

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

TIAGO MARETTI GONÇALVES

MODO REPRODUTIVO DE ACESSOS DE *Paspalum* spp.
(GRUPO INFORMAL Plicatula) E BUSCA DE
MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A
APOMIXIA

SÃO CARLOS - SP
2019

TIAGO MARETTI GONÇALVES

MODO REPRODUTIVO DE ACESSOS DE *Paspalum* spp. (GRUPO INFORMAL Plicatula) E
BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A APOMIXIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador(a): Profa. Dr^a Alessandra Pereira Fávero

Coorientador(a): Dr^a Bianca Bacili Zanotto Vigna

São Carlos
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Tiago Maretti Gonçalves, realizada em 26/07/2019:

Prof. Dr. Alessandra Pereira Fávero
UFSCar

Prof. Dr. Bianca Bacchi Zanotto
EMBRAPA

Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes
UFSCar

Prof. Dr. Simone Cristina Méo Niciura
EMBRAPA

Prof. Dr. Ana Luísa Sousa Azevedo
EMBRAPA

Prof. Dr. Rebecca Caroline Ulbricht Ferreira
UNICAMP

DEDICATÓRIA

A minha tia, Milca Gonçalves, meu maior amor e exemplo de sabedoria;
A minha vó Ana Carvalho Gonçalves, meu orgulho e exemplo de vida, dedico.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, e por ter me abençoado permitindo a realização de mais esta jornada com força, vitalidade e êxito e acima de tudo com alegria de viver!

À minha tia Milca Gonçalves, que é a luz da minha vida, que sempre esteve ao meu lado na minha jornada de vida ensinando-me e dando todo o suporte! Uma pessoa de luz, fibra e amor, sempre será meu amor eterno!

À minha vó Ana Carvalho Gonçalves, que é um exemplo de sabedoria e amor.

Aos meu pais Clodoaldo Gonçalves, minha mãe Adriane Pelegrino Maretti e meu tio Israel Gonçalves pelo amor, carinho e intenso cuidado.

À minha orientadora, Dr^aAlessandra Pereira Fávero, que sempre esteve ao meu lado, disposta a ensinar e promover a busca do conhecimento de maneira tão leve, descontraída e amorosa. Nunca irei esquecer do dia que nos encontramos para uma primeira conversa. Com humildade, amor e muita motivação me propôs desafio de iniciar nesta pesquisa e concluir esta tese. Você me mostrou que com paciência, calma e sabedoria podemos evoluir e crescer! Muito obrigado por ter me ensinado, por ter feito de mim um ser humano mais capacitado e pronto para poder contribuir com a nação brasileira no que tange ao ensino, a pesquisa e a extensão.

À minha co-orientadora, Dr^aBianca Bacilli Zanotto Vigna que com seu conhecimento, visão e ética sempre esteve disposta a me auxiliar e a conduzir a pesquisa da melhor maneira possível. Obrigado pela paciência, apoio e pelo carinho.

À Dr^a Ana Luísa Sousa Azevedo da Embrapa Gado de Leite, por ter me disponibilizado o seu laboratório, bem como o citômetro de fluxo. Sempre com muita paciência, carinho e dedicação me auxiliou na condução de parte dos experimentos fornecendo grande apoio e revisão dos dados.

Ao professor Dr. Francis de Moraes Franco Nunes que me aceitou na disciplina de Estágio Supervisionado em Docência (PESCD) como aluno e que com grande carinho, profissionalismo e dedicação me orientou no aprimoramento à docência e ao ensino de genética.

À professora Dr^a Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo que esteve presente em minha banca de avaliação de admissão ao curso de doutorado e também na banca de qualificação como avaliadora, que de uma maneira tão amorosa, ética e dedicada, contribuiu com o enriquecimento e melhoria deste trabalho com valiosas sugestões.

À Dr^a Cynthia Aparecida de Castro que esteve presente em minha banca de qualificação como avaliadora, contribuindo com valiosas sugestões e dicas para o meu trabalho.

Ao professor Dr. Paulo Teixeira Lacava, presente como membro da banca de admissão ao curso de doutorado que contribuiu com valiosas sugestões no projeto e também por ter me ensinado as técnicas básicas de pipetagem na saudosa Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG) nos tempos de graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura.

À assistente Cristiane de Souza da Fonseca e ao Biólogo Fernando Rodrigues de Oliveira que me auxiliaram em grande parte dos experimentos no citômetro de fluxo na Embrapa Gado de Leite.

Ao Dr. Frederico de Pina Matta pelos ensinamentos e auxílio na condução dos experimentos sobre análise citoembriológica de ovários.

Aos colegas de trabalho, Naiana Barbosa Dinato e Ailton Ferreira de Paula pelo apoio, cuidado, parceria e descontração.

À amiga Amanda Figueiredo e Bruno Bernardo dos Santos pela amizade, carinho e admiração.

Aos professores que contribuíram para o meu conhecimento nas disciplinas do curso de pós-graduação.

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste, pelo apoio e atenção e pela ajuda durante a condução dos experimentos, em especial ao, Natal Silvestre, Emar José Fagundes (Mineiro), Márcio Dias Rabelo, Gilberto Cesar Agostinho e Dr. Wilson Malagó Jr., pela ajuda na utilização dos laboratórios, no campo e da casa de vegetação.

A Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), à Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), à Embrapa Gado de Leite (CNPGL) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv), por disponibilizar a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão dos recursos financeiros e Bolsa de Estudos.

Aos pesquisadores Dr. Camilo Quarín, Dr. Carlos Alberto Acuña e Dr^aPatricia Elda Novo pelos ensinamentos e sugestões.

A todos os membros da banca de doutorado, que foi cuidadosamente constituída a fim de contribuir e aprimorar este trabalho

E a todos que de alguma forma auxiliaram a condução deste trabalho e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu agradecimento.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

RESUMO

Pertencente à família das Gramíneas, o gênero *Paspalum* detém mais de 350 espécies, muitas delas com grande potencial forrageiro ou de uso como cobertura vegetal. O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste possibilita pesquisas com o gênero possuindo atualmente cerca de 450 acessos de 50 espécies, a maioria pertencente ao grupo Plicatula. Muitos dos acessos de *Paspalum* deste grupo são tetraplóides ($2n=4x=40$) e de comportamento apomítico, sendo raros os genótipos sexuais. A identificação apenas de acessos com modo de reprodução apomítica em uma coleção limita o programa de melhoramento genético, pois inviabiliza as hibridações em grande número. Para contornar essa situação, genótipos diplóides e sexuais devem ser poliploidizados para serem utilizados em cruzamentos intra e interespecíficos. Desta maneira, a caracterização reprodutiva em *Paspalum* é de grande importância, uma vez que viabiliza a identificação de genótipos sexuais e facilita a escolha de genitores potenciais para o melhoramento genético. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar reprodutivamente 137 acessos de *Paspalum* pertencentes ao grupo informal Plicatula conservados no BAG de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste pelo uso de citometria de fluxo e análise citoembriológica e buscar marcadores moleculares associados a apomixia neste grupo. Após a análise dos dados obtidos pela citometria de fluxo, 49 acessos foram considerados altamente apomíticos, 85 foram apomíticos facultativos e um acesso (BGP 272 – *P. rojasii*) apresentou comportamento compatível com o modo reprodutivo sexual. Além destes resultados, a técnica de citometria de fluxo possibilitou pela primeira vez, a caracterização do modo reprodutivo de 12 acessos pertencentes a espécie *P. rhodopedum*. Pela análise citoembriológica, foram caracterizados cinco acessos, sendo três sexuais (BGP 281 – *P. lenticulare*; BGP 272 – *P. rojasii* e BGP 380 – *P. compressifolium*) e dois acessos (BGP 232 – *P. plicatum*; BGP 178 – *P. compressifolium*) caracterizados como altamente apomítico e apomítico facultativo, respectivamente. Na parte molecular, houve a busca de associação para a apomixia com o uso de 1 marcador p779/780, descrito como completamente ligado a aposporia em *B. decumbens*, dois marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e 19 SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) previamente associados a apomixia no gênero *Paspalum* e, com base na metodologia de Análise de Bulk Segregante, foram genotipados 51 marcadores microssatélites nucleares, totalizando 73 marcadores moleculares avaliados em acessos sexuais e apomíticos de *P. compressifolium* e *P. lenticulare*. Para os marcadores SCAR também foram incluídos acessos pertencentes a *P. rojasii*. Ocorreu grande polimorfismo entre as amostras, porém não foi observada ligação entre a característica de apomixia e os marcadores moleculares avaliados. O presente estudo evidenciou uma significativa variação genética reprodutiva entre os acessos caracterizados, houve correspondência entre o nível de ploidia e o modo de reprodução como esperado e nenhum dos marcadores moleculares avaliados apresentaram

ligação com a aposporia no germoplasma avaliado. Assim, este estudo apresentou resultados importantes que poderão ser aplicados na seleção de genitores em programas de melhoramento genético de *Paspalum*.

Palavras-chave: Citometria de fluxo, Análise citoembriológica, Gramíneas, Germoplasma, Pré-melhoramento.

ABSTRACT

Belonging to the grass family, the genus *Paspalum* has more than 350 species, many of them with great forage potential or for use as vegetation. The *Paspalum* Germplasm Bank (GB) of Embrapa Pecuária Sudeste enables research with the genus and currently has about 450 accessions of 50 species, most of them belonging to the Plicatula group. Many of the *Paspalum* accessions of this group are tetraploid ($2n = 4x = 40$) and of apomitic behavior, and sexual genotypes are rare. Identifying only accessions with apomitic reproduction mode in a collection limits the breeding program because there is no possibility of hybridization. To circumvent this situation, diploid and sexual genotypes must be polyploidized for use in intra and interspecific crosses. Thus, reproductive characterization in *Paspalum* is of great importance, since it enables the identification of sexual genotypes and facilitates the choice of potential parents for genetic improvement. In this context, the objective of the present work was to reproductively characterize 137 *Paspalum* accessions belonging to the informal Plicatula group conserved in the *Paspalum* GB of Embrapa Pecuária Sudeste by the use of flow cytometry and cytoembriological analysis and search for molecular markers associated to apomixis. After analysis of the data obtained by flow cytometry, 49 accessions were considered highly apomictic, 85 were facultative apomictics and one accession (BGP 272 - *P. rojasii*) showed behavior compatible with the sexual reproductive mode. In addition to these results, the flow cytometry technique made it possible for the first time to characterize the reproductive mode of 12 accessions belonging to *P. rhodopedum* species. By cytoembriological analysis, five accessions were characterized, three sexual accessions (BGP 281 - *P. lenticulare*; BGP 272 - *P. rojasii* and BGP 380 - *P. compressifolium*) and two accessions (BGP 232 - *P. plicatulum*; BGP 178 - *P. compressifolium*) characterized as highly apomictic and facultative apomictic, respectively. In the molecular part, an association for apomixis was sought with the use of 1 marker p779/780, described as completely linked to apporia in *B. decumbens*, two RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) and 19 SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) previously associated with apomixis in the genus *Paspalum* and, based on the Bulk Segregant Analysis methodology, 51 nuclear microsatellite markers were genotyped, totaling 73 molecular markers evaluated in *P. compressifolium* and *P. lenticulare* sexual and apomitic accessions. For SCAR markers, accessions belonging to *P. rojasii* were also included. A large polymorphism occurred between the samples, but no link was observed between the apomixis characteristic and the molecular markers evaluated. The present study shows a greater reproductive genetic variation among the characterized accessions, there was a correspondence between the ploidy level and the reproduction mode, as expected, and none of the genotyped molecular markers were linked to apospory in the evaluated germplasm. Thus, this study presented important results that could be applied to the selection of parents in *Paspalum* breeding programs.

Keywords: Flow cytometry, Cytoembriological analysis, Grasses, Germoplasm, Pre-breeding.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Banco Ativo de Germoplasma de <i>Paspalum</i> spp. da Embrapa Pecuária Sudeste.	22
Figura 2 – Mecanismos apomíticos: diplosporia, aposporia e embrionia adventícia comparados com o processo sexual.....	26
Figura 3 – Via sexual de uma semente caracterizada por meio da técnica de citometria de fluxo	36
Figura 4 – Via apomítica de uma semente caracterizada por meio da técnica de citometria de fluxo..	37
Figura 5 – Saquinho de organza envolvendo a inflorescência devidamente identificada.....	47
Figura 6 – Obtenção das cariopses.....	48
Figura 7 – Processamento das cariopses e leitura no citômetro de fluxo para cada acesso avaliado....	49
Figura 8 – Esquema ilustrando a coleta e extração de DNA total de folhas de <i>Paspalum</i> spp.	52
Figura 9 – Esquema exibindo os critérios passo-a-passo das análises para busca de associação com a apomixia para os acessos genotipados em acrilamida com os marcadores SSR.....	60
Figura 10 – Óvulos apomíticos pertencentes ao acesso BGP 232 de <i>P. plicatulum</i> , apresentando núcleos polares e três sacos embrionários com ausência de antípoda. Escala de 100 µm.	63
Figura 11 – Saco embrionário sexual pertencente ao acesso BGP 281 de <i>P. compressifolium</i> . Presença aparente de antípodas, núcleos polares e oosfera circundada pelas sinérgides.	64
Figura 12 – Óvulo estéril pertencente ao acesso BGP 380 (<i>P. compressifolium</i>).....	65
Figura 13 – Histogramas gerados pelo Citômetro de Fluxo para alguns acessos de <i>Paspalum</i> spp.	71
Figura 14 – Perfil de amplificação dos marcadores RAPD avaliados em gel de agarose a 2%.....	81
Figura 15 – Seis marcadores SCAR (A a F) genotipados em agarose a 2,5% nos acessos de <i>Paspalum</i> spp. na busca de associação com apomixia.....	82
Figura 16 – Busca de associação do marcador SSR Pp-Unicamp20 (144-170 pb) ao modo de reprodução.....	87
Figura 17 – Perfil de amplificação dos marcadores Pp-Unicamp19 (203-241pb) e Pp-Unicamp18 (222-258 pb) em acrilamida 6%.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de <i>Paspalum</i> e respectivos acessos utilizados no presente estudo, com código BGP (Banco de Germoplasma de <i>Paspalum</i>), informações do código do coletor e local de coleta.....	42
Tabela 2 – Acessos utilizados para busca de marcadores moleculares associados a apomixia.	50
Tabela 3 – Acessos constituintes dos bulks analisados no presente estudo com os marcadores SSR. .	51
Tabela 4 – Marcadores SCAR implementados por Calderini et al. (2011) utilizados no presente estudo	54
Tabela 5 – Marcadores SSR utilizados no presente estudo para busca de associação com a apomixia	56
Tabela 6 – Modo de reprodução dos acessos analisados por análise citoembriológica.	62
Tabela 7 – Modo reprodutivo dos acessos analisados pela técnica de citometria de fluxo por seleção de sementes (FCSS) oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de <i>Paspalum</i>	67
Tabela 8 – Índices de fluorescência para os acessos BGP 151 (<i>P. rhodopedum</i>), BGP 75 (<i>P. compressifolium</i>) e BGP 272 (<i>P. rojasii</i>)	72
Tabela 9 – Modo de reprodução agrupados por espécie e número de acessos analisados pela técnica de citometria de fluxo oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de <i>Paspalum</i> da Embrapa Pecuária Sudeste	76
Tabela 10 – Resultados da amplificação dos marcadores SSR genômicos nos bulks.....	84

LISTA DE SIGLAS

- ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
- ACR – Apospory Controlling Region
- AFLP – *Amplified fragment length polymorphism*
- ASGR – Apospory Specific Genomic Region
- BAG – Banco Ativo de Germoplasma
- BSA – *Bulk Segregant Analysis*
- CMM – Célula-mãe do megásporo
- DIC – Contraste Interferencial Diferencial
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- EBN – *Endosperm Balance Number*
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FCM – *Flow Citometry*
- FCSS – *Flow Cytometry Seed Screen*
- PIB – Produto Interno Bruto
- RAPD– *Random Amplified Polymorphic DNA*
- RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
- RNA – Ácido Ribonucleico
- RS – Rio Grande do Sul
- SCAR – *Sequence Characterized Amplified Region*
- SSR – *Simple Sequence Repeat*
- USDA-ARS – United States Department of Agriculture - Agriculture Research Service

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. HIPÓTESES	17
3. OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1 AS FORRAGEIRAS NO BRASIL	18
4.2 O GÊNERO <i>PASPALUM</i>	19
4.3 O GRUPO <i>PLICATULA</i>	23
4.4 APOMIXIA.....	24
4.5 TIPOS DE APOMIXIA	25
4.6 CONTROLE GENÉTICO DA APOMIXIA	28
4.7 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DO MODO DE REPRODUÇÃO	30
4.7.1 Teste de progênie	30
4.7.2 Análise citoembriológica.....	30
4.7.3 Marcadores moleculares.....	32
4.7.4 Citometria de Fluxo.....	35
4.8 MELHORAMENTO GENÉTICO DE <i>PASPALUM</i> (GRUPO INFORMAL <i>PLICATULA</i>)	39
5. MATERIAL E MÉTODOS	42
5.1 GERMOPLASMA UTILIZADO.....	42
5.2 CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA POR MEIO DA TÉCNICA DE ANÁLISE CITOEMBRIOLÓGICA	45
5.3 CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA PELO USO DE SELEÇÃO DE SEMENTES POR CITOMETRIA DE FLUXO (FCSS).....	46
5.4. BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A APOMIXIA	49
5.4.1 Material vegetal e estratégias de busca	49
5.4.2 Extração e quantificação de DNA	52
5.4.3 Genotipagem com marcadores RAPD	52
5.4.4 Genotipagem dos marcadores SCAR.....	53
5.4.5 Genotipagem com marcadores SSR	55
5.4.6 Genotipagem com marcador p779/p780	61
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1 CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA PELO USO DE ANÁLISE CITOEMBRIOLÓGICA	61

6.2 CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA POR CITOMETRIA DE FLUXO	66
6.3 BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES RAPD, SCAR e p779/780 ASSOCIADOS À APOMIXIA NO GRUPO PLICATULA	80
6.4 BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES SSR ASSOCIADOS A APOMIXIA NO GRUPO PLICATULA:	84
7. CONCLUSÕES	90
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	91
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

Representada por cerca de 759 gêneros e 11.883 espécies (THE PLANT LIST, 2013) a família das gramíneas (Poaceae) apresenta reconhecida importância na agricultura, economia e ecologia, estando presente em uma grande variedade de habitats em todo o mundo (WHEELER et al., 1982; BARKER et al., 2000; OSBORNE et al., 2011). Dentro desta família, destaca-se o gênero *Paspalum* L. que detém de 330 (NOVO et al., 2018) à 400 espécies descritas na literatura (CHASE, 1929). Suas espécies possuem ocorrência natural em diversas áreas ao longo da América do Norte, Central e do Sul, sendo que os grandes centros de diversidade ocorrem no cerrado brasileiro e campos da Argentina, Uruguai e sul do Brasil. (RUA et al., 2010).

O Bioma do Cerrado brasileiro é caracterizado como o principal centro de origem das espécies do gênero *Paspalum*, cuja distribuição ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais das Américas (RUA, 2006). De maneira geral, as espécies desse gênero ocorrem distribuídas desde o nível do mar até altitudes superiores a 4.500 metros (MORRONE et al., 1995, 2000), em bordas de matas, áreas alteradas e savanas. O gênero possui espécies aquáticas, adaptadas à aridez ou salinidade relativamente alta (BARRETO, 1957, CLAYTON e RENVOIZE, 1986).

As espécies de *Paspalum* foram agrupadas, por descritores morfológicos, em grupos informais (CHASE, 1929). Diversas espécies pertencentes ao grupo informal Plicatula possuem grande potencial forrageiro. Este grupo engloba espécies predominantemente apomíticas, tetraplóides e com meiose irregular (VALLS e POZZOBON, 1987).

As principais características morfológicas do grupo são espiguetas lisas-convexas, geralmente com rugas (plicas) transversais na lema estéril com coloração verde-escuro na fase jovem e marrom ou olivácea na maturidade. O antécio apresenta cor castanho-escuro e brilhante (NOVO et al., 2018).

Taxonomicamente, o gênero *Paspalum* possui quatro subgêneros, sendo eles: *Anachyris*, *Ceresia*, *Harpostachis* e *Paspalum* sensu stricto, sendo este último o detentor de maior diversidade e do maior número de espécies (ZULOAGA e MORRONE, 2005, ORTIZ et al., 2013).

Em relação ao modo reprodutivo, as espécies do gênero *Paspalum* exibem mecanismos da fecundação cruzada, autofecundação ou apomixia. Este último mecanismo é também conhecido como agamospermia e é definida como o processo de formação de sementes sem a ocorrência da fecundação (DALL'AGNOL e SCHIFINO-WITTMAN, 2005)

dando origem a uma planta geneticamente idêntica a planta mãe (GAUER e CAVALLI-MOLINA, 2000).

Segundo HANNA (1995), a apomixia possui grande importância na produção de alimentos, forrageiras e fibras, que são propagadas por semente, e além disso, pode ser um mecanismo utilizado na estabilização de genótipos superiores e fixação da heterose (BURTON e FORBES, 1960, BHAT et al., 2005).

Na literatura, existem poucos trabalhos com o objetivo de se conhecer o modo reprodutivo das espécies pertencentes ao grupo informal *Plicatula* (GALDEANO et al., 2016; NOVO et al., 2018). Assim sendo, os resultados do presente estudo são de grande importância pois podem ser aplicados em futuros programas de melhoramento genético sendo determinantes para o aumento na alimentação animal incrementando assim a produção de carne e de leite (VALLE et al. 2009). No que tange ao melhoramento genético de *Paspalum*, os métodos mais comuns são por meio de seleções de ecótipos e via cruzamentos. Para viabilizar a seleção de ecótipos, é necessária a realização de coletas de germoplasma, avaliação, seleção, multiplicação dos melhores ecótipos e liberação de genótipos superiores como novas cultivares apomíticas, ou seja, clones propagados por sementes (ORTIZ et al., 2013). Como relatado anteriormente, no gênero *Paspalum* muitas espécies são apomíticas e tetraploides o que pode inviabilizar o avanço do programa de melhoramento, pela diferença entre a ploidia do material sexual e a sua contraparte apomítica. Assim, para contornar esse entrave, é imprescindível a existência da contraparte sexual diploide ou a duplicação dos cromossomos destes acessos por meio da colchicina originando uma planta tetraploide para viabilizar os cruzamentos com um genitor masculino apomítico doador de pólen.

Na literatura, existem disponíveis várias técnicas que são utilizadas para a caracterização reprodutiva em plantas, dentre elas as mais comuns compreendem: avaliações morfológicas em testes de progênie, cortes histológicos, análise de ovário por microscopia, teste com auxina, métodos bioquímicos (isoenzimas) e moleculares e citometria de fluxo (VALLE et al., 2004).

A caracterização reprodutiva e a consequente identificação de plantas apomíticas e sexuais dentro do gênero *Paspalum* é fundamental na conservação adequada de recursos genéticos e avanços dos programas de melhoramento genético. O conhecimento do modo de reprodução e do desenvolvimento das sementes de uma espécie determina a escolha do método de melhoramento aplicável e do tipo de variedade a ser obtida (BORÉM e MIRANDA, 2005).

2. HIPÓTESES

1. É possível a ocorrência de acessos diploides sexuais dentro do grupo informal Plicatula conservados no BAG *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste.
2. Ocorre variabilidade genético-reprodutiva dentro dos acessos aqui caracterizados.
3. É possível a associação de marcadores moleculares com a apomixia em acessos pertencentes ao grupo Plicatulado gênero *Paspalum*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar reprodutivamente 137 acessos do gênero *Paspalum* do grupo informal Plicatula, conservados no BAG *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste, e buscar marcadores moleculares associados a apomixia nesse grupo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar o modo reprodutivo de 137 acessos de *Paspalum* por meio da técnica de citometria de fluxo via análise de conteúdo de DNA de sementes e classificá-los como sexual, apomítico facultativo ou altamente apomítico.
2. Em casos necessários, identificar o modo de reprodução via análise citoembriológica;
3. Buscar associação entre a apomixia e marcadores moleculares disponíveis na literatura nas espécies que apresentam genótipos sexuais.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 AS FORRAGEIRAS NO BRASIL

Como base alimentar da bovinocultura de corte e de leite, as plantas forrageiras são de destacada importância para o Brasil, pois a criação de animais a pasto promoveu um diferencial qualitativo para a carne brasileira e colocou o país como o segundo maior exportador mundial (CARVALHO e ZEN, 2017).

Segundo as estimativas da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC), o Brasil exportou no ano de 2018 cerca de 2 milhões de toneladas de carne bovina, apresentando expressiva contribuição ao Produto Interno Bruto (PIB) da agropecuária brasileira. O incremento da produção brasileira ocorreu devido a vários fatores como: melhoramento genético dos animais e de gramíneas forrageiras, melhoria no manejo das pastagens, terras disponíveis, condições climáticas favoráveis, que contribuíram para ganhos de produtividade (FLORINDO et al., 2015). Vale a pena ressaltarmos ainda que, o Brasil detém o título de maior produtor e exportador de sementes de forrageiras tropicais do mundo, produzindo em 2017/2018 um total de 8 milhões de toneladas de sementes exportando mais de 38 mil toneladas deste insumo (ABSCEM, 2018).

Estando presente em todas as unidades da federação brasileira, a pecuária é marcada por significativa presença nas regiões Centro-Oeste e Norte do país possuindo, nestas regiões, mais de 74 e 48 milhões de cabeças de gado respectivamente. Os estados com maiores rebanhos são Mato Grosso (29 milhões), Goiás (22 milhões), Minas Gerais (21,9 milhões) e Mato Grosso do Sul, com 21,4 milhões de cabeças (IBGE, 2017).

Devido à atividade pecuária ser amplamente distribuída por todo o território nacional e o Brasil ser detentor de uma série de biomas diferenciados, é de grande importância a existência de espécies forrageiras, incluindo gramíneas e leguminosas que atendam às necessidades específicas de cada região. Em sistemas de exploração pecuária baseados na utilização de pastagens, a planta forrageira assume papel primordial, uma vez que tanto a rentabilidade quanto a sustentabilidade desses sistemas dependem da escolha da forrageira adequada (FONSECA et al., 2011).

Com aproximadamente 150 milhões de hectares (ABIEC, 2019), as pastagens plantadas no território brasileiro resumem-se à utilização de poucas cultivares forrageiras, sendo as braquiárias as mais utilizadas ocupando cerca de 80% de toda a área plantada (MACEDO, 2006). No entanto, existem inúmeras espécies forrageiras adaptadas para as

condições brasileiras, sendo a maioria tropical ou subtropical, com origem na África. Além da expressiva presença do gênero *Urochloa* (braquiárias), ocorrem também os gêneros *Andropogon*, *Arachis*, *Avena*, *Cynodon*, *Hemarthria*, *Megathyrus*, *Paspalum*, *Penisetum*, *Sorghum*, *Stylosanthes* e outros (MACHADO et al., 2010).

Com destacada importância dentro da família Poaceae, as espécies do gênero *Paspalum* vêm sendo cada vez mais utilizadas como uma boa opção de plantas forrageiras com alto valor nutricional para o gado e, por ser um gênero com espécies nativas brasileiras, existe um menor risco de causar um desequilíbrio ecológico (BATISTA e NETO, 2000).

No Pampa gaúcho, as espécies do gênero *Paspalum* são frequentes e numerosas, constituindo-se em um componente obrigatório em todas as formações campestres. Portanto, o estudo deste gênero é importante não só para o conhecimento das pastagens naturais brasileiras, como também para buscar espécies com características agrônomicas desejáveis, possíveis de se utilizar tanto em programas de melhoramento como também para serem empregadas diretamente como forrageiras cultivadas (BARRETO, 1974).

4.2 O GÊNERO *PASPALUM*

Paspalum é um dos gêneros mais importantes dentro da família Poaceae, não somente pela abundância no número de espécies e por sua importância econômica, mas também por ter grande representatividade nas pastagens naturais da América (ZULOAGA e MORRONE, 2005). Pertencente à tribo Paniceae, o gênero *Paspalum* compreende aproximadamente de 330 (ALISCIONI, 2002) a 400 espécies (CHASE, 1929). Segundo dados de Valls (1987), o gênero ocupa um reconhecido destaque entre as gramíneas brasileiras e possui muitas espécies com bom valor forrageiro.

É o principal gênero de gramíneas forrageiras tropicais do Novo Mundo (ZULOAGA e MORRONE 2005; MORRONE et al. 2012; SCATAGLINI et al. 2014) e apresenta grande adaptabilidade a diferentes ecossistemas. Além disso, possui grande importância aplicada em áreas de pastagens servindo de base alimentar para a criação de ruminantes, além do seu uso como cobertura vegetal. (BATISTA e NETO, 2000). Vale a pena destacarmos que o gênero *Paspalum* apresenta papel considerável na conservação do solo, como em zonas litorâneas. Algumas espécies são importantes na proteção de solos arenosos e utilizadas na fabricação de papel. Além disso, suas sementes servem de alimento para muitos pássaros (PRESTES et al., 1976). Pode ser utilizada também na alimentação humana pois a espécie *P. scrobiculatum* L., popularmente conhecida como *Kodomillet*, produz sementes que contêm níveis consideráveis

de proteínas sendo uma espécie amplamente consumida na Índia (VERMA et al., 2015). Além disso, esta espécie apresenta potencial medicinal, sendo suas sementes úteis no controle de inflamação, hepatopatia, hemorragias, debilidade geral e até mesmo no controle de diabetes (THE WEALTH OF INDIA, 2003; JAIN et al., 2010).

Os diferentes ecótipos de *Paspalum* possuem adaptações às mais variadas condições de solo e clima e apresentam características morfológicas muito variadas quanto, por exemplo, a presença ou não de rizomas, seu tamanho e espessura, tamanho das flores e das inflorescências, rendimento e qualidade (NABINGER e DALL'AGNOL 2008), etc. Segundo Carámbula (2002), diversas espécies do gênero *Paspalum* possuem grande resistência ao pisoteio e pastoreio quando em solo com boa fertilidade; resistência à estiagem ou ao excesso de água; e capacidade de rebrotar vigorosamente após períodos de seca em respostas às chuvas graças ao seu sistema radicular extenso.

Distribuindo-se ao longo dos trópicos e subtropicais, espécies do gênero *Paspalum* L. podem ocorrer em florestas subtropicais, florestas tropicais, savanas, pântanos e dunas, porém são mais frequentemente encontradas nas pastagens naturais de leste da Bolívia, Paraguai, Brasil Central e do Sul, norte da Argentina e do Uruguai (ZULOAGA e MORRONE, 2005). Entretanto, no Brasil, ocorrem 214 espécies (FLORA DO BRASIL 2020, 2019), constituindo parte das mais diversas formações vegetais, em diferentes condições ecológicas. Deste modo, são conhecidas espécies tipicamente hidrófilas que ocorrem próxima dos grandes rios da Amazônia até espécies xerófitas nas condições de Cerrado do Centro-Oeste e Nordeste brasileiro (BATISTA e NETO, 2000).

Segundo Allen e Hall (2003), o principal centro de origem e da diversidade do gênero está localizado nos trópicos e subtropicais da América do Sul, principalmente na região central do Brasil, onde numerosas espécies parecem estar associadas com extensas pradarias e terrenos rochosos. Nesta região brasileira, ocorre um importante domínio ecológico, o cerrado, sendo responsável por abrigar 157 espécies do gênero (FLORA DO BRASIL 2020, 2019).

Morfologicamente, as espécies de *Paspalum* são caracterizadas por suas espiguetas plano-convexas. Elas também são reconhecidas pela ausência, ou, raras vezes, a presença mínima, de gluma inferior (BATISTA e NETO 2000; RUA et al., 2010). As inflorescências são em panícula com um a muitos ráceros, estes digitados ou racemosos no eixo principal. Outra característica do gênero é a cor do antécio, que principalmente no grupo informal *Plicatula* possuem uma cor marrom escuro brilhante (HITCHCOCK, 1971)

Em relação à taxonomia do gênero, estudos pioneiros foram realizados por LINNAEUS (1759) que identificou várias espécies. Estudos taxonômicos mais abrangentes foram realizados por CHASE (1929), PILGER (1940), BARRETO (1974), CLAYTON e RENVOIZE (1986), ZULOAGA e MORRONE (2005), DENHAM (2005) e SCATAGLINI et al (2014).

Estudos taxonômicos mais recentes foram realizados por Zuloaga e Morrone (2005) e aceitaram três subgêneros em *Paspalum*: *Anachyris* (Nees) Chase, *Ceresia* e *Paspalum* subdividido em 28 grupos informais. Já, Denham (2005) reconheceu o subgênero *Harpostachys* (Trin.) S. Denham. Atualmente, 39 grupos informais são listados para o gênero (SCATAGLINI et al., 2014)

Devido ao grande interesse em várias espécies desse gênero, muitos acessos foram conservados em bancos de germoplasma em vários países (CIDADE et al., 2013). Em número, o maior Banco de Germoplasma do gênero *Paspalum* pertence ao *United States Department of Agriculture – Agriculture Research Service* (USDA-ARS), o qual conserva mais de mil acessos de *Paspalum* e está localizado em Griffin, na Georgia, onde são realizadas pesquisas relacionadas à conservação dos recursos genéticos do gênero (RAYMER et al., 2008). Além desse BAG, há a conservação de acessos de *Paspalum* em outros países, como na Argentina e Brasil (CASLER e DUNCAN, 2003).

No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) possui um grande acervo de espécies forrageiras conservadas em Bancos de Germoplasma, sendo parte delas pertencentes ao gênero *Paspalum*. No sul do Brasil, destacamos o Banco Ativo de Germoplasma de Forrageiras do Sul, localizado na Embrapa Pecuária Sul, em Bagé, Rio Grande do Sul (RS), com mais de 300 amostras conservadas. O acervo de plantas contempla desde acessos de *P. notatum* Flügge, a grama forquilha e *P. lepton* Schult., a grama cinzenta, como também acessos de espécies do gênero *Bromus* (ALELO, 2019).

Já a Embrapa Pecuária Sudeste, localizada no município de São Carlos – região central do estado de São Paulo - se destaca por realizar pesquisas visando à obtenção de novas cultivares de *Paspalum* para fins forrageiros ou como cobertura vegetal. Esta unidade de pesquisa possui uma expressiva coleção de acessos mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG *Paspalum*) com aproximadamente 450 acessos (Figura 1) de 50 espécies, tendo como principais objetivos o enriquecimento, a conservação, a caracterização, a avaliação, a valorização e o uso do germoplasma. Além disso, o BAG *Paspalum* mantido pela Embrapa Pecuária Sudeste é o mais diversificado do mundo no que

tange as espécies do grupo Plicatula, conservando mais de 270 acessos de 12 espécies deste grupo (BATISTA e NETO, 2000; ALELO, 2019).

