

Campo Grande, MS / Novembro, 2024

Otimização da PCR e avaliação da eficiência do marcador SCAR P779/780 para detecção da apomixia em *Brachiaria* spp. (syn. *Urochloa*)

Kelly dos Santos Pedroso⁽¹⁾, Andréa Raposo⁽²⁾, Mariane de Mendonça Vilela⁽³⁾, Dayane Silva Alvares⁽⁴⁾, Cacilda Borges do Valle⁽⁵⁾, Sanzio Carvalho Lima Barrios⁽⁶⁾, Sandra Ratier⁽⁷⁾

⁽¹⁾ Bióloga, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. ⁽²⁾ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de plantas, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

⁽³⁾ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de plantas, Analista da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. ⁽⁴⁾ Biotecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS. ⁽⁵⁾ Engenheira Agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora aposentada da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. ⁽⁶⁾ Engenheiro Agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. ⁽⁷⁾ Assistente de laboratório da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL



Embrapa Gado de Corte
Av. Rádio Maia, 830 - Zona Rural
Campo Grande, MS, 79106-550
www.embrapa.br/gado-de-corte
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
Presidente
Karem Guimarães Xavier Meireles
Secretário-executivo
Rodrigo Carvalho Alva
Membros
Alexandre Romeiro de Araújo
Davi José Bungenstab
Fabiane Siqueira
Gilberto Romeiro de Oliveira
Menezes
Luiz Orcício Fialho de Oliveira
Marcelo Castro Pereira
Mariane de Mendonça Vilela
Marta Pereira da Silva
Mateus Figueiredo Santos
Vanessa Felipe de Souza

Edição executiva
Rodrigo Carvalho Alva
Revisão de texto
Rodrigo Carvalho Alva
Normalização bibliográfica
Autor principal
Projeto gráfico
Leandro Sousa Fazio
Diagramação
Rodrigo Carvalho Alva

Tiragem: Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

Abstract – Brazil has the largest commercial beef cattle herd in the world, with approximately 194.4 million head, and is the leading producer and exporter of forage seeds. Brazilian livestock farming is of great economic importance and plays a significant role in job creation. The most commonly used grasses in central of the Brazilian are of the genus *Brachiaria* (syn. *Urochloa*), which reproduce by apomixis, a type of asexual reproduction where plants produce seeds identical to the maternal genotype. In the genetic improvement of species from this genus, one of the strategies is the crossing of sexual plants with apomictic genotypes, and the resulting progeny comprises sexual and apomictic hybrids. As the identification of the mode of reproduction by microscopy (cytoembryology) is time-consuming and laborious, molecular markers associated with apomixis were sought to accelerate this process. One of the methodologies employed for the study of molecular markers is the PCR technique, which allows the amplification of specific target DNA sequences. The present study aimed to optimize this technique to increase the specificity of the SCAR p779/p780 molecular marker linked to apomixis and to estimate its efficiency in diagnosing the reproductive mode in *Brachiaria* spp. Initially, 7 individuals with known reproductive modes through cytoembryological studies and progeny tests were used. Four PCR protocols were tested using this marker: two conventional PCRs and two TD (touchdown) PCRs using two different annealing temperatures (56 and 57°C). The amplified products were visualized on an agarose gel. The presence of a band approximately 900 base pairs indicated that the individual reproduces by apomixis, and its absence indicated sexual reproduction. The TD PCR at 57°C allowed for greater stringency in primer annealing, with no nonspecific bands observed, and provided better band symmetry on the agarose gel. A new PCR with these parameters was performed on 43 individuals to verify the correlation between the reproductive mode determined by molecular and cytogenetic methods. An efficiency of 90.6% was obtained in detecting apomixis in the

hybrids using the SCAR p779/p780 molecular marker. This result is promising, and increasing the sample size is necessary to confirm the marker's efficiency percentage in detecting the reproductive mode in species of this genus. If the efficiency remains the same or increases, this marker can be incorporated into marker-assisted selection in the *Brachiaria* breeding programs.

Index terms: *Brachiaria*, molecular marker, SCAR, reproduction mode.

