennisetum*. **BMC Evolutionary Biology** 11:289.

Barcaccia G, Mazzucato A, Albertini E, Zethof J, Pezzotti M, Gerats A and Falcinelli M (1998) Inheritance of parthenogenesis in *Poa pratensis* L.: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. **Theoretical and Applied Genetics** 97: 74-82.

Barcaccia G, Albertini E (2013) Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma. **Plant Reproduction** 26:159–179.

Bashaw EC (1980) **Apomixis and its application in crop improvement.** Hybridization of crop plants, 45-63.

Bitencourt GA, Chiari L, do Valle CB (2012) Avaliação de híbridos por meio de marcadores RAPD e identificação do modo de reprodução pela anatomia de sacos embrionários em *Brachiaria humidicola*. **Ensaio e Ciência**, 16:59-70.

Bonato ALV, do Valle CB, Jank L, Resende RMS, Leguizamón GDC (2002) **Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum maximum*.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte 4 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 79).

Borém A, Caixeta ET (2006) Marcadores moleculares. Viçosa: Editora JARD 1:374p.

Bhat V, Dwivedi KK, Khurana JP, Sopory SK (2005) Apomixis: An enigma with potential applications. **Current Science** 89:1879-1893.

Bluma-Marques AC, Chiari L, Agnes DC, Jank L, Pagliarini MS (2014) Molecular markers linked to apomixis in *Panicum maximum* Jacq. **African Journal Biotechnology** 13:2198-2202.

Brugnoli EA, Martínez EJ, Ferrari Usandizaga SC, Zilli AL, Urbani MH, Acuña CA (2019) Breeding tetraploid *Paspalum simplex*: hybridization, early identification of apomicts, and impact of apomixis on hybrid performance. **Crop Science** 59:1617-1624.

Camelo-García VM, da Silva Andrade SC, Geering AD, Kitajima EW, Rezende JA (2016) Genome organization and host range of a Brazilian isolate of *Johnsongrass mosaic virus*. **Archives of virology**. 161:1335-1341.

Carneiro VTC, Dusi DMA (2002) Apomixia: em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 25:36-42.

Cavalcanti JJV (2009) Importância da seleção assistida por marcadores moleculares. In: 12º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. **Resumos...** Fortaleza: 2009 Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/631506/1/RE09165.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2020

Cerrudo D, Cao S, Yuan Y, Martinez C, Suarez EA, Babu R, Zhang X, Trachsel S (2018) Genomic selection outperforms marker assisted selection for grain yield and physiological traits in a maize doubled haploid population across water treatments. **Frontiers Plant Science** 9:366.

Combes D, Pernès J (1970) Variations dans le nombre chromosomique du *Panicum maximum*, Jacq. En relation avec le mode de reproduction. **Comptes Rendus Academie des Sciences de Paris, Serie D** 270:782-785.

Cruz RP, Federizzi LC, Milach SCK (1998) A apomixia no melhoramento de plantas. **Ciência rural** 28:155-161.

Chaume R (1985) Organisation de la variabilité génétique du complexe agamique

Panicum maximum: en vue de son utilisation en amélioration des plantes. Éd. de l'ORSTOM 243p.

Dall'Agnol M, Schifino-Wittmann MT (2005) Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista brasileira Agrociência** 11:127-133.

Deo TG, Ferreira RCU et al., (2020) High-resolution linkage map with allele dosage allows the identification of regions governing complex traits and apospory in guinea grass (*Megathyrsus maximus*). **Frontiers Plant Science** 11:15.

do Valle CB, Jank L, Resende RMS (2009) O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres** 56:460-472.

Dwivedi KK, Bhat SR, Bhat V, Bhat BV, Gupta MG (2007) Identification of a SCAR marker linked to apomixis in buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.), **Plant Science** 1:788-795.

Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta SI, Takahara M, Nakajima K (2005) Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.). **Grassland Science** 51:71-78.

Faleiro FG (2007) Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Embrapa Cerrados, 102p.