Figura 1 – Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* spp. da Embrapa Pecuária Sudeste.



Fonte: Autor

Citogeneticamente, a maioria das espécies do gênero *Paspalum* possui um número cromossômico múltiplo de 10, ocorrendo vários níveis de ploidia (ZULOAGA e MORRONE, 2005). Muitas espécies são tetraploides ($2n = 4x = 40$) e outras são multiploides, ou seja, na mesma espécie ocorrem citótipos diploides ($2x$) e poliploides, geralmente tetraploides ($4x$) e raramente triploides ($3x$) ou hexaploides ($6x$) (NOVO et al., 2018). Neste sentido, vários trabalhos têm sido realizados a fim de se conhecer o número de cromossomos, compreender o comportamento meiótico, bem como o modo de reprodução do gênero (PAGLIARINI et al., 2001; ADAMOWSKI et al., 2005; HOJSGAARD et al., 2008; PENALOZA et al., 2008; POZZOBON et al., 2013). Nestes estudos, a variabilidade cromossômica e o modo de reprodução foram identificados em diferentes acessos diploides, tetraploides ou hexaploides. Para *Paspalum scrobiculatum* L. e *P. floridanum* Michx há relatos na literatura de valores de $12x$ e $16x$ para o nível de ploidia, respectivamente (DARLINGTON e WYLIE, 1956; CHAO, 1974).

No que tange ao modo reprodutivo, de forma geral, acessos diploides apresentam reprodução sexual, enquanto os poliploides são apomíticos (QUARÍN, 1992). No entanto,

segundo BURSON (1997), alguns poliploides reproduzem-se sexualmente e muitos apomíticos são facultativos. Desta maneira estes dados reforçam a existência de uma grande heterogeneidade genética dentro do gênero *Paspalum* (OBEID e PEREIRA, 2011).

4.3 O GRUPO PLICATULA

Com reconhecida importância dentro do gênero *Paspalum*, o Grupo Plicatula apresenta um total de 40 espécies descritas (OLIVEIRA e VALLS, 2008), possuindo uma grande heterogeneidade morfológica (KILLEN, 1990). Descrito por Chase (1929), este grupo é caracterizado por suas espécies apresentarem espiguetas com convexidade geralmente pronunciada, antécio castanho-escuro a atro-purpúreo brilhante e lema inferior com ondulações transversais. Segundo Zuloaga e Morrone (2005) suas espécies podem ser perenes ou anuais, terrestres ou palustres e inflorescências geralmente com numerosos ráceros, rígidos, espiguetas marcadamente plano-convexas. Vale a pena destacar que o grupo Plicatula pode ser facilmente reconhecido pelas características morfológicas de suas espiguetas, no entanto, a delimitação do taxons é dificultada pela grande variabilidade dos caracteres vegetativos e reprodutivos.

Em relação a sua distribuição, o grupo Plicatula possui ocorrência limitada ao continente americano, dos Estados Unidos até o Uruguai e a Argentina. No Brasil, o grupo reúne, aproximadamente, trinta espécies anuais e perenes, algumas endêmicas a determinadas regiões e outras de ampla distribuição pelo continente americano (OLIVEIRA, 2004), a exceção de *P. scrobiculatum* L. e espécies relacionadas, que ocorrem na Ásia, África e Oceania (OLIVEIRA e VALLS, 2008).

Estudos genético moleculares dentro do grupo informal Plicatula são pouco frequentes na literatura, fato este que pode estar relacionado a dificuldade taxonômica dentro do grupo. Novo et al. (2016) realizaram cruzamentos interespecíficos entre acessos pertencentes as espécies *P. oteroi* - Grama-tio-Pedro (utilizado como doador de pólen apomítico tetraploide) e *P. plicatulum* (genitor feminino que foi tetraploidizado por meio do uso de colchicina). Como principais resultados, a análise citogenética mostrou que os híbridos formaram pareamento meiótico irregular com um menor número de quadrivalentes e mais bivalentes quando comparado aos seus genitores. Assim, este estudo sugeriu que a espécie *P. oteroi* é um autotetraplóide natural. Foi também efetuada a caracterização reprodutiva dos híbridos por meio da técnica de citometria de fluxo, nesta etapa do trabalho, ocorreu a presença desde

híbridos com comportamento apomítico facultativo, obrigatórios e sexuais, sendo este último mecanismo o mais prevalente.

Estudos envolvendo cruzamentos interespecíficos e a determinação do modo reprodutivo em espécies do grupo informal *Plicatula* foram realizados por Novo et al. (2017). Neste estudo, os autores efetuaram cruzamentos utilizando 22 acessos tetraplóides apomíticos pertencentes a 12 espécies diferentes como doadores de pólen, e um genótipo sexual tetraplóide induzido por colchicina a partir de um acesso sexual diploide de *P. plicatulum*. A frequência do sucesso de cruzabilidade variou entre 0 e 16%. Os cruzamentos mais bem sucedidos envolveram as espécies *P. guenoarum*, *P. plicatulum*, *P. chaseanum* e *P. oteroi*. A fertilidade dos híbridos amostrados variou entre 1,6% para o cruzamento envolvendo *P. lenticulare* e 40,1% para um cruzamento intraespecífico (*P. plicatulum*, acesso Hojs388). Os híbridos das famílias mais numerosas foram classificados quanto ao modo de reprodução utilizando análise de sementes por citometria de fluxo, do qual variaram desde apomíticos a sexuais.

4.4 APOMIXIA

A reprodução sexual em angiospermas compreende a alternância cíclica entre a planta em si ($2n$) e um gametófito (n). Os gametas masculinos e femininos haploides são originados no desenvolvimento embrionário por meio de divisões meióticas e dão origem a um microgametófito (pólen) e um megagametófito (o saco embrionário), respectivamente. Em muitas plantas, o saco embrionário sexual inclui uma oosfera, duas sinérgides em um polo, uma grande célula central binucleada (núcleos polares) e antípodas no polo oposto, sendo conhecido morfológicamente como um saco embrionário do tipo *Polygonum*, porém podem ocorrer variações. A formação da cariopse ocorre após a dupla fertilização do óvulo e os núcleos polares do saco embrionário para formar o embrião ($2n$) e o endosperma ($3n$) (ORTIZ e PESSINO, 2002).

Em contrapartida à reprodução sexual, encontramos na natureza o mecanismo da apomixia, que inibe a redução do número de cromossomos na meiose e a fecundação do óvulo, produzindo, desta maneira, sementes viáveis cujos embriões se desenvolvem por partenogênese, resultando em réplicas genéticas da planta mãe (ORTIZ e PESSINO, 2002). A apomixia, em grego significa *apo* “longe de” e *mixia* “mistura”, é sinônimo de formação assexual da semente ou agamospermia (ASKER e JERLING, 1992; NAUMOVA, 2008).

Embora considerada como um fenômeno raro, a apomixia ocorre em grande parte das angiospermas (BICKNELL e KOLTUNOW, 2004). Segundo Carman (1997), este fenômeno foi descrito em mais de 400 espécies com flores, incluindo representantes de mais de 40 famílias e é bem representada tanto entre monocotiledôneas quanto em plantas eudicotiledôneas, parecendo estar ausente em gimnospermas (KRIZEK, 2006). No gênero *Paspalum*, a apomixia é uma característica de grande relevância, uma vez que se faz presente em várias espécies do gênero (OZIAS-AKINS e DJIK 2007; ORTIZ et al., 2013).

No que tange a sua importância, a apomixia possui grande potencial para revolucionar a produção agrícola, maximizando a produção por meio da fixação do vigor híbrido, evitando assim perdas devido a problemas de polinização tornando o processo de melhoramento mais eficiente (DALL'AGNOL e SCHIFINO-WITTMANN, 2005). Por exemplo, em muitos países em desenvolvimento, a cultura do arroz é a principal fonte de alimento, e muitos agricultores possuem pequenos arrozais os quais são responsáveis por quase toda produção. A apomixia na cultura do arroz permitiria que os agricultores nos países em desenvolvimento perpetuassem o vigor híbrido utilizando sementes da colheita anterior para plantar a próxima safra, não necessitando desta maneira, da compra de novas sementes (KOLTUNOW, 1993).

Outros fatores de grande importância atrelados ao uso da apomixia são: (1) a possibilidade de propagar e armazenar via semente culturas que só possam ser propagadas por tubérculos, rizomas ou estaca, (2) produção de sementes por pequenos produtores por um número infinito de gerações, (3) a imediata fixação de qualquer genótipo superior, selecionado no processo de melhoramento, permitindo que o mesmo dê origem a plantas idênticas, independentemente do seu grau de heterozigose e (4) a ausência de contaminação cruzada em programas de sementes híbridas que não possuem boas linhas de esterilidade masculina (HANNA, 1995; KOLTUNOW et al., 1995; VAN DIJK e VAN DAMME, 2000; VALLE et al., 2004, BHAT et al., 2005, BARCACCIA e ALBERTINI, 2013).

4.5 TIPOS DE APOMIXIA

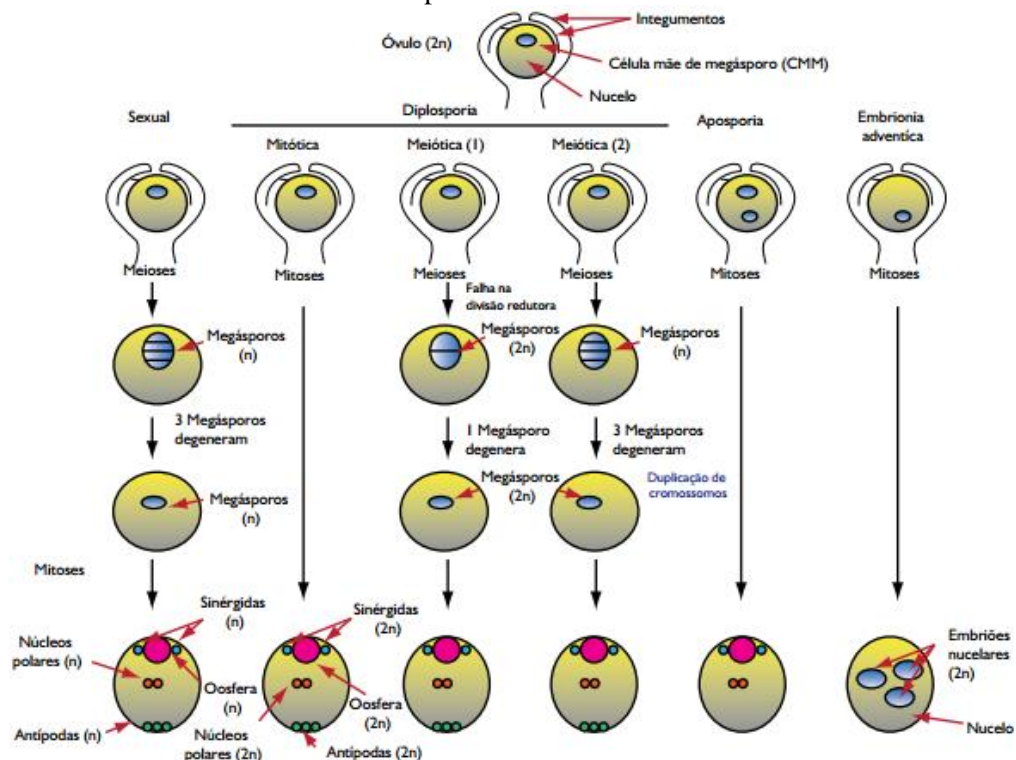
A apomixia é subdividida em duas categorias: esporofítica ou gametofítica (HAND e KOLTUNOW, 2014). Esta divisão é baseada na origem e no padrão de desenvolvimento da célula que originará o embrião. Se o embrião se desenvolve a partir de um gametófito (saco embrionário) ela é denominada gametofítica. Em contrapartida, se o embrião se desenvolve diretamente da oosfera na ausência do saco embrionário, ela é classificada como esporofítica (HAND e KOLTUNOW, 2004).

Na apomixia esporofítica (Figura 2), também denominada embrionia adventícia, os embriões desenvolvem-se a partir de divisões mitóticas de células somáticas do óvulo (principalmente oriundos da nucela), integumentos ou parede do ovário e o embrião gerado independe da presença de um saco embrionário (KOLTUNOW, 1993; GAUER e CAVALLI-MOLINA, 2000).

É inteiramente possível que um embrião sexual e um embrião adventício possam ser simultaneamente gerados no desenvolvimento da semente resultando no fenômeno da poliembrião, ou seja, o desenvolvimento de vários embriões em uma semente (NAUMOVA, 2008).

A embrionia adventícia é um mecanismo encontrado esporadicamente ao longo de toda a árvore filogenética das plantas com flores. É mais típica de árvores, arbustos e gramíneas perenes que se originam nas regiões dos trópicos e sub-trópicos (NAUMOVA, 2008). Segundo estudos de Bashaw (1980), a embrionia adventícia é um mecanismo comum em espécies de *Citrus*, onde os embriões se diferenciam principalmente das células da nucela, e devido a este acontecimento, é referido como embrionia nucelar. E este mecanismo também ocorre em gramíneas, podendo ocorrer em conjunto com a aposporia.

Figura 2 – Mecanismos apomíticos: diplosporia, aposporia e embrionia adventícia comparados com o processo sexual



Fonte: (GAUER e CAVALLI-MOLINA, 2000 modificado por KARASAWA, 2009)

No mecanismo da apomixia gametofítica (Figura 2), ocorre a omissão da meiose e a formação de um embrião a partir de uma oosfera não fertilizada (partenogênese), enquanto o endosperma pode ser formado por desenvolvimento autônomo dos núcleos polares (célula central) ou dependente de fertilização (pseudogamia). Dependendo do mecanismo da formação do megásporo não reduzido, a descendência resultante, pela regra, será geneticamente idêntica à planta-mãe, sem quaisquer rearranjos cromossômicos. E desta maneira, é possível fixar genótipos complexos em múltiplas gerações sem uma perda de heterozigosidade (SCHMID et al., 2015).

Segundo Asker e Jerling (1992) existem dois tipos de apomixia gametofítica: a diplospórica e apospórica. Na diplospórica o saco embrionário se origina por divisão mitótica da célula mãe do megásporo e este mecanismo foi encontrado em representantes de diferentes espécies das famílias Asteraceae, Solanaceae, Rosaceae, Poaceae e Brassicaceae (NAUMOVA, 2008).

De acordo com Bhat et al (2005), a apomixia gametofítica do tipo apospórica ocorre quando os sacos de embriões não reduzidos se desenvolvem a partir de células da nucela no óvulo. Várias células da nucela podem iniciar o desenvolvimento apospórico, mas geralmente apenas uma delas dá origem a um saco embrionário maduro. A aposporia é iniciada após a diferenciação da célula-mãe do megásporo (CMM). O megásporo se degenera e o saco embrionário apospórico ocupa a posição perto da extremidade micropilar do óvulo. O embrião desenvolve partenogeneticamente da oosfera não reduzida, mas a polinização e fertilização dos núcleos polares são necessárias para o desenvolvimento do endosperma. A aposporia gametofítica é de ocorrência comum em muitas espécies da família das gramíneas e no gênero *Paspalum* é o mecanismo apomítico mais recorrente (ACUÑA et al., 2004).

No gênero *Paspalum*, o gametófito feminino apomítico mais comumente encontrado é o do tipo *Paspalum*, que morfológicamente possui uma oosfera e dois núcleos polares, embora uma ou duas sinérgides possam ser observadas ao lado da oosfera e as antípodas estão sempre ausentes (ORTIZ et al., 2013).

Uma particularidade inerente à apomixia é que este mecanismo é mais comumente encontrado em plantas triploides e poliploides. Assim sendo, Martínez et al. (2007) discutem que, em *Paspalum*, a principal causa deste fator é a ocorrência de um efeito letal pleiotrópico associados com gametas haploides fazendo com que a ocorrência da apomixia em plantas diploides não seja normalmente encontrada. No entanto, a poliploidização por si só não é suficiente para induzir apomixia, uma vez que nem todos os apomíticos são poliploides como

é o caso relatado na literatura por Skalinska (1971), que encontrou plantas diploides apomíticas da espécie *Hieracium aurantiacum* L.

4.6 CONTROLE GENÉTICO DA APOMIXIA

A apomixia é um caráter que parece ser controlado por muitos genes, podendo ser estes recessivos ou dominantes. Segundo Burson (1991; 1992), um gene dominante e genes reguladores determinam a expressão da apomixia facultativa no biotipo de anteras roxas de *P. dilatatum*. Já em *P. notatum*, Martínez et al. (2001) verificaram que os resultados de análise de progênes concordavam de maneira mais plausível com um modelo modificado de herança tetrassômica, de um só gene dominante com efeito pleiotrópico e penetrância incompleta. Em estudos recentes, Marcon et al. (2019) relataram que em *P. notatum* a apomixia parece ser controlada por muitos genes sendo estes de herança quantitativa e que a distância genética dos genitores pode afetar a sua expressão.

Em *P. notatum* o segmento do cromossomo que codifica para aposporia se assemelha a região genômica específica para a aposporia (ACR) encontrada em outras gramíneas, tais como *Pennisetum squamulatum* (OZIAS-AKINS et al., 1998; ROCHE et al., 1999), *Cenchrus ciliaris* (OZIAS-AKINS et al., 2003; ROCHE et al., 1999), *P. simplex* (LABOMBARDA et al., 2002; PUPILLI et al., 2004) e *Panicum maximum* (EBINA et al., 2005). Mapas genéticos de ligação foram desenvolvidos e foi verificada a sintenia da região que controla aposporia em *P. notatum* e *P. simplex* com o arroz (*Oryza sativa*) e o milho (*Zea mays*). Pupilli et al. (2001) identificaram um conjunto de marcadores moleculares que apresentaram grande sintenia entre a região que controla a aposporia (ASGR) em *P. simplex* com a região telomérica do braço longo do cromossomo 12 em arroz. Assim, este estudo mostrou que a expressão da apomixia em *P. simplex* é dada por um segmento cromossômico relativamente grande que é herdado como uma única unidade genética. Já Podio et al. (2012) encontraram resultados similares com *P. notatum*, no entanto, foi encontrada grande sintenia com a região que controla a aposporia desta espécie com os cromossomos 2 e 12 de arroz e 3 e 5 em milho. Estas pesquisas abrem um questionamento sobre a possibilidade ou não da região que controla a aposporia (ACR) ou da ASGR serem conservadas ao longo da família das gramíneas. Recentes descobertas sobre homologia entre a ACR de *P. simplex* e de outras espécies de gramíneas foram realizadas por Galla et al. (2019). Neste estudo os autores encontraram grande sintenia em relação ao cromossomo da região da ACR em *P. simplex* com as posições teloméricas dos cromossomos 12, 8, 3, e 4 de arroz, *Sorghum bicolor*, *Setaria*

italica e *Brachypodium distachyum*, respectivamente, e outra porção mais centromérica foi sintênica com o cromossomo 1 de milho.

Na genética da apomixia é descrita a ocorrência de elementos transponíveis (retrotransposons I e TY3-gypsy e Ty1-copia) ligados a ASGR em *P. notatum* que também ocorrem em sequências repetitivas na ASGR de outras espécies de gramíneas (AKIYAMA et al., 2004; CALDERINI et al., 2006; CONNER et al., 2008).

Segundo Ortiz et al. (2013), análises moleculares comparativas e estudos citológicos revelaram que a ACR em *P. simplex* e espécies de *P. notatum* parece ser localizada numa região cromossômica heterocromática não-pericentromérica em que a recombinação genética é suprimida. Desta maneira, a supressão do advento da recombinação pode estar relacionada a um rearranjo de DNA que decorre de sua poliploidização. Além disso, a perda de recombinação após rearranjo cromossômico local também foi relatada em outras espécies apomíticas como *Pennisetum squamulatum* (OZIAS-AKINS et al., 1998) e *Cenchrus ciliaris* (GOEL et al., 2003)

Outra particularidade a ser ressaltada é a observação de menos indivíduos apomíticos em populações segregantes do que o esperado. A hipótese mais comum para explicar este fenômeno é a presença de um alelo letal ligado ao locus da apomixia, agindo quanto ao nível gametofítico quanto ao esporofítico (ORTIZ et al., 2013). Polegri et al. (2010) propuseram que em um sistema de cruzamento envolvendo os genitores sexuais e apomíticos, o genótipo sexual que recebe o locus da apomixia deve regular uma rede de genes que atuam a jusante dos fatores ligados à apomixia. Se este genótipo sexual é incapaz de regular adequadamente a interação destes genes, por exemplo, devido à distância genética entre os genitores, como em cruzamentos interespecíficos, poderia finalmente resultar em zigotos apomíticos letais.

Estudos atuais relacionados ao controle genético molecular da apomixia na espécie *Arabidopsis thaliana* revelou uma mutação na proteína denominada ARGONAUTA 9 (Ago9) que pode levar o gametófito feminino a se reproduzir apomiticamente (SCHMIDT et al., 2011). Da mesma maneira que a proteína Ago9, a proteína Ago104 quando mutada pode originar sacos embrionários apomíticos em *Arabidopsis* e em milho (SINGH et al., 2011). Mutações adicionais nos genes metilados de *Arabidopsis* RNA-dependente (RdDM) (Metilação de DNA dependente de RNA) podem resultar defeitos equivalentes, sugerindo que o silenciamento de regiões repetitivas heterocromáticas é fundamental para distinguir a via sexual da via apomítica (OLMEDO-MONFIL et al., 2010).

Transcrição de RNA diferencialmente expressos em espécies do gênero *Paspalum* podem aumentar a probabilidade de se identificar genes ligados a aposporia. Estes genes

podem estar ligados a classes de ontologia, que são: genes de “transdução de sinal”, genes que se ligam ao DNA, metabolismo de proteínas, genes ligados à transcrição e de transporte (ORTIZ et al., 2013). Em pesquisas recentes, vale a pena ressaltarmos que já existem vários genes candidatos que podem estar ligados diretamente ao mecanismo da apomixia no gênero *Paspalum*, dentre eles podemos citar o MT-A70, que desempenha o papel de uma metiltransferase em locais específicos de RNAm; o gene MAP3K, que codifica uma proteína ativadora de mitógeno que foi expresso diferencialmente em plantas apomíticas e sexuais na espécie de *P. notatum* (ORTIZ et al., 2013).

4.7 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DO MODO DE REPRODUÇÃO

Segundo Naumova (1997), Carneiro e Dusi (2002) e 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) avaliações morfológicas em testes de progênie, 2) análise de ovário por microscopia (análise citoembriológica), 3) teste com auxina, 4) métodos bioquímicos (isoenzimas) e moleculares e 5) citometria de fluxo.

4.7.1 Teste de progênie

Segundo Bashaw (1980), 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. Entretanto esta técnica demanda a presença de um número populacional elevado (mais de 100 indivíduos), a disponibilidade de espaço para o desenvolvimento das plantas e o tempo necessário para um ciclo de crescimento completo. Além disso, a ocorrência de apomixia facultativa ou homozigose de genitores podem causar erros na determinação do grau de apomixia (VALLE et al., 2004).

4.7.2 Análise citoembriológica

As técnicas citoembriológicas de estudo da estrutura do ovário utilizando a microscopia se baseiam em cortes seriados e coloração, permitindo a visualização da megagametogênese e detectando, desta maneira, a apomixia. Entretanto, esta técnica demanda muito tempo de preparo de amostras e de análise, além de demandar mão-de-obra especializada sendo inviável no estudo de grandes populações.

Outras metodologias utilizando clarificação do ovário e microscopia de fase ou interferência (HERR, 1971; YOUNG et al., 1979; CRANE e CARMAN, 1987) são também indicadas garantindo resultados mais seguros e eficientes (VALLE et al., 2004). Ao efetuarem o cruzamento entre plantas da espécie de *P. notatum*, sendo 11 híbridos tetraploides sexuais cruzados com seis clones apomíticos doadores de pólen, Acuña et al. (2011) obtiveram um total de 2700 plantas que foram denominadas de segunda geração segregante de híbridos tetraploides. Deste total, foram selecionados 211 híbridos, os quais foram submetidos à caracterização reprodutiva pela técnica de análise citoembriológica de ovários pelo método de Young (1979). Um total de 20 óvulos foram analisados a partir de, pelo menos, duas inflorescências diferentes. Foram caracterizadas 173 plantas como sexuais, pois apresentaram um único saco embrionário, sete plantas como altamente apomíticas e 31 plantas como apomíticas facultativas. Nas plantas altamente apomíticas, os sacos de embrião apospórico foram encontrados em, pelo menos, 65% dos óvulos. Já nas plantas apomíticas facultativas, 30% dos óvulos analisados exibiram sacos apospóricos.

Krykci et al. (2012) analisaram citoembriologicamente o modo de reprodução de híbridos intraespecíficos de *P. notatum*, gerados a partir de cruzamentos entre genitores sexuais e apomíticos. Como principal resultado os autores puderam observar que das 54 plantas híbridas analisadas, 20 plantas foram classificadas como apomíticas e 16 se mostraram sexuais. Entretanto, no restante das plantas não houve resultados conclusivos, devendo desta maneira ser melhor analisados.

Ao analisar citoembriologicamente o modo reprodutivo de três plantas tetraploidizadas de *P. notatum* ($2n = 4x = 40$), Krykci et al. (2016) relataram o modo reprodutivo sexual em duas delas (WKS 63 e WKS 92), ou seja, o modo reprodutivo foi mantido como no genótipo original (diploide). Nestas plantas sexuais, os autores relataram a ocorrência de sacos embrionários do tipo com *Polygonum*. Entretanto, a planta WKS, que antes era caracterizada como sexual, se tornou apomítica após a poliploidização. A mudança do modo reprodutivo que decorre da poliploidização é um fenômeno normal e a expressão da apomixia nesta planta duplicada é um efeito de dosagem do gene (QUARÍN et al., 2001).

Com o objetivo de determinar o modo de reprodução de 28 híbridos intraespecíficos de *P. notatum*, Weiler et al. (2017) utilizaram a metodologia de análise citoembriológica. Pelo presente estudo, os autores puderam encontrar prevalência do modo reprodutivo apomítico, sendo que 19 plantas exibiram morfologia do saco embrionário compatível com reprodução apomítica e nove tinham morfologia do saco embrionário compatível com a reprodução sexual. Dois híbridos, denominados A16 e B26, demonstraram ser apomíticos facultativos

com 12 e 26 ovários sexuais contra 19 e 16 ovários apomíticos, respectivamente. Pelos exemplos aqui citados, a análise citoembriológica de ovários tem se mostrado útil para os programas de melhoramento de *Paspalum* pois é uma opção para a identificação das plantas apomíticas e sexuais.

4.7.3 Marcadores moleculares

Sendo definidos como uma sequência de nucleotídeos correspondente a uma localização física no genoma (SCHULMAN, 2007), os marcadores moleculares exibem polimorfismos que podem surgir devido a mutações no genoma e também por fluxo gênico entre cruzamento de indivíduos em uma população gerando novas combinações de genes (HARTL e CLARK, 1997; BALLOUX e LUGON-MOULIN, 2002).

No que tange ao estudo de caracterização molecular de plantas apomíticas, marcadores moleculares e bioquímicos que co-segregam com este traço foram desenvolvidos para algumas espécies e apresentam como maior vantagem a precocidade na determinação do modo de reprodução, a qual pode ser realizada em sementes ou plântulas (VALLE et al., 2004). Outra potencialidade do uso de marcadores está no fato de estes não sofrerem influência ambiental e ainda é possível distinguir indivíduos homozigotos dominantes dos heterozigotos no caso de marcadores co-dominantes (BASHAW, 1980; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Nos últimos anos, vários marcadores moleculares tais como polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD, do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP, do inglês *Amplified fragment length polymorphism*) e de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) foram estudados e estão ligados ao locus da aposporia em *P. simplex* (PUPILLI et al., 2001; LABOMBARDA et al., 2002) e *P. notatum* (MARTÍNEZ et al., 2003; PUPILLI et al., 2004; STEIN et al., 2004, 2007, CALDERINI et al., 2006, 2011).

Alternativamente, marcadores moleculares SCAR (do inglês, *Sequence Characterized Amplified Region*) têm sido utilizados com êxito na identificação da apomixia em plantas do gênero *Paspalum*. Diferentemente do marcador RAPD, o marcador 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), o marcador SCAR se caracteriza por ser regiões amplificadas a partir de sequências caracterizadas. 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).

Martínez et al. (2003) utilizaram marcadores moleculares AFLP, RAPD e RFLP para a caracterização da apomixia em plantas tetraplóides de *Paspalum notatum*. Neste estudo, os autores utilizaram um genitor masculino doador de pólen apomítico (Q4117) e um genitor feminino completamente sexual (Q4188), do qual o cruzamento originou uma F₁ de 290 indivíduos que foram caracterizados em relação ao modo reprodutivo por meio da técnica de análises citoembriológicas. A análise molecular para a busca de marcadores ligados a aposporia seguiu o método de BSA (do inglês *Bulk Segregant Analysis*). Dentre os marcadores utilizados neste estudo os autores encontraram dois *primers* RAPD (BCU 243 e BCU 259) completamente ligados a aposporia que foram repetidos em pelo menos dois experimentos independentes para corroborar a reprodutibilidade dos marcadores detectados. Desta forma, os iniciadores BCU243 e BCU259 puderam ser convertidos em marcadores SCAR a fim de aumentar sua reprodutibilidade e eficiência na identificação de plantas apomíticas na espécie *P. notatum*, uma vez que são ligados a aposporia.

Pupilli et al. (2004) utilizaram um conjunto de marcadores moleculares RFLP, incluindo cinco marcadores de arroz previamente ligados a apomixia em *Paspalum simplex*. Neste trabalho os marcadores utilizados foram úteis para detectar a ligação com a apomixia nas espécies *P. notatum* e *P. malacophyllum*. Como resultado um mapa genético comparativo foi construído em torno do loco da apomixia para as três espécies e subsequentemente foi comparado com o mapa genético do arroz. O loco que controla a apomixia em *P. simplex* foi quase completamente conservado na espécie *P. malacophyllum*, sugerindo-se uma íntima relação entre eles. Os marcadores moleculares também evidenciaram que para as três espécies de *Paspalum* houve uma supressão de recombinação para o locus da apomixia. No caso de *P. notatum* pode ser devido a uma translocação afetando desta maneira os produtos gerados no evento de crossing-over e, conseqüentemente, o pareamento cromossômico.

Hojsgaard et al. (2011) efetuaram um cruzamento entre uma planta sexual tetraploide ($2n = 4x = 40$) de *P. simplex* (C1b2), com uma planta apomítica tetraploide natural ($2n = 4x =$

40) de *P. procurrens* (Q4094). Toda a progênie de 134 híbridos foi utilizada para a busca de plantas apomíticas utilizando um marcador molecular SCAR de 650 pb, implementado por Calderini et al. (2006). Entre os 134 híbridos apenas oito apresentaram o amplicon para o loco da apomixia, sendo uma banda de aproximadamente 800 pb. Posteriormente, foram realizados testes de progênies que confirmaram os resultados obtidos pelos marcadores SCAR.

Calderini et al. (2011) isolaram 19 marcadores moleculares SCAR provenientes de marcadores AFLP totalmente ligados à apomixia em *P. simplex*. Nesta pesquisa os autores encontraram um total de 16.700 bandas com pesos moleculares de 100 a 700 pb. Destes, 16.570 fragmentos foram monomórficos em todos os marcadores, enquanto 130 fragmentos foram específicos para o bulk apomítico.

A busca de marcadores moleculares ligados ao traço da aposporia em *Paspalum* 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. Estes bulks são então analisados individualmente para a possível detecção de marcas ligadas ao modo reprodutivo. Cada banda é analisada individualmente buscando-se identificar marcas associadas ao modo reprodutivo nos bulks apomíticos e ausentes nos sexuais, ou em todos os sexuais e ausentes nos apomíticos. Assim, se for encontrado alguma marca de interesse, o bulk é então aberto para a busca de marcas específicas ligadas ao modo reprodutivo em cada indivíduo. Vale a pena ressaltarmos ainda que não existem marcadores associados à apomixia em espécies do Grupo Plicatula e que os marcadores identificados na literatura precisam ser validados em outras progênies das espécies para as quais foram desenvolvidos em outras espécies de interesse.

Outra metodologia de grande interesse para a associação entre a apomixia e uma determinada região gênica é a seleção assistida por marcadores moleculares (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 SAM tem sido aplicada em diversos objetivos, tais como: a piramidação de alelos de resistência a doenças, o uso em retrocruzamentos, mapeamento de locos controladores de caracteres quantitativos - QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e estudos de associação com modo reprodutivo em gramíneas do gênero *Cenchrus* (KUMAR et al. 2017).

4.7.4 Citometria de Fluxo

A técnica de citometria de fluxo (FCM, do inglês *Flow Cytometry*) foi originalmente criada na década de 50 para aplicações médicas voltadas para estudos de contagem de células sanguíneas. No final dos anos 70, a FCM foi estabelecida como uma técnica mais poderosa para estimar conteúdo de DNA em células humanas (DOLEŽEL, 1991). Esta técnica se baseia em propriedades ópticas das partículas que fluem em uma suspensão líquida, estas partículas são forçadas a se moverem em um fluido laminar individualmente no centro de uma câmara de fluxo. Nestas partículas ocorre, então, a interceptação de feixes luminosos (*lasers*) que liberam fótons que são captados por um sistema de filtros ópticos sendo transformados em dados por um computador (LOUREIRO e SANTOS, 2004).

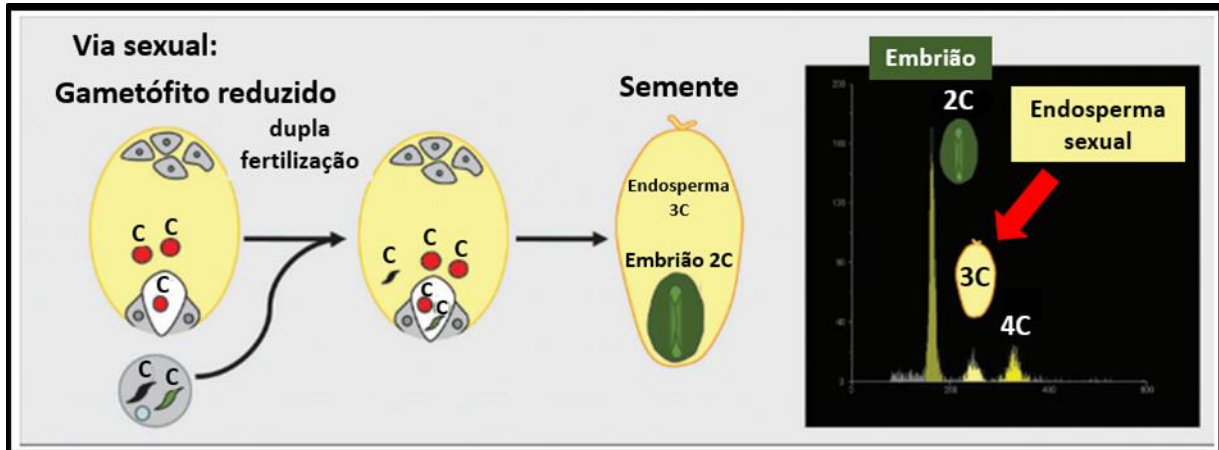
Na área vegetal, esta técnica detém grande relevância, uma vez que possui diversas aplicações tais como: determinação do conteúdo de DNA, estimação do nível de ploidia, estudos do ciclo celular e endorreduplicação do material genético, detecção de células apoptóticas e determinação do modo reprodutivo. Nesta última aplicação, o modo de reprodução em plantas, principalmente nas angiospermas é detectado em sementes por meio da diferença entre o conteúdo de DNA do embrião e do endosperma (SLIWINSKA, 2018).