Resumo – O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos de corte do mundo, com cerca de 194,4 milhões de cabeças destinadas à produção de carne, e é o principal produtor e exportador de sementes forrageiras. A pecuária brasileira tem grande importância econômica e na geração de empregos. As gramíneas mais utilizadas nas pastagens do Brasil Central são do gênero *Brachiaria* (syn. *Urochloa*), e estas se reproduzem por apomixia, um tipo de reprodução assexuada, onde as plantas produzem sementes idênticas ao genótipo materno. No melhoramento genético de espécies desse gênero, uma das estratégias é o cruzamento de plantas sexuais com genótipos apomíticos e as progênie resultantes compreendem híbridos sexuais e apomíticos. Como a identificação do modo de reprodução por microscopia (citoembriologia) é morosa e trabalhosa, buscou-se marcadores moleculares associados a apomixia para acelerar esse processo. Uma das metodologias empregadas para o estudo dos marcadores moleculares é a técnica de PCR, que permite a amplificação de sequências específicas do DNA alvo. O presente estudo visou otimizar esta técnica para aumentar a especificidade do marcador molecular SCAR p779/p780 ligado à apomixia e estimar sua eficiência no diagnóstico do modo reprodutivo em *Brachiaria* spp.. Foram utilizados inicialmente 7 indivíduos com modo de reprodução conhecido através de estudos citoembriológicos e testes de progênie, e testados 4 protocolos de PCR utilizando este marcador: duas PCR convencionais e duas PCR TD (*touchdown*) utilizando duas temperaturas de anelamento diferentes (56 e 57°C). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose, e a presença de uma banda com aproximadamente 900 pares de base indicou que o indivíduo se reproduz por apomixia e sua ausência por via sexual. A PCR TD a 57°C permitiu maior rigor no anelamento dos primers, não se observando bandas inespecíficas, além de proporcionar

melhor simetria das bandas no gel de agarose. Foi realizada uma nova PCR com esses parâmetros em 43 indivíduos para confirmar a coincidência entre ao modo reprodutivo avaliado por marcador e por microscopia. Obteve-se uma eficiência de 90,6% na detecção na apomixia em híbridos de *Brachiaria* spp. utilizando o marcador molecular SCAR p779/p780. O presente resultado é promissor, entretanto é necessário aumentar o número amostral para comprovar o percentual de eficiência do marcador na detecção do modo reprodutivo em espécies desse gênero. Caso a eficiência permaneça a mesma ou aumente, este marcador poderá ser incorporado na seleção assistida por marcadores moleculares nos programas de melhoramento de espécies de *Brachiaria*.

Termos para indexação: *Brachiaria*, marcador molecular, SCAR, modo de reprodução.

Introdução

Em 2022 o rebanho mundial de bovinos foi de aproximadamente 994,14 milhões de animais, dos quais cerca de 224,6 milhões pertenciam ao Brasil (IBGE, 2023). Além de ter o maior número global de cabeça de gado, o Brasil possui também o maior rebanho comercial de bovinos de corte (ABIEC, 2023), com um número estimado de 194,4 milhões de cabeças destinadas à produção de carne. O Brasil é também o principal produtor e exportador de sementes forrageiras tropicais do mundo, sendo responsável pelo abastecimento em toda a América latina tropical (Souza et al., 2017).

Dentro do Agronegócio brasileiro a importância da pecuária vai além dos aspectos econômicos, abrangendo também questões sociais, ambientais e de segurança alimentar. A pecuária movimenta toda a cadeia produtiva, já que a carne bovina é um dos produtos mais exportados do país, contribuindo significativamente para o Produto Interno Bruto (PIB) e gerando milhões de empregos diretos e indiretos (Ferreira; Pereira, 2021).

Algumas espécies do gênero *Brachiaria* (syn. *Urochloa*) (Paula et al., 2017) são gramíneas forrageiras amplamente utilizadas nas pastagens brasileiras devido às suas características agrônomicas favoráveis e adaptação a diferentes condições climáticas e tipos de solo. Originárias da África (Lima e Cunha, 2008; Domingues, 2009), estas chegaram ao Brasil entre as décadas de 1950 e 1960 com a introdução da cultivar australiana Basilisk (*B. decumbes*) (Pizarro et al., 1996), que logo se destacou por sua capacidade

de adaptação a diferentes condições de solo e clima. Com o tempo, outras espécies de *Brachiaria*, como *B. brizantha*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*, foram sendo incorporadas nas pastagens brasileiras, cada uma apresentando características específicas em termos de produtividade, resistência a pragas e qualidade nutricional. Em 1984, a Embrapa Gado de Corte lançou a cultivar Marandu (*B. brizantha*), que se tornou o capim mais plantado do Brasil até os dias atuais (Bezerra et al., 2020).