Ferreira ME, Fernández JN, Grattapaglia D (1998) Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Federal District, Brazil: Embrapa Cenargen, 220p.
Fernandes CD, Resende R, Jank L, Santos MF, Souza DAE (2019) Reação de genótipos de *Panicum maximum* ao vírus *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV), causador do mosaico foliar em gramíneas. In: 51º CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Anais... Brasília-DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia 1:818-818.

Figueiredo UJD, Nunes JAR, Valle CBD (2012) Estimation of genetic parameters and selection of *Brachiaria humidicola* progenies using a selection index. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 12:237-244.

Forster JW, Jones ES, Batley J, Smith KF (2004) Molecular marker-based genetic analysis of pasture and turf grasses. In: **Molecular breeding of forage and turf. Developments in Plant Breeding, Springer** 11:197-238.

Gauer L, Cavalli-Molina S (2000) Apomixia: um método alternativo para a produção de sementes em plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha** 6:157-170.

Goel S, Chen Z, Conner JA, Akiyama Y, Hanna WW, Ozias-Akins P (2003) Delineation by fluorescence in situ hybridization of a single hemizygous chromosomal region associated with aposporous embryo sac formation in *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. **Genetics** 163:1069-1082.

Gustine DL, Sherwood RT, Huff DR (1997) Apospory-linked molecular markers in buffelgrass. **Crop science** 37:947-951.

Grossniklaus U, Nogler GA, Van Dijk PJ (2001) How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis. **The plant cell** 13:1491-1498.

Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. **IEEE transactions on automatic control** 19:716-723.

Hagely KB, Jo H, Kim JH, Hudson KA, Bilyeu K (2020) Molecular-assisted breeding for improved carbohydrate profiles in soybean seed. **Theoretical Applied Genetics** 133:1189-1200.

Hand ML, Koltunow AMG (2014) The genetic control of apomixis: asexual seed formation. **Genetics** 197:441–450.

Hanna WW, bashaw EC (1987) Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science** 27:1136-1139.

Jank L, Resende RMS, Valle CD, Resende MD, Chiari L, Cançado LJ, Simioni C (2008) Melhoramento genético de *Panicum maximum*. **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: Embrapa p. 55-87.

Jank L (1995) Melhoramento e seleção de variedades de *Panicum maximum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM. **Anais...** Piracicaba: FEALQ 12:21-58.

Jank L, Barrios SC, do Valle CB, Simeão RM, Alves GF (2014) The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science** 65:1132-1137.

Jank L, de Andrade CMS, Barbosa RA, Macedo MCM, Valério JR, Verzignassi JR, Zimmer AH, Fernandes CD, Santos MF, Resende RMS (2017) **O capim-BRS Quênia (*Panicum maximum* Jacq.) na diversificação e intensificação das pastagens.** Campo Grande: Embrapa Acre 18 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 138).

Kumar S (2014) RNAi (RNA interference) vectors for functional genomics study in plants. **National Academy Science Letters** 37:289-294.

Koltunow AM (1993) Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell** 5:1425-1437.

Kumar S, Saxena S (2016) Sequence characterized amplified regions linked with apomictic mode of reproduction in four different apomictic *Cenchrus* species. **Molecular Plant Breeding** 7:1-14.

Kumar S, Saxena S, Gupta MG (2017) Marker-assisted screening of breeding populations of an apomictic grass *Cenchrus ciliaris* L. segregating for the mode of reproduction. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 17:10-17.

Lara LA, Santos MF et al. (2019) Genomic selection with allele dosage in *Panicum maximum* Jacq. **G3: Genes, Genomes, Genetics** 9:2463-2475.

Leblanc O, Grimanelli D, de Leon DG, Savidan Y (1995) Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics** 90:1198-1203.

Martinez EJ, Hopp HE, Stein J, Ortiz JPA, Quarín CL (2003) Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. **Molecular Breeding** 12:319-327.