Outro ponto a ser destacado é a facilidade e rapidez da técnica de citometria para a caracterização do modo reprodutivo quando comparada a outras técnicas, como a microdissecação e a análise citoembriológica, sendo estas muito laboriosas e que demandam um grande intervalo de tempo e grande número de ovários para a correta determinação do modo reprodutivo (MATZK et al., 2007).

Utilizando a técnica de citometria de fluxo, a análise de triagem de sementes (FCSS, do inglês *Flow Cytometry Seed Screen*), proposta por Matzk et al. (2000), tem auxiliado sobremaneira a caracterização reprodutiva dentro do gênero *Paspalum*, pois, dentro deste gênero, ocorre uma diferença entre o conteúdo de DNA do endosperma e do embrião nas cariopses, ocorrendo assim distinção entre sexuais e apomíticos. Uma planta sexual produz uma cariopse formada por um embrião ($n + n$) que surgiu da fertilização da oosfera reduzida (n) por um núcleo de espermático reduzido (n) e endosperma derivado da fertilização de dois núcleos polares reduzidos por um outro núcleo espermático reduzido $[(n + n) + n]$. Portanto, esta cariopse tem uma razão de 2:3 (embrião: endosperma) do conteúdo de DNA (ORTIZ et al., 2013). Na Figura 3 está ilustrado, à esquerda, um gametófito feminino reduzido, e uma semente com conteúdo do embrião e do endosperma 2:3. No histograma, estão dispostos

picos de conteúdo de DNA relativos ao embrião (2C), endosperma sexual (3C) e células do embrião em divisão celular (4C).

Figura 3 – Via sexual de uma semente caracterizada por meio da técnica de citometria de fluxo



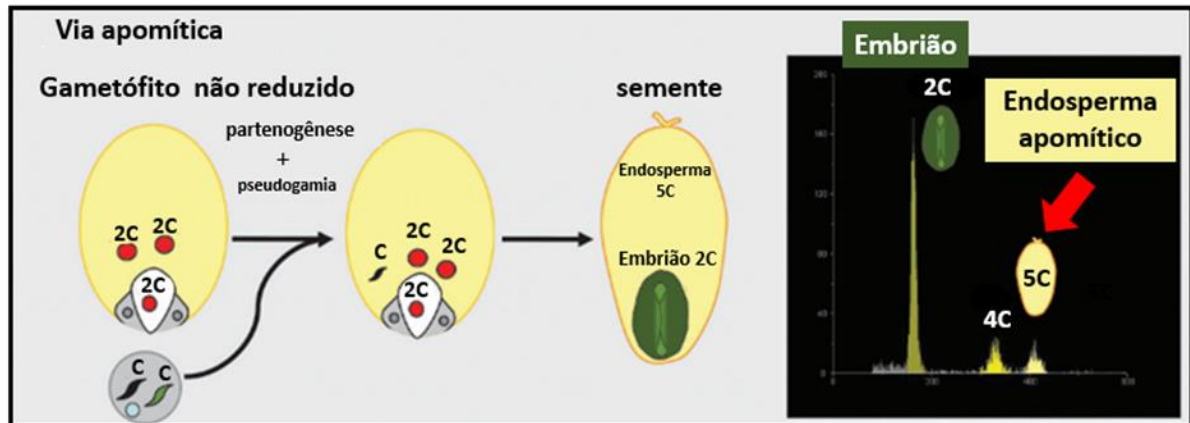
Legenda: À esquerda da imagem está esquematizado o processo de dupla fertilização e formação de uma semente sexual por meio de um gametófito feminino e núcleos polares reduzidos. À direita da imagem está disposto um histograma evidenciando picos 2C (embrião), 3C (endosperma sexual) e 4C (duplicado do embrião).

Fonte: Adaptada de HOJSGAARD e HERBIG (2014).

Já uma planta apomítica produz sementes formadas por um embrião não reduzido (2n) e endosperma derivado da fertilização de dois núcleos polares não reduzidos por um outro núcleo espermático reduzido $[(2n + 2n) + n]$. Portanto, esta semente possui uma razão de 2:5 (embrião:endosperma) do conteúdo de DNA. Na Figura 4 está ilustrado o histograma de uma semente apomítica com a razão do conteúdo de DNA do embrião e endosperma de 2:5 e um histograma evidenciando os picos do embrião (2C), o pico de células do embrião em divisão celular (4C) e o endosperma apomítico (5C).

Nas espécies do gênero *Paspalum*, a caracterização reprodutiva por meio técnica de citometria de fluxo é possível uma vez que existe a diferença entre a quantidade de núcleos polares e a oosfera, ou seja 2:1, e assim existe a diferença entre o conteúdo de DNA entre eles. Se dentro do gênero ocorresse apenas um único núcleo polar e uma oosfera existiria a possibilidade de caracterizar-se erroneamente a semente em sexual ou apomítica, uma vez que teria a mesma proporção de 2:3 (embrião:núcleos polares). Em gramíneas como nas braquiárias, ocorre uma alta frequência de sacos embrionários com a presença de um único núcleo polar e uma única oosfera (NAUMOVA et al. 1999), e desta forma, neste gênero a técnica de citometria de fluxo não é recomendada para caracterização do modo de reprodução.

Figura 4 – Via apomítica de uma semente caracterizada por meio da técnica de citometria de fluxo.



Legenda: À esquerda da imagem está esquematizada um gametófito feminino não reduzido sofrendo partenogênese (formação de um embrião não reduzido 2C na ausência de fecundação) e pseudogamia (união dos núcleos polares não reduzidos com um núcleo gamético reduzido, originando um endosperma 5C). À direita da imagem está disposto um histograma evidenciando picos 2C (embrião), 4C (duplicado do embrião) e 5C (endosperma apomítico).

Fonte: Adaptado de HOJSGAARD e HERBIG (2014).

Há vários trabalhos que utilizaram a técnica de citometria de fluxo para caracterização do modo reprodutivo dentro do gênero *Paspalum* (SARTOR et al., 2009; SARTOR et al., 2011; HOJSGAARD et al., 2013; AGUILERA et al., 2015; GALDEANO et al., 2016).

Sartor et al. (2009) tetraploidizaram um acesso sexual diplóide de *P. plicatulum* e cruzaram com um acesso tetraploide apomítico da mesma espécie e de outras espécies pertencentes ao grupo Plicatula. Em análises citológicas todas as plantas apresentaram saco embrionário meiótico, sugerindo que o método de reprodução sexual foi preservado após a indução de poliploidia. Alternativamente, as técnicas de citometria de fluxo e a genotipagem com 40 primers RAPD foram utilizadas, e confirmaram que o modo reprodutivo nos acessos tetraploidizados de *P. plicatulum* eram exclusivamente sexuais. Os acessos sexuais tetraploides de *P. plicatulum* obtidos neste estudo abriram caminho para programas de melhoramento de plantas envolvendo hibridizações, recombinações alélicas, seleção de plantas e manipulação da apomixia dentro do grupo Plicatula, acessando a variabilidade genética contida naturalmente em acessos tetraploides apomíticos e de outras espécies tetraploides apomíticas dentro deste grupo (SARTOR et al., 2009). Além disso, trabalhos mais recentes na literatura foram realizados a partir do cruzamento de um genitor feminino tetraploidizado artificialmente pertencente a espécie de *P. plicatulum* (4PT), e cruzada com diferentes espécies pertencentes ao grupo Plicatula (NOVO et al., 2016; 2017; 2018). Nestes estudos, os autores puderam verificar o comportamento meiótico, distância genética por meio

de marcadores moleculares, heterose e fertilidade dos híbridos formados entre os cruzamentos interespecíficos em relação aos genitores.

Por meio de citometria de fluxo, Sartor et al. (2011) caracterizaram o comportamento reprodutivo de cinco espécies de *Paspalum* (*P. alcalinum*, *P. denticulatum*, *P. lividum*, *P. nicorae* e *P. rufum*) utilizando a metodologia FCSS, constituindo um total de 19 acessos oriundos da Argentina e Paraguai. Neste estudo os autores encontraram diversidade reprodutiva nas espécies analisadas e ocorreu grande prevalência do modo apomítico de reprodução. Os acessos 2x exibiram comportamento sexual, acessos 4x apresentaram apomixia facultativa (sexualidade e apomixia) e os acessos com níveis mais altos de ploidia, como 5x e 6x, exibiram comportamento altamente apomítico.

Hojsgaard et al. (2013) utilizaram a citometria de fluxo para identificar o modo reprodutivo em cinco acessos de *Paspalum malacophyllum*. Como principal resultado, 11% das sementes apresentaram sexualidade (picos de 2C:3C). Já as proporções de 77% a 87% foram de sementes com conteúdo de DNA de 2C:5C (aposporia pseudogâmica) e um número muito baixo apresentaram picos 3C:5C (aposporia e fertilização dupla), indicando que, em alguns sacos apospóricos, a partenogênese falhou e ocorreu a formação de sementes com embrião $2n + n$.

Aguilera et al. (2015) realizaram um cruzamento entre um genitor masculino apomítico tetraploide de *Paspalum guenoarum* cv. Rojas doador de pólen com um genitor feminino tetraploide sexual de *Paspalum plicatulum*. Um total de quatro plantas F_1 originadas desse cruzamento foram auto-polinizadas para a obtenção da geração F_2 e uma população de retrocruzamento chamada BC foi originada entre 4PT sexual cruzada com genitores apomíticos e sexuais oriundos da geração F_1 . Como resultado do cruzamento entre a planta 4PT sexual e o doador de pólen apomítico de *P. guenoarum*, houve a formação de 189 plantas F_1 híbridas, confirmadas por meio de marcadores morfológicos e marcadores moleculares AFLP. De um total de 189 plantas, 182 apresentaram a formação de cariopses cheias. Por meio da técnica de citometria, 112 plantas foram consideradas sexuais e 70 apomíticas, e os histogramas mostraram picos que variaram desde o conteúdo de DNA 4Cx, 6Cx, 8Cx, 10Cx, 12Cx a valores mais altos como picos 20Cx. As sementes dos indivíduos formados na geração F_2 e oriundas do retrocruzamento com o pai apomítico mostraram que todas as plantas apresentaram picos exclusivamente sexuais, caracterizando desta maneira seu modo sexual de reprodução. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que (i) a apomixia pode ser transmitida pelo pólen de *P. guenoarum* a outras espécies do grupo Plicatula, (ii) o traço é

herdado ou transmitido como fator dominante mendeliano, e (iii) a reprodução completamente sexual requer a condição recessiva (nuliplex) homozigota (aaaa).

Em um estudo de determinação do modo reprodutivo e conteúdo de DNA, Galdeano et al. (2016) analisaram 77 acessos de 47 espécies do gênero *Paspalum* pertencentes aos subgêneros *Ceresia*, *Anachyris* e *Paspalum sensu strictu*. Como principal resultado do modo reprodutivo, a técnica de citometria de fluxo mostrou que 32 acessos eram sexuais e 45 eram apomíticos (apomixia facultativa ou obrigatória). Esse trabalho relata pela primeira vez o modo de reprodução de 12 espécies e uma variedade botânica. Além disso, esse trabalho proporcionou o esclarecimento do modo reprodutivo de 10 espécies com citótipos variáveis. Foram relatados histogramas com $2C + (3C)$ e $2C + (5C)$. Outro resultado a ser destacado é o modo reprodutivo da espécie *P. nicorae*, atualmente sinonimizado a *P. lepton* (Oliveira e Valls, 2008) que, por meio de técnicas citoembriológicas, foi descrita como uma espécie apomítica obrigatória, no entanto, os autores comprovaram seu modo reprodutivo como sendo o apomítico facultativo.

Assim, para a correta determinação do modo reprodutivo das espécies de *Paspalum*, Rebozzio et al. (2011) relataram que o uso em conjunto de técnicas como análises citoembriológicas, citometria de fluxo e marcadores ligados ao traço da apomixia são de grande importância pois levam a geração de resultados mais robustos e confiáveis.

4.8 MELHORAMENTO GENÉTICO DE *PASPALUM* (GRUPO INFORMAL PLICATULA)

O melhoramento genético vegetal é definido como a arte e a ciência que visam à modificação genética das plantas para torná-las mais úteis aos homens, animais e ambiente. Desde os primórdios o homem iniciou o processo de melhoramento selecionando espécies e variedades mais desejáveis, obtendo-se assim as primeiras mudanças alélicas e contribuindo de forma decisiva para as características das espécies cultivadas atualmente (BORÉM e MIRANDA, 2005).

Em um âmbito geral, o melhoramento de forrageiras no Brasil foi intensificado na década de 80, com coletas de germoplasma que tiveram como objetivos a exploração da variabilidade natural existente bem como a geração de nova variabilidade por meio de cruzamentos (SAVIDAN et al., 1985). A seleção, a partir da variabilidade natural nessas coleções, tem sido o principal método de desenvolvimento de cultivares utilizado para forrageiras tropicais no Brasil, no entanto este método, apesar de mais simples e rápido, é finito, visto que se baseia apenas na avaliação da capacidade adaptativa de materiais coletados

na natureza. O melhoramento de forrageiras via recombinação genética passa, portanto, a se constituir na melhor opção na geração de novos cultivares (VALLE et al., 2009).

Segundo Valle et al. (2009), o melhoramento de forrageiras tropicais, no Brasil e no mundo, é uma atividade que demanda equipes multidisciplinares. Por limitações de germoplasma, de equipes com conhecimentos básicos e de métodos eficientes de triagem para avaliar os complexos critérios de mérito, são poucos os gêneros e espécies trabalhados com o fim de responder à urgente demanda por diversificação dos extensos monocultivos que se formaram no Brasil Central.

Dentro do gênero *Paspalum*, Ortiz et al. (2013) destacam os principais objetivos em programas de melhoramento genético desta cultura, que podem ser enumerados: (a) tolerância ao frio e crescimento em estações mais amenas; (b) plantas com maior rendimento de sementes; (c) resistência ao pastejo; (d) maior valor nutritivo; e (e) resistência a estresses bióticos. No entanto, o autor destaca alguns pontos que devem ser levados em consideração antes de se iniciar um programa de melhoramento envolvendo espécies do gênero *Paspalum* como: (1) disponibilidade de uma coleção diversa de germoplasma; (2) conhecimento adequado da biologia, citologia e sistema reprodutivo do material disponível; e (3) objetivos explícitos e alcançáveis. Assim sendo, vale a pena ressaltarmos que o presente trabalho entra em conformidade com o item 2, que vem a enriquecer o conhecimento do modo reprodutivo dos acessos de *Paspalum* pertencentes ao grupo informal Plicatula, sendo informações indispensáveis para os programas de melhoramento do gênero.

É relatada a ocorrência da apomixia no gênero *Paspalum*. Assim sendo, o melhoramento genético dentro deste gênero pode ser realizado por meio de seleções de ecótipos superiores e via cruzamentos. Para viabilizar a seleção de ecótipos, é necessária a realização de coletas de germoplasma, avaliação, seleção, multiplicação dos melhores ecótipos e liberação de genótipos superiores como novas cultivares apomíticas, ou seja, clones propagados por sementes (ORTIZ et al., 2013). Como exemplo de seleção de ecótipos superiores, foi lançada no mercado em meados do século XX a cultivar tetraploide Argentina (PI 148996), que foi oriunda de uma avaliação de mais de 80 acessos de *P. notatum* e é amplamente cultivada até os dias atuais (BLOUNT et al., 2009). Existem várias espécies pertencentes ao grupo informal Plicatula (*P. atratum*, *P. guenarum* e *P. plicatulum*) que foram lançadas como cultivares no mercado, fruto do trabalho de diversas equipes de melhoramento genético do mundo. Como exemplo de cultivares lançadas do grupo Plicatula, encontramos a cultivar Capim Pojuca (*P. atratum* - BRA-009610), lançada no mercado pela Embrapa Cerrados em 2002 e que possui grande produção de forragens e sementes, boa resistência a

ataques de cigarrinhas, além de boa palatabilidade (FERNANDES et al., 2002). Já a cultivar Azulão (No 586) de *P. guenoarum*, originária do Brasil, apresenta boa palatabilidade aos animais, boa resistência à geada e floração tardia (TROPICAL FORAGES, 2019). A cultivar Bryan (CPI 21378) de *P. plicatulum* possui boa palatabilidade aos animais sendo adaptada a solos costeiros com baixa fertilidade (TROPICAL FORAGES, 2019).

O melhoramento de genótipos apomíticos de *Paspalum* via hibridação começou com o trabalho pioneiro do Dr. G. W. Burton (USDA-ARS, Tifton, GA, EUA) e sua equipe, que geraram plantas tetraplóides sexuais induzidas por colchicina (BURTON e FORBES, 1960) e as cruzaram com ecótipos tetraplóides naturais para obter híbridos apomíticos, que não foram liberados como cultivares (BURTON et al, 1992). Em outro trabalho, um híbrido sexual tetraplóide foi cruzado com um ecótipo local argentino para produzir vários híbridos, dos quais foi originada a cultivar 'Boyero UNNE', que foi lançada em 2012 como a primeira cultivar apomítica de *Paspalum* desenvolvida pelo método de hibridação (QUARÍN et al., 2003).

Além dos métodos tradicionais de melhoramento descritos, é relatado o uso da engenharia genética no melhoramento de espécies de *Paspalum*, principalmente da espécie de *P. notatum*, detentora de um grande potencial para gramados e fins forrageiros. Plantas de *P. notatum* se mostraram resistentes à lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* por meio da inserção de um gene *cry1Fa* codificando uma δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* pelo bombardeamento de partículas (LUCIANI et al., 2007). Sandhu et al. (2007) inseriram por meio de técnica de biobalística o gene "bar" que conferiu resistência ao glifosato em plantas de *P. notatum* e permitiu um incremento na habilidade competitiva contra plantas daninhas durante o estabelecimento de pastagens. No entanto, vale a pena ressaltarmos que nenhuma destas novas plantas geneticamente modificadas foram liberadas no mercado.

Desta forma, poucos são os trabalhos relatados na literatura que possuem como base a caracterização reprodutiva de espécies do gênero *Paspalum*, pertencentes ao grupo informal Plicatula. Assim sendo, os resultados deste trabalho são de grande importância uma vez são informações que podem servir como base para um programa de melhoramento genético de apomíticos com potenciais aplicações na alimentação animal e possível incremento na produção de carne no país.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 GERMOPLASMA UTILIZADO

No presente estudo foram utilizados 137 acessos de *Paspalum* (Tabela 1), pertencentes a dez espécies do grupo informal Plicatula (*P. atratum* Swallen, *P. compressifolium* Swallen, *P. guenoarum* Arechav., *P. lenticulare* Kunth., *P. lepton* Schult., *P. oteroi* Swallen, *P. plicatum* Michx., *P. rhodopedum* L.B.Sm. & Wassh, *P. rojasii* Hack, *P. wrightii* Hitchc. & Chase), todos mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste, localizado no município de São Carlos – SP.

Tabela 1 –Espécies de *Paspalum* e respectivos acessos utilizados no presente estudo, com código BGP (Banco de Germoplasma de *Paspalum*), informações do código do coletor e local de coleta

Espécie	BGP	Código coletor*	Local da coleta
<i>P. atratum</i>	9	VR 7532	Goiatuba, GO, BR
<i>P. atratum</i>	10	VVeSv 8323	Cristalândia, TO, BR
<i>P. atratum</i>	50	Ge 3272	Planaltina, GO, BR
<i>P. atratum</i>	93	VKSSv 8857	Ji-Paraná, RO, BR
<i>P. atratum</i>	94	VKSSv 8866	Porto Velho, RO, BR
<i>P. atratum</i>	95	VKSSv 8914	Cáceres, MT, BR
<i>P. atratum</i>	96	VKSSv 9003	Nobres, MT, BR
<i>P. atratum</i>	103	VSW 9908	Aquidauana, MS, BR
<i>P. atratum</i>	260	VRcMmSv14490	Cachoeira Alta, GO, BR
<i>P. atratum</i>	263	VRcMmSv 14501	Paranaíba, MS, BR
<i>P. atratum</i>	268	VRcMmSv 14508	Paranaíba, MS, BR
<i>P. atratum</i>	269	V 14514	Inocência, MS, BR
<i>P. atratum</i>	279	VRcMmSv 14554	Anastácio, MS, BR
<i>P. atratum</i>	280	V 14557	Anastácio, MS, BR
<i>P. atratum</i>	282	VRcMmSv 14564	Anastácio, MS, BR
<i>P. atratum</i>	288	VRcMmSv 14579	Aral Moreira, MS, BR
<i>P. atratum</i>	307	Rc 1441	Brasil
<i>P. compressifolium</i>	18	VDGoMi 8070	Urubici, SC, BR
<i>P. compressifolium</i>	53	VCoBu 4400	Vacaria, RS, BR
<i>P. compressifolium</i>	54	VCoBu 4495	Lages, SC, BR
<i>P. compressifolium</i>	75	VCoBu 4496	Lages, SC, BR
<i>P. compressifolium</i>	78	VBoPrOl 4617	Santiago, RS, BR
<i>P. compressifolium</i>	84	V 4793	Guaíba, RS, BR
<i>P. compressifolium</i>	85	VCoPo 4822	Porto Alegre, RS, BR
<i>P. compressifolium</i>	140	VGoMi 10744	Lagoa Vermelha, RS, BR
<i>P. compressifolium</i>	153	D GoMi 480	Campos Novos, SC, BR
<i>P. compressifolium</i>	178	VGoMiSv 11100	Balsa Nova, PR, BR
<i>P. compressifolium</i>	179	VGoMiSv 11101	Balsa Nova, PR, BR
<i>P. compressifolium</i>	186	VGoSv 11179	Balsa Nova, PR, BR

Espécie	BGP	Código coletor*	Local da coleta
<i>P. compressifolium</i>	190	VGoSv 11291	Ponta Grossa, PR, BR
<i>P. compressifolium</i>	220	VTsCr 14196	Vila Flores, RS, BR
<i>P. compressifolium</i>	249	VTs 14431	Arroio dos Ratos, RS, BR
<i>P. compressifolium</i>	323	FWC 35	Mostardas, RS, BR
<i>P. compressifolium</i>	326	FWC 39	Pelotas, RS, BR
<i>P. compressifolium</i>	331	FWC 46	São Lourenço do Sul, RS, BR
<i>P. compressifolium</i>	380	Nd**	Desconhecido
<i>P. guenoarum</i>	5	VCoBu 4397	São Gabriel, RS, BR
<i>P. guenoarum</i>	55	VNSh 4062	Bom Jesus, SC, BR
<i>P. guenoarum</i>	79	VBoPrOl 4628	Santiago, Chile
<i>P. guenoarum</i>	136	VGoMi 10718	Passo Fundo, RS, BR
<i>P. guenoarum</i>	145	VGoMi 10791	Bom Jesus, RS, BR
<i>P. guenoarum</i>	166	VQFdSv 11838	Caarapó, MS, BR
<i>P. guenoarum</i>	183	VGoMiSv 11148	Quatro Barras, PR, BR
<i>P. guenoarum</i>	192	VGoSv 11303	Ponta Grossa, PR, BR
<i>P. guenoarum</i>	211	BdBo 303	Quaraí, RS, BR
<i>P. guenoarum</i>	212	Nd**	Quaraí, RS, BR
<i>P. guenoarum</i>	245	VTsRcRm 14357	Fontoura Xavier, RS, BR
<i>P. guenoarum</i>	264	VRcMmSv 14502	Paranaíba, MS, BR
<i>P. guenoarum</i>	284	V 14568	Dourados, MS, BR
<i>P. guenoarum</i>	299	V 14623	Dourados, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	7	VSsSi 5146	Rio Verde, GO, BR
<i>P. lenticulare</i>	77	V 4574	Campo Grande, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	97	VPoBi 9421	S. Antônio do Leverger, MT, BR
<i>P. lenticulare</i>	99	VSW 9884	Anastácio, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	101	VSW 9898	Miranda, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	102	VSW 9899	Miranda, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	104	VSW 9916	Aquidauana, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	106	VSW 9927	Bella Vista, Itapúa, Paraguai
<i>P. lenticulare</i>	116	SvSlSr 537	Montes Claros, MG, BR
<i>P. lenticulare</i>	119	VPoJSv 10361	Corumbá, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	122	VPoJSv 10434	Coxim, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	149	DGoMi 276	Campo Belo do Sul, SC, BR
<i>P. lenticulare</i>	162	VQFdSv 11789	Campo Grande, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	165	VQFdSv 11827	Dourados, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	175	VQFdSv 11912	Amambaí, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	206	Sv 850	Cachoeira de Goiás, GO, BR
<i>P. lenticulare</i>	213	VGoSv 11428	Abelardo Luz, SC, BR
<i>P. lenticulare</i>	259	VRcMmSv 14487	Acreúna, GO, BR
<i>P. lenticulare</i>	262	VRcMmSv 14500	Itarumã, GO, BR
<i>P. lenticulare</i>	271	VRcMmSv 14535	Dois Irmãos do Buriti, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	281	VRcMmSv 14559	Anastácio, MS, BR
<i>P. lenticulare</i>	305	VPoAsAk 14663	Alcinópolis, MS, BR
<i>P. lepton</i>	125	VBdZa 10558	Irani, SC, BR
<i>P. lepton</i>	270	VRcMmSv 14520	Campo Grande, MS, BR
<i>P. lepton</i>	287	VRcMmSv 14578	Aral Moreira, MS, BR
<i>P. lepton</i>	292	VRcMmSv 14602	Coronel Sapucaia, MS, BR
<i>P. lepton</i>	324	FWC 37	Tavares, RS, BR
<i>P. oteroi</i>	4	AVi 1332	Corumbá, MS, BR

Espécie	BGP	Código coletor*	Local da coleta
<i>P. oteroi</i>	118	VPoJSv 10349	Corumbá, MS, BR
<i>P. oteroi</i>	273	VRc 14539	Corumbá, MS, BR
<i>P. plicatulum</i>	21	VGnMaBd 9604	São Gabriel, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	65	V 4234	Porto Alegre, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	66	V BoPrSe 4250	Arrio dos Ratos, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	67	VBoPrSe 4258	Butiá, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	68	VBoPrSe 4273	Encruzilhada do Sul, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	71	V BoPrSe 4337	São Gabriel, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	73	V BoPrSe 4347	São Gabriel, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	76	VCoBu 4497	Lages, SC, BR
<i>P. plicatulum</i>	83	VBoPrOI 4741	São Sepé, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	86	V 5852	Porto Lucena, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	87	EEA 81	São Gabriel, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	88	EEA 147	Guaíba, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	89	EEA 148	Guaíba, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	90	EEA 149	Guaíba, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	109	VBoIrSv 9981	Rio Grande, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	120	VPoJSv 10362	Corumbá, MS, BR
<i>P. plicatulum</i>	137	VGoMi 10728	Soledade, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	160	VQFdSv 11751	Três Lagoas, MS, BR
<i>P. plicatulum</i>	172	VQFdSv 11893	Aral Moreira, MS, BR
<i>P. plicatulum</i>	174	VQFdSv 11898	Aral Moreira, MS, BR
<i>P. plicatulum</i>	177	VGoMiSv 11082	Campo Largo, PR, BR
<i>P. plicatulum</i>	180	VGoMiSv 11102	Balsa Nova, PR, BR
<i>P. plicatulum</i>	181	VGoMiSv 11141	Quatro Barras, PR, BR
<i>P. plicatulum</i>	182	VGoMiSv 11142	Quatro Barras, PR, BR
<i>P. plicatulum</i>	195	VGoSv 11372	Guarapuava, PR, BR
<i>P. plicatulum</i>	196	VGoSv 11373	Guarapuava, PR, BR
<i>P. plicatulum</i>	197	VGoSv 11447	Palmas, PR, BR
<i>P. plicatulum</i>	198	VGoSv 11450	Palmas, PR, BR
<i>P. plicatulum</i>	202	VSv 11562	Mandirituba, PR, BR
<i>P. plicatulum</i>	225	VTsDp 14204	Passo Fundo, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	232	VTsDp 14229	São Luiz Gonzaga, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	250	VTs 14432	Arroio dos Ratos, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	261	VRcMmSv 14496	Itarumã, GO, BR
<i>P. plicatulum</i>	265	VRcMmSv 14503	Paranaíba, MS, BR
<i>P. plicatulum</i>	266	VRcMmSv 14504	Paranaíba, MS, BR
<i>P. plicatulum</i>	301	VRcMmSv 14630	Campo Grande, MS, BR
<i>P. plicatulum</i>	317	FHDS 11	São Bento do Sul, SC, BR
<i>P. plicatulum</i>	327	FWC 40	Pelotas, RS, BR
<i>P. plicatulum</i>	328	FWC 41	Pelotas, RS, BR
<i>P. rhodopedum</i>	37	VMrFrLw 9827	Santo Ângelo, RS, BR
<i>P. rhodopedum</i>	38	VMrFr 9845	Passo Fundo, RS, BR
<i>P. rhodopedum</i>	56	VNSh 4083	Vacaria, RS, BR
<i>P. rhodopedum</i>	57	VCoBu 4515	Curitibanos, SC, BR
<i>P. rhodopedum</i>	58	DFi 151	Lages, SC, BR
<i>P. rhodopedum</i>	72	VBoPrSe 4344	São Gabriel, RS, BR
<i>P. rhodopedum</i>	131	VGnMrBd 10691	Cruz Alta, RS, BR
<i>P. rhodopedum</i>	132	VGnMrBd 10692	Cruz Alta, RS, BR

Espécie	BGP	Código coletor*	Local da coleta
<i>P. rhodopedum</i>	151	DGoMi 311	Barracão, RS, BR
<i>P. rhodopedum</i>	187	VGoSv 11231	Ponta Grossa, PR, BR
<i>P. rhodopedum</i>	221	VTsDp 14197	Passo Fundo, RS, BR
<i>P. rhodopedum</i>	290	VRcMmSv 14583	Aral Moreira, MS, BR
<i>P. rojasii</i>	69	VBoPrSe 4316	Lavras do Sul, RS, BR
<i>P. rojasii</i>	81	VBoPrOl 4665	Itaqui, RS, BR
<i>P. rojasii</i>	82	VBoPrOl 4699	Uruguaiana, RS, BR
<i>P. rojasii</i>	171	VQFdSv 11875	Caarapó, MS, BR
<i>P. rojasii</i>	272	VRcMmSv 14536	Dois Irmãos do Buriti, MS, BR
<i>P. rojasii</i>	300	VRcMmSv 14628	Campo Grande, MS, BR

* Siglas com nomes dos coletores: A: A.C.Allem; AK: S.Arigaki; As: A.O.Scariot; Bd: I.I.Boldrini; Bi: L.B.Bianchetti; Bo: S.C.Boechat; Bu: B.L.Burson; Co: L.Coradin; Cr: C.M.Castro; D: M.Dall'Agnol; Dp: D.Palmieri; EEA: Inst. n°, EEA; FD: M.S.França Dantas; Fi: R.G.Fischer; Fi: R.G.Fischer; Fr: J.M.O.Freitas; FWc: F.W.Cidade; Gn: J.O.N.Gonçalves; Go: K.E.Gomes; H: R.O.Hammons; Ir: B.E.Irgang; J: J.F.M.Valls; J: L.Jank; K: A.Krapovickas; Lw: H.M.Longhi-Wagner; Ma: M.C.Assis; Mi: S.T.S.Miotto; Mr: C.O.C.Moraes; N: C.Nabinger; Oi: M.L.A.A.Oliveira; Po: A.Pott; Pr: A.I.C.Pereira; Q: C.L.Quarin; Rc: R.C.Oliveira; Rm: R.Miz; S: C.E.Simpson; Se: B.A.Severo; Sh: V.P.Shell da Silva; Si: P.A.B.Salles; Sr: F.R.Scarano; Ss: S.M.Sano; Sv: G.P.Silva; Ts: T.Souza-Chies; Ve: R.F.A.VeigaVi: J.G.A.Vieira; VR: V.R.Rao; W: W.L.Werneck; Za: A.C.A.Zanatta; **Nd = dado não disponível

Fonte: Autor

5.2 CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA POR MEIO DA TÉCNICA DE ANÁLISE CITOEMBRIOLÓGICA

Por meio da técnica de análises citoembriológicas foram caracterizados cinco acessos de *Paspalum* (BGP 178 – *P. compressifolium*; BGP 232 – *P. plicatulum*; BGP 272 – *P. rojasii*; BGP 281 – *P. lenticulare*; BGP 380 – *P. compressifolium*). As inflorescências de plantas diferentes dentro do mesmo acesso com estigmas brilhantes e vistosos foram coletadas na antese em parcelas a campo pelo período inicial da manhã (entre 8 e 10 h). Logo após a retirada das inflorescências, estas foram acondicionadas em frascos de vidro com água para a manutenção do turgor celular. No Laboratório de Sementes da Embrapa Pecuária Sudeste, as inflorescências foram, então, fixadas por 24 h à temperatura ambiente em solução formalina-ácido acético-álcool (FAA), composta por álcool 95%, ácido acético glacial, água destilada e formalina 40% (40:14:3:3, v/v/v/v) (YOUNG et al., 1979). Após esse período, foram lavadas em água corrente e armazenadas em etanol 70%, mantidas refrigeradas até a extração dos ovários.

Os ovários foram dissecados dos floretes com uso de pinças e um microscópio estereoscópio. Nesta etapa, os floretes eram mantidos em uma placa de petri embebidos em uma solução de álcool 70%. De 78 a 200 ovários foram dissecados para cada acesso, com exceção do BGP 272 que foram 14 ovários. Os ovários dissecados foram então clareados pelo protocolo descrito por Young et al. (1979), como descrito a seguir: 1ª Etapa: Etanol a 85% (24

horas); 2ª Etapa: Etanol a 100% (24 horas); 3ª Etapa: Solução de 1:1 etanol/salicilato de metila (50:50 v/v) por 24 horas; 4ª Etapa: Solução de 1:3 etanol/salicilato (25:75 v/v) por 24 horas; 5ª Etapa: Solução de Salicilato de metila puro 100% por 24 horas (última etapa repetida duas vezes).