A maioria das plantas superiores se reproduz de maneira sexuada, no entanto, algumas também podem se reproduzir assexuadamente. Existem aproximadamente 110 espécies do gênero *Brachiaria* (Valle; Jank; Resende, 2009), e estas apresentam reprodução tanto sexuada quanto assexuada. Nestas, as plantas sexuais geralmente são diploides e as apomíticas poliploides (Worthington et al., 2019). A apomixia em *Brachiaria* é gametofítica do tipo apospórica pseudogâmica, ou seja, a formação de embriões se dá por partenogênese a partir da diferenciação de células somáticas da nucela (Hanna e Bashaw, 1987; Asker e Jerling, 1992). Estas formam um ou mais sacos embrionários contendo uma célula-ovo com o mesmo complemento cromossômico da planta mãe (Cruz et al., 1998), processo este conhecido como apomeiose, onde a meiose, responsável pela redução no número cromossômico, foi substituída pela mitose. Além disso, ocorre a ligação do núcleo polar com um núcleo espermático do grão de pólen para a formação do endosperma (pseudogamia) (Valle, 1990; Lutts et al., 1994). Por gerar sementes clonais idênticas ao genótipo materno, a apomixia apresenta grande potencial para o desenvolvimento de cultivares com características desejadas, dada a sua capacidade de fixar qualquer genótipo (Xiong et al., 2023), promovendo a fixação da heterose, o que pode acelerar as estratégias no processo de melhoramento (Goel et al., 2006; Xu et al., 2022).

A apomixia e a reprodução sexual podem ocorrer simultaneamente em uma mesma planta ou ainda no mesmo óvulo. Em plantas chamadas apomíticas obrigatórias, não ocorre a reprodução sexual, e todas as sementes colhidas têm o mesmo genótipo da planta mãe. Nas apomíticas facultativas, em uma mesma planta podem ser colhidas sementes zigóticas e apomíticas, e assim sua progênie é constituída por uma população variável de plantas, algumas das quais são clones da planta mãe e outras híbridos sexuais (Koltunow et al., 1995).

O desenvolvimento da apomixia é complexo e compreende três componentes distintos, a saber, apomeiose (levando à formação de óvulos não reduzidos), partenogênese (desenvolvimento de embrião sem fertilização) e desenvolvimento funcional do endosperma. Portanto, verifica-se que diferentes *loci* controlam o desenvolvimento dos seus diferentes componentes. Nesse processo pode ocorrer o envolvimento de um gene regulador principal ou de um conjunto de genes-chave, que são herdados juntos como um único fator mendeliano dominante, que determina que células-mãe de megásporos ou células nucelares somáticas formem um saco embrionário e um embrião a partir de óvulos não reduzidos e sem fertilização (Savidan, 2000; Brukhin, 2017). A este conjunto de genes tem-se chamado região genômica apospórica específica (ARSGR) (Kaushal et al. 2019). De acordo com Moraes et al. (2023), a segregação esperada para a apomixia é de 1:1 (apomítico:sexual). Em gramíneas dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum* estudos têm demonstrado que a apomixia é dominante sobre a sexualidade (Valle e Savidan, 1983; Savidan, 1996; Zorzatto et al. 2010).

No melhoramento genético de espécies desse gênero cruzam-se plantas sexuais com genótipos apomíticos e as progênies resultantes compreendem híbridos sexuais e apomíticos. Se as características desejadas se encontrarem na progênie apomítica, estarão fixadas, e as plantas com estas características podem vir a ser lançadas como uma nova cultivar. Já características de interesse na progênie sexual as habilita a tornarem-se genitoras em um próximo ciclo de cruzamentos.

A identificação do sistema reprodutivo em braquiárias, tradicionalmente é realizada via análise de sacos embrionários ou com a utilização de descritores morfológicos em teste de progênie (Figura 1). Porém, o uso desses métodos apresenta limitações, tais como serem frequentemente afetados pelo ambiente e sua avaliação só pode ser realizada na planta adulta (Silva et al., 2005). Uma alternativa é a utilização de marcadores moleculares que são como “marcas digitais” que ocorrem nos segmentos de DNA, que geralmente estão ligados a uma característica de interesse, são variáveis entre os indivíduos, ocorrem em diferentes regiões do genoma, apresentam herança mendeliana, não sofrem influência ambiental e podem ser analisados em qualquer estágio de desenvolvimento do indivíduo (Souza, 2001; Cai-xeta et al., 2009).