Mateus RG, Barrios SCL, Valle CBD, Valério JR, Torres FZV, Martins LB, Amaral P NCD (2015) Genetic parameters and selection of *Brachiaria decumbens* hybrids for agronomic traits and resistance to spittlebugs. **Crop Breed Appl Biotech** 15:227-234.

Matias FI, Alves FC, Meireles KGX, Barrios SCL, do Valle CB, Endelman JB, Fritsche-Neto R (2019) On the accuracy of genomic prediction models considering multi-trait and allele dosage in *Urochloa* spp. interespecific tetraploid hybrids. **Molecular Breeding** 39:100.

Michelmore RW, Paran I, Kesselli RV (1991) 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 of the National Academy of Sciences** 88:9828–9832.

Nakagawa H (1990) Embryo-sac analysis and crossing procedure for breeding apomictic guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.). **Japan Agriculture Riser Quarterly** 24:163-168.

Ortiz JPA, Pessino SC, Leblanc O, Hayward MD, Quarin, CL (1997) Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. **Theoretical Applied Genetics** 95:850-856.

Ozias-Akins P, Lubbers EL, Hanna WW, McNay JW (1993) Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: Co-inheritance of the trait and molecular markers. **Theoretical Applied Genetics** 85:632-638.

Ozias-Akins P, Roche D, Hanna WW (1998) 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** 95:5127- 5132.

Paran I, Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics** 85:985-993.

Pessino SC, Ortiz J, Leblanc O, do Valle CB, Hayward MD (1997) Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. **Theoretical and Applied Genetics** 94:439-444.

Pessino SC, Evans C, Ortiz JPA, Armstead I, Valle CBD, Hayward MD (1998) A genetic Map of the apospory-region in *brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. **Hereditas** 128:153-158.

R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Raposo A, do Valle CB, Jank L, Ratier S, Barrios S, Santos M, (2019) **Determinação do modo de reprodução em *Brachiara* spp. e *Panicum maximum* usando microscopia por contraste de interferência em ovários clarificados**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte 38 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 267).

Resende RMS, Jank L, Valle CBD, Bonato ALV (2004) Biometrical analysis and selection of tetraploid progenies of *Panicum maximum* using mixed model methods. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39:335-341.

Russell WA, Eberhart SA (1970) Effects of Three Gene Loci in the Inheritance of Quantitative Characters in Maize¹. **Crop Science** 10:165-169.

Savidan Y (1981) Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guinea grass (*Panicum maximum*). **Proceedings XIV International Grassland Congress**. Lexington: Proceedings Boulder: Westview Press, 1983. 182-184

Savidan YH (1982) **Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq.** Paris: Orstom 9 p. (Travaux et Documents de l'ORSTOM, SB197, S3)

Savidan YH, Jank L, Costa JCG, e Valle, CB (1989) Breeding *Panicum maximum* in Brazil. 1. Genetic resources, modes of reproduction and breeding procedures. **Euphytica** 41:107-112.

Savidan Y (2000) Apomixis: genetics and breeding. **Plant Breeding Reviews** 18:13-86.

Silva MP, Amaral Jr AT, Pereira MG, Rodrigues R, Daher RF, Posse SCP (2005) Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem. **Acta Scientiarum Agronomy** 27:531-539.

Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. **Annual Statistics** 6:461–464.

Zorzatto C, Chiari L, Bitencourt G de A, Valle CB do, Leguizamon GO de C, Schuster I, Pagliarini MS (2010) Identification of a molecular marker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Plant Breeding** 6:734-736.

Warmke HE (1954) Apomixis in *Panicum maximum*. **American Journal of Botany** 41:5-11.

Worthington M, Heffelfinger C, Bernal D, Quintero C, Zapata YP, Perez JG (2016) A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. **Genetics** 203:1117-1132.

Yadav CB, Anuj, Kumar S, Gupta MG, Bhat V (2012) Genetic linkage maps of the chromosomal regions associated with apomictic and sexual modes of reproduction in *Cenchrus ciliaris*. **Molecular Breeding** 30:239-250.