Os ovários clarificados foram armazenados em uma solução de salicilato de metila 100% até a análise por microscopia de contraste interferencial diferencial (DIC). Para isso, eles foram organizados em uma lâmina e mantidos úmidos com salicilato de metila.

Para a classificação reprodutiva dos sacos embrionários, levou-se em consideração a presença ou ausência de antípodas e a existência ou não de múltiplos sacos embrionários. Segundo Quarín et al. (2001), um ovário sexual é aquele que contém um único saco meiótico por óvulo, formado pela divisão celular da célula mãe do megásporo reduzida e é caracterizado por possuir a oosfera e duas sinérgides na porção final da micrópila, e um aglomerado de células antipodais no polo chalazal. Já um ovário apomítico é aquele que geralmente possui múltiplos sacos embrionários que são caracterizados pela presença da oosfera, uma ou duas sinérgides, dois núcleos polares e ausência de células antipodais. Além da classificação dos ovários em sexuais ou apomíticos, houve também a classificação de ovários estéreis, quando presentes. Os sacos embrionários classificados como estéreis foram aqueles que apresentaram aborto ou atrofia de estruturas internas.

5.3 CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA PELO USO DE SELEÇÃO DE SEMENTES POR CITOMETRIA DE FLUXO (FCSS)

As inflorescências quando estavam em período inicial da antese foram envoltas por sacos de tecido organza com dimensões de 30 cm de comprimento por 15 cm de largura os quais possuem microporos para maior eficiência na coleta das sementes (Figura 5). Após um período de 30 dias, os sacos foram retirados e as sementes foram colhidas e devidamente identificadas. As espiguetas foram, então, separadas com o uso de um soprador de ventoinha elétrico com tubo de acrílico vertical, modelo *757 South Dakota Seed Blower (Seedburo Equipment Company)* para a limpeza inicial e separação de espiguetas com e sem cariopses.

Figura 5 – Saquinho de organza envolvendo a inflorescência devidamente identificada



Fonte: Autor

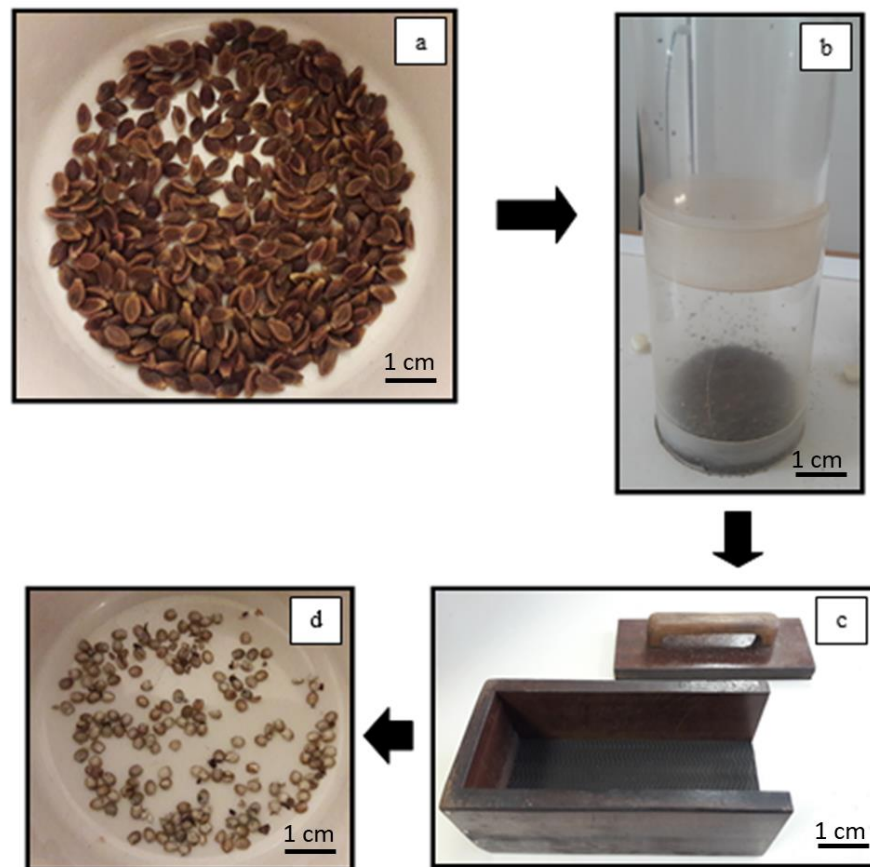
Espiguetas sem cariopses foram descartadas, apenas as espiguetas cheias foram armazenadas para análise. A etapa seguinte consistiu na separação das cariopses das demais estruturas da espiguetas. As espiguetas cheias foram colocadas no centro de uma caixa de madeira forrada com manta de borracha estriada sobre a qual uma tampa também forrada com esta borracha foi friccionada sobre as espiguetas para a retirada da lema, pálea e glumas e, então, exposição das cariopses (Figura 6).

As cariopses de cada planta de cada acesso foram acondicionadas em microtubos e identificadas para posterior análise do modo reprodutivo na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, utilizando um citômetro de fluxo tipo Facscalibur (Becton e Dickinson).

A caracterização reprodutiva dos acessos de *Paspalum* foi realizada por FCSS. Foram avaliadas cariopses de três plantas de cada acesso. Para a análise no citômetro, foram analisadas pelo menos 20 cariopses por planta, totalizando 60 plantas por acesso. (Figura 7). Com auxílio de um bisturi as cariopses foram cortadas em 400 μ l de tampão LB01 (DOLEŽEL et al. 1989) e filtradas em uma malha 40 μ m. O tampão LB01 implementado por Doležel et al. (1989) é composto por: 15 mM Tris; 2 mM Na₂EDTA; 0,5 mM espermina.4HCl; 80 mM KCl; 20 mM NaCl; 15 mM b-mercaptoetanol; 0,1% (v/v) Triton X-100; pH 7,5. Neste tampão as funções para substâncias são: (i) substâncias orgânicas (por

exemplo, Tris) – função de estabilizar o pH da solução (geralmente entre 7,0 e 8,0, compatível com fluorocromos de DNA comuns); (ii) agentes quelantes (por exemplo, EDTA) - liga os cátions bivalentes, que servem como cofatores de nucleases; (iii) estabilizadores de cromatina (por exemplo, espermina) (iv) sais inorgânicos (por exemplo, KCl) para obter força iônica; (v) detergentes não iônicos (por exemplo, Triton X-100) para liberar e limpar os núcleos (GREILHUBER et al., 2007).

Figura 6 – Obtenção das cariopses.

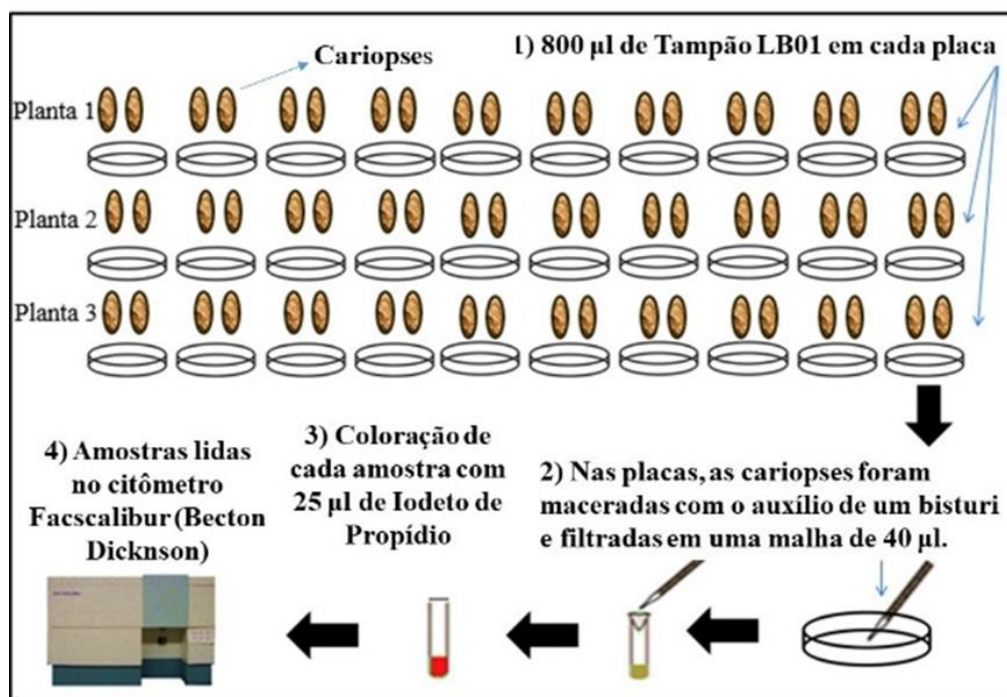


Legenda: a) Espiguetas retiradas do saquinho a campo prontas para separação b) separação das espiguetas cheias utilizando-se soprador de sementes, c) caixa de raspagem de espiguetas para separação de cariopses, d) cariopses obtidas.

Fonte: Autor

À suspensão nuclear foram adicionados 25µl de iodeto de propídeo e realizadas, pelo menos, 6000 contagens por amostra em tempo médio de 1 minuto (Figura 7), sendo os histogramas obtidos no software Cell Quest e analisados pelo uso do Flowing software, versão 2.5 (TERHO, 2017).

Figura 7 – Processamento das cariopses e leitura no citômetro de fluxo para cada acesso avaliado



Fonte: Autor

O método de análise de sementes via citometria de fluxo permite distinguir a semente sexual da semente apomítica comparando o conteúdo de DNA do embrião e o conteúdo do DNA do endosperma. As sementes que se originaram sexualmente mostram picos 2C:3C (2C corresponde ao embrião $n + n$, e 3C ao endosperma originado pela fusão de dois núcleos polares com um núcleo vegetativo masculino haplóide n). Por outro lado, uma relação de picos 2C:5C evidencia uma semente de origem apomítica (2C corresponde ao embrião diploide $2n+0$ e 5C, um endosperma $4n + n$ oriundo da fusão de dois núcleos polares $2n$ com um núcleo gamético vegetativo masculino haplóide acarretando a formação de um endosperma $5n$) (HOJSGAARD et al. 2013). O mecanismo da apomixia facultativa nas espécies de *Paspalum* é caracterizado pela presença de sementes sexuais e apomíticas produzidas na mesma planta (ORTIZ et al. 1997). A apomixia facultativa foi identificada por citometria de fluxo pela mistura de cariopses sexuais e apomíticas.

5.4. BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A APOMIXIA

5.4.1 Material vegetal e estratégias de busca

O material utilizado para a busca de marcadores moleculares associados à apomixia foi selecionado a partir de acessos sexuais identificados reprodutivamente por análises citoembriológicas que estavam disponíveis no momento da genotipagem. Desta maneira, foram genotipados acessos das espécies *P. compressifolium* (BGP 380) e *P. lenticulare* (BGP 281) utilizando os marcadores RAPD, SCAR e SSR. Para os marcadores SCAR, foi incluído o acesso sexual de *P. rojasii* (BGP 272). Abaixo está a Tabela 2 com os acessos utilizados para esta busca.

Tabela 2 – Acessos utilizados para busca de marcadores moleculares associados a apomixia.

BGP	Espécie	Modo reprodutivo	BGP	Espécie	Modo reprodutivo
18	<i>P. compressifolium</i>	AF ^a	7	<i>P. lenticulare</i>	AA ^b
140	<i>P. compressifolium</i>	AF	271	<i>P. lenticulare</i>	AA
53	<i>P. compressifolium</i>	AF	101	<i>P. lenticulare</i>	AF
54	<i>P. compressifolium</i>	AA	77	<i>P. lenticulare</i>	AF
220	<i>P. compressifolium</i>	AF	281	<i>P. lenticulare</i>	Sexual
78	<i>P. compressifolium</i>	AF	BAG ^c		
75	<i>P. compressifolium</i>	AF	262	<i>P. lenticulare</i>	AF
85	<i>P. compressifolium</i>	AA	162	<i>P. lenticulare</i>	AF
84	<i>P. compressifolium</i>	AF	106	<i>P. lenticulare</i>	AF
178	<i>P. compressifolium</i>	AA	104	<i>P. lenticulare</i>	AA
323	<i>P. compressifolium</i>	AF	97	<i>P. lenticulare</i>	AF
326	<i>P. compressifolium</i>	AF	175	<i>P. lenticulare</i>	AF
331	<i>P. compressifolium</i>	AF	119	<i>P. lenticulare</i>	AF
153	<i>P. compressifolium</i>	AA	102	<i>P. lenticulare</i>	AA
138	<i>P. compressifolium</i>	AA	149	<i>P. lenticulare</i>	AF
207	<i>P. compressifolium</i>	AA	122	<i>P. lenticulare</i>	AA
249	<i>P. compressifolium</i>	AF	165	<i>P. lenticulare</i>	AA
188	<i>P. compressifolium</i>	AA	259	<i>P. lenticulare</i>	AF
176	<i>P. compressifolium</i>	AA	206	<i>P. lenticulare</i>	AF
179	<i>P. compressifolium</i>	AF	305	<i>P. lenticulare</i>	AF
186	<i>P. compressifolium</i>	AF	302	<i>P. lenticulare</i>	AA
190	<i>P. compressifolium</i>	AF	213	<i>P. lenticulare</i>	AF
380	<i>P. compressifolium</i>	Sexual	99	<i>P. lenticulare</i>	AA
272	<i>P. rojasii</i>	Sexual	121	<i>P. lenticulare</i>	AF
281	<i>P. lenticulare</i>	Sexual	267	<i>P. lenticulare</i>	AF
380	<i>P. compressifolium</i>	Sexual	81	<i>P. rojasii</i>	AF
42 ^d	<i>P. simplex</i>	AA	F4 ^f	(<i>P. plicatulum</i> x <i>P. guenoarum</i>) ^{4x}	Sexual
272	<i>P. rojasii</i>	Sexual	F10 ^f	(<i>P. plicatulum</i> x <i>P. guenoarum</i>) ^{4x}	Sexual
A ^e	<i>P. notatum</i>	AA	F37 ^f	(<i>P. plicatulum</i> x <i>P. guenoarum</i>) ^{4x}	Sexual
B ^e	<i>P. notatum</i>	AA	F42 ^f	(<i>P. plicatulum</i> x <i>P. guenoarum</i>) ^{4x}	Sexual

BGP	Espécie	Modo reprodutivo	BGP	Espécie	Modo reprodutivo
C ^e	<i>P. notatum</i>	AA			
D ^e	<i>P. notatum</i>	Sexual			
E ^e	<i>P. notatum</i>	Sexual			
F ^e	<i>P. notatum</i>	Sexual			

a = AF (apomítico facultativo)

b = AA (altamente apomítico)

c = BAG (Banco Ativo de Germoplasma)

d = Acesso BGP 42 de *P. simplex* colocado como testemunha para análise dos marcadores SCAR

e = Acessos de *P. notatum* colocados como testemunha para análise dos marcadores RAPD

f = Híbridos argentinos sexuais, oriundos do cruzamento entre *P. plicatum* x *P. guenoarum*

Fonte: Autor

Como estratégias de busca de marcadores para a apomixia, foram utilizadas duas metodologias: 1) marcadores previamente descritos como associados à apomixia em outras espécies do gênero e avaliados no germoplasma deste estudo, como é o caso dos marcadores RAPD desenvolvidos por Matínez et al. (2003) para *P. notatum* e dos marcadores SCAR ligados a aposporia em *P. simplex* (Calderini et al., 2011), e 2) marcadores microsatélites (SSR) genômicos desenvolvidos por Cidade et al. (2009; 2010; 2013) e Oliveira et al. (2016) por BSA com bulks apomíticos e sexuais disponíveis para as espécies *P. lenticulare* e *P. compressifolium*.

Os bulks foram construídos por meio da combinação de uma quantidade equimolar de DNA de amostras com o mesmo modo de reprodução, tendo sido montados um bulk de amostras apomíticas e um bulk de amostras sexuais (quando disponíveis mais de uma amostra sexual) para cada espécie em que existe disponibilidade de acessos sexuais. Os bulks foram compostos como disposto na Tabela 3 e, para as espécies *P. compressifolium* e *P. lenticulare*, somente um acesso sexual está disponível, não sendo possível montar um bulk sexual para estas espécies.

Tabela 3 – Acessos constituintes dos bulks analisados no presente estudo com os marcadores SSR.

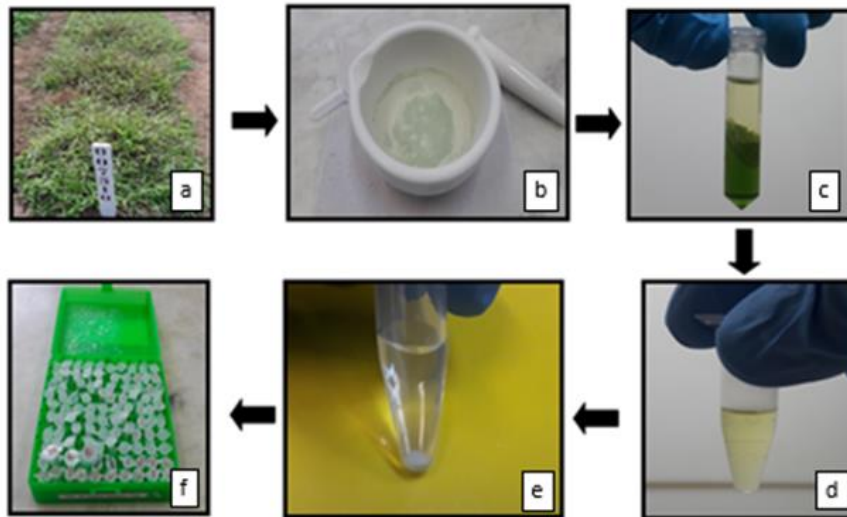
Bulk	Reprodução	Acessos	Espécie
Bulk1	Apomítica	BGP 77; 106; 175; 149; 165; 206 e 213	<i>P. lenticulare</i>
Bulk 2	Apomítica	BGP 220; 78; 323 e 326	<i>P. compressifolium</i>
Bulk 3	Sexual	F4; F10; F37 e F42	(<i>P. plicatum</i> x <i>P. guenoarum</i>) ^{4x}
Amostra 4	Sexual	BGP 281	<i>P. lenticulare</i>
Amostra 5	Sexual	BGP 380	<i>P. compressifolium</i>

Fonte: Autor

5.4.2 Extração e quantificação de DNA

As folhas coletadas em cada indivíduo foram maceradas com nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana com o auxílio de pistilo e nitrogênio líquido. A extração do DNA genômico total dos indivíduos foi realizada seguindo o protocolo de Doyle e Doyle (1987) por CTAB adaptado por Cidade et al. (2013) (Figura 8). A integridade do DNA genômico foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (g/mL), em tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) 1X e corados com brometo de etídeo na concentração de 0.5 ug/ml.

Figura 8 – Esquema ilustrando a coleta e extração de DNA total de folhas de *Paspalum* spp.



Legenda: a) acesso de *Paspalum* spp. conservado a campo, b) Folhas de *Paspalum* spp. maceradas em nitrogênio líquido para extração de DNA genômico, c) lavagem do DNA com fenol-clorofórmio, d) precipitação do DNA com etanol gelado, e) Pellet de DNA no fundo do eppendorf f) amostras de DNA de *Paspalum* spp. acondicionadas e identificadas em caixa.

Fonte: Autor

A imagem de cada gel foi visualizada sob luz ultravioleta e registrada em fotodocumentador Bio-Rad Gel Doc XR+. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 para verificar a pureza do material.

5.4.3 Genotipagem com marcadores RAPD

Dois marcadores RAPD (BCU 243 e BCU 259) previamente descritos como ligados à aposporia em acessos tetraploides de *P. notatum* (MARTÍNEZ et al., 2003) foram avaliados

nos acessos apomíticos BGP 77, BGP 106, BGP 175, BGP 149 e BGP 165 e sexuais BGP 281, F4 e F10. Três genótipos apomíticos e três sexuais de *P. notatum* (amostras A-F) foram usados como controle de funcionamento da reação, já que os marcadores foram desenvolvidos para esta espécie. Os marcadores BCU 243 e BCU 259 correspondem a bandas de tamanho 377 e 1157 pares de bases (pb), respectivamente.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador (BioRad-T100 Thermal Cycler) com volume final de 25 µl contendo 20 µg de DNA genômico, 12,5 µL de Master Mix Red Neobio (150 mM Tris-HCl; 40 mM, (NH₄)₂SO₄; 40 mM MgCl₂, e 0,05 u/LTaq DNA polimerase), 1,5 mM MgCl₂ e 15 µg de cada *primer*.

Os ciclos de PCR consistiram em 1 min a 93°C seguidos de 40 ciclos de 1 min a 93 °C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C, e extensão final de 5 min a 72°C. Os géis foram confeccionados com agarose a 2% e submetidos a corrente de 40V por 4 h. Um total de 8 µL do produto de PCR foi utilizado em cada poço no gel, com o Ladder 50 pb (Ludwig) e Ladder 1kb (Invitrogen). A coloração dos géis foi realizada com brometo na concentração de 0.5 µg/ml e os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados utilizando sistema fotodocumentador Bio-Rad Gel Doc XR+.

5.4.4 Genotipagem dos marcadores SCAR

Dezenove marcadores SCAR (Tabela 4) foram utilizados no presente estudo e foram descritos por Calderini et al. (2011) como ligados à aposporia em *P. simplex*.

Os marcadores SCAR foram avaliados nos seguintes acessos: F4, BGP 42, BGP 272, BGP 81, BGP 281, BGP 165, BGP 380 e BGP 220. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada no termociclador (BioRad-T100 Thermal Cycler) em um volume final de 25 µl. A reação consistiu de 50 µg de DNA genômico, 12,5 µL de Master Mix Red Neobio (150 mM Tris-HCl; 40 mM, (NH₄)₂SO₄; 40 mM MgCl₂, e 0,05 u/LTaq DNA polimerase), 1,5 mM MgCl₂ e 30 µg de cada *primer*. Os ciclos de PCR consistiram em: 1) desnaturação das fitas a 94°C a 2 minutos; 2) 94°C a 30 segundos; 3) X T°C (sendo X a temperatura de anelamento específica de cada marcador) durante 30 segundos; 4) 72°C a 30 segundos; 5) repetição dos passos 2 a 4 por 30 vezes; 6) extensão final a 72°C durante 7 minutos. Os géis foram confeccionados em agarose a 2,5% e submetidos a corrente de 100V por 1h e 30 min. Um total de 10 µl do produto de PCR foram utilizados em cada poço no gel e os marcadores de peso molecular de 50 pb (Ludwig) e 1kb (Invitrogen) foram utilizados para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. A coloração dos géis foi realizada com brometo de etídio na

concentração de 0.5 ug/ml e os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados utilizando sistema fotodocumentador Bio-Rad Gel Doc XR+.

Tabela 4 – Marcadores SCAR implementados por Calderini et al. (2011) utilizados no presente estudo

Marcador	Sequência forward e reverse (5' – 3')	Size (pb)	T (°C)
Psapo7589-149	ATCTGAAAACCTTATCAAACCTTCC GCGGGCTTTCACAATAATAC	149	53
Psapo6779-249	CATGCTGAATTGAGGTAGGC GAAACAAAACCTCACACCTTCG	249	55
Psapo6487-111	TTGCTCACACGTCACCTCTC TGGTTGAACAACCTTTCATGG	111	52
Psapo6487-186	AAATATGGCGATGTGCCAAG GCAATCATCGTAGATACTC AAATCTC	186	54
Psapo7579-106	TAGTGTCAACGAGACCTGCT GGGAGTTACAGAGTTAGTTTT GTTCA	106	55
Psapo6582-195	CACAACACAAATCCAACCTACGA CCTGTATTTGCTATTGCTTTCCC	195	53
Psapo7090-115	TATTTATGCTTCCAAGGTGCCA CCACTATTCTATTCAGGTGC	115	53
Psapo6989-94	CATGTAAGAGATCGCACAGG CATCAGCAGAAATTGTAAG CTACC	94	57
Psapo6792-234	CGAGGCAGCATCATCTAAGG GCATCTGGCATGATTTGGTC	234	57
Psapo6592-183	TCACCCTATTACTCATAGGCCA CATAAACCAATTGATTGGCGTG	183	61
Psapo6781-63	TGCTCTTTGGAACCTATTGAC GGATCAGTAGAAACTGATTCCT	63	58
Psapo6582-128	GTTTGACTTATTGACTGCATGG TGGCACATCTGTTTACAGGG	128	58
Psapo7687-191	TCTATAACACTGTTTGACACGG AATTCCACCTGGATGTGAGAG	191	58
Psapo6687-194	ACGCGATCATGTGGGATAGC GCAGCCGCAGGAGAATACAC	194	58
Psapo7892-230	GTTGATCACCGTTGAAGTGAG TTTGTGCATCATCCACTTCC	230	58
Psapo7881-124	GGCAACATAACTTAGTGAGGCA GGGTGTCCAAGCTCTTTACAG	124	62
Psapo6677-116	GACTTCTTTACACAGAGGTGG CTTATCCTGATGGGATACGA	116	58
Psapow5	ATGGATAGTGACAATCTGT TAAGCAAGGAGTAATCAAAG	169	55
Psapo7681-211	AGGAGCACCAATTTCTATGGG TGGAAACCAATGCTAAGGGA	211	57

Fonte: Autor

5.4.5 Genotipagem com marcadores SSR

Para a busca de possíveis marcadores moleculares ligados a apomixia, foram avaliados 51 marcadores microssatélites descritos como não ligados a esta característica e previamente desenvolvidos para as espécies *P. notatum*, *P. atratum* e *P. plicatulum* por Cidade et al. (2009; 2010 e 2013) e Oliveira et al. (2016) (Tabela 5).

Os marcadores SSR foram avaliados nos seguintes acessos em bulks: BGP 77, 106, 175, 149, 165, 206, 213, 220, 78, 323, 326, F4, F10, F37, F42, 281 e 380. Os fragmentos de DNA foram amplificados via PCR no termociclador (BioRad-T100 Thermal Cycler) com volume final de reação de 25 µl, contendo 50 µg de DNA genômico, 12,5 µL de Master Mix Red Neobio (150 mM Tris-HCl; 40 mM, (NH₄)₂SO₄; 40 mM MgCl₂, e 0,05 u/uL Taq DNA polimerase), e 20 µg de cada primer. As condições de amplificação foram: desnaturação a 95°C por três minutos, seguida de 34 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos na temperatura de hibridização de cada marcador e um minuto a 72°C; e por fim, a fase de extensão por cinco minutos a 72°C. O protocolo de PCR para os marcadores Touchdown seguiram as seguintes condições propostas por Don et al. (1991): 1ª etapa – 94°C durante 4 minutos; 2ª etapa – 94°C durante 0:45 segundos; 3ª etapa – 60°C durante 1 minuto (0,5°C por ciclo); 4ª etapa – 72°C durante 1:15 minutos; 5ª etapa (volta ao passo 2, 10 x); 6ª etapa - 94°C durante 0:45 segundos; 7ª etapa – 50°C durante 1 minuto; 8ª etapa - 72°C durante 1:15 minutos; 9ª etapa – volta ao passo 6, por 25 x; 10ª etapa – 72°C durante 10 minutos e etapa final de 4°C infinito. Os fragmentos de DNA resultantes da amplificação foram mantidos em freezer a -20°C.

Os géis foram confeccionados em agarose a 3% e corridos a 100V por, aproximadamente, 1h. Para estimar o tamanho das bandas foi utilizado o marcador de peso molecular de 50 pb (Ludwig Biotecnologia LTDA). Após a confirmação do sucesso da amplificação, as amostras foram preparadas para eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 6% utilizando 3 µl do produto da amplificação, 3,5 µl de formamida (formamida 50% com azul de bromofenol e xilenocianol) e 3,5 µl de água MilliQ. Assim, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e aplicadas no gel, sendo submetidas a uma corrida a 60W por, aproximadamente, 3h utilizando marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen), desnaturado a 95°C por 5 minutos. A corrida eletroforética foi realizada em cuba de eletroforese *Dual Dedicated Height Nucleic Acid Sequencer* (CBS, modelo DDH-400-33) e os géis foram corados com nitrato de prata para visualização dos fragmentos amplificados por meio de protocolo estabelecido na literatura (CRESTE et al., 2001).

Tabela 5 – Marcadores SSR utilizados no presente estudo para busca de associação com a apomixia

Marcador	Sequencia F: (5'-3') R: (5'-3')	Espécie	Tamanho esperado (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
PA01B7	F: GCCCCCTGCCCCTGCTGACA R: CATGCGCCCCACGAAACACGAA		239-279	60	
PA02A5	F: CGGATCCGATGTCTGA R: TAGCACGTGTCCTTTTACCA		122-132	56	
PA02B1	F: AGCGCACTCGAAGGTCTG R: CGCACACGTCATCATCATT		130-170	60	
PA02B6	F: CGCCTAACCGCCCACCATA R: AACCTGTTCCCTTCGCCTTCTCC		169	60	
PA02C3	F: GTCAGAAATCAACACAAAACCT R: CGCGAGACGTCATCATTC	<i>P. atratum</i>	240-250	60	Cidade et al. (2010)
PA01C1	F: AGGTTGGCTCCAGAGTTGTTTG R: AGTGCTAGTGCGAGTGCTGTGT		231	58	
PA02F8	F: TATTCCTACGACGAGCCGACTT R: AGCGCAAACACAAAAACAAATC		166-200	TD*	
PA02H4	F: CCCCTGGTGACTIONGAGC R: CACGGGGATTATACTGGTTC		218	TD*	
PA02H9	F: ATCAGTTGGTCGAGTCTTCATCA R: TGGTGCACCGGTATCTGTTT		270-330	TD*	
PP01A5	F: CTTCCCTCCGCTTCTCCCACAAT R: AAATAAGACCCCCCTCCCTCCAT		257	60	
PP01D11	F: CTCCCCCTCCCCTCATTTCCTA R: GCCTTCCTCCGCTTCTTCCACA		245	60	
PP01B3	F: TCGGTTGATCAAAAAGGTAT R: CCACAAGCCAAGGTTAG	<i>P. plicatum</i>	217	50	Cidade et al. (2010)
PP01F3	F: ACCACGCCGAACCACACCTT R: GGCCAGCCTCCCACACCTC		180	60	
PP02F2	F: AGGGAAGCTCGCACTCAC		164	54	

Marcador	Sequencia F: (5'-3') R: (5'-3')	Espécie	Tamanho esperado (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
PP02D2	R: ATCTCTTTAGCAACCACCTTCA F: TGTTGATTGTTGTCTCCCAGTC R: TCATTAGTTGTTTCGCCAGCAGT		249	TD*	
PP02D6	F: ATCCGGTATAGCCAGTAGCAGT R: CGACGACGGTAAAGCACAC		223	TD*	
PP02F1	F: TCAGTAAAGACCCAACCT R: TGAAATGCTAAGAAATGAAC		252	TD*	
PN02A12	F: CGTCGTCAAACCCCTTCAT R: TCGGCGCTGTCTTCATCAT		185-205	60	
PN02B5B	F: GCATGCATAGAGCCAAATAGAT R: TAGGTAGTGGCGGTGAAGATAGTA		156-188	60	
PN02B3	F: CAAACAATGGGACAACACTT R: TTTTCTGCTCTGGCTCAT		139-157	50	
PN03D10	F: GTTATTCCTTCACTCACTCACC R: AGCTTTCTGCCTTCTTTTT		280-300	50	
PN03D12	F: TGGGGAAGCAGGAAGTCACA R: CAGCTCACCGATGGGAATG	<i>P. notatum</i>	220-240	50	Cidade et al. (2009; 2013)
PN02G3	F: GTCGCCGGTCGCAGTCG R: CACATAGCCGGCCTCCTCTC		294-302	60	
PN03F10	F: TGCCTACCGTTTCTCTTCTCT R: GGGATGGGTCTTGACTCTTGAT		165-177	60	
PN03F3	F: ACCCCGCGTCCTCTTTCTCA R: CCCAACCACCATATCCTCTG		165-203	60	
PN03F9	F: AAAAGGGCAGGAGTTAGGAC R: AGTTGGCTCAGTTACGATTTTA		179-275	60	
PN03F1	F: CAGTGACCAAGCTTACAACCTA R: GTGGCATGCCTTTCTACAA		184-192	50	
PN03F7	F: TGCTGGCAGTCTTTCTCT R: GGCCATAACCACTTTTTG		200-212	50	
PN03A5	F: GTGGCTGGGATGAAAGAACAAA		249-287	60	

Marcador	Sequencia F: (5'-3') R: (5'-3')	Espécie	Tamanho esperado (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
PN03A6	R: TAGCTCGCGCATAGGGGTAG F: TGTTAACGGCAAATCAAAT R: GCCTACCCAAAGCATAACC		152-192	60	
PN03E9	F: TGCCTTTTTCCATCCTAC		168-186	60	
PN03F2	F: TGCAACAAAATAGTCAAAGAT R: AGGAGGCATATTATTAGTTCAA		241-249	60	
PN03G8	F: GCACTCTGAACTCTTGGCTCTT R: CAGGTGCTTGCTTGGTCTAA		254-258	60	
PN03H10	F: GGTGCCCAGTGAACAACA R: GAGAATGGATGGATGAAACGAT		222-272	60	
PN02G10	F: GATACGTCTGATTCTTGTTTCG R: TCCTTCATGTGTTGTGGTCTC	<i>P. notatum</i>	189-219	60	Cidade et al. (2009; 2013)
PN03E7	F: CATGCTTTTCTGCTTCC R: GCTAATACTGCTTGCTCTTC		298	TD*	
PN03H3	F: CATGTAAACGTAGCAGAGGT R: GCTAATTTTACAGGGTGGTC		198-250	51.4	
Pp-Unicamp1	F: GTGCAACACTATGACACCAG R: ACAGTGCCCAATTGTTGT		173-181	60	
Pp-Unicamp2	F: CTCCACCAACGCCTTAC R: TAGTCCATACCCTTTCGTTT		187-203	51	
Pp-Unicamp3	F: TCTGCTAAGTTACCGCTCAT R: ATGGATATGGAACCTTGATGG		127-167	60	
Pp-Unicamp5	F: TTGGATGCACACCAGTATAG R: CCCTCTTCATTCTCATTAG		133-151	65	
Pp-Unicamp13	F: GGAGAGATGAGACTCCCTTGG R: TCAAGGTGGACCAAACACAC	<i>P. plicatulum</i>	116-142	55	Oliveira et al. (2016)
Pp-Unicamp15	F: ACAGCTTGGGCCTGACAC R: GGCTGAACTCTCTTCCATTGTT		152-166	55	
Pp-Unicamp16	F: GCACGTGTTTCGTCATGAAAT R: GCTTGGTCCCATGGATTATG		258-300	55	

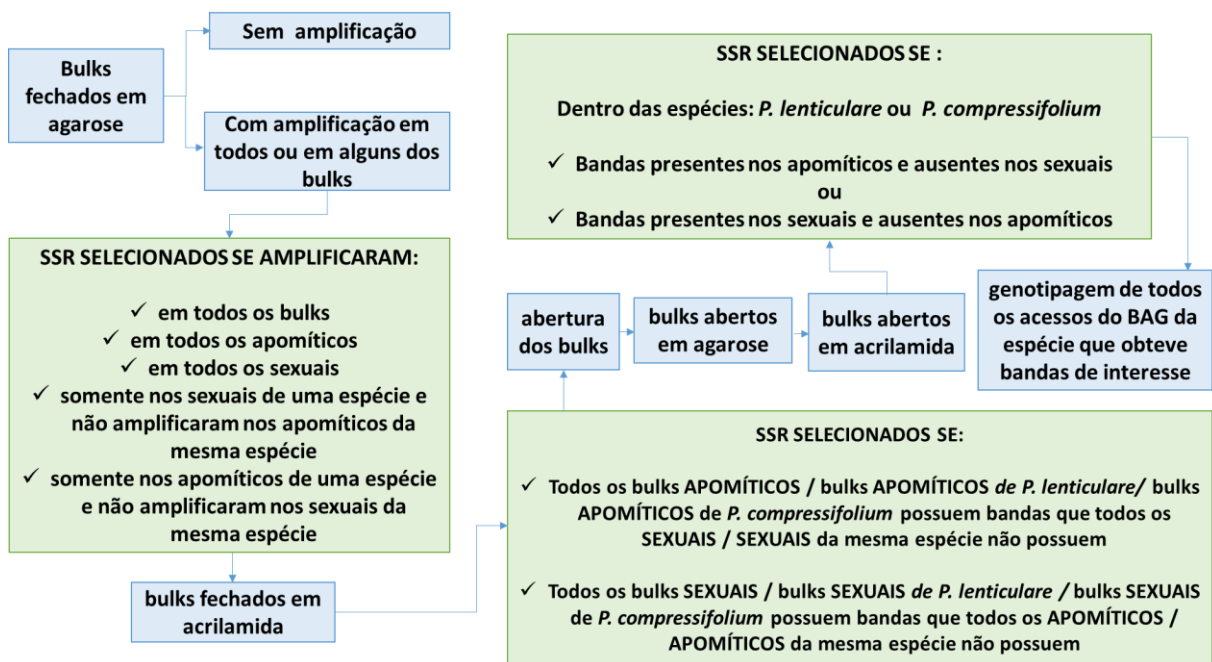
Marcador	Sequencia F: (5'-3') R: (5'-3')	Espécie	Tamanho esperado (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
Pp-Unicamp17	F: GGCCTGGTTGATTGATCT R: CGGAGTTGAAGATGGACTC		155-169	51	
Pp-Unicamp18	F: AGCCTTGCCTCCAGTC R: TTTCAGGTTACAGGTTGAGAG		222-258	65	
Pp-Unicamp19	F: CCCTCCCTCCATTTCA R: AGCTCGCAGAAGGCAAGA		203-241	57	
Pp-Unicamp20	F: TGGGTTTGGGATAAAGGATAG R: GGCCTCAACATGGGTAAC		144-170	51	
Pp-Unicamp21	F: GAGAGCCCAGACACAATGG R: ATCAACACGCTGCTTCAGTG		145-205	55	
Pp-Unicamp23	F: AGCAGGAGATCATGGAG R: TCCTACGTGAATGGCTAC		230-256	60	
Pp-Unicamp24	F: GGAGAGATGAGACTCCCTTG R: ACTCTCTACCGGTCATGAT		232-266	60	

*TD = Touchdown

Fonte: Autor

Nesta etapa, cada banda foi analisada individualmente buscando identificar marcas associadas ao modo de reprodução em todos os indivíduos apomíticos e ausentes em todos os sexuais, ou vice-versa. As marcas também foram analisadas dentro de cada espécie, separadamente, com o mesmo critério. Os marcadores que foram monomórficos foram descartados. Os marcadores com padrões de interesse (bandas presentes nos sexuais e ausentes nos apomíticos ou vice-versa) foram avaliados nos bulks abertos para a busca de associação com a apomixia. Aqueles marcadores que apresentaram alguma banda possivelmente associada ao modo de reprodução ao abrir os bulks foram avaliados em todas as amostras de *P. compressifolium* e *P. lenticulare* do BAG *Paspalum* e genotipados para o modo de reprodução (Tabela 2). Na Figura 9 encontra-se um esquema das análises detalhadas para a busca de associação com a apomixia nos géis de acrilamida genotipados para os SSR.