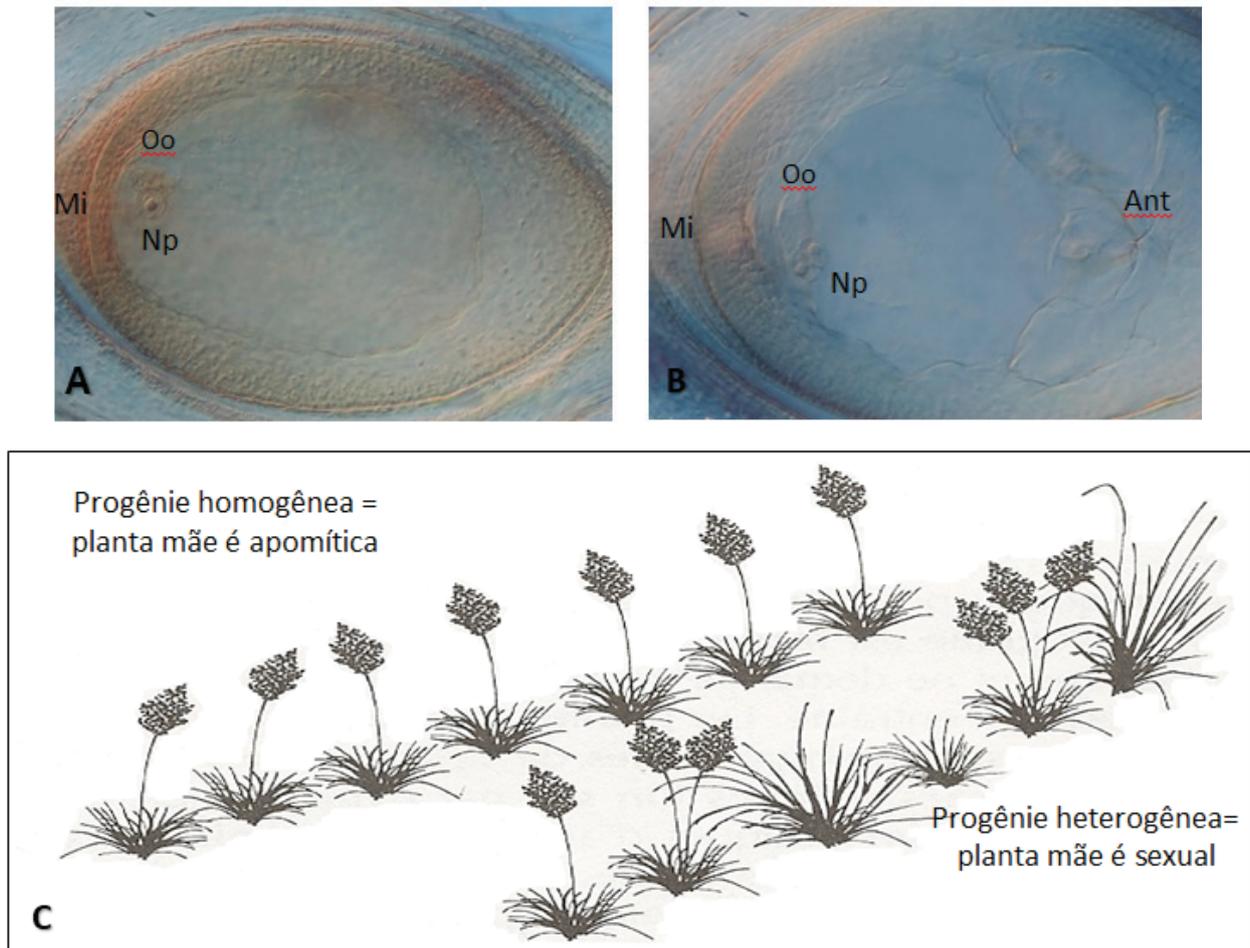


Figura 1. Formas de identificação do modo de reprodução em indivíduos de *Brachiaria* spp. Análise citoembriológica: A) Morfologia de saco embrionário apospórico (apomítico) típico; B) Morfologia de saco embrionário meiótico (sexual) típico. Np – núcleo polar; Oo - oosfera; Mi – micrópila; Ant – antípodas; C) Teste de progênes para determinação do modo de reprodução das plantas-mães: cada linha representa uma progênie. Fonte: Savidan e Valle, 1999.

Existem diferentes tipos de marcadores moleculares, cada um possui características próprias, sendo originados por técnicas distintas, e cada técnica utiliza uma estratégia particular para detectar o polimorfismo do DNA (Mondini et al., 2009). Dentre estes, encontra-se o marcador SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) (Paran e Michelmore, 1993), que são marcadores dominantes, identificados pela amplificação por PCR. Sua análise é realizada por eletroforese em gel de agarose ou acrilamida, o polimorfismo pode ser detectado diretamente pela presença ou ausência da banda no gel.

O primeiro relato de co-herança de apomixia apospórica e marcadores moleculares foi em *Pennisetum*. Dois marcadores foram encontrados: um RFLP e um RAPD ligados à aposporia (Ozias-Akins et al., 1993). Ozias-Akins et al. (1998) desenvolveram marcadores SCAR a partir de marcadores RAPD previamente encontrados em 1993. Após estes,

vários outros estudos envolvendo a utilização de marcadores moleculares em espécies apomíticas surgiram. Zorzatto et al. (2010) estudando outras sequências de marcadores RAPD, identificaram, um que estava a 4,61 cM de distância do apo-locus, em *Brachiaria humidicola* hexaploide, ou seja, que este marcador está relativamente próximo ao apo-locus, e que existe uma probabilidade de ocorrer 4,61% recombinação. Bitencourt et al. (2012) utilizaram RAPD nesta mesma espécie para identificar o modo de reprodução de híbridos resultantes de cruzamento intraespecífico. Poblete-Vargas et al. (2018) verificaram que os marcadores AFLP (Polimorfismo de Comprimento de fragmento Ampliado) e CAPS (Polimorfismo Ampliado Clivado Marcadores de Sequência) foram adequados para estimar a relação genética entre pais e híbridos do gênero *Brachiaria*, separando os genótipos apomíticos dos sexuais.