Yamada T, Fukuoka H, Wakamatsu T (1989) Recurrent selection programs for white clover (*Trifolium repens* L.) using self-compatible plants. I. Selection of self-compatible plants and inheritance of a self-compatibility factor. **Euphytica** 44:167-172.

Young BA, Sherwood RT, Bashaw EC (1979) Cleared-pistyl and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. **Canadian Journal of Botany** 57:1668-1672.

APÊNDICE

A) Classificação do modo de reprodução por meio da análise citoembriológica de ovários clarificados e pelo marcador SCAR p779/p780 em oito cruzamentos de *Megathyrus maximus*.

Origem	Genótipo	F	G	Origem	Genótipo	F	G	Origem	Genótipo	F	G
Parental	S-1	SEX	SEX	C1	27	APO	SEX	C3	61	SEX	SEX
Parental	S-2	SEX	SEX	C1	28	APO	APO	C3	62	APO	APO
Parental	S-3	SEX	SEX	C1	29	SEX	SEX	C3	63	APO	APO
Parental	S-4	SEX	SEX	C1	30	SEX	SEX	C3	64	APO	APO
Parental	S-5	SEX	SEX	C1	31	APO	APO	C3	65	APO	APO
Parental	AP1	APO	APO	C1	32	APO	APO	C3	66	APO	APO
Parental	AP-2	APO	APO	C1	33	APO	SEX	C3	67	APO	APO
Parental	AP-3	APO	APO	C1	34	APO	APO	C4	68	SEX	SEX
C1	1	SEX	SEX	C1	35	SEX	SEX	C4	69	APO	APO
C1	2	APO	APO	C1	36	SEX	SEX	C4	70	APO	APO
C1	3	SEX	SEX	C1	37	SEX	SEX	C4	71	SEX	SEX
C1	4	APO	APO	C1	38	APO	APO	C4	72	SEX	SEX
C1	5	APO	APO	C1	39	APO	APO	C4	73	APO	SEX
C1	6	SEX	SEX	C1	40	APO	APO	C4	74	APO	APO
C1	7	APO	APO	C1	41	APO	APO	C4	75	APO	APO
C1	8	APO	APO	C1	42	APO	APO	C4	76	SEX	SEX
C1	9	SEX	APO	C1	43	SEX	SEX	C4	77	APO	APO
C1	10	SEX	SEX	C1	44	APO	APO	C5	78	APO	APO
C1	11	SEX	SEX	C1	45	SEX	SEX	C5	79	APO	APO
C1	12	SEX	SEX	C1	46	SEX	SEX	C5	80	APO	APO
C1	13	APO	APO	C1	47	APO	APO	C5	81	SEX	SEX
C1	14	SEX	SEX	C1	48	APO	APO	C5	82	APO	APO
C1	15	APO	APO	C2	49	SEX	SEX	C5	83	APO	APO
C1	16	SEX	SEX	C2	50	APO	APO	C5	84	SEX	SEX
C1	17	SEX	SEX	C2	51	SEX	APO	C5	85	SEX	SEX
C1	18	SEX	SEX	C2	52	APO	APO	C5	86	APO	APO
C1	19	SEX	APO	C2	53	APO	APO	C6	87	SEX	SEX
C1	20	SEX	SEX	C2	54	APO	APO	C6	88	APO	APO
C1	21	SEX	SEX	C2	55	SEX	SEX	C6	89	APO	APO
C1	22	APO	APO	C2	56	APO	APO	C7	90	SEX	SEX
C1	23	APO	APO	C3	57	SEX	SEX	C7	91	SEX	SEX
C1	24	APO	APO	C3	58	APO	APO	C7	92	SEX	SEX
C1	25	APO	APO	C3	59	SEX	SEX	C7	93	SEX	SEX
C1	26	SEX	APO	C3	60	SEX	SEX	C8	94	SEX	SEX
Soma Híb									94		
Total									102		

F: fenotipagem, G: genotipagem, SEX: sexual, APO: apomítico