Figura 9 – Esquema exibindo os critérios passo-a-passo das análises para busca de associação com a apomixia para os acessos genotipados em acrilamida com os marcadores SSR



Fonte: Autor

5.4.6 Genotipagem com marcador p779/p780

O marcador p779/780, descrito como completamente ligado a aposporia em *B. decumbens* (WORTHINGTON et al., 2016) foi testado. Esta mesma região também foi reportada como associada a apomixia em *P. squamulatum* e *C. ciliaris* (AKIYAMA et al., 2011). O marcador foi avaliado nos seguintes acessos apomíticos BGP 77, BGP 106, BGP 175, BGP 149 e BGP 165 e sexuais BGP 281, F4 e F10. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada no termociclador (BioRad-T100 Thermal Cycler) com volume final de 24 µl como segue: 40 µg de DNA genômico foram adicionados a uma mistura contendo 12 µL de Master Mix Red Neobio (150 mM Tris-HCl; 40 mM, (NH₄)₂SO₄; 40 mM MgCl₂, e 0,05 u/uL Taq DNA polimerase), e 1,2 µM de cada primer, *forward* e *reverse*. Os ciclos de PCR consistiram em desnaturação inicial a 94°C durante 5 min seguido por 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 52°C durante 30 s e 72°C durante 60 s, com um passo extensão final a 72°C por 10 min. Os géis foram confeccionados em agarose a 1,5% e submetidos a corrente de 100V por 1h e 30 min. Um total de 10 µl do produto de PCR foi utilizado em cada poço no gel e os marcadores de peso molecular de 50 pb (Ludwig) e 1kb (Invitrogen) foram utilizados para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. A coloração dos géis foi realizada com brometo de etídio na concentração de 0.5 µg/ml e os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados utilizando sistema fotodocumentador Bio-Rad Gel DocXR+.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA PELO USO DE ANÁLISE CITOEMBRIOLÓGICA

Foram caracterizados reprodutivamente um total de cinco acessos de *Paspalum*. Como resultado desta etapa, três acessos (BGP 272 de *P. rojasii*; BGP 281 de *P. lenticulare* e BGP 380 de *P. compressifolium*) apresentaram modo de reprodução sexual. Um acesso foi apomítico (BGP 232 de *P. plicatulum*) e um acesso apresentou comportamento reprodutivo do tipo apomítico facultativo (BGP 178 de *P. compressifolium*). Na Tabela 6 encontra-se a caracterização reprodutiva detalhada destes acessos.

Tabela 6 – Modo de reprodução dos acessos analisados por análise citoembriológica.

BGP	Espécie	S	%	A	%	E	%	Total	MR
178	<i>P. compressifolium</i>	2	2,48	65	80,24	14	17,28	81	Apomítico facultativo
232	<i>P. plicatulum</i>	-	-	65	83,33	13	16,66	78	Apomítico
281	<i>P. lenticulare</i>	125	62,50	-	-	75	37,50	200	Sexual
272	<i>P. rojasii</i>	13	92,85	-	-	1	7,14	14	Sexual
380	<i>P. compressifolium</i>	101	63,29	-	-	57	36,70	158	Sexual

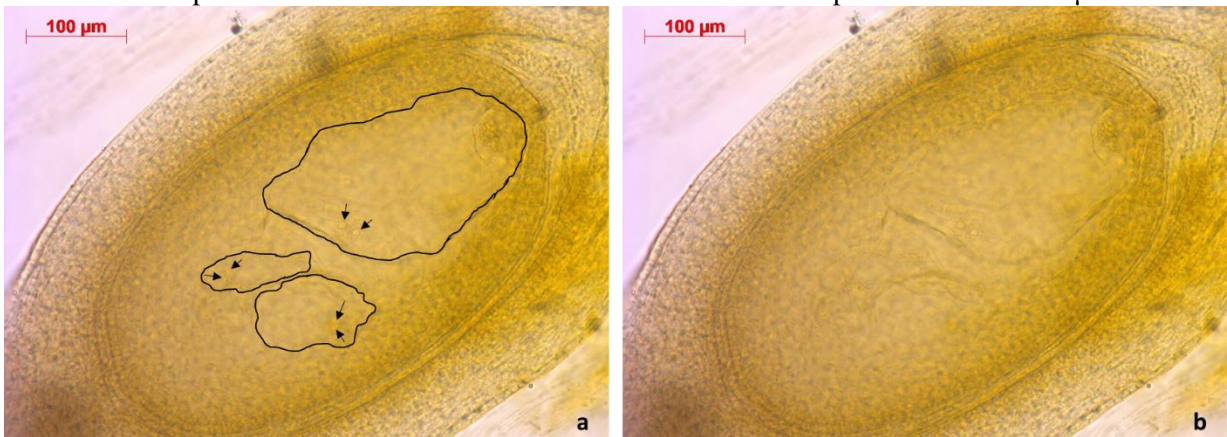
S = Número de sacos embrionários sexuais; A = Número de sacos embrionários apomíticos; E = Número de sacos embrionários estéreis; MR = Modo reprodutivo

Fonte: Autor

No acesso BGP 178 de *P. compressifolium* foram analisados um total de 81 óvulos, dos quais 65 apresentaram sacos embrionários apomíticos, e dois foram compatíveis com o modo sexual de reprodução, desta forma, o acesso foi classificado como apomítico facultativo. Neste acesso não foram encontrados óvulos heterogêneos, ou seja, aqueles que possuem tanto um saco embrionário sexual em conjunto com outros apomíticos no mesmo óvulo. Assim sendo, os apomíticos estavam em óvulos separados dos sexuais. No entanto, Quarín et al. (1986) encontraram óvulos de constituição heterogênea oriundos de uma planta tetraploide denominada T435 pertencente a espécie de *P. cromyorrhizon*. Isso sugere que a expressão da apomixia depende em sobremaneira da dosagem do gene que codifica essa característica, porque a incidência de sexualidade decresce quando o nível de ploidia aumenta. É importante ressaltarmos que, em *Paspalum*, as espécies diplóides são sexuais ou altamente sexuais, enquanto que muitos tetraplóides são apomíticos (QUARÍN, 1992).

Para o acesso BGP 232 de *P. plicatulum* foi analisado um total de 78 óvulos dos quais 65 apresentaram comportamento reprodutivo do tipo apomítico. Os 13 acessos restantes foram estéreis. Na Figura 10, pode-se observar óvulos dotados de múltiplos sacos embrionários e ausência de antípoda. No gênero *Paspalum*, sacos embrionários apomíticos são aqueles condizentes com a morfologia celular do tipo *Paspalum* sendo detentor de uma oosfera, dois núcleos polares, às vezes uma ou duas sinérgides, geralmente observadas próximas da oosfera, e ausência de antípodas (ORTIZ et al., 2013).

Figura 10 – Óvulos apomíticos pertencentes ao acesso BGP 232 de *P. plicatulum*, apresentando núcleos polares e três sacos embrionários com ausência de antípoda. Escala de 100 μm .



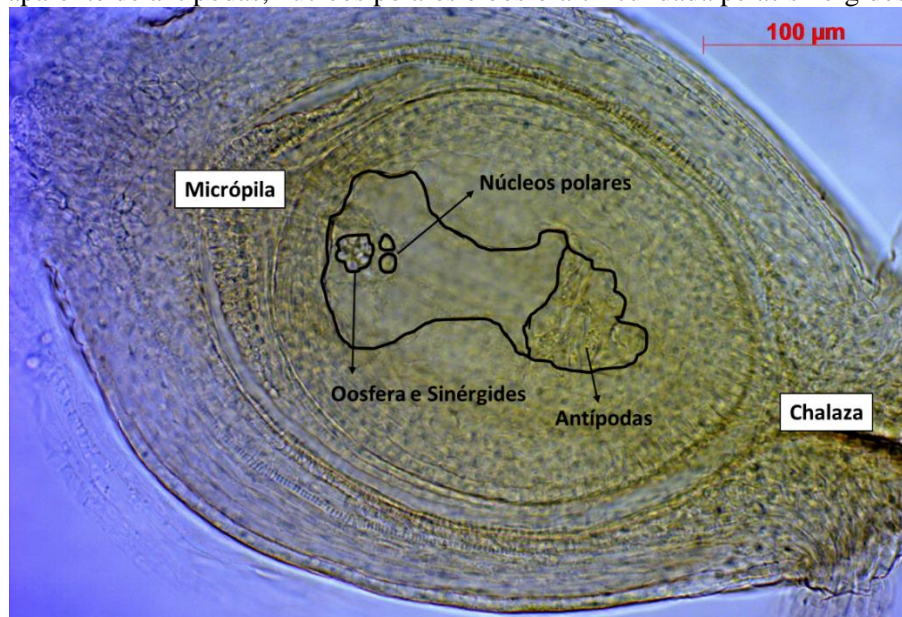
Legenda: a) Os círculos em preto representam os sacos embrionários apomíticos já, as setas indicam os núcleos polares b) mesma imagem que em A no entanto, com ausência de demarcações e setas

Fonte: Autor

O acesso classificado como apomítico, BGP 232, apresentou de dois até seis sacos embrionários dentro de um mesmo óvulo analisado, o que pode denotar variação quando analisamos outras espécies dentro do gênero *Paspalum*. Em relação a essa ocorrência, Quarín e Burson (1991) encontraram grande prevalência de um a três sacos embrionários apospóricos por óvulo em acessos apomíticos nas espécies *P. distichum* e *P. denticulatum*, no entanto, nestas espécies um único saco embrionário apomítico foi relatado como sendo o mais frequente.

No que tange aos acessos classificados como sexuais (BGP 272 de *P. rojasii*; BGP 281 de *P. lenticulare* e BGP 380 de *P. compressifolium*), foram analisados um total de 14, 200 e 158 óvulos, respectivamente (Tabela 6). Na Figura 11, encontra-se ilustrado um saco embrionário sexual do acesso BGP 281 de *P. compressifolium*. Estes acessos caracterizados como sexuais neste trabalho exibe um resultado de grande importância, pois poderão ser utilizados em futuros programas de melhoramento genético de *Paspalum* como genitores diploides sexuais. Na literatura, encontramos para estas espécies outros acessos caracterizados sexualmente como V14386 (*P. rojasii*) coletado em Capão Alto – RS (POZZOBON et al., 2008), N188 (*P. lenticulare*) coletado no Paraguai (QUARÍN et al. 1997; ESPINOZA et al. 2001; GALDEANO et al. 2016) e o acessos sexual VBoPrSe 4225 (*P. compressifolium*) coletado em Arroio dos Ratos – RS. Comparando com os resultados encontrados para estas espécies no presente trabalho, com exceção do acesso BGP 380 de *P. compressifolium* que não possui origem conhecida, os acessos de BGP 272 de *P. rojasii* e BGP 281 de *P. lenticulare* possuem origens diferentes quando comparado aos acessos citados na literatura.

Figura 11 – Saco embrionário sexual pertencente ao acesso BGP 281 de *P. compressifolium*. Presença aparente de antípodas, núcleos polares e oosfera circundada pelas sinérgides.



Fonte: Autor

Em plantas sexuais de *Paspalum*, o tipo morfológico do saco embrionário mais comum é o condizente com o padrão denominado *Polygonum*, ou seja, este tipo de saco embrionário detém um único saco meiótico com dois núcleos polares, e uma massa de células denominada antípodas no polo da chalaza (ORTIZ et al., 2013), além da presença de sinérgides. Pelo presente trabalho, porém, na maioria dos óvulos sexuais caracterizados, as estruturas visualizadas no microscópio de interferência se resumem às antípodas e aos núcleos polares. Em algumas fotos conseguimos visualizar, além desta estrutura, a oosfera, que na Figura 10 é representada pela estrutura que vem logo ao lado das sinérgides.

Todos os óvulos dos acessos sexuais avaliados (BGP 272, 281 e 380) apresentaram um único saco embrionário. E isto está de acordo com o processo normal da megagametogênese, onde a célula arqueosporial ou célula mãe do megásporo sofre meiose formando quatro megásporos sendo que três se degeneram. O megásporo funcional então se divide por mitose formando um único saco embrionário (gametófito) do tipo *Polygonum* (NAKAMURA et al., 2009).

No que tange as estruturas internas do saco embrionário observadas na Figura 10, além dos núcleos polares (imprescindíveis para a formação do endosperma e nutrição da planta nos primeiros estágios de vida) e oosfera que originará um embrião sadio, as sinérgides e as antípodas também desempenham papéis de grande importância. Segundo Leshem et al (2013), elas desempenham um papel primordial para o correto descarregamento do grão de pólen por

meio do tubo polínico para dentro do gametófito. Já as antípodas ainda permanecem com funções obscuras, no entanto, em Poaceae, estudos ultraestruturais em arroz suportam a hipótese de que as células das antípodas detêm um papel de transporte de nutrientes da nucela para dentro do saco embrionário (MAEDA e MYIAKE, 1997). Assim sendo, todas as estruturas internas do gametófito feminino são de grande importância para a formação de uma semente pela fecundação da oosfera por meio do núcleo gamético masculino e o endosperma pela fusão dos núcleos polares e um segundo núcleo gamético masculino (exibindo desta forma o mecanismo natural da dupla fertilização). Na Tabela 6 é importante ressaltar o alto número de óvulos estéreis em *P. lenticulare* (BGP 281) e *P. compressifolium* (BGP 380), sendo 75 e 57 óvulos, respectivamente.

Na Figura 12 pode ser observado um óvulo estéril do acesso BGP 380, ausente de suas estruturas reprodutivas. Um óvulo estéril é aquele que pode possuir apenas um conjunto de células proliferadas ao seu redor, ou seja, as células nucelares.

Figura 12 – Óvulo estéril pertencente ao acesso BGP 380 (*P. compressifolium*)



Fonte: Autor

Quarín et al. (1984) e Burson (1997), ao analisarem o modo reprodutivo de híbridos artificiais e espécies silvestres, também encontraram um grande número de óvulos abortados nos genótipos caracterizados como sexuais. Além disso, é discutido que a esterilidade em sacos embrionários em plantas pode estar relacionada a um stress ambiental sofrido pelo organismo no seu ciclo de vida. Altas temperaturas, baixo teor de pluviosidade, baixa

disponibilidade de nutrientes e até mesmo uma alta concentração salina no solo podem influenciar na formação de óvulos estéreis (SUN et al. 2004; ZINN et al. 2010).

O acesso BGP 272 de *P. rojasii* apresentou apenas um único ovário estéril. Neste acesso, não foi possível a caracterização reprodutiva em um número maior de óvulos devido ao fato de ter ocorrido grande infestação de fungos patogênicos conhecidos como carvão (*Ustilago operta*). Provavelmente, se dispuséssemos de um número maior de espiguetas saudáveis para a análise poderíamos ter encontrado também um expressivo número de óvulos estéreis para este acesso. No acesso BGP 232 de *P. plicatulum* foram observados 13 sacos embrionários estéreis, ou seja, 16,66% do seu total caracterizado.

A técnica de análise citoembriológica utilizada para a caracterização reprodutiva dos acessos de *Paspalum* spp. mostrou-se de grande importância, pois, além da descoberta do modo de reprodução, podem ser exploradas outras características intrínsecas à estrutura reprodutiva da planta. O emprego desta técnica para a determinação do modo reprodutivo dentro de *Paspalum* é ressaltada por Rebozzio et al. (2011) como uma das mais importantes, pois consiste em um método de baixo custo e traz muitas informações nos processos reprodutivos, principalmente no que tange a reprodução por apomixia. Outra característica morfológica ressaltada pelos autores que facilita a distinção entre ovários sexuais e apomíticos é a presença de um único saco embrionário em sementes sexuais e, por outro lado, os ovários apomíticos detêm múltiplos sacos embrionários.

6.2 CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Dos 150 acessos inicialmente disponíveis, foi caracterizado reprodutivamente por FCSS um total de 135 acessos de *Paspalum* distribuídos em nove espécies pertencentes ao grupo Plicatula (Tabela 7). Treze acessos não foram caracterizados reprodutivamente, seja por motivos fisiológicos (grande presença de sementes vazias) ou até mesmo por ataque de fungos patogênicos conhecidos como carvão (*Ustilago operta*) e ergot (*Claviceps paspali*) (MOYANO et al., 2010; MARCHI et al., 2011). Dois acessos (BGP 281 e 380) foram caracterizados exclusivamente por análise citoembriológica. Nestes dois acessos não foi possível a caracterização por meio da técnica de citometria de fluxo pela indisponibilidade de sementes cheias (com cariopses) e saudáveis.

Tabela 7 – Modo reprodutivo dos acessos analisados pela técnica de citometria de fluxo por seleção de sementes (FCSS) oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum*

BGP	Espécie	NTC ^a	NC Apo ^b	NC Sex ^c	P%C apo ^d	P%C Sex ^e	MR ^f
9	<i>P. atratum</i>	34	31	3	91,18	8,82	AF
10	<i>P. atratum</i>	24	21	3	87,50	12,50	AF
50	<i>P. atratum</i>	26	26	0	100,00	0,00	AA
93	<i>P. atratum</i>	58	56	2	96,55	3,45	AF
94	<i>P. atratum</i>	58	56	2	96,55	3,45	AF
95	<i>P. atratum</i>	42	42	0	100,00	-	AA
96	<i>P. atratum</i>	52	51	1	98,08	1,92	AF
103	<i>P. atratum</i>	78	73	5	93,59	6,41	AF
260	<i>P. atratum</i>	54	54	0	100,00	-	AA
263	<i>P. atratum</i>	32	31	1	96,88	3,13	AF
268	<i>P. atratum</i>	20	20	0	100,00	-	AA
269	<i>P. atratum</i>	60	59	1	98,33	1,67	AF
279	<i>P. atratum</i>	10	10	0	100,00	-	AA
280	<i>P. atratum</i>	46	43	3	93,48	6,52	AF
282	<i>P. atratum</i>	56	55	1	98,21	1,79	AF
288	<i>P. atratum</i>	18	15	3	83,33	16,67	AF
307	<i>P. atratum</i>	64	63	1	98,44	1,56	AF
18	<i>P. compressifolium</i>	28	26	2	92,86	7,14	AF
53	<i>P. compressifolium</i>	46	41	5	89,13	10,87	AF
54	<i>P. compressifolium</i>	58	58	0	100,00	-	AA
75	<i>P. compressifolium</i>	38	37	1	97,37	2,63	AF
78	<i>P. compressifolium</i>	52	49	3	94,23	5,77	AF
84	<i>P. compressifolium</i>	38	34	4	89,47	10,53	AF
85	<i>P. compressifolium</i>	34	34	0	100,00	-	AA
140	<i>P. compressifolium</i>	48	46	2	95,83	4,17	AF
153	<i>P. compressifolium</i>	40	40	0	100,00	-	AA
178	<i>P. compressifolium</i>	38	38	0	100,00	-	AA
179	<i>P. compressifolium</i>	56	54	2	96,43	3,57	AF
186	<i>P. compressifolium</i>	18	16	2	88,89	11,11	AF
190	<i>P. compressifolium</i>	20	18	2	90,00	10,00	AF
193	<i>P. compressifolium</i>	-	-	-	-	-	SS
220	<i>P. compressifolium</i>	26	21	5	80,77	19,23	AF
249	<i>P. compressifolium</i>	60	52	8	86,67	13,33	AF
323	<i>P. compressifolium</i>	20	19	1	95,00	5,00	AF
326	<i>P. compressifolium</i>	52	48	4	92,31	7,69	AF
331	<i>P. compressifolium</i>	89	69	15	77,53	16,85	AF
5	<i>P. guenoarum</i>	44	43	1	97,73	2,27	AF
55	<i>P. guenoarum</i>	24	24	0	100,00	-	AA
79	<i>P. guenoarum</i>	12	12	0	100,00	-	AA
136	<i>P. guenoarum</i>	54	54	0	100,00	-	AA
145	<i>P. guenoarum</i>	58	58	0	100,00	-	AA
166	<i>P. guenoarum</i>	28	28	0	100,00	-	AA
183	<i>P. guenoarum</i>	56	54	2	96,43	3,57	AF
192	<i>P. guenoarum</i>	40	40	0	100,00	-	AA
211	<i>P. guenoarum</i>	46	44	2	95,65	4,35	AF
212	<i>P. guenoarum</i>	44	44	0	100,00	-	AA
245	<i>P. guenoarum</i>	76	76	0	100,00	-	AA
264	<i>P. guenoarum</i>	28	28	0	100,00	-	AA
284	<i>P. guenoarum</i>	34	34	0	100,00	-	AA
299	<i>P. guenoarum</i>	52	50	2	96,15	3,85	AF

BGP	Espèce	NTC ^a	NC Apo ^b	NC Sex ^c	P% C apo ^d	P% C Sex ^e	MR ^f
7	<i>P. lenticulare</i>	22	22	0	100,00	-	AA
77	<i>P. lenticulare</i>	20	16	4	80,00	20,00	AF
97	<i>P. lenticulare</i>	44	40	4	90,91	9,09	AF
99	<i>P. lenticulare</i>	20	20	0	100,00	-	AA
101	<i>P. lenticulare</i>	36	35	1	97,22	2,78	AF
102	<i>P. lenticulare</i>	20	20	0	100,0	-	AA
104	<i>P. lenticulare</i>	56	56	0	100,00	-	AA
106	<i>P. lenticulare</i>	48	37	11	77,08	22,92	AF
116	<i>P. lenticulare</i>	40	40	0	100,00	-	AA
119	<i>P. lenticulare</i>	40	37	3	92,50%	7,50%	AF
122	<i>P. lenticulare</i>	60	60	0	100,00	-	AA
149	<i>P. lenticulare</i>	100	80	20	80,00%	20,00	AF
162	<i>P. lenticulare</i>	56	55	1	98,21	1,79	AF
165	<i>P. lenticulare</i>	56	56	0	100,00	-	AA
175	<i>P. lenticulare</i>	58	57	1	98,28	1,72	AF
206	<i>P. lenticulare</i>	60	57	3	95,00	5,00	AF
213	<i>P. lenticulare</i>	60	57	3	95,00	5,00	AF
259	<i>P. lenticulare</i>	40	35	5	87,50	12,50	AF
262	<i>P. lenticulare</i>	54	52	2	96,30	3,70	AF
271	<i>P. lenticulare</i>	42	42	0	100,00	-	AA
305	<i>P. lenticulare</i>	62	61	1	98,39	1,61	AF
125	<i>P. lepton</i>	2	2	0	100,00	-	AA
270	<i>P. lepton</i>	20	19	1	95,00	5,00	AF
287	<i>P. lepton</i>	16	16	0	100,00	-	AA
292	<i>P. lepton</i>	44	42	2	95,45	4,55	AF
324	<i>P. lepton</i>	52	46	6	88,46	11,54	AF
4	<i>P. oteroi</i>	56	56	0	100,00	-	AA
118	<i>P. oteroi</i>	52	49	3	94,23	5,77	AF
273	<i>P. oteroi</i>	54	46	8	85,19	14,81	AF
21	<i>P. plicatulum</i>	68	64	4	94,12	5,88	AF
65	<i>P. plicatulum</i>	38	33	5	86,84	13,16	AF
66	<i>P. plicatulum</i>	60	60	0	100,00	-	AA
67	<i>P. plicatulum</i>	94	91	3	96,81	3,19	AF
68	<i>P. plicatulum</i>	58	58	0	100,00	-	AA
71	<i>P. plicatulum</i>	38	38	0	100,00	-	AA
73	<i>P. plicatulum</i>	58	58	0	100,00	-	AA
76	<i>P. plicatulum</i>	40	40	0	100,00	-	AA
83	<i>P. plicatulum</i>	20	20	0	100,00	-	AA
86	<i>P. plicatulum</i>	68	55	13	80,88	19,12	AF
87	<i>P. plicatulum</i>	28	28	0	100,00	-	AA
88	<i>P. plicatulum</i>	16	15	1	93,75	6,25	AF
89	<i>P. plicatulum</i>	32	31	1	96,88	3,13	AF
90	<i>P. plicatulum</i>	12	11	1	91,67	8,33	AF
108	<i>P. plicatulum</i>	-	-	-	-	-	SS
109	<i>P. plicatulum</i>	74	71	3	95,95	4,05	AF
120	<i>P. plicatulum</i>	42	42	0	100,00	-	AA
137	<i>P. plicatulum</i>	60	58	2	96,67	3,33	AF
160	<i>P. plicatulum</i>	8	8	0	100,00	-	AA
172	<i>P. plicatulum</i>	60	57	3	95,00	5,00	AF
174	<i>P. plicatulum</i>	50	48	2	96,00	4,00	AF
177	<i>P. plicatulum</i>	38	38	0	100,00	-	AA
180	<i>P. plicatulum</i>	60	46	14	76,67	23,33	AF
181	<i>P. plicatulum</i>	18	16	2	88,89	11,11	AF

BGP	Espécie	NTC ^a	NC Apo ^b	NC Sex ^c	P%CA ^d	P%CS ^e	MR ^f
182	<i>P. plicatulum</i>	60	60	0	100,00	-	AA
195	<i>P. plicatulum</i>	36	36	0	100,00	-	AA
196	<i>P. plicatulum</i>	54	50	4	92,59	7,41	AF
197	<i>P. plicatulum</i>	60	47	13	78,33	21,67	AF
198	<i>P. plicatulum</i>	14	14	0	100,00	-	AA
202	<i>P. plicatulum</i>	24	20	4	83,33	16,67	AF
225	<i>P. plicatulum</i>	60	57	3	95,00	5,00	AF
232	<i>P. plicatulum</i>	54	49	7	90,74	12,96	AF
250	<i>P. plicatulum</i>	62	61	1	98,39	1,61	AF
261	<i>P. plicatulum</i>	20	18	2	90,00	10,00	AF
265	<i>P. plicatulum</i>	38	35	3	92,11	7,89	AF
266	<i>P. plicatulum</i>	58	55	3	94,83	5,17	AF
301	<i>P. plicatulum</i>	36	36	0	100,00	-	AA
317	<i>P. plicatulum</i>	66	66	0	100,00	-	AA
327	<i>P. plicatulum</i>	44	43	1	97,73	2,27	AF
328	<i>P. plicatulum</i>	58	55	3	94,83	5,17	AF
37	<i>P. rhodopedum</i>	30	29	1	96,67	3,33	AF
38	<i>P. rhodopedum</i>	46	44	2	95,65	4,35	AF
56	<i>P. rhodopedum</i>	42	39	3	92,86	7,14	AF
57	<i>P. rhodopedum</i>	48	44	4	91,67	8,33	AF
58	<i>P. rhodopedum</i>	38	34	4	89,47	10,53	AF
72	<i>P. rhodopedum</i>	50	46	4	92,00	8,00	AF
131	<i>P. rhodopedum</i>	34	33	1	97,06	2,94	AF
132	<i>P. rhodopedum</i>	18	18	0	100,00	-	AA
151	<i>P. rhodopedum</i>	56	56	0	100,00	-	AA
187	<i>P. rhodopedum</i>	46	43	3	93,48	6,52	AF
221	<i>P. rhodopedum</i>	30	23	7	76,67	23,33	AF
290	<i>P. rhodopedum</i>	36	36	0	100,00	-	AA
69	<i>P. rojasii</i>	58	51	7	87,93	12,07	AF
81	<i>P. rojasii</i>	40	39	1	97,50	2,50	AF
82	<i>P. rojasii</i>	34	30	4	88,24	11,76	AF
171	<i>P. rojasii</i>	46	41	5	89,13	10,87	AF
272	<i>P. rojasii</i>	6	0	6	0,00	100,00	S
300	<i>P. rojasii</i>	54	54	0	100,00	-	AA

a- NTC = Número total de cariopses avaliadas; b- NCApo = Número de cariopses apomíticas; c- NCSex = Número de cariopses sexuais; d- P%CA = Porcentagem de cariopses apomíticas; e- P%CS = Porcentagem de cariopses sexuais; f - MR=modo reprodutivo. AF = apomítico facultativo; AA= altamente apomítico; S = sexual

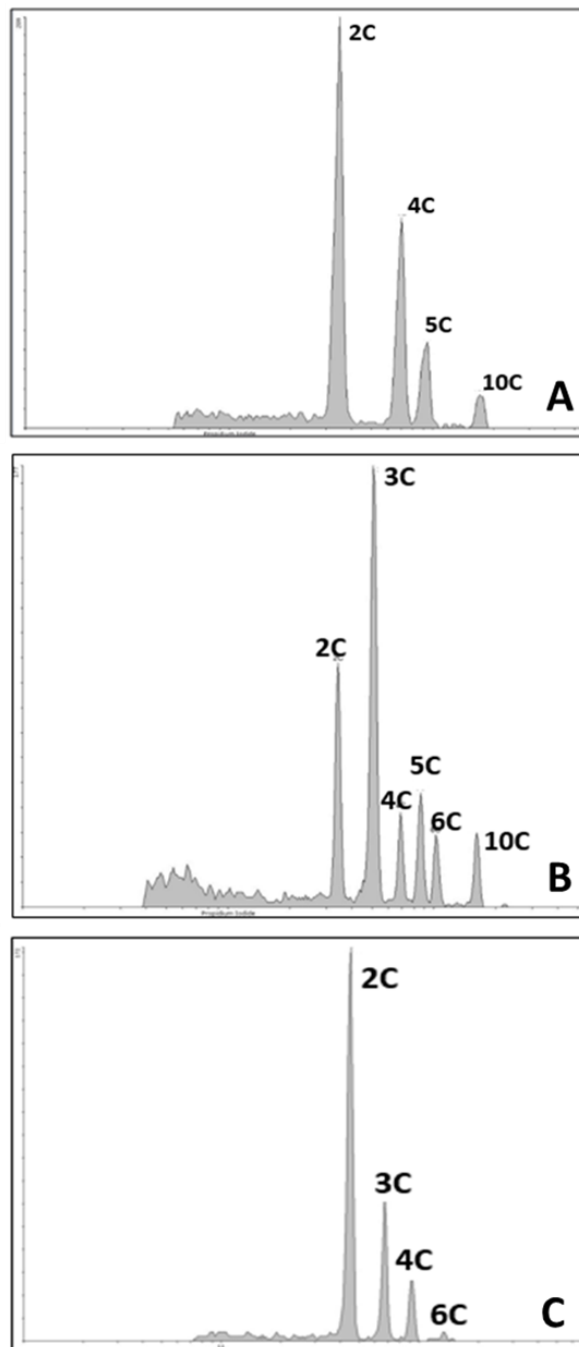
Fonte: Autor

Um total de 49 acessos (36,29%) apresentou reprodução compatível com o mecanismo altamente apomítico (Tabela 7). Estes acessos mostraram sementes com picos de conteúdo de DNA correspondente a 2C:5C. Na Figura 13A está disposto um histograma de duas sementes do acesso BGP 151 (*P. rhodopedum*), caracterizado como altamente apomítico com a presença de picos 2C:5C, um pico 4C e 10C. A presença do pico 4C está relacionada ao processo natural de endoreduplicação do embrião, assim, desta maneira, o mesmo é observado com o pico 10C, no entanto este último faz relação com o conteúdo de DNA do endosperma 5C que sofreu um processo de endoreduplicação na fase do ciclo celular.