O marcador p779/p780 (psASGR – BBML específico) foi originalmente desenvolvido a partir das sequências do 4º e 7º éxons do gene ASGR-BABY BOOM-like (ASGR-BBML) (região genômica apospórica específica *Baby Boom Like*), proposto como candidato para partenogênese em *Pennisetum squamulatum* (syn. *Cenchrus ciliaris*) (Akiyama et al., 2011), e se mostrou altamente diagnóstico para a reprodução apomítica em *Brachiaria* spp. (Worthington et al. 2016; Worthington et al., 2019) e em *Panicum maximum* (Santos, 2021). Moraes et al. (2023) verificaram que este marcador apresenta baixa taxa de recombinação podendo ser utilizado de forma confiável para detecção de apomixia em *B. humidicola*. Estes mesmos autores observaram a presença de dois SNPs (Poliformismo de Nucleotídeo Único ou em inglês, Single Nucleotide Polymorphism) que co-segregaram juntamente como o fenótipo apomítico.

Para aumentar a eficiência no melhoramento das forrageiras *Brachiaria* spp., é necessário aumentar a eficácia na identificação das progênes resultantes dos cruzamentos, identificando plantas sexuais e apomíticas de forma rápida e segura. Híbridos apomíticos podem ser candidatos a novas cultivares, e os melhores híbridos sexuais podem ser utilizados como genitores em futuros cruzamentos ou recombinados no melhoramento intrapopulacional. Dentro deste contexto, a utilização do marcador molecular SCAR p779/p780 irá permitir a identificação precoce, rápida e segura das progênes geradas.

O SCAR p779/p780 é um marcador baseado em PCR (Reação em cadeia da Polimerase – Polymerase Chain Reaction). Esta metodologia foi descrita pela primeira vez nos anos 80 por Kary Mullis, que recebeu em 1994 o prêmio Nobel (Novais e Pires-Alves, 2004), e consiste na amplificação *in vitro* de regiões específicas da molécula de DNA através de uma variação cíclica de temperaturas (Green e Sambrook, 2018). O objetivo da PCR é a amplificação de muitas cópias de uma sequência específica de DNA, a partir de uma fita molde (Kolmodin e Birch, 2002; Kramer e Coen, 2006) gerando um produto que pode ser estudado.

Existem muitas variações da técnica de PCR que buscam maximizar o sucesso da amplificação das amostras e modular a especificidade do processo. A PCR *Touchdown* (PCR TD) oferece um meio simples e rápido para otimizar a PCR convencional. Nela, a temperatura selecionada para a etapa de anelamento é inicialmente definida entre 5°C e 10°C acima da temperatura de *melting* (Tm) calculada dos *primers*: Tm

corresponde à temperatura em que metade dos *primers* estão anelados ao DNA molde e a outra metade, ainda em fita simples. O anelamento sob condições de alto rigor favorece a formação de híbridos perfeitos entre *primer* e DNA molde. Nos ciclos subsequentes, a temperatura vai sendo gradualmente diminuída, de modo que, ao final da PCR, a temperatura esteja 2°C a 5°C abaixo da Tm calculada dos *primers*. Com a diminuição gradual da temperatura de anelamento ocorre um aumento da eficiência da reação. As regiões que foram originalmente amplificadas durante os ciclos iniciais (altamente específicos) serão amplificadas ainda mais e competirão com qualquer amplificação não específica que possa ocorrer em temperaturas mais baixas. Desta forma tem-se um aumento da especificidade, sensibilidade e rendimento da PCR (Korbie e Mattick, 2008; Lorenz, 2012).

O objetivo do presente estudo foi realizar a adequação da técnica de PCR utilizada na amplificação do marcador molecular SCAR p779/p780 em indivíduos de *Brachiaria* spp. de forma a reduzir as ampliações inespecíficas e obter maior especificidade no diagnóstico molecular do modo reprodutivo em indivíduos desta espécie.

Material e métodos

As plantas utilizadas para o presente estudo possuem o seu modo de reprodução conhecido através de análises citoembriológicas e teste de progênie (Tabela 1). Algumas são cultivares presentes no mercado e outras fazem parte do programa de melhoramento de *Brachiaria* spp. (syn. *Urochloa* spp.) da Embrapa Gado de Corte.

O DNA genômico de folhas jovens dos 44 indivíduos de *Brachiaria* spp. foram extraídos usando o protocolo descrito por Bonato et al. (2002). Foi utilizado tampão CTAB 2% (brometo de cetiltrimetilamônio – CTAB 2%, 1,4 M de NaCl, 0,02 M de EDTA, 1% de PVP-40, 0,1 M de Tris-HCl pH 8, acrescido de 0,2% de β-mercaptoetanol) e aproximadamente 300 mg de tecido congelado. Após extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific), onde a pureza foi avaliada pela razão de leitura nos comprimentos de onda de 260/280 nm, e sua qualidade e concentração foram verificadas em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed® (Bio-tium), com o uso do DNA fago λ como padrão em concentrações de 30 a 300 ng.

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

ID	MP	ID	MP	ID	MP	ID	MP
1	SEX	12	SEX	23	APO	34	SEX
2	APO	13	APO	24	APO	35	SEX
3	APO	14	APO	25	APO	36	SEX
4	SEX	15	APO	26	SEX	37	APO
5	APO	16	APO	27	SEX	38	SEX
6	SEX	17	APO	28	SEX	39	SEX
7	APO	18	APO	29	APO	40	SEX
8	APO	19	SEX	30	APO	41	SEX
9	APO	20	SEX	31	SEX	42	SEX
10	APO	21	SEX	32	APO	43	SEX
11	SEX	22	APO	33	APO	44	APO

ID – número de identificação da planta; MP – modo de reprodução; SEX – modo de reprodução sexual; APO – modo de reprodução apomítico.

Otimização da PCR

Com o objetivo de maximizar o sucesso da amplificação das amostras, tornando o processo mais específico e com bom rendimento, o que irá refletir na visualização dos produtos amplificados no gel, foram inicialmente utilizados 7 indivíduos e testados 4 protocolos de PCR utilizando o marcador molecular SCAR p779/p780 (sequência de iniciadores 5' TATGTCACGACAAGAATATG 3'/ 5' TGTAACCATA-ACTCTCAGCT 3') (Akiyama et al. 2011).

As reações foram feitas de acordo com Worthington et al. (2016) em um volume final de 15 µL, contendo 30 ng de DNA genômico; 1X Tampão de PCR; 1,5 mM MgCl₂; 0,125 mM dNTP; 0,5 µM *Primers*

Forward e Reverse; 0,5 U Taq DNA polimerase e água Milli-Q estéril. As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Para a otimização foram utilizadas duas temperaturas de anelamento 56 e 57°C e dois protocolos de PCR, o convencional e o TD (touchdown) de acordo com as tabelas 2 e 3.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (1,5 g de agarose; 100 ml TBE 1X), corado com GelRed® (Bio-tium), e fotodocumentados em sistema digital (Gel Doc XR+ Bio Rad). Para este marcador, a presença de uma banda com cerca de 900 a 950 pb indica que o indivíduo é apomítico e a ausência, que é sexual.

Tabela 2. Parâmetros da PCR convencional utilizando o marcador molecular SCAR p779/p780 com a variação na temperatura de anelamento.

PCR convencional 56°C			PCR convencional 57°C		
Temperatura	Tempo	Repetição	Temperatura	Tempo	Repetição
Desnaturação			Desnaturação		
94°C	5 minutos	1X	94°C	5 minutos	1X
Anelamento			Anelamento		
94°C	30 segundos		94°C	30 segundos	
56°C	30 segundos	30X	57°C	30 segundos	30X
72°C	60 segundos		72°C	60 segundos	
Extensão			Extensão		
72°C	10 minutos	1X	72°C	10 minutos	1X
4°C	Infinito		4°C	Infinito	

Tabela 3. Parâmetros da PCR TD (touchdown) utilizando o marcador molecular SCAR p779/p780 com a variação na temperatura de anelamento.

PCR TD 56°C			PCR TD 57°C		
Temperatura	Tempo	Repetição	Temperatura	Tempo	Repetição
Desnaturação			Desnaturação		
94°C	5 minutos	1X	94°C	5 minutos	1X
Anelamento			Anelamento		
94°C	30 segundos		94°C	30 segundos	
60°C	30 segundos	1X	61°C	30 segundos	1X
72°C	60 segundos		72°C	60 segundos	
94°C	30 segundos		94°C	30 segundos	
59°C	30 segundos	1X	60°C	30 segundos	1X
72°C	60 segundos		72°C	60 segundos	
94°C	30 segundos		94°C	30 segundos	
58°C	30 segundos	1X	59°C	30 segundos	1X
72°C	60 segundos		72°C	60 segundos	
94°C	30 segundos		94°C	30 segundos	
57°C	30 segundos	1X	58°C	30 segundos	1X
72°C	60 segundos		72°C	60 segundos	
94°C	30 segundos		94°C	30 segundos	
56°C	30 segundos	1X	57°C	30 segundos	1X
72°C	60 segundos		72°C	60 segundos	
94°C	30 segundos		94°C	30 segundos	
56°C	30 segundos	35X	57°C	30 segundos	35X
72°C	60 segundos		72°C	60 segundos	
Extensão			Extensão		
72°C	5 minutos	1X	72°C	5 minutos	1X
4°C	Infinito		4°C	Infinito	