Oitenta e cinco acessos (62,96%) foram caracterizados como apomíticos facultativos. Estes acessos mostraram sementes apomíticas com picos 3:5 (proporção 3 para o embrião e 5 para o endosperma) e sementes sexuais com picos 2:3 (proporção 2 para o embrião e 3 para o endosperma). Na Figura 13B está representado um histograma pertencente ao acesso BGP 75 de *P. compressifolium*, que foi caracterizado como apomítico facultativo. A presença do pico 4C representa a duplicação do conteúdo de DNA do embrião 2C, o mesmo pode ser observado com o pico 6C e 10C. No entanto, estes dois últimos picos correspondem à duplicação do endosperma 3C e 5C, respectivamente, e denotam um evento comum em divisões celulares.

Apenas um único acesso apresentou o mecanismo de reprodução exclusivamente sexual por meio da técnica de citometria de fluxo, sendo o BGP 272 de *P. rojasii*. Na Figura 13C está disposto um histograma de duas kariopses do acesso BGP 272. É possível observar que, além da presença do pico sexual típico 3C, vemos a ocorrência de um pico definido 6C, referente à endoreduplicação do endosperma.

Figura 13 – Histogramas gerados pelo Citômetro de Fluxo para alguns acessos de *Paspalum* spp.



Legenda: a) Acesso BGP 151 (*P. rhodopedum*), com pico do embrião 2C, 4C e pico associado ao endosperma 5C e 10C. b) acesso BGP 75 (*P. compressifolium*), com pico do endosperma 3C sexual, pico do endosperma apomítico 5C, pico de endoreduplicação do 6C e 10C. c) Acesso BGP 272 de *P. rojasii*, classificado como sexual, com picos 2C, 3C, 4C e 6C. Os picos 4C correspondem ao embrião 2C duplicado, os picos 6C correspondem ao endosperma sexual duplicado, já os picos 10C fazem relação ao endosperma 5C apomítico duplicado

Fonte: Autor

O valor para o índice de fluorescência estimados para as sementes por meio do citômetro de fluxo dos acessos acima descritos, estão na Tabela 8. O índice de fluorescência é o valor do conteúdo de DNA presente na semente lida pelo citômetro.

Tabela 8 – Índices de fluorescência para os acessos BGP 151 (*P. rhodopedum*), BGP 75 (*P. compressifolium*) e BGP 272 (*P. rojasii*)

BGP	Espécie	Picos	Média do índice de fluorescência observada	Média do índice de fluorescência esperada (em relação ao valor de C)	Diferença (O-E)
151	<i>P. rhodopedum</i>	C	181,51	181,51	-
		2C	363,03	$181,51 * 2 = 363,02$	0,01
		3C	-	-	-
		4C	733,02	$181,51 * 4 = 726,04$	6,98
		5C	930,65	$181,51 * 5 = 907,55$	23,10
		6C	-	-	-
		10C	1.704,05	$181,51 * 10 = 1.815,10$	-111,05
75	<i>P. compressifolium</i>	C	193,78	193,78	-
		2C	387,57	$193,78 * 2 = 387,52$	0,05
		3C	598,40	$193,78 * 3 = 581,34$	17,06
		4C	783,40	$193,78 * 4 = 775,12$	8,28
		5C	997,26	$193,78 * 5 = 968,90$	28,36
		6C	1.173,39	$193,78 * 6 = 1.162,60$	10,71
		10C	1.867,47	$193,78 * 10 = 1.937,80$	-70,00
272	<i>P. rojasii</i>	C	104,85	104,85	-
		2C	209,70	$104,85 * 2 = 209,70$	0,00
		3C	326,66	$104,85 * 3 = 314,55$	12,11
		4C	403,80	$104,85 * 4 = 419,40$	-15,60
		5C	-	-	-
		6C	650,84	$104,85 * 6 = 629,10$	21,74
		10C	-	-	-

Fonte: Autor

Para os acessos BGP 151 (*P. rhodopedum*) e BGP 75 (*P. compressifolium*), a diferença entre o valor observado e o esperado para o pico 10C está muito alta (-111,05 e -70,00, respectivamente). Esta grande diferença pode ocorrer devido a um erro experimental que aumenta à medida que a distância entre os picos são maiores, ou seja, os picos com conteúdo de DNA 10C irão possuir um erro maior quando comparado ao pico 2C por exemplo. Desta maneira, o erro já era esperado pela metodologia utilizada.

Podemos observar que a variabilidade genético-reprodutiva ocorreu em grande prevalência em acessos caracterizados como apomíticos, sendo 49 acessos altamente apomíticos, 85 apomíticos facultativos e um acesso sexual. A grande ocorrência do

mecanismo de reprodução apomítica dentro das espécies de *Paspalum* reportados neste estudo está de acordo com a literatura (QUARÍN, 1992). Assim sendo, é importante destacarmos que o gênero *Paspalum* como um todo detém uma série de características interessantes que o torna grande candidato para estudos da apomixia e mineração de genes que controlam essa característica, tais como: (1) o tamanho pequeno do genoma; (2) a existência de citótipos sexuais e apomíticos dentro da mesma espécie; (3) a capacidade de produzir um grande número de sementes; e (4) a disponibilidade de metodologias de transformação genética (ORTIZ et al., 2013).

Comparando o modo reprodutivo do nosso trabalho com as mesmas espécies analisadas por Galdeano et al. (2016) – *P. atratum*, *P. guenoarum*, *P. lenticulare*, *P. oteroi* e *P. plicatulum*, o nosso resultado se mostra comparável, uma vez que também ocorreu prevalência de acessos apomíticos, variando desde altamente apomíticos até apomíticos facultativos. Em contrapartida, para a espécie de *P. plicatulum* nosso trabalho não encontrou nenhum acesso sexual, enquanto que Galdeano et al. (2016) encontraram para esta espécie um acesso sexual identificado como HONFI14.

Atualmente, a citometria de fluxo tem sido uma técnica muito utilizada na pesquisa em diversas áreas como a ecologia e a biologia sistemática (KRON et al. 2007; LOUREIRO et al. 2010). Além da caracterização reprodutiva, é uma técnica poderosa utilizada na caracterização do conteúdo de DNA em folhas de *Paspalum* e inferência do nível de ploidia (JARRET et al. 1995; VAIO et al. 2007; SARTOR et al. 2011). Utilizando os mesmos acessos deste trabalho, também foi caracterizado o conteúdo de DNA e inferido o nível de ploidia a partir do conteúdo de DNA de folhas de *Paspalum* (dados não publicados). Houve correspondência entre o nível de ploidia e o modo de reprodução, ou seja, os acessos poliploides (tetraploides) foram apomíticos e os diploides foram sexuais, corroborando os dados do presente estudo entre nível de ploidia e modo de reprodução.

Tomando como base a premissa entre o nível de ploidia e o modo reprodutivo dentro do gênero *Paspalum*, o mecanismo da apomixia não é expresso em plantas diploides. O principal fato deste fenômeno pode estar relacionado à dosagem do gene da aposporia, ou seja, ele necessita estar presente em mais cópias no genoma do embrião para se expressar. Assim sendo, gametas haploides seriam letais e não conseguiriam expressar a apomixia, já os poliploides, por conterem mais cópias deste gene, poderia expressá-lo de maneira efetiva (MARTÍNEZ et al., 2001; GRIMANELLI et al., 2001; MARTÍNEZ et al., 2007). Em *Paspalum notatum*, por exemplo, uma simples duplicação cromossômica de plantas diploides produz autotetraploides apomíticos, indicando que os alelos para a apomixia estão presentes

nos diploides, e que sua expressão é dependente da ploidia. Para corroborar esta forte relação entre poliploidia e apomixia, Quarin et al. (2001) poliploidizaram, com o auxílio de colchicina, plantas diploides sexuais de *P. notatum* nativas de Cayastá, Argentina. Como principal resultado, os autores conseguiram três plantas duplicadas (tetraploides), sendo que duas exibiram o modo de reprodução apomítica facultativa e uma planta permaneceu sendo sexual. Os autores concluíram que o gene da apomixia pode estar presente em plantas diploides mas, pelo fato da dosagem do alelo ser baixa, ele não consegue se expressar. Assim sendo, o processo de poliploidização fez com que essas plantas expressas sem o gene da aposporia, por este estar presente em maior dose.

Outro ponto a ser considerado é a questão do balanço do endosperma (EBN – *Endosperm Balance Number*). Nesta teoria proposta por Johnston et al. (1980), cada espécie possui uma ploidia efetiva específica do genoma, que deve estar em uma proporção materna e paterna de 2:1 respectivamente, assegurando-se assim a formação normal do endosperma. Qualquer valor que desvie desta proporção pode ser letal, fazendo com que o endosperma não se desenvolva. No entanto, em plantas apomíticas pseudogâmicas, diferentes mecanismos podem ter contornado essa sensibilidade ao desbalanço do endosperma formando assim sementes viáveis, uma vez que a fertilização de dois núcleos polares não reduzidos juntos ($2n + 2n$) por um núcleo espermático (n) produz uma relação de 4:1 materna a paterna (m:p) (GRIMANELLI et al. 1997). Pela técnica de citometria de fluxo, o acesso BGP 272 de *P. rojasii* apresentou o conteúdo de DNA do endosperma de $3C = (1C \text{ maternal} + 1C \text{ maternal} + 1C \text{ paternal})$, sendo concordante com o que ocorre no mecanismo sexual normal. Já os acessos classificados como apomíticos exibiram endosperma com conteúdo de DNA $5C = (2C \text{ maternal} + 2C \text{ maternal} + 1C \text{ paternal})$. No gênero *Paspalum*, plantas apomíticas carregam dois núcleos polares não reduzidos em seus sacos embrionários (BURSON e BENNETT 1970; NORRMANN et al. 1989). Assim, como é ressaltado por Grimanelli et al. (1997) e Quarin et al. (1999), o saco embrionário em *Paspalum* difere do tipo morfológico *Panicum*, e o endosperma teria uma proporção de genoma materno-paterno de 4:1. Neste sentido, Quarin et al. (1999) estudaram o efeito de diferentes fontes de grãos de pólen com diferentes níveis de ploidiana formação dos endospermas e produção de sementes em genótipos tetraploides apospóricos de *Paspalum notatum* ($2n = 4x = 40$). Cada inflorescência foi polinizada uma única vez com grãos de pólen pertencentes à mesma espécie que partiram desde o nível de ploidia $2x$ a $8x$, grãos de pólen $3x$ e $4x$ de *P. cromyorrhizon* e grãos de pólen $2x$ e $4x$ pertencentes à espécie *P. simplex*. Neste estudo, os autores verificaram que o endosperma em *P. notatum* apomítico $4x$ é pseudogâmico e é formado independentemente

tanto pelo nível de ploidia do polinizador como também pela espécie que o pertence, levando a formação de sementes viáveis. As taxas de germinação de sementes foram significativamente menores quando o doador de pólen foi 3x de *P. cromyorrhizon* ou 2x e 4x de *P. simplex*. Sacos embrionários apospóricos em *Paspalum* contribuem para a formação do endosperma com dois núcleos polares não reduzidos (2n), enquanto a contribuição masculina é a mesma que em plantas sexuais (n). Assim deve existir um *imprinting* no endosperma em plantas apomíticas onde a formação de sementes é viável ocorrendo uma insensibilidade ao EBN.

Em relação ao acesso BGP 272 de *P. rojasii*, caracterizado pela técnica de citometria como sexual, nosso estudo revelou um resultado promissor, uma vez que este acesso poderá ser utilizado como genitor feminino em hibridações envolvendo um genitor masculino apomítico doador de pólen dentro do programa de melhoramento genético de *Paspalum*. Neste sentido, seria necessário realizar a duplicação cromossômica (por meio do uso de colchicina) do acesso sexual 2x, para a ocorrência de correto pareamento meiótico em hibridações em nível tetraploide. O cruzamento iria formar uma população de plantas F₁ segregante para o modo de reprodução e plantas apomíticas oriundas deste cruzamento poderiam ser lançadas como cultivares apomíticas caso forem consideradas genótipos elite. Além do acesso sexual BGP 272 de *P. rojasii*, foram encontrados outros dois acessos sexuais (BGP 281 de *P. lenticulare* e BGP 380 de *P. compressifolium*) pela análise citoembriológica. Assim sendo, também podem ser utilizados como genitores femininos em programas de melhoramento genético cruzados com um genitor masculino apomítico.

Apesar do nível diplóide nas espécies de *Paspalum* apresentarem o mecanismo de reprodução sexual, são relatadas várias espécies poliploides sexuais, destacando assim uma variedade citotípica e reprodutiva, como é o caso das espécies: *P. conspersum* com 60 cromossomos (QUARIN e HANNA, 1980b; GALDEANO et al., 2016); *P. dasypleurum* com 40 cromossomos (QUARÍN E CAPONIO, 1995; GALDEANO et al., 2016); *P. densum* com 40 cromossomos (GALDEANO et al., 2016); *Paspalum dilatatum* biótipo Virasoro com 40 cromossomos (CAPONIO E QUARÍN, 1987; GALDEANO et al., 2016); *P. ionanthum* com 40 cromossomos (QUARÍN e NORMANN, 1987; GALDEANO et al., 2016); *P. regnellii* com 40 cromossomos (NORMANN, 1981; GALDEANO et al., 2016); *P. urvillei* com 40 cromossomos (BROWN e EMERY, 1958; GALDEANO et al., 2016) e *P. virgatum* com 40 cromossomos (BURSON e QUARÍN, 1982; GALDEANO et al., 2016).

Um resumo dos resultados por espécie caracterizada neste trabalho é apresentado na Tabela 9. As espécies *P. plicatulum* e *P. lenticulare* apresentaram o maior número de acessos

caracterizados de todo o trabalho, totalizando 39 e 21 acessos, respectivamente. Além disso, estas duas espécies exibiram acessos com modo reprodutivo tanto pelo mecanismo altamente apomítico (15 acessos para *P. plicatulum* e oito para *P. lenticulare*) quanto pelo mecanismo apomítico facultativo (24 acessos para *P. plicatulum* e 13 para *P. lenticulare*). Galdeano et al. (2016) também relataram níveis variados de apomixia para os acessos pertencentes a estas espécies, entretanto acessos sexuais também foram encontrados para as espécies *P. lenticulare* e *P. plicatulum*.

Tabela 9 – Modo de reprodução agrupados por espécie e número de acessos analisados pela técnica de citometria de fluxo oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste

Espécie	Nº de acessos com modo reprodutivo			Total de acessos por espécie	Referências
	AA	AF	S		
<i>P. atratum</i>	5	12	-	17	1 acesso APO (Quarín et al. 1997; Galdeano et al. 2016)
<i>P. compressifolium</i>	4	14	1	19	2 APO e 1 SEX (Quarín et al. 1996)
<i>P. guenoarum</i>	10	4	-	14	1 APO (Espinoza et al. 2001; Galdeano et al. 2016)
<i>P. lenticulare</i>	8	13	1	22	1 SEX (Quarín et al. 1997; Espinoza et al. 2001; Galdeano et al. (2016) e 3 APO (Espinoza et al. 2001; Galdeano et al. 2016)
<i>P. leptan</i>	2	3	-	5	1 APO - Sin. <i>P. nicorae</i> (Sartor et al. 2011)
<i>P. oteroi</i>	1	2	-	3	1 AF (Galdeano et al. 2016)
<i>P. plicatulum</i>	15	24	-	39	1 SEX (Espinoza et al. 2001) e 1 APO (Burson, 1997)
<i>P. rhodopedum</i>	3	9	-	12	Atual trabalho, resultado inovador
<i>P. rojasii</i>	1	4	1	6	1 APO (Galdeano et al. 2016) 1 SEX (Pozzobon, 2008; Galdeano et al. 2016)
Total	49	85	1	137	

Legenda: AA: altamente apomítico, AF: apomítico facultativo, S: sexual

Fonte: Autor

Para estas espécies, Galdeano et al. (2016) coletaram dois acessos diplóides sexuais, identificados como N188 e HONFI14 e pertencentes a *P. lenticulare* e *P. plicatulum*, respectivamente. O local de coleta do acesso N188 foi o Paraguai, a 50 km ao Nordeste da cidade de Concepción, em uma estrada indo para Paso Barreto (ESPINOZA et al., 2001). Já HONFI14 foi coletado na Argentina, em Misiones, Candelaria (ESPINOZA E QUARÍN,

1997). Os acessos sexuais identificados em nosso estudo, como sendo BGP 281 *P. lenticulare*, BGP 272 *P. rojasii* e BGP 380 de *P. compressifolium*, foram coletados nos municípios de Anastácio, MS, Dois Irmãos do Buriti, MS, e o acesso BGP 380 possui origem desconhecida. Assim, estes acessos não devem possuir a mesma origem dos acessos sexuais relatados no trabalho de Galdeano et al. (2016), não havendo relação entre eles. No mundo, o gênero *Paspalum* ocorre amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (Zuloaga e Morrone, 2005). No Brasil, o gênero *Paspalum* possui mais de 220 espécies (Valls e Pozzobon, 1987) e muitas espécies se distribuem de maneira bem heterogênea, populando desde a Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (FLORA, 2020). Para as espécies dos acessos sexuais encontrados no nosso trabalho, *P. compressifolium* ocorre nos domínios do Cerrado, Mata Atlântica e Pampa, *P. rojasii* ocorre na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, já para a espécie de *P. lenticulare*, ocorre em grande prevalência mostrando-se presente em todas as regiões brasileiras.

No nosso estudo, para a espécie de *P. rhodopedum*, foi obtido o primeiro registro do modo de reprodução por meio da técnica de citometria de fluxo, com base em 12 acessos, sendo assim o nosso trabalho inova ao caracterizar acessos para esta espécie. Já entre as espécies com menor número de acessos caracterizados, podem ser destacadas as espécies *P. rojasii*, *P. leptum* e *P. oteroi* com 6, 5 e 3 acessos, respectivamente. O acesso BGP 272 de *P. rojasii* foi exclusivamente sexual.

No que tange ao mecanismo de apomixia facultativa, um total 85 acessos caracterizados (62,96%) apresentaram este mecanismo de reprodução. Pela Tabela 7, os acessos apomíticos facultativos com a maior porcentagem de sementes sexuais foram BGP 180 (*P. plicatulum*), BGP 221 (*P. rhodopedum*) e BGP 106 (*P. lenticulare*) com 23%. Já o acesso menos expressivo para porcentagem de sexualidade dentro nos apomíticos facultativos foi o BGP 307, de *P. atratum*, com 1,56%. A apomixia facultativa é definida pela capacidade da planta desenvolver vias meióticas e apomíticas simultaneamente (HOJSGAARD et al. 2013). Assim sendo, as taxas de apomixia e sexualidade podem variar na planta, e esta variação pode estar relacionada ao ambiente. Fatores ambientais associados ao fotoperíodo durante o desenvolvimento da inflorescência, intensidade da luz, níveis de nutrientes, temperatura níveis de fertilidade do solo e até mesmo a época do florescimento em que a inflorescência é coletada para a análise podem acarretar grandes alterações na frequência de embriões sexuais ou apomíticos em uma população de plantas (QUARÍN, 1986; KOLTUNOW, 1993; RIOS et al., 2013; RODRIGO et al., 2017). Quarín (1986) ressaltou que a variação entre sexualidade e apomixia em indivíduos apomíticos facultativos possui um

importante significado agrônômico, ou seja, a variabilidade nas progênes depende do momento da colheita, favorecendo a seleção de novos genótipos (sendo estes apomíticos ou sexuais). Ao colher sementes formadas sob as melhores condições para o crescimento e floração, estas teriam maior capacidade de serem apomíticas, por outro lado, ao colher sementes sob condições de estresse elas teriam maior chance de serem sexuais.

Em cultivares da espécie *Eragrostis curvula* (capim-chorão), Rodrigo et al. (2017) verificaram a influência de fatores ambientais na expressão da aposporia e sexualidade. A cultivar apomítica facultativa Tanganyika INTA, que em condições normais mostrou apenas 2% de sexualidade, foi exposta a diferentes condições de estresse. Como resultado, os autores verificaram uma expressiva formação de sacos embrionários sexuais demonstrando um aumento da expressão da sexualidade em comparação com as plantas controle. Já quando uma planta altamente apomítica, como é o caso da cv. Tanganyika USDA, foi exposta a diferentes condições de estresse, não demonstrou a capacidade de gerar sacos embrionários sexuais sob quaisquer condições e é, portanto, classificada como uma cultivar totalmente apomítica. Desta forma estes resultados demonstram que diferentes condições de estresse podem alterar a expressão da reprodução sexual em cultivares apomíticos tetraplóides facultativos e quando o estresse cessa, o modo reprodutivo volta ao nível original da apomixia.

Outro ponto a ser considerado sobre a expressão da aposporia ou sexualidade em plantas apomíticas facultativas é o seu ciclo de florescimento. Rebozzio et al. (2011), ao estudarem a variação da sexualidade em apomíticos facultativos de *P. notatum*, verificaram que no período máximo de floração houve grande produção de sementes apomíticas, enquanto que no final do florescimento ocorreu decréscimo da formação de sementes apospóricas e aumento significativo na produção de sementes sexuais. Outra espécie pertencente ao gênero *Paspalum* e geneticamente próxima de *P. notatum*, a espécie de *P. cromyorrhizon*, apresentou variação no grau de expressão apomítica correlacionada com diferentes estágios de floração. Naquele estudo os autores verificaram produção máxima de sementes apomíticas no pico de florescimento da planta (QUARIN, 1986). Resultado similar foi alcançado por Rios et al. (2013) ao analisarem a variação da apomixia e sexualidade em cinco genótipos apomíticos facultativos de *P. notatum* e dois híbridos altamente apomíticos quanto a época de florescimento. Além disso, foi estudado se níveis de adubação nitrogenada influenciavam o índice de aposporia. Esses autores verificaram que os cinco genótipos se comportavam como apomíticos facultativos, variando a taxa de aposporia ao longo da época de floração. Assim, o potencial para a aposporia aumentou à medida que as plantas atingiram seu pico de floração (verão), o potencial de reprodução sexual aumentou na primavera e no outono. Já para os dois

híbridos altamente apomíticos, o potencial da aposporia foi consistente durante toda a época de florescimento. O índice variável de nitrogênio no solo não teve efeito na variação de apomixia ou sexualidade nas plantas estudadas.

Pelos resultados aqui expostos, a técnica FCSS mostrou-se como uma ferramenta rápida e eficaz na caracterização do modo de reprodução dos acessos analisados. Segundo Matzk et al. (2007), esta metodologia para caracterização do modo de reprodução parte do princípio da utilização de sementes maduras em vez de tecidos frescos. As células de sementes maduras (secas) estão metabolicamente inativas. A redução das atividades enzimáticas pode resultar em maior estabilidade do DNA durante o isolamento, coloração e armazenamento dos núcleos. Por esse motivo, para a maioria dos acessos aqui caracterizados, houve a presença de picos nos histogramas bem delimitados e com grande amplitude principalmente para os picos do embrião que possui maior número de células quando comparado ao do endosperma que se apresenta com menor amplitude. Quarín (1999) relatou que esta ferramenta possui grande aplicação na detecção do modo de reprodução em *Paspalum*, uma vez que é baseada na diferença entre o conteúdo relativo de DNA entre embrião e o endosperma de sementes sexuais e apomíticas. Assim, a técnica de citometria de fluxo por seleção de sementes (FCSS) não é aplicável se o embrião e o endosperma apresentarem a mesma ploidia (MATZK et al., 2007).

Dentro do gênero *Paspalum* é possível a caracterização do modo reprodutivo por meio da técnica de citometria uma vez que as espécies possuem distinção entre o número de núcleos polares e oosfera (2 núcleos polares para 1 oosfera). A alta frequência de dois núcleos polares por saco embrionário em contraste com a oosfera leva à correta distinção entre o conteúdo de DNA do embrião e do endosperma em relação aos indivíduos sexuais e apomíticos. Plantas apomíticas com frequente ocorrência de um único núcleo polar por saco embrionário, como ocorre em gramíneas como as braquiárias (NAUMOVA et al., 1999) e o capim-chorão (MEIER et al., 2011), podem ser erroneamente classificadas como sexuais.

Outro ponto a ser ressaltado é a importância da preparação das sementes para o estudo do modo de reprodução aplicado na técnica da FCSS. O material a ser analisado (cariopses) deve ser muito bem processado por meio de um tampão específico. O tratamento das cariopses com este tampão de isolamento, além de liberarem os núcleos do citoplasma em quantidades suficientes, também devem manter a integridade nuclear durante todo o experimento e proteger o DNA da degradação por endonucleases (GREILHUBER et al., 2007).

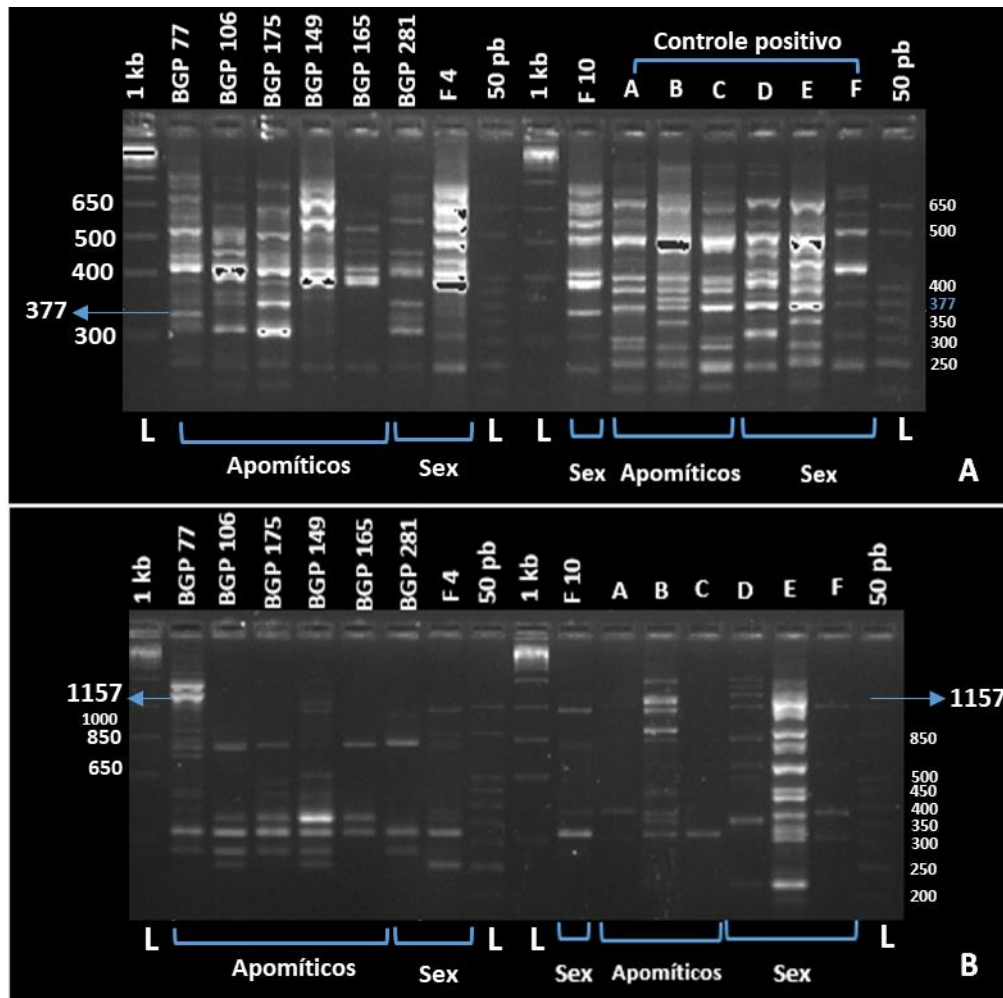
6.3 BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES RAPD, SCAR e p779/780 ASSOCIADOS À APOMIXIA NO GRUPO PLICATULA

Como principal resultado, os dois marcadores moleculares RAPD utilizados na genotipagem (BCU 243 e BCU 259) não apresentaram ligação com a aposporia. Na Figura 14 A está disposto o perfil de amplificação do marcador BCU 243, o qual possui banda de interesse de 377 pb e, na Figura 14 B, está representado o perfil de amplificação do marcador BCU 259, possuindo banda de amplificação de interesse de 1.157 pb. Assim, os resultados encontrados nos géis RAPD evidenciaram que, para estes fragmentos esperados, ocorreu a amplificação dos marcadores tanto em alguns acessos apomíticos como também nos sexuais, não havendo ligação com a apomixia. O resultado ideal para associação dos marcadores ligados a este caráter seria a amplificação destas bandas de interesse apenas nos indivíduos apomíticos, e ausentes nos acessos sexuais.

As amostras analisadas como testemunhas A-F, pertencentes a *P. notatum*, apresentaram bandas amplificadas para a região de interesse de ambos os marcadores, mostrando o sucesso na reação de PCR. O marcador BCU 243 amplificou sua banda de interesse de 377 pb em todos os indivíduos, no entanto, o marcador BCU 259 amplifica sua banda de interesse de 1157 pb nos indivíduos B, D e E, sendo caracterizados reprodutivamente como apomítico, sexual e sexual. Assim, tanto nas testemunhas incuídas de *P. notatum* como também nos acessos pertencentes ao grupo Plicatula, os marcadores RAPD não se apresentaram ligados ao caráter aposporia.

Em relação aos marcadores moleculares SCAR amplificados, nenhum dos 19 marcadores apresentou ligação com o traço da apomixia nos genótipos avaliados neste trabalho. Para a maioria dos marcadores SCAR, não ocorreu amplificação de bandas para os acessos do grupo Plicatula analisados, embora, para os marcadores Psapo7589-149, Psapow5, Psapo6792-234, Psapo7687-191, Psapo6687-194 e Psapo7579-106 houve a amplificação em, pelo menos, um acesso (sexuais e/ou apomíticos). O acesso BGP 42, que foi incluído como controle positivo, apresentou amplificação do fragmento do tamanho esperado em todos os marcadores, com exceção do marcador SCAR Psapo6989-94. Esse resultado está de acordo com o esperado, uma vez que estes marcadores foram desenvolvidos para esta espécie (*P. simplex*).

Figura 14 – Perfil de amplificação dos marcadores RAPD avaliados em gel de agarose a 2%.



Legenda: Perfil de amplificação do marcador RAPD BCU 243 com fragmento de 377 pb indicado (A) e do marcador RAPD BCU 259 com fragmento de 1157 pb indicado (B) em gel de agarose. L = Ladders utilizados de 50 pb Ludwig e 1Kb Plus Invitrogen. Controles positivos: *P. notatum* apomíticos: (A, B e C); *P. notatum* sexual: (D, E e F).

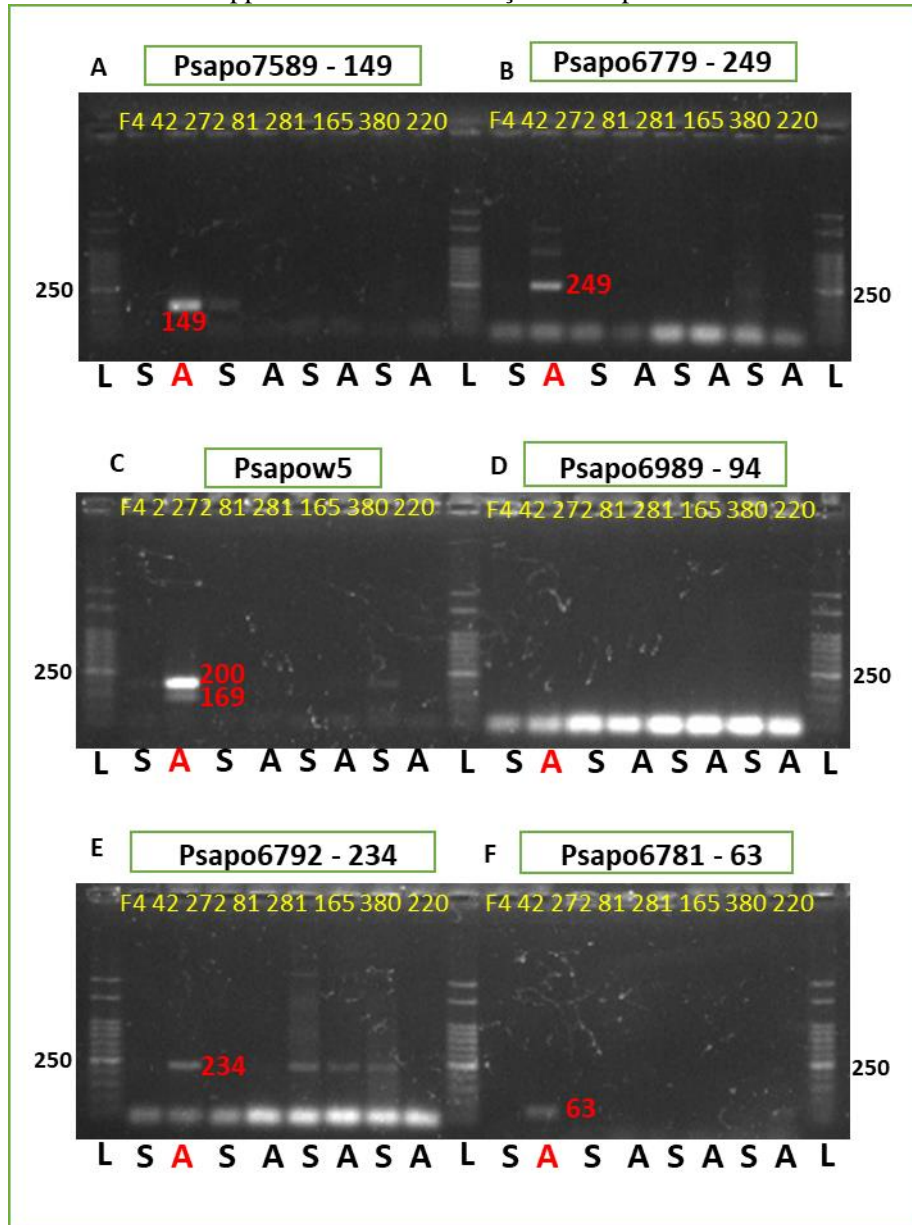
Fonte: Autor

Vale a pena ressaltarmos que o marcador molecular Psapo6989-94 não amplificou em nenhuma amostra. Na Figura 15 encontram-se o perfil de amplificação de alguns marcadores SCAR genotipados.

Uma das hipóteses para a não ligação dos marcadores RAPD e SCAR utilizados na genotipagem da apomixia pode estar relacionada à especificidade dos marcadores utilizados devido a uma diferença na sequência de DNA da região que controla a aposporia. Martínez et al. (2007) e Calderini et al. (2011) desenvolveram os marcadores RAPD e SCAR, respectivamente, para as espécies *P. notatum* e *P. simplex*. Pupilli et al. (2004) relataram que a região que controla a aposporia (ACR) em três espécies de *Paspalum* (*P. notatum*, *P.*

simplex, e *P. malacophyllum*) é conservada e apresenta grande sintonia com o braço longo do cromossomo 12 em arroz.

Figura 15– Seis marcadores SCAR (A a F) genotipados em agarose a 2,5% nos acessos de *Paspalum* spp. na busca de associação com apomixia.



Legenda: L: Ladder de 50 pb Ludwig. S= Sexual, A = Apomítico. Os nomes dos acessos estão em amarelo. O controle positivo está indicado como A vermelho na imagem e corresponde ao acesso BGP 42 de *P. simplex*. O tamanho esperado de banda em pb para cada marcador está indicado em vermelho.

Fonte: Autor

Nas espécies do grupo *Plicatula* aqui utilizadas (*P. lenticulare* e *P. compressifolium*), a região que controla a aposporia pode conter uma sequência genética diferente das espécies estudadas na literatura. Isso pode estar relacionado a uma distância filogenética entre as espécies analisadas e em relação as espécies para as quais os marcadores foram

desenvolvidos. As espécies do presente trabalho pertencem ao grupo Plicatula (subgênero *Paspalum*) e estão no clado NPBT da árvore filogenética (RUA et al., 2010). A espécie *P. notatum* (grupo Notata, subgênero *Paspalum*) está no mesmo clado, embora em um outro nó distante e *P. simplex* está localizada no clado CQPA, e inclusive pertence a um outro subgênero, *Anachyris* (RUA et al. 2010). Desta maneira, a sequência genética que codifica a aposporia entre essas espécies pode ser diferente, não ocorrendo homologia entre elas e, por conseguinte, impossibilitando a amplificação da região.

Martínez et al. (2003), ao desenvolverem os marcadores RAPD completamente ligados ao traço da aposporia, detinham uma população de cruzamento segregando para o modo de reprodução. Nesta abordagem, os autores cruzaram uma planta tetraplóide sexual com um doador de pólen apomítico de *P. notatum* e obtiveram uma progênie F₁ de 290 indivíduos que foram caracterizados reprodutivamente por meio de análises citoembriológicas. Assim, neste estudo os autores detinham uma população de estudo estruturada. Uma abordagem com uma população de cruzamento, segregando para o modo reprodutivo, poderia ter mostrado resultados satisfatórios quanto à verificação de ligação dos marcadores RAPD como também os SCAR para a aposporia. Em relação aos marcadores SCAR desenvolvidos na espécie *P. simplex* por Calderini et al. (2011), foi utilizada a metodologia baseada na clonagem molecular de fragmentos de BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) potencialmente ligados a aposporia, além da abordagem de mapeamento genético. Estas ferramentas demandam uma população desenvolvida especificamente para tal e um grande aporte financeiro, os quais estavam indisponíveis no momento da realização deste trabalho.

No nosso estudo, além, da ausência de população biparental (cruzamentos), a busca de associação com a apomixia ocorreu com a inclusão de genótipos apomíticos facultativos. Outro ponto crítico, uma vez que o ideal seria ter analisado apenas acessos altamente apomíticos, diminuindo assim a ocorrência de segregação no entanto, no momento de realização das pesquisas não detínhamos disponíveis materiais exclusivamente altamente apomíticos.

É válido ressaltar que houve a identificação de apenas três acessos (BGP 272 de *P. rojasii*, BGP 281 de *P. lenticulare* e BGP 380 de *P. compressifolium*) e quatro híbridos (F4, F10, F37 e F42) sexuais dentro do grupo Plicatula. Assim o nosso número disponível de acessos sexuais para contraste de bulks e procura de marcadores ligados ao traço da apomixia era muito restrito, dificultando ainda mais a validação de possíveis marcas candidatas para com o modo reprodutivo.

No que tange ao marcador molecular p779/780, não ocorreu amplificação com os acessos aqui genotipados pertencentes ao gênero *Paspalum* (grupo informa Plicatula). Assim, o insucesso de amplificação deste marcador pode estar relacionado a espécie para o qual o este foi desenvolvido. Este marcador foi inicialmente desenvolvido para espécies do gênero *Cenchrus* (*C. ciliaris*) e *Penisetum* (*P. squamulatum*) por Akyiama et al. (2011) e foram totalmente ligados a apomixia nestas espécies. No entanto, mais recentemente, Worthington et al. (2016) encontraram ligação com apomixia deste marcador em acessos de *Brachiaria decumbens* (CIAT 606), *B. humidicola* (CIAT 16888) e *B. brizantha* (CIAT 6294/6297) e também para *Panicum maximum* (CIAT 26924).

6.4 BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES SSR ASSOCIADOS A APOMIXIA NO GRUPO PLICATULA:

Foram avaliados 51 marcadores SSR genômicos descritos na literatura, sem ligação à apomixia reportada. Como principal resultado desta análise, nenhum marcador apresentou ligação com a aposporia. Na Tabela 10 podemos observar que 14 marcadores foram monomórficos entre as amostras, 25 marcadores não amplificaram quando foi dado o início da genotipagem e um total de 12 marcadores não apresentaram um padrão de bandas conclusivo em relação à ligação com o modo de reprodução, ou seja, apresentaram bandas tanto nos indivíduos sexuais, como também nos apomíticos. Desta forma, com base na metodologia utilizada, BSA em germoplasma, nenhum dos marcadores está ligado ao modo reprodutivo nos acessos de *Paspalum* avaliados. Na Figura 16 encontram-se os géis de agarose (A) e acrilamida (B) para o marcador Pp-Unicamp20 como exemplo da abordagem adotada.

Tabela 10 – Resultados da amplificação dos marcadores SSR genômicos nos bulks

Marcador	Resultado da caracterização reprodutiva
PA01B7	Sem ligação com modo de reprodução
PP01A5	Monomórfico
PP01D11	Monomórfico
PA02A5	Sem ligação com modo de reprodução
PP01B3	Monomórfico
PA02B1	Monomórfico
PA02B6	Sem ligação com modo de reprodução
PA02C3	Sem ligação com modo de reprodução
PP01F3	Monomórfico
PP02F2	Marcador não amplificou
PA01C1	Marcador não amplificou

Marcador	Resultado da caracterização reprodutiva
PA02F8	Marcador não amplificou
PA02H4	Marcador não amplificou
PA02H9	Sem ligação com modo de reprodução
PP02D2	Marcador não amplificou
PP02D6	Marcador não amplificou
PP02F1	Marcador não amplificou
Pp-Unicamp3	Monomórfico
Pp-Unicamp17	Monomórfico
Pp-Unicamp18	Sem amplificação na região esperada
Pp-Unicamp19	Sem ligação com o modo de reprodução
Pp-Unicamp20	Sem ligação com modo de reprodução
Pp-Unicamp13	Monomórfico
Pp-Unicamp15	Sem ligação com modo de reprodução
Pp-Unicamp21	Sem ligação com modo de reprodução
Pp-Unicamp23	Monomórfico
Pp-Unicamp24	Sem ligação com modo de reprodução
Pp-Unicamp01	Marcador não amplificou
Pp-Unicamp02	Monomórfico
Pp-Unicamp16	Monomórfico
Pp-Unicamp25	Marcador não amplificou
Pp-Unicamp05	Monomórfico
PN02B5B	Marcador não amplificou
PN02B3	Marcador não amplificou
PN03D10	Marcador não amplificou
PN03D12	Marcador não amplificou
PN02G3	Monomórfico
PN03F10	Marcador não amplificou
PN03F3	Marcador não amplificou
PN03F9	Marcador não amplificou
PN03F1	Marcador não amplificou
PN03F7	Monomórfico
PN03A5	Sem ligação com modo de reprodução
PN03A6	Marcador não amplificou
PN03E9	Marcador não amplificou
PN03F2	Marcador não amplificou
PN03G8	Marcador não amplificou
PN03H10	Marcador não amplificou
PN02G10	Marcador não amplificou
PN03E7	Marcador não amplificou
PN03H3	Marcador não amplificou

Fonte: Autor

Na Figura 16 A é apresentado o perfil de amplificação dos bulks em gel de agarose e verificado se está de acordo com o tamanho esperado para o marcador em questão. Para o marcador Pp-Unicamp20, descrito por Oliveira et al. (2016), o tamanho esperado dos fragmentos é entre 144 e 170 pares de bases. Neste gel foram verificadas bandas correspondentes a 150 pb, estando dentro do tamanho esperado deste marcador. Na Figura 16 B é apresentado o perfil de amplificação dos fragmentos em gel de acrilamida, uma vez que a

malha do gel de acrilamida permite uma melhor separação e visualização das bandas. Neste gel, observamos que o Bulk apomítico de *P. lenticulare* apresenta bandas que o sexual não as possui. O acesso sexual BGP 380 de *P. compressifolium* apresentou duas bandas que o bulk apomítico para esta espécie não apresentou, desta forma, os bulks de *P. lenticulare* e de *P. compressifolium* foram abertos para avaliar o marcador em cada genótipo que os compõe de forma individual. Na Figura 16 C está sendo mostrado o gel de agarose de abertura de bulks, no qual é possível observar polimorfismo para os acessos BGP 323, 326 e os híbridos argentinos F4, F10, F37 e F42.

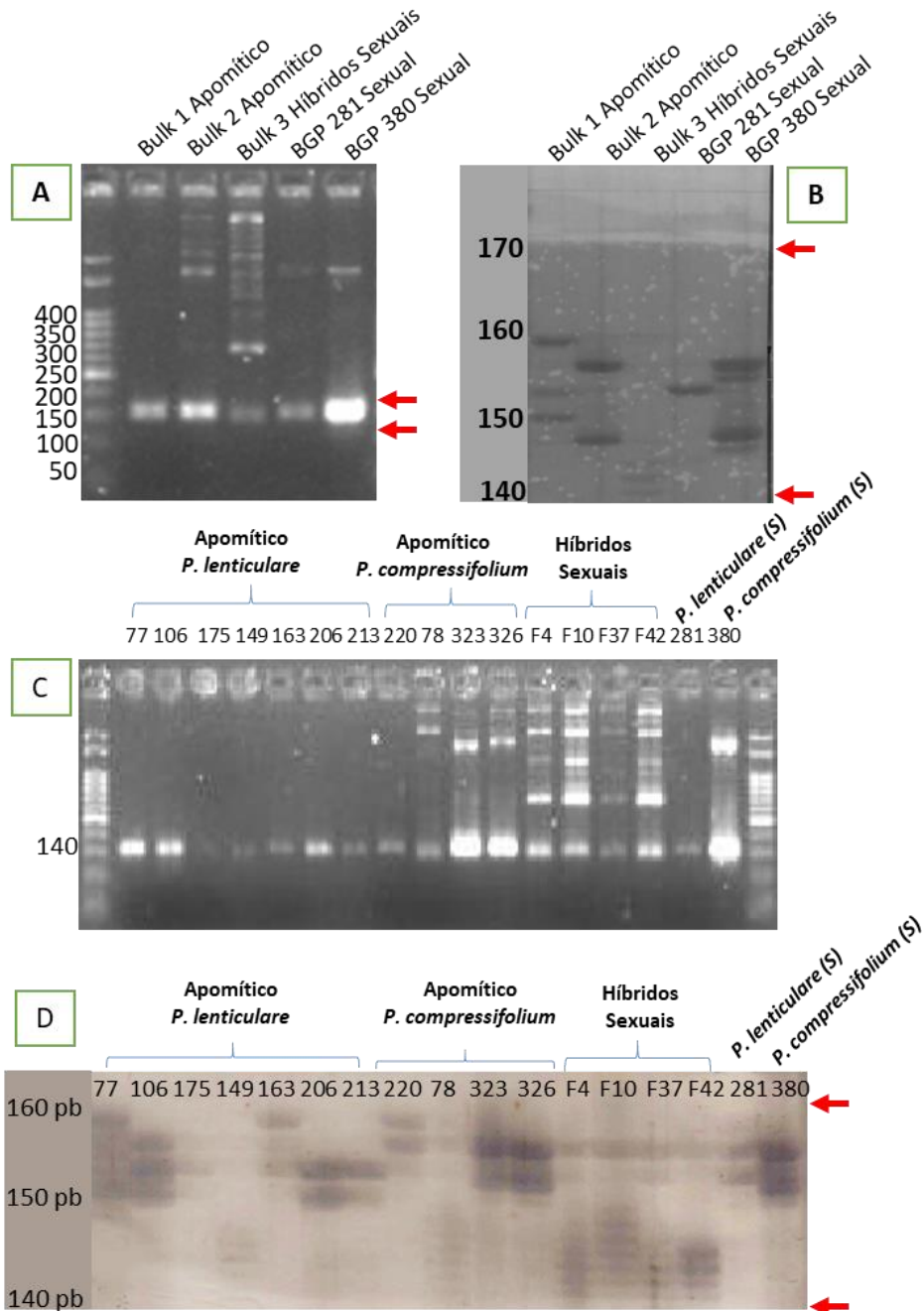
Finalmente, na Figura 16 D, pode ser observado o gel de abertura de bulks em acrilamida desnaturante, onde podemos verificar o comportamento de bandas para cada indivíduo analisado. Podemos notar que muitas bandas estão presentes tanto nos sexuais como nos apomíticos e vice-versa, não ocorrendo assim um padrão de associação com o modo de reprodução. Para todos os outros marcadores avaliados que não apresentaram ligação com modo de reprodução, o comportamento de bandas ao abrir os bulks de acrilamida para os indivíduos do BAG foi semelhante ao marcador Pp-Unicamp20, sendo assim caracterizados com ausência de ligação com modo de reprodução.

Ainda sobre os marcadores sem ligação com modo de reprodução, vale a pena ressaltarmos que o marcador Pp-Unicamp19 com tamanhos de fragmentos de 222 pb a 241 pb apresentou polimorfismo para todos os bulks e o marcador Pp-Unicamp18, que possui tamanho de fragmentos esperados de 222 a 258 pb, não amplificou bandas no local esperado, mas sim nas alturas de 110 a 160 pb. No entanto, ainda sim não apresentaram ligação com o modo de reprodução. Na Figura 17 encontram-se dispostos dois géis de acrilamida de bulks fechados evidenciando estes dois marcadores.

Outros resultados da Tabela 10 chamam a atenção também para os marcadores que não possuíram amplificação, ou seja, um total de 25 marcadores SSR. Estes marcadores foram inicialmente genotipados em uma reação de PCR para corrida eletroforética em agarose, no entanto, ao revelarmos os géis não ocorreu efetiva amplificação. O principal motivo da ausência de amplificação nestes marcadores pode ser devido a especificidade do marcador para as amostras analisadas, uma vez que foram desenvolvidos para outras espécies como *P. atratum*, *P. plicatulum* e *P. notatum*. Por fim, é importante ressaltar que 14 marcadores apresentaram-se monomórficos nas amostras avaliadas (Tabela 10). Segundo Elston et al. (2012) se na população apenas um alelo ocorre em um local ou locus, é aceito que este é monomórfico (uma única forma) ou monoalélico. Assim, se fossem genotipados outros

acessos de *Paspalum* spp. segregando para com o modo reprodutivo (apomíticos e sexuais) poderíamos ter encontrado alelos diferentes com a presença de polimorfismo.

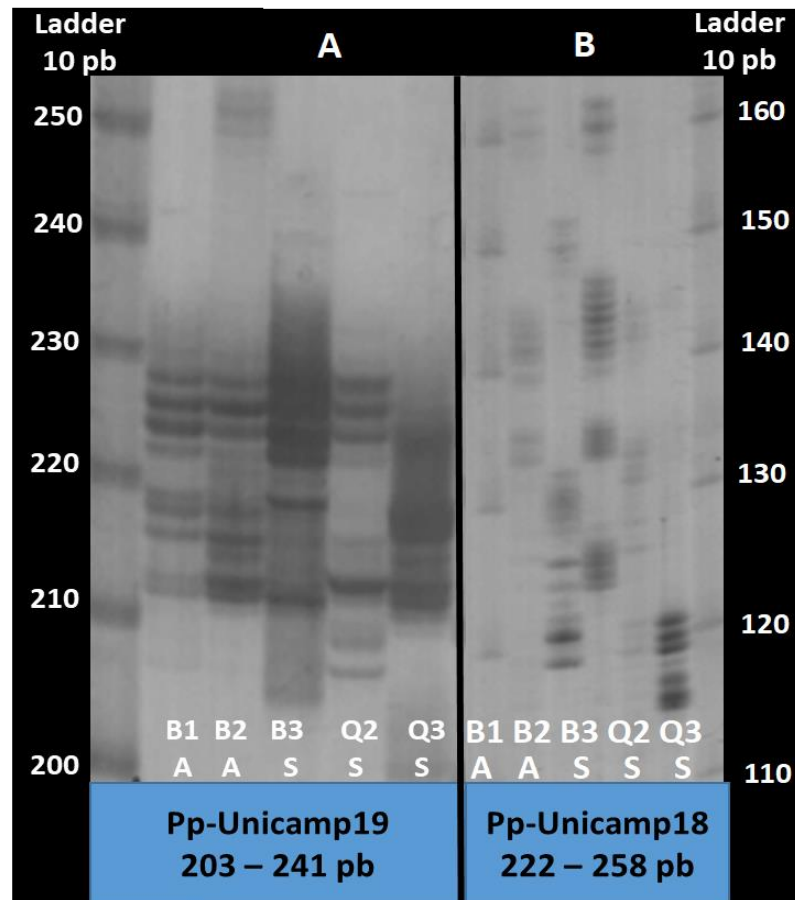
Figura 16 – Busca de associação do marcador SSR Pp-Unicamp20 (144-170 pb) ao modo de reprodução



Legenda: A) Gel de agarose 2% com Bulks fechados; B) Gel de acrilamida 6% com Bulks fechados; C) Gel de agarose 2% com Bulks abertos; D) Gel de acrilamida 6% com os Bulks abertos. B1 = Apomítico de *P. lenticulare*, B2 = Apomítico de *P. compressifolium*, B3 = Híbridos Argentinos sexuais entre *P. guenoarum* x *P. plicatulum*. Géis de agarose possuem Ladder de 50 pb (Ludwig) e, os de acrilamida, 10 pb (Invitrogen). As setas em vermelho indicam a região de amplificação do marcador

Fonte: Autor

Figura 17 – Perfil de amplificação dos marcadores Pp-Unicamp19 (203-241pb) e Pp-Unicamp18 (222-258 pb) em acrilamida 6%.



Legenda: A) bandas polimórficas para todos os bulks, B) Região amplificada pelo marcador PP18 (região amplificada observada de 110 pb a 160 pb), região observada de 110 pb a 160 pb), região observada de 222 a 258 pb. B1 = Bulk apomítico de *P. lenticulare*, B2 = Bulk apomítico de *P. compressifolium*; B3 = Bulk sexual de híbridos argentinos entre *P. plicatulum* x *P. guenoarum*, Q2 = BGP 281 (*P. lenticulare*) sexual, Q3 = BGP 380 (*P. compressifolium*) sexual. A = apomítico, S = sexual. Ladder de 10 pb Invitrogen indicado no gel.

Fonte: Autor

Os marcadores moleculares microssatélites são os mais extensivamente utilizados na genotipagem de plantas nos últimos 20 anos, pois possuem alto grau de informação, são codominantes, multialélicos, com grande reprodutibilidade e transferibilidade entre as espécies (MASON, 2015). Assim sendo, são sensíveis para o estudo de busca de marcas associadas à apomixia, uma vez que este traço em *Paspalum* é controlado geneticamente por um alelo tetrassômico dominante com um efeito letal pleiotrópico com penetrância incompleta (ORTIZ et al., 2013). No entanto, não conseguimos associação com apomixia nos marcadores genotipados para os microssatélites descritos anteriormente em espécies de *Paspalum* desenvolvidos por Cidade et al. (2009; 2010; 2013) e Oliveira et al. (2016).

A dificuldade em encontrar associação da apomixia com estes marcadores SSR genotipados já era esperada, uma vez que são marcadores genômicos com distribuição desconhecida no genoma, e sua ligação com a região que controla a aposporia em *Paspalum* (ACR) seria pouco provável. Assim, a busca de marcadores associados à apomixia pode demandar a aplicação de outras tecnologias de análise como, por exemplo, a construção de um mapa genético saturado. Neste exemplo podemos citar o trabalho de Worthington et al. (2019) que utilizaram a metodologia de mapeamento genético para construção de um mapa denso para a espécie de *Brachiaria humidicola*. Neste estudo, os autores cruzaram um genitor feminino sexual (CIAT 26146) com um doador de pólen apomítico (CIAT 16888), sendo ambos poliplóides com 36 cromossomos. Desse cruzamento, foi obtida uma progênie de 102 indivíduos na F₁ segregando para o modo de reprodução. Desse total, 77 híbridos foram caracterizados reprodutivamente, dos quais 37 foram sexuais e 40 apomíticos. A partir da F₁, os autores desenvolveram marcadores moleculares para construção de um mapa genético tanto do genitor masculino quanto feminino. Marcadores SNPs foram utilizados para atribuir grupos de ligação entre *B. humidicola* e o milheto (*Setaria italica*). Os autores verificaram que os cromossomos 3, 5 e 6 de *B. humidicola* foram altamente colineares com os cromossomos 3, 8 e 9 do milheto, respectivamente. No entanto, três pares de cromossomos de milheto foram fundidos em *B. humidicola*. Já a região mapeada da ASGR em *B. humidicola* deteve uma região sintênica entre os cromossomos 1 e 7 de *S. italica*. Por fim, os autores também verificaram grande ligação entre as regiões que codificam para com a aposporia nas espécies de *B. decumbens*, *B. humidicola* e *P. squamulatum* e o par de marcador p779/p780 desenvolvidos a partir de seqüências gênicas ligadas a aposporia na espécie de *Penisetum squamulatum* (psASGR–BBML). Assim, os autores indicam que, provavelmente a apomixia evoluiu como um único evento e se espalhou para outras espécies através de hibridização ou diversificação filogenética. O advento da genômica comparativa com a utilização de clones de BACs ligados à região da ACR também apoiam a origem comum da apomixia na tribo Paniceae também para as espécies do gênero *Cenchrus* e *Penisetum*. (CONNER et al., 2008).

Assim sendo, além da utilização de técnicas de mapeamento genético, sequenciamento de materiais sexuais e apomíticos (genômica comparativa) e a abordagem de construção de bibliotecas de BAC com clones potencialmente ligados a aposporia (OZIAS-AKINS et al., 2003; CALDERINI et al., 2011) também poderiam ter oferecido bons resultados quanto a associação a este traço, no entanto, no desenvolvimento inicial deste estudo não dispunhamos de uma população de mapeamento segregando para o modo de reprodução e nem orçamento para tal abordagem, por isso optamos pelo método BSA.

O método de análise de bulk segregante (BSA) com marcadores moleculares buscando ligação com a aposporia tem sido eficiente em outras gramíneas, como é o caso relatado na literatura em *Tripsacum* (Leblanc et al. 1995), *Brachiaria* (Pessino et al. 1997; 1998; Zorzatto 2008), *Pennisetum ciliare* (Gustine et al. 1997), *Pennisetum squamulatum* (Ozias-Akins et al. 1998), *Poa* (Barcaccia et al. 1998) e *Panicum maximum* (Marques, 2013), pois em todos estes estudos ocorreram a identificação de bandas ligadas a apomixia. No entanto, as associações são mais facilmente encontradas em populações bi-parentais de irmãos completos, o que não dispúnhamos em nosso trabalho. Segundo Chiari et al. (2007), a identificação de marcadores moleculares ligados a este traço pode facilitar sobremaneira o processo de identificação do modo de reprodução, permitindo discriminar de forma precisa e precoce, ainda nos estágios iniciais de desenvolvimento das plantas, se as mesmas são apomíticas ou sexuais, além de reduzir os gastos.

A metodologia e o material disponíveis para a busca de marcadores moleculares ligados a aposporia, utilizando a técnica de BSA em acessos do germoplasma, é uma abordagem válida, porém, não resultou em marcadores associados à apomixia. Assim, vale a pena ressaltarmos que se não fosse utilizada esta abordagem, teríamos gasto uma grande quantidade de reagentes e tempo, testando os marcadores em um número muito maior de acessos. Assim, os bulks, montados com um número muito menor de acessos segregando para o modo de reprodução nas espécies, só eram abertos quando encontrado algum padrão de interesse. Os que foram monomórficos já eram descartados, economizando reagente e tempo.

7. CONCLUSÕES

- Foram caracterizados o modo reprodutivo de 137 acessos de *Paspalum*, sendo 85 acessos apomíticos facultativos, 49 acessos altamente apomíticos e três acessos sexuais (BGP 272 – *P. rojasii*, BGP 281- *P. lenticulare* BGP 380 de *P. compressifolium*); ocorrendo assim uma destacada variação genético-reprodutiva com predominância do modo apomítico de reprodução;
- Ocorreu correspondência entre o nível de ploidia e o modo de reprodução dos acessos, ou seja, os diplóides foram sexuais e os tetraplóides foram apomíticos, como esperado;
- Nenhum dos 73 marcadores moleculares utilizados (1 p779/780; 2 RAPD; 19 SCAR e 51 SSR) apresentou ligação com a apomixia usando abordagem BSA em germoplasma disponível.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, os resultados oriundos deste trabalho poderão servir como base para seleção de genitores em programas de melhoramento de *Paspalum*. Os acessos aqui caracterizados como sexuais, BGP 272 de *P. rojasii*, BGP 281 de *P. lenticulare* e BGP 380 de *P. compressifolium* poderão ser tetraploidizados utilizando-se a metodologia de duplicação de DNA por meio de colchicina e posterior uso como genitores femininos cruzados com pais apomíticos tetraploides doadores de pólen. Além desta aplicação promissora, poderão ser implementadas a construção de população de mapeamento a partir de cruzamentos a depender também de processos de poliploidização dos materiais aqui caracterizados reprodutivamente.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, C.A.; MARTÍNEZ, E.J.; QUARIN, C.L. Apospory followed by sterility in a hypotriploid hybrid (2x X 4x) of *Paspalum*. **Caryologia**, v. 57, n. 4, p. 373-378, 2004.

ACUÑA, C.A.; BLOUNT, A.R.; QUESENBERRY, K.H.; KENWORTHY, K.E.; HANNA, W. W. Tetraploid bahiagrass hybrids: breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids. **Euphytica**, v. 179, p. 227–235, 2011.

ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; BONATO, A. B. M.; BATISTA, L. A. R.; VALLS, J. F. M. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 773-780, 2005

AGUILERA, P.M.; GALDEANO, F.; QUARIN, C.L.; ORTIZ, J.P.A. Inheritance of Aposporous Apomixis in Inter-specific Hybrids Derived from Sexual *Paspalum plicatulum* and Apomictic *Paspalum guenoarum*. **Crop Science**, v. 55, p. 1947-1956, 2015.

AKIYAMA, Y.; CONNER, J.A.; GOEL, S.; MORISHIGE, D.T.; MULLET, J.E.; HANNA, W.W.; OZIAS-AKINS, P. High resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of genomic region associated with apomixis. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1733–1741, 2004.

AKIYAMA, Y.; GOEL, S.; CONNER, J. A.; HANNA, W. W.; YAMADA-AKYIAMA, H.; OZIAS-AKINS, P. Evolution of the apomixis transmitting chromosome in *Pennisetum*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 289, p. 1-16, 2011.

ALELO. **Banco Ativo de Germoplasma de Forrageiras do Sul (BAG ForSul)**.

Disponível em:

<<http://alelobag.cenargen.embrapa.br/AleloConsultas/Passaporte/detalhesBanco.do?idb=358>>

Acesso em: 3 de janeiro de 2019.

ALISCIONI, S.S. Contribución a la filogenia del género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Annal of the Missouri Botanical Garden**, v. 89, p. 504-523, 2002.

ALLEN, C.M.; HALL, D.W.; *Paspalum* L. In: BARKWORTH, M.E.; CAPELS, K.M.; LONG, S.; PIEP, M.B. **Magnoliophyta: Commelinidae (in Part) Poaceae**, Part 2: Flora of North America, New York: New York: Oxford University Press, 2003, p.572–599.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE SEMENTES. **SeedsBrazilianYearbook 2018**. Disponível em:

<http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wpcontent/uploads/2018/10/SEMENTES_2018.pdf>

Acesso em: 13 ago. 2019

ASKER, S.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 298 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES.

BeefREPORT: Perfil da pecuária no Brasil. Disponível em:

<<http://www.abiec.com.br/control/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>> Acesso em

10 de janeiro 2019.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 11, 155–165, 2002.

BARCACCIA, G.; ALBERTINI, E. Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma. **Plant Reproduction**, v. 26, p. 159–179, 2013.

BARKER, N.P.; CLARK, L.G.; DAVIS, J.I.; DUVALL, M.R.; GUALA, G.F.; HSIAO, C.; KELLOGG, E.A.; LINDER, H.P.; MASONGAMER, R.; MATHEWS, S.; SPANGLER R. A phylogeny of the grass family (Poaceae), as inferred from eight character sets. In: JACOBS S.W.L.; EVERETT, J. (eds) **Grasses: systematics and evolution**. (CSIRO: Melbourne), 2000, p.3-7.

BARRETO, I. L. **O Gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul**. 258 f. Tese (Livre Docência em Fitotecnia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1974.

BARRETO, I.L. Las especies de *Paspalum* con dos racimos conjugados en Rio Grande Del Sur (Brasil). **Revista Argentina de Agronomía**, v. 24, p. 89-117. 1957.

BASHAW, E.C. Apomixis and its application in crop improvement. In: FEHR, W.R.; HADLEY, H.H. (eds) **Hybridization of Crop Plants**. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, 1980, pp. 45–63.

BATISTA, L.A.R.; NETO, A.R. **Espécies do Gênero *Paspalum* com potencial forrageiro**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2000. 19p.

BHAT, V.; DIWIVEDI, K.K.; KHURANA, J.P.; SOPORY, S.K. Apomixis: An enigma with potential applications. **Current Science**, v. 89, n. 11, p. 1879-1893, 2005.

BICKNELL, R.A. KOLTUNOW, A.M. Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. **The Plant Cell**, v. 16, p. 228-245, 2004.

BLOUNT, A.R.; ACUNA, C.A.; SINGH, R.J. **Bahiagrass, Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement series: forage crops**, 2009, Boca Raton, FLCRC Press, 81-102p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Sistemas reprodutivos das espécies cultivadas. In: BÓREM, A.; MIRANDA, G. V. (Eds.) **Melhoramento de Plantas**. 4ª ed., Viçosa: UFV, 2005. 525p.

BROWN, W.V.; EMERY, W.H.P. Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 253–263, 1958.

BURSON, B. L.; BENNETT, H.W. Cytology, method of reproduction and fertility of Brunswickgrass, *Paspalum nicorae* Parodi. **Crop Science**, v.10, 184-187, 1970

BURSON, B.L. Apomixis and Sexuality in Some *Paspalum* Species. **Crop Science**, v.37, p.1347-1351, 1997.

BURSON, B.L. Apomixis in *Paspalum*. In: APOMIXIS WORKSHOP, Atlanta. **Proceedings...** Atlanta: US DEPARTMENT OF AGRICULTURE - AGRICULTURE RESEARCH SERVICE, 1992. p. 1-12.

BURSON, B.L. Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. **Botanical Gazette**, v. 152, p. 219-223, 1991.

BURSON, B.L.; QUARÍN, C.L. Cytology of *Paspalum virgatum* and its relationship with *P. intermedium* and *P. jurgensii*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 24, p. 219–226, 1982

BURTON, G.W.; ELGIN, J.H.; MIKSCHE, J.P. Manipulating apomixis in *Paspalum*. In: APOMIXIS WORKSHOP. **Proceedings...** Washington, ARS Research Bulletin, n. 104, 1992, p. 16-19.

BURTON, G.W.; FORBES, I. The genetics and manipulation of obligate apomixis in common Bahia Grass (*Paspalum notatum* Flugge). In: 8th INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS. **Proceedings...** 1960, p. 66–71.

CALDERINI, O.; CHANG, S.B.; JONG, H.; BUSTI, A.; PAOLOCCI, F.; ARCIONI, S.; VRIES, S.; ABMA-HENKENS, M.H.C.; KLEIN LANKHORST, R.M.; DONNISON, I.S.; PUPILLI, F. Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcolinearity with rice. **Theoretical and Applied Genetics**, 112:1179–1191, 2006.

CALDERINI, O.; DONNISON, I.; POLEGRI, L.; PANARA, F.; THOMAS, A.; ARCIONI, S.; PUPILLI, F. Partial isolation of the genomic region linked with apomixis in *Paspalum simplex*. **Molecular Breeding**, v. 28, p. 265–276, 2011.

CAPONIO, I.; QUARÍN, C.L. El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. **Kurtziana**, v. 19, p. 35–45, 1987.

CARÁMBULA, M. *Paspalum dilatatum*: características agronómicas y su rol en las pasturas. **Revista Argentina de Producción Animal**, v. 2, p. 68-94, 2002.

CARMAN, J.G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. **Biological Journal of Linnean Society**, v. 61, 1997, p. 51–94.

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

CARVALHO, B.T.; ZEN, S. A cadeia de Pecuária de Corte no Brasil: evolução e tendência. **Revista iPecege**, v. 3, n. 1, p. 85-99, 2017.

CASLER, M.D.; DUNCAN, R.R. **Turfgrass biology, genetics, and breeding**. Wiley, 2003. 384 p.

CHAO, C.Y. Megasporogenesis and megagametogenesis in *Paspalum commersonii* and *P. longifolium* at two polyploid levels. **Botaniska Notiser**, v. 127, p. 267–275, 1974.

CHASE, A. The North American species of *Paspalum*. **Contributions from the United States National Herbarium**, v, 28, p. 1–310, 1929.