Eficiência do marcador

Após análise dos géis dos protocolos testados, foi escolhida a PCR que possibilitou melhor visualização do seu produto, e então foi realizada uma nova PCR com 43 indivíduos (Tabela 1). Pelo fato do indivíduo 44 não ter apresentado o DNA com a pureza ideal e pouco produto de amplificação nos géis, optou-se em não utilizá-lo. Para se estimar a eficiência do marcador, utilizando-se a PCR otimizada, foi verificada a coincidência da determinação do modo de reprodução entre a análise molecular e citoembriológica, de acordo com a seguinte expressão: $\%C = \frac{N_{coin}}{NT} \times 100$

Onde: %C = porcentagem de coincidência; N_{coin} = número de coincidência entre os resultados previamente conhecidos sobre o modo de reprodução e os dados moleculares; NT = número total de indivíduos analisados.

Resultados e discussão

A técnica de PCR pode ser aplicada de diversas maneiras e, geralmente, segue um protocolo padrão com condições pré-estabelecidas. Porém, existem situações em que a sua otimização se faz necessária, para que se obtenha uma boa qualidade e

rendimento das ampliações. De acordo com Brent et al. (2003) a seleção de *primers*, a concentração de cloreto de magnésio e a temperatura de anelamento são os fatores críticos para a reação de PCR, além da qualidade e pureza do DNA extraído.

O presente estudo partiu do protocolo padrão utilizado por Worthington et al. (2016) para

amplificar o marcador molecular SCAR p779/p780 e, a partir dele, foram avaliados 4 protocolos diferentes. Na Figura 2 tem-se o resultado dos testes em que foram realizadas duas PCR convencionais (A e B), utilizando temperaturas de anelamento (T_a) de 56 e 57°C e duas PCR TD (C e D) com estas mesmas temperaturas.