CHIARI, L.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L.; VALLE, C. B.; JUNGSMANN, L. **A biotecnologia nos programas de melhoramento de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2007. p.12. (Documentos 168).

CIDADE, F.W.; SOUZA-CHIES, T.T.; SOUZA, F.H.D.; BATISTA, L.A.R.; DALL'AGNOL, M.; VALLA, J.F.M.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. Microsatellite loci for *Paspalum atratum* (Poaceae) and cross-amplification in other species. **American Journal of Botany**, p. 107-110, 2010.

CIDADE, F.W.; VIGNA, B.B.Z.; SOUZA, F.H.D.; VALLS, J.F.M.; DALL'AGNOL, M.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA-CHIES, T.T.; SOUZA, A.P. Genetic variation in polyploid forage grass: Assessing the molecular genetic variability in the *Paspalum* genus. **BioMedCentral Genetics**, v. 14, n. 50, p. 1-18, 2013.

CLAYTON, W.J.; RENVOIZE, S.A. **Genera Graminum**. Her Majesty's Stationery Office. London, 1986. 389p.

CAVALCANTI, J. J.V. Importância da seleção assistida por marcadores moleculares. In: 12º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2009, Fortaleza. Anais eletrônicos. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/631506/1/RE09165.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2019

CONNER, J.A.; GOEL S.; GUNAWAN, G.; CORDONNIER-PRATT, M.M.; JOHNSON, V.E.; LIANG, C.; WANG, H.; PRATT, L.H.; MULLET, J.E.; DEBARRY, J.; YANG, L.; BENNETZEN, J.L.; KLEIN, P.E.; OZIAS-AKINS, P. Sequence analysis of bacterial artificial chromosome clones from the apospory-specific genomic region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. **Plant Physiology**, v. 147, p. 1396–13411, 2008.

CRANE, C.F.; CARMAN, J.G. Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from Eastern Australia and New Zeland. **American Journal of Botany**, v. 74, p. 477-496, 1987.

CRESTE, S.; TILMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing by silver staining. **Plant Molecular Reporter**, v. 19, p. 299-306, 2001.

DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 127, p. 133, 2005.

DARLINGTON C.D.; WYLIE, A.P. **Chromosome atlas of flowering plants**. George Allen andUnwinLtd., London, UK, 1956, 519p.

DENHAM, S.S. Revisión sistemática del subgénero Harpostachys de *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 92, p. 463-532, 2005.

DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, v. 31, p. 113–120, 1989.

DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**. v. 2, v. 4, 143-154, 1991.

DON, R. H.; COX, P. T.; WAINWRIGHT, B. J.; BAKER, K. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 14, p. 4008, 1991.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

EBINA, M.; NAKAGAWA, H.; YAMAMOTO, T.; ARAYA, H.; TSURUTA, S.; TAKAHARA, M.; NAKAJIMA, K. Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). **Grassland Science**, v.5, p. 71–78, 2005.

ELSTON, R.; SATAGOPAN, J.; SUN, S. Genetic Terminology. **Methods in Molecular Biology**, v. 850, p. 1–9, 2012.

ESPINOZA, F.; QUARÍN, C.L. Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and Sexual Diploid Biotypes of Two Apomictic *Paspalum* Species. **Australian Journal of Botany**, v. 45, p. 871-877, 1997.

ESPINOZA, F.; URBANI, M.H.; MARTÍNEZ, E.J.; QUARÍN, C.L. The breeding system of three *Paspalum* species with forage potential. **Tropical Grasslands**, v. 35, p. 211-217, 2001.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007, 102p.

FERNANDES, F.D.; BARCELLOS, A.O.; ANDRADE, R.P.; BATISTA, L.A.R.; GOMES, A.C.; JÚNIOR, H.L.C. **Qualidade da Forragem do Capim Pojuca em Diferentes Idades de Rebrotação**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 19p. (Documentos, 52).

FLORA DO BRASIL 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB13432>>. Acesso em: 01 Mai. 2019

FLORINDO, T.J.; MEDEIROS, G.I.B.; COSTA, J.S.; RUVIARO, C.F. Competitividade dos principais países exportadores de carne bovina no período de 2002 a 2013. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 12, p. 1-3, 2015.

FONSECA, D.M.; SANTOS, M.E.R.; MARTUSCELLO, J.A. Importância das forrageiras no sistema de produção. In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (Eds.). **Plantas Forrageiras**. Viçosa: UFV, 2011. p. 13-29.

GALDEANO, F.; URBANI, M.H.; SARTOR, M.E.; HONFI, A.I.; ESPINOZA, F.; QUARIN, C.L. Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of *Paspalum*

(Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. **Journal of Plant Research**, v. 10, p. 1-14, 2016.

GALLA, G.; SIENA, L.A.; ORTIZ, J.P.A.; BAUMLEIN, H.; BARCACCIA, H.; PESSINO, C.; BELLUCCI, M.; PUPILLI, F. A portion of the Apomixis Locus of *Paspalum simplex* is Microsyntenic with an Unstable Chromosome segment Highly Conserved Among Poaceae. **Scientific Reports**, v. 9, n. 3271, p.1-12, 2019.

GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Apomixia: um método alternativo para a produção de sementes em plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 6, n. 1, p. 157-170, 2000.

GOEL, S.; CHEN, Z.; CONNER, J.A.; AKIYAMA, Y.; HANNA, W.W.; OZIAS-AKINS, P. Delineation by fluorescence in situ hybridization of a single hemizygous chromosomal region associated with aposporous embryo sacs formation in *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. **Genetics**, v. 163, p. 1069-1082, 2003.

GREILHUBER, J.; TEMSCH, E. M.; LOUREIO, J.C.M. Nuclear DNA Content Measurement. In: DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (Eds) **Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes, and genomes**. Weinheim: Wiley-VCH; 2007. pp. 67–101.

GRIMANELLI, D.; HERNANDEZ, M.; PEROTTI, E. et al. Dosage effects in the endosperm of diplosporous apomictic *Tripsacum* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v.10, p. 279-282, 1997.

GRIMANELLI, D.; LEBLANC, O.; PEROTTI, E.; GROSSNIKLAUS, U. Developmental genetics of gametophytic apomixes, **Trends in Genetics**, v.17, n. 10, p. 597-604, 2001.

GUSTINE, D. L.; SHERWOOD, R. T.; HUFF, D. R. Apospory-Linked Molecular Markers in Buffelgrass. **Crop Science**, v. 37, n. 3, p. 947-951, 1997.

HAND, M.L.; KOLTUNOW, A.M.G. The Genetic Control of Apomixis: Asexual Seed Formation. **Genetics**, v. 197, p. 441–450, 2014.

HANNA, W.W. Use of apomixis in cultivar development. **Advances in Agronomy**, v. 54, p. 333-350, 1995.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of Population Genetics**. Sinauer, Canadá, 1997, 542 p.

HERR, J.M. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. **American Journal of Botany**, v. 58, p. 785-790, 1971.

HITCHCOCK, A.S. **Manual of the Grasses of the United States**. Dover Publications. 2^a ed. 1971. 576p.

HOJSGAARD, D.H.; SCHEGG, E.; VALLS, J.F.M.; MARTÍNEZ, E.; QUARIN, C.L. Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris* (Poaceae). **Flora**, v. 203, p. 535-547, 2008.

HOJSGAARD, D.H.; MARTÍNEZ, E.J.; ACUNA, C.A.; QUARIN, C.L.; PUPILLI, F. A molecular map of the apomixis-control locus in *Paspalum procurrans* and its comparative analysis with other species of *Paspalum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, p. 959–971, 2011.

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.

HOJSGAARD, D.H.; HERBIG, E. Durchflusszytometrie. Anwendung in der Pflanzen-Reproduktionsbiologie. **LABO**, v.3, p. 34-39, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Tabela 3939**: Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2019.

JAIN, S.; BHATIA, G.; BARIK, R.; KUMAR, P.; JAIN, A.; DIXIT, V.K. Antidiabetic activity of *Paspalum scrobiculatum* Linn. in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 325–328, 2010.

JARRET, R.L.; OZIAS-AKINS, P.; PHATAK, S.; NADIMPALLI, R.; DUNCAN, R.; HILIARD, S. DNA contents in *Paspalum* spp. determined by flow cytometry. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v.42, n.3, p.37-242, 1995.

JOHNSTON, S.A.; DEN NIJS T.P.M.; PELOQUIN, S.J. HANNEMAN JR, R.E. The significance of genetic balance to endosperm development in interspecific crosses. **Theoretical Applied Genetics**, v. 57, p. 5–9, 1980.

KARASAWA, M.M.G. **Diversidade Reprodutiva de Plantas**. 1. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009. v.1. 113p.

KILLEN, T.J. The grasses of Chiquitanía, Santa Cruz, Bolivia. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 77, p. 125-201, 1990.

KOLTUNOW, A.M. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell**, v. 5, p. 1425–1437, 1993.

KOLTUNOW, A.M.; BLICKNELL, R.A.; CHAUDHURY, A.M. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiology**, v. 108, p. 345-352, 1995.

KRIZEK, B.A. **Molecular biology of floral organogenesis**. In: THE MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY OF FLOWERING (ed). Brian Jordan, Oxfordshire. CABI Publishing, 2006, p. 100-123.

KRON, P.; SUDA, J.; HUSBAND, B.C. Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 38, p. 847-876, 2007.

KRYCKI, K. C.; SIMIONI, C. Determinação do modo de reprodução de híbridos de *Paspalum notatum* através de análises citoembriológicas. In: XXIV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. **Anais....** Porto Alegre, 2012.

KRYCKI, K. C.; SIMIONI, C.; DALL'AGNOL, M. Cytoembryological evaluation, meiotic behavior and pollen viability of *Paspalum notatum* tetraploidized plants. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, p. 282-288, 2016.

KUMAR, S.; SASHENA, S.; GUPTA, M. 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.

LABOMBARDA, P.; BISTI, A.; CÁCERES, M.E.; QUARIN, C.L.; PUPILLI, F.; ACIONI, S. An AFLP marker tightly linked to apomixis reveals hemizyosity in a portion of the apomixis-controlling locus in *Paspalum simplex*. **Genome**, v. 45, p. 513-519, 2002.

LEBLANC, M.; DUENAS, M.; HERNÁNDEZ, M. BELLO, S. GARCIA, V. BERTHAUD, J.; SAVIDAN, Y. Chromosome doubling in *Tripsacum*: the production of artificial, sexual tetraploid plants. **Plant Breeding**, v. 114, n. 3, 226-230, 1995.

LESHEM, Y.; JOHNSON, C.; SUNDARESAN, V. Pollen tube entry into the synergid cell of *Arabidopsis* is observed at a site distinct from the filiform apparatus. **Plant Reproduction**, v. 26, n. 2, p. 93-99, 2013.

LINNAEUS, C. **Systema Naturae**, ed. 10. Laurentii Salvii, Stockholm, 1759. 846p.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, v. 77, p. 18-29, 2004.

LOUREIRO, J.; TRAVNICEK P.; RAUCHOVÁ, J.; URFUS, T.; VIT, P.; ŠTECH M.; CASTRO, S.; SUDA, J. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. **Preslia**, v. 82, p.3-21, 2010.

LUCIANI, G.; ALTPELER, F.; YACTAYI-CHANG, J.; ZHANG, H.; GALLO, M.; MEAGHER, R.L.; WOFFORD, D. Expression of cry1Fa in Bahiagrass Enhances Resistance to Fall Armyworm, **Crop Science**, v. 47, n. 6, p. 2430-2436, 2007.

MACEDO, M.C.M. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In BARBOSA, R. A (ed.) **Morte de pastos de braquiárias**. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 2006, p. 35.

MACHADO, L.A.Z.; LEMPP, B.; DO VALLE, C.B.; JANK, L.; BATISTA, L. A.R.; POSTIGLIONI, S.R.; RESENDE, R.M.S.; FERNANDES, C.D.; VERZIGNASSI, J.R.; VALENTIM, J.F.; ASSIS, G.M.L.; ANDRADE, C.M.S. Principais espécies forrageiras utilizadas em pastagens para gado de corte. In: PIRES, A.V. (Ed.) **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: Fealq, 2010. p.375-417.

MAEDA, E.; MIYAKE, H. Ultrastructure of Antipodal Cells of Rice (*Oryza sativa*) before Anthesis with Special Reference to Concentric Configuration of Endoplasmic Reticula. **Japanese Journal of Crop Science**. v. 66, n. 3, p. 488-496, 1997.

MARCHI, C.E.; FERNANDES, C.D.; VERZIGNASSI, J.R. **Doenças em plantas forrageiras**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2011, 32p. (Documentos, 187).

MARCON, F.; MARTÍNEZ, E. J.; RODRÍGUEZ, G. R.; ZILLI, A.; BRUGNOLI, E. A.; ACUNA, C. A. Genetic distance and the relationship with heterosis and reproductive behavior in tetraploid bahiagrass hybrids. v. 39, n. 89, p. 1-13, 2019.

MARQUES, A.C.B. **Validação de marcadores moleculares ligados à apomixia em *Panicum maximum* Jacq.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2013. 51 f. (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

MARTÍNEZ, E.J.; URBANI, M.H.; QUARIN, C.L.; ORTIZ, J.P. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. **Hereditas**, v. 135, p. 19-25, 2001.

MARTÍNEZ, E.J.; HOPP, H. E.; STEIN, J.; ORTIZ, J.P.A.; QUARIN, C.L. Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. **Molecular Breeding**, v. 12, n. 312-327, 2003.

MARTÍNEZ, E.J. ACUNA, C.A. HOJSGAARD, D.H. TCACH, M.A. QUARIN, C.L. Segregation for Sexual Seed Production in *Paspalum* as Directed by Male Gametes of Apomictic Triploid Plants. **Annals of Botany**, 100:1239–1247, 2007.

MASON, A.S. SSR Genotyping. In: BATLEY, J. (Ed). **Plant Genotyping**. Springer, New York, NY, 2015, p. 77-89.

MATZK, F. A novel approach to differentiate embryos in the absence of endosperm. Sexual Plant Reproduction. **Heidelberg**, v. 4, p. 88-94, 1991.

MATZK, F. Reproduction mode screening. In: DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (Eds). **Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes, and genomes**. Weinheim: Wiley-VCH; 2007. p. 131–152.

MATZK, F.; MEISTER, A.; SCHUBERT, I. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. **The Plant Journal**, v. 21, p. 97-108, 2000.

MEIER, M.; ZAPPACOSTA, D.; SELVA, J.P.; PESSINO, S.; ECHENIQUE, V. Evaluation of different methods for assessing the reproductive mode of weeping lovegrass plants, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. **Australian Journal of Botany**, v.59, p.253–261, 2011.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELLI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 21: 9828–9832, 1991.

MORRONE, O.; ZULOAGA, F.O.; CARBONÓ, E. Revisión del grupo Racemosa del género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.82, p. 82-116. 1995.

- MORRONE, O.; DENHAM, S.S.; ALISCIONI, S.S.; ZULOAGA, F.O. Revisión de las especies de *Paspalum* (Panicoideae: Paniceae), subgénero *Anachyris*. **Candollea**, v. 55, p. 105-135. 2000.
- MORRONE, O.; AAGENSEN, L.; SCATAGLINI, M.A.; SALARIATO, D.; DENHAM, S.S.; CHEMISQUY, M.A.; SEDE, S.M.; GIUSSANI, L.M.; KELLOG, E.A.; ZULOAGA, F.O. Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. **Cladistics**, v. 28, p. 333–356, 2012.
- MOYANO, M.R.; MOLINA, A.M.; LORA, A.J.; MENDEZ, J. RUEDA, A. Tremorgenic mycotoxicosis caused by *Paspalum paspaloides* (Michx.) Scribner infected by *Claviceps paspali*: a case report. **VeterinarniMedicina**, v. 55, n. 7, p. 336–338, 2010.
- NABINGER, C.; DALL'AGNOL, M. Principais gramíneas nativas do RS: características gerais, distribuição e potencial forrageiro. In: SIMPÓSIO DE FORRAGEIRAS E PRODUÇÃO ANIMAL, 2008, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2008, p.7-54.
- NAKAMURA, A.T.; LONGHI-WAGNER, H.M.; SCATENA, V.L. Desenvolvimento de óvulo, fruto e semente de espécies de Poaceae (Poales). **Revista Brasileira de Botânica**, v.32, n.1, p.165-176, 2009.
- NAUMOVA, T. Apomixis in tropical foddercrops: cytological and functional aspects. **Euphytica**, v. 96, p. 93–99, 1997.
- NAUMOVA, T.; HAYWARD, D.M.; WAGENVOORT, M. Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. **Sexual Plant Reproduction**. v. 12, p. 43-52, 1999.
- NAUMOVA, T.M. Apomixis and amphimixis in flowering plants. **Cytology and Genetics**, v. 42, n.3, p. 79-188, 2008.
- NORRMANN, G.A. Citología y método de reproducción en dos especies de *Paspalum* (Graminieae). **Bonplandia**, v. 5, p. 149–158, 1981.
- NORRMANN, G.A.; QUARÍN C.L.; BURSON. B.L. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. **Journal of Heredity**, v.80, p.24-28, 1989.
- NOVO, P.E.; VALLS, J.F.M.; GALDEANO, F.; HONFI, A.I.; ESPINOZA, F.; QUARÍN, C.L. Interspecific hybrids between *Paspalum plicatulum* and *P. oteroi*: a key tool for forage breeding. **Scientia Agricola**, v. 73, n.4, p. 356-359, 2016.
- NOVO, P. E. ACUÑA, C.A.; QUARÍN, C.L.; URBANI, M.H.; MARCÓN, F.; ESPINOZA, F. Hybridization and heterosis in the Plicatula group of *Paspalum*. **Euphytica**, v. 213, n.8. p. 1-12, 2017.
- NOVO, P.E.; GALDEANO, F.; ESPINOZA, F.; QUARÍN, C.L. Cytogenetic relationships, polyploid origin and taxonomic issues in *Paspalum* species: inter- and intraspecific hybrids between a sexual synthetic autotetraploid and five wild apomictic tetraploid species. **Plant Biology**, v. 21, n. 2, p. 267-277, 2018.

OBEID, J.A.; PEREIRA, D.H. Gênero *Paspalum*. In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. **Plantas forrageiras**. Viçosa: UFV, 2011. p. 131-165.

OLIVEIRA, R.C. **O gênero *Paspalum* L., grupo *Plicatula* (Poaceae: Paniceae), no Brasil**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2004. 385 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, 2004.

OLIVEIRA, R.C.; VALLS, J.F.M. Novos sinônimos e ocorrências em *Paspalum* (Poaceae). **Hoehnea**, v. 35, p. 125-131, 2008.

OLIVEIRA, R.C.; VALLS, J.F.M. Taxonomia de *Paspalum* L., grupo *Linearia* (Gramineae - Paniceae) do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 371-389, 2008.

OLIVEIRA, F.A.; CIDADE, F.W.; FÁVERO, A.P.; VIGNA, B.B.Z.; SOZA, A.P. First microsatellite markers for *Paspalum plicatulum* (Poaceae) characterization and cross-amplification indifferent *Paspalum* species of the *Plicatula* group. **BMC Research Notes**, v.9, p.511, 2016.

OLMEDO-MONFIL, V.; DURÁN-FIGUEROA, N.; ARTEAGA-VÁSQUEZ, M.; DEMESA-ARÉVALO, E.; AUTRAN, D.; GRIMANELLI, D.; KEITH SLOTKIN, R.; MARTIENSSEN, R.A.; VIELLE-CALZADA, J.P. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. **Nature**, v. 464, p. 628–632, 2010.

ORTIZ, J. P. A.; PESSINO, S. C.; LEBLANC, O. HAYWARD, M. D.; QUARÍN, C. L. Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 850—856, 1997.

ORTIZ, J.P.A.; PESSINO, S.C. Apomixis and its potential role in agriculture. **AgBiotechNet**, v. 4, p. 1-4, 2002.

ORTIZ, J.P.A.; QUARIN, C.L.; PESSINO, S.C.; ACUNA, C.; MARTÍNEZ, E.J.; ESPINOZA, F.; HOJSGAARD, D.H.; SARTOR, M.E.; CACERES, M.E.; PUPILLI, F. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. **Annals of Botany**, v. 112, p. 767–787, 2013.

OSBORNE, C. P.; VISSER, V.; CHAPMAN, S.; BARKER, A.; FRECKLETON, R. P.; SALAMIN, N. N.; SIMPSON, D.; UREN, V. GrassPortal: an online ecological and evolutionary data facility for the grasses. **South African Journal of Botany**, v.77, n.2, p. 566-566, 2011.

OZIAS-AKINS, P.; ROCHE, D.; HANNA, W. W. Tight clustering and hemizyosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 5127–5132, 1998.

OZIAS-AKINS, P.; AKIYAMA, Y.; HANNA, W.W. Molecular characterization of the genomic region linked with apomixis in *Pennisetum/Cenchrus*. **Functional & Integrative Genomics**, v. 3, p. 94–104, 2003.

OZIAS-AKINKS, P.; VAN DIJK, P. J. Mendelian Genetics of Apomixis in Plants. *Annual Review of Genetics*, v. 41, p. 509-537, 2007

PAGLIARINI, M.S.; CARRARO, L.R.; FREITAS, P.M.; ADAMOWSKI, E.V.; BATISTA, L.A.R.; VALLS, J.F.M. Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. **Hereditas**, v. 135, p. 27-34, 2001.

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

PENALOZA, A.P.S.; CORTES, A.L.; POZZOBON, M.T.; SANTOS, S.; RUA, G.H.; VALLS, J.F.M. Unusual chromosome numbers in *Paspalum* L. (Poaceae: Paniceae) from Brazil. **Genetic and Molecular Research**, v. 7, p. 399-406, 2008.

PESSINO, S. C.; ORTIZ, J. P. A. LEBLANC, O.; VALLE, C. B. EVANS, C. HAYWARD, M. D. Identification of maize linkage group related to apomixes in *Brachiaria*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 439–444, 1997.

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

PILGER, R.K.F. Gramineae III: Unterfamilie Panicoideae. In ENGLER, L. A.; PRANTL, K. (Eds). **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**, 1940, p. 1-208.

PODIO, M.; SIENA, L.A.; HOJSGAARD, D.; STEIN, J.; QUARÍN, C.L.; ORTIZ, J.P.A. Evaluation of meiotic abnormalities and pollen viability in aposporous and sexual tetraploid *Paspalum notatum* (Poaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, p. 1625-1633, 2012.

POLEGRI, L.; CALDERINI, O.; ARCIONI, S.; PUPILLI, F. Specific expression of apomixis-linked alleles revealed by comparative transcriptomic analysis of sexual and apomictic *Paspalum simplex* Morong flowers. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 1869–1883, 2010.

POZZOBON, M. T.; MACHADO, A. C. C.; VAIO, M.; VALLS, J. F. M.; PENALOZA, A. P. S.; Santos, S.; CÔRTEZ, A. L.; RUA, G. H. Cytogenetic analyses in *Paspalum* reveal new diploid species and accessions. **Ciências Rural**, v.38, n.5, p. 1292-1299, 2008.

POZZOBON, M.T.; PAGANELLA, M.B.; SANTOS, S. VALLS, J.F.M. Cytological and reproductive aspects in the Caespitosa group of *Paspalum*. **Ciência Rural**, v. 43, n. 11, p. 2004-2010, 2013.

PRESTES, P.J.Q.; FREITAS, E.A.G.; BARRETO, I.L. Hábito vegetativo e variação estacional do valor nutritivo das principais gramíneas das pastagens nativas do Rio Grande do Sul. **Anuário Técnico do Instituto de Pesquisas Zootécnicas**, v. 3, p. 516-531, 1976.

PUPILLI, F.; LABOMBARDA, P.; CÁCERES, M.E.; QUARIN, C.L.; ARCIONI, S. The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homoeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. **Molecular Breeding**, v. 8, p. 53-61, 2001.

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

QUARÍN, C.L.; HANNA, W.W. Chromosome behavior, embryo sac development, and fertility of *Paspalum modestum*, *P. boscianum*, and *P. conspersum*. **Journal of Heredity**, v. 71, p. 419-422, 1980.

QUARÍN, C.L.; BURSON, B.L.; BURTON, G.W. Cytology of Intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromoerhizon*. **Botanical Gazette**, v.145, n.6, p. 420-426, 1984.

QUARÍN, C.L. Seasonal changes in the incidence of apomixes of diploid, triploid, and tetraploid plants of *Paspalum cromoerhizon*. **Euphytica**, v. 35, p. 515-522, 1986.

QUARÍN, C.L.; NORMANN, G.A. Cytology and reproductive behavior of *Paspalum equitans*, *P. ionanthum*, and their hybrids with diploid and tetraploid cytotypes of *P. cromoerhizon*. **Botanical Gazette**, v. 148, p. 386-391, 1987.

QUARÍN, C.L.; BURSON, B. L. Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. **Cytologia**, v.56, p. 223-228, 1991.

QUARÍN, C.L. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. **Apomixis Newsletter**, v. 5, p. 8-15, 1992.

QUARÍN, C.L.; CAPONIO, I. Cytogenetics and reproduction of *Paspalum dasypleurum* and its hybrids with *P. urvillei* and *P. dilatatum* ssp. *flavescens*. **International Journal of Plant Sciences**, v. 156, p. 232-235, 1995.

QUARÍN, C. L.; POZZOBON, M. T.; VALLS, J. F. M. Cytology and reproductive behavior of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: *Paspalum compressifolium*. **Euphytica**, v. 90, p. 345-349, 1996.

QUARÍN, C.L.; VALLS, J. F. M.; URBANI, M. H. Cytological and reproductive behavior of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. **Tropical Grasslands**, v. 31, p. 114-116, 1997.

QUARÍN, C.L. Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction**, v. 11, p. 331 - 335, 1999.

QUARÍN, C.L.; ESPINOZA, F.; MARTÍNEZ, E.J.; PESSINO, S.C.; BOVO, O.A. A rise of Ploidy Level induces the expression of apomixes in *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction**, v.13, p.243-249, 2001.

QUARÍN, C.L.; URBANI, M.H.; BLOUNT, A.R.; MARTÍNEZ, E.J. Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of bahiagrass, **Crop Science**, v. 43, p. 745-746, 2003.

RAYMER, P.; BRAMAN, S.; BURPEE, L.; CARROW, R.; CHEN, Z.; MURPHY, T. Seashore *Paspalum*: breeding a turfgrass for the future. **Green Section Record**, p. 22-26. 2008.

REBOZZIO, R.N.; SARTOR, M.E.; QUARÍN, C.L.; Espinoza, F. Residual sexuality and its seasonal variation in natural apomictic *Paspalum notatum* accessions, **Biologia Plantarum**, v.55, n.2, p.391-395, 2001.

RIOS, E.F.; BLOUNT, A.; KENWORTHY, E.; ACUÑA, C.A.; QUESENBERRY, K.H. Seasonal expression of apospory in bahiagrass. **Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales**, v. 1, p. 116-118, 2013.

ROCHE, D.; CONG, P.; CHEN, Z.; HANNA, W.W.; GUSTINE, D.L.; SHERWOOD, R.T.; OZIAS-AKINS, P. An apospory-specific genomic region is conserved between buffelgrass (*Cenchrus ciliaris*L.) and *Pennisetum squamulatum*Fresen. **Plant Journal**, v. 19, p. 203–208, 1999.

RODRIGO, J. M.; ZAPPACOSTA, D. C.; SELVA, J. P.; GARBUS, I.; ALBERTINI, E.; ECHENIQUE, V. Apomixis frequency under stress conditions in weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). **PlosOne**, v.12, n.4, p.1-17, 2017.

RUA, G.H. Estudos filogenéticos em Paniceae: os casos de *Paspalum* e *Digitaria*. In: MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P. (orgs.). **Os avanços da botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética**. Sociedade Botânica do Brasil, Porto Alegre, p. 170-173, 2006.

RUA, G. H.; SPERANZA, P. R.; VAIO, M.; ARAKAKI, M. A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, n. 3-4, p. 227–243, 2010.

SANDHU, S.; ALTPETER, F.; BLOUNT, A.R. Apomictic bahiagrass expressing the bar gene is highly resistant to glufosinate under field conditions, **Crop Science**, v. 47 p. 1691-1697, 2007

SARTOR, M.E.; QUARIN, C.L.; ESPINOZA, F. Mode of Reproduction of Colchicine-Induced *Paspalum plicatulum* Tetraploids. **Crop Science**, v. 49, p. 1270-1276, 2009.

SARTOR, M.E.; QUARIN, C.L.; URBANI, M.H.; ESPINOZA, F. Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species. **Plant Systematics and Evolution**, v. 293, p. 31–41, 2011.

SAVIDAN, Y.H.; JANK, L.; PENTEADO, M. I.O. **Introdução, avaliação e melhoramento de plantas forrageiras tropicais no Brasil: novas propostas de Modus operandi**. Campo Grande, EMBRAPA – CNPQC, 36p, 1985. (Documentos, 24).

SCATAGLINI, M.A.; ZULOAGA, F.O.; GIUSSANI, L.M.; DENHAM, S.S.; MORRONE, O. Phylogeny of New World *Paspalum* (Poaceae, Panicoideae, Paspaleae) based on plastid and nuclear markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, p. 1051-1070, 2014.

SCHMIDT, A.; WUST, S.E.; VIJVERBEG, K.; BAROUX, C.; KLEEN, D.; GROSSNIKLAUS, U. Transcriptome analysis of the *Arabidopsis* megaspore mother cell uncovers the importance of RNA helicases for plant germline development. **PLoS Biology**, v. 9, n. 9, p. 1-19, 2011.

SCHMID, M.W.; SDHMID, A.; GROSSNIKLAUS, U. The Female Gametophyte: na emerging model for cell type-specific systems biology in plant development. **Frontiers in Plant Sciences**, v. 6, n. 907, p. 1-18, 2015.

SCHULMAN, A.H. Molecular markers to assess genetic diversity. **Euphytica**, v. 158, p. 313-321, 2007.

SINGH, M.; GOEL, S.; MEELEY, R.B.; DANTEC, C.; PARRINELO, H.; MICHAUD, C.; LEBLANC, O.; GRIMANELLI, D. Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein. **Plant Cell**, v. 23, n. 443-458, 2011.

SKALINSKA, M. Experimental and embryological studies in *Hieracium aurantiacum* L. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 14, p. 139-155, 1971.

SLIWINSKA, E. Flow cytometry – a modern method for exploring genome size and nuclear DNA synthesis in horticultural and medicinal plant species. **Folia Horticulturae**. v. 30, n.1, 193-128, 2018.

STEIN, J.; QUARIN, C.L.; MARTÍNEZ, E.J.; PESSINO, S.C.; ORTIZ, J.P.A. Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 186-191, 2004.

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

SUN, K.; HUNT, K.; HAUSER, B.A. Ovule Abortion in *Arabidopsis* Triggered by Stress. **Plant Physiology**, v. 135, p.2358-2367, 2004.

TERHO, P (2017). **Flowing Software 2.5.1**. Disponível em:

<<http://flowingsoftware.btk.fi/index.php?page=3>> Acesso em: 14 de junho 2017

THE PLANT LIST. **Poaceae**, 2013. Disponível em:

<<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Poaceae/>> Acesso em: 11 de março 2018.

THE WEALTH OF INDIA. *P. scrobiculatum*: A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products. CSIR, New Delhi, India, p. 284. 2003.

TROPICAL FORAGES. **Fact Sheet Index**. Disponível em <<http://www.tropicalforages.info/key/forages/Media/Html/entities/index.htm>>. Acesso em: 28 de abril 2019.

VAIO, M.; MAZELLA, C.; PORRO, V.; SPERANZA, P.; LÓPEZ-CARRO, B.; ESTRAMIL, E.; FOLLE, G.A. Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. **Plant Systematics and Evolution**, v.265, p.109–121, 2007.

VALLE, C.B.; BONATO, A.L.V.; PAGLIARINI, M.S.; RESENDE-SIMEÃO, R.M.; JANK, L. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. **Clonagem de Plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. cap. 3, p.47-65.

VALLE, C.B.; JANK, L.; SIMEÃO, R.M. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 460-472, 2009.

VALLS, J.F.M. Recursos genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORMAENTO GENÉTICO DE *PASPALUM*, 1987, Nova Odessa, SP. **Anais...**Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1987, p. 3-13.

VALLS, J.F.M.; POZZOBON, M.T. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORMAMENTO GENÉTICO DE *PASPALUM*, 1987, Nova Odessa, SP. **Anais...**Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1987. p.15-21.

VAN DIJK, P.; VAN DAMME, J. Apomixis technology and the paradox of sex. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 81-84, 2000.

VERMA, S.; SRIVASTAVA, S.; TIWARI, N. Comparative study on nutritional and sensory quality of barnyard and foxtail millet food products with traditional rice products. **Journal Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 5147–5155, 2015.

WEILER, R.L.; DALL'AGNOL, M.; SIMIONI, C.; KRYCKI, C.; DAHMER, N.; GUERRA, D. Determination of the mode of reproduction of bahiagrass hybrids using cytoembryological analysis and molecular markers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 3, p. 185-191, 2017.

WHEELER, D.J.B.; JACOBS, S.W.L.; NORTON, B.E. **Grasses of New South Wales**. University of New England, Armidale, 1982, 295p.

WORTHINGTON, M.; HEFFELFINGER, C.; BERNAL, D.; QUINTERO, C.; ZAPATA, Y.P.; PEREZ, J.G.; VEGA, J.; MILES, J.; DELLAPORTA, S.; TOHME, J. A Parthenogenesis Gene Candidate and Evidence for Segmental Allopolyploidy in Apomictic *Brachiariadecumbens*. **Genetics**, v. 203, n. 3, p. 1117–1132, 2016.

WORTHINGTON, M.; EBINA, M.; YAMANAKA, N.; HEFFELFINGER, C.; QUINTERO, C.; ZAPATA, Y.P.; PEREZ, J.P.; SELVARAJ, M.; ISHITANI, M.; DUITAMA, J.; DE LA HOZ, J.F.; RAO, I.; DELLAPORTA, S.; TOHME, J.; ARANGO, A. Translocation of a parthenogenesis gene candidate to an alternate carrier chromosome in apomictic *Brachiaria humidicola*. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-19, 2019.

YOUNG, B.A.; SHERWOOD, R.T.; BASHAW, E.C. Cleared pystil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixes in grasses. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1668-1672, 1979.

ZINN, K.E.; TUNC-OZDEMIR, M.; HARPER, J.F. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n.7, p.1959–1968, 2010.

ZORZATTO, C. **Prospecção de marcadores moleculares RAPD e SSR ligados à apomixia em *Brachiaria humidicola***. 2008. 58 f. (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

ZULOAGA, F.O.; MORRONE, O. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral (Argentina, Bolivia, Sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v. 102, p. 1-297, 2005.