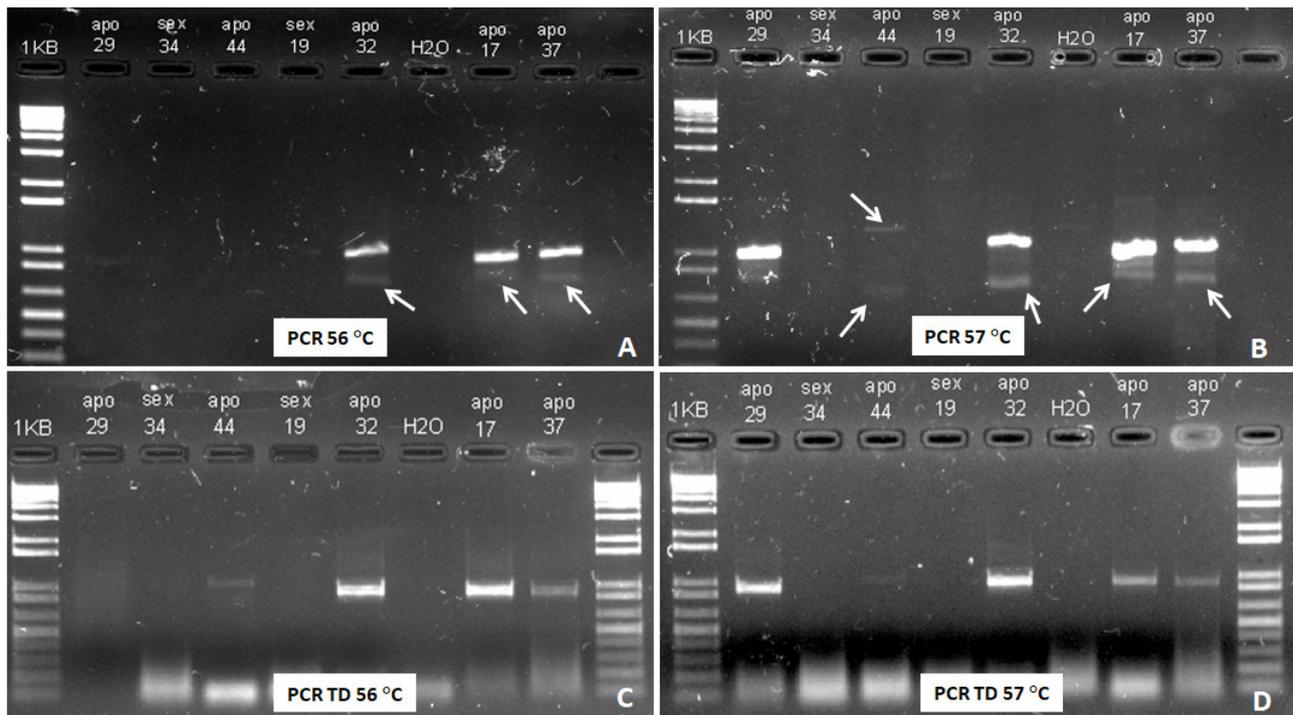


Figura 1. Formas de identificação do modo de reprodução em indivíduos de *Brachiaria* spp. Análise citoembriológica: A) Morfologia de saco embrionário apospórico (apomítico) típico; B) Morfologia de saco embrionário meiótico (sexual) típico. Np – núcleo polar; Oo - oosfera; Mi – micrópila; Ant – antípodas; C) Teste de progênies para determinação do modo de reprodução das plantas-mães: cada linha representa uma progênie. Fonte: Savidan e Valle, 1999.

Nas PCR convencionais (Figura A e B) dos indivíduos apomíticos observa-se a presença de bandas inespecíficas no gel (apontadas pelas setas), isto é, bandas de menor ou maior peso molecular que o produto esperado. Esse fato indica a falta de especificidade na amplificação dos fragmentos nestes protocolos, que pode ser justificada por condições de baixa estringência da PCR. Nestas situações, o desequilíbrio nas condições físico-químicas ideais da reação facilitam o pareamento imperfeito dos *primers* com o DNA, resultando no anelamento e amplificação de regiões do DNA diferentes da região alvo (Lorenz, 2012).

Ainda observando as PCR convencionais, verifica-se que com a T_a de 56 °C não ocorreu a amplificação esperada do fragmento em dois indivíduos apomíticos (29 e 44). Já com a T_a de 57°C, o indivíduo 29 apresentou a amplificação esperada e, no 44, ocorreu a presença de duas bandas inespecíficas, uma de tamanho maior e outra menor comparada ao fragmento esperado.

Como esperado, a utilização da PCR TD (Figura 2 C e D) permitiu maior rigor no anelamento dos *primers*, favorecendo a formação de híbridos perfeitos entre *primer* e DNA molde, não se observando bandas inespecíficas, além de proporcionar melhor simetria das bandas no gel de agarose. Analisando as duas T_a neste tipo de

PCR, verifica-se que o indivíduo apomítico 29 só apresentou amplificação na Ta de 57°C e o 44, apesar de apresentar pouco produto amplificado, teve amplificação nas duas temperaturas testadas. Esta baixa amplificação pode ser justificada pela baixa medida na espectrofotometria da razão 260/280 que foi observada na leitura do Nanodrop (resultado não apresentado), indicando que a pureza do DNA deste indivíduo não foi satisfatória, o que provavelmente atrapalhou sua amplificação.

Após análise dos géis das PCR dos protocolos testados, constatou-se que a PCR TD a 57°C (Figura D) foi a mais adequada para o uso do marcador molecular SCAR p779/p780, uma vez que possibilitou a amplificação de todos os indivíduos apomíticos e sem a presença de bandas inespecíficas. Portanto, esta PCR foi utilizada para se verificar a eficiência do marcador na detecção da apomixia em *Brachiaria*, através da porcentagem de coincidência entre o modo de reprodução conhecido e os dados gerados pelo uso do marcador molecular SCAR p779/p780.

Observa-se no gel de agarose da Figura 3 que, dos 43 indivíduos analisados, quatro deles

apresentaram problemas para o diagnóstico do modo de reprodução. O indivíduo apomítico 9 apresentou uma banda bem fraca, com o tamanho do fragmento esperado, mesmo padrão de banda observado no indivíduo sexual 11 o que impede um diagnóstico conclusivo, em ambos os casos. O indivíduo apomítico 18 apresentou duas bandas inespecíficas, uma maior e outra menor que o fragmento esperado, padrão também observado no indivíduo 44 na PCR convencional a 57°C, e que não permite concluir o diagnóstico molecular do modo de reprodução. Por fim, o indivíduo apomítico 23 não apresentou amplificação, sendo classificado como sexual pelo marcador molecular. Portanto, dos 43 indivíduos estudados, 39 deles apresentaram coincidência com relação ao modo reprodutivo entre os métodos molecular e citogenético, três foram inconclusivos e apenas um apresentou resultado discordante (Figura 3). Este resultado representa uma eficiência de 90,6% na detecção do modo de reprodução em híbridos de *Brachiaria*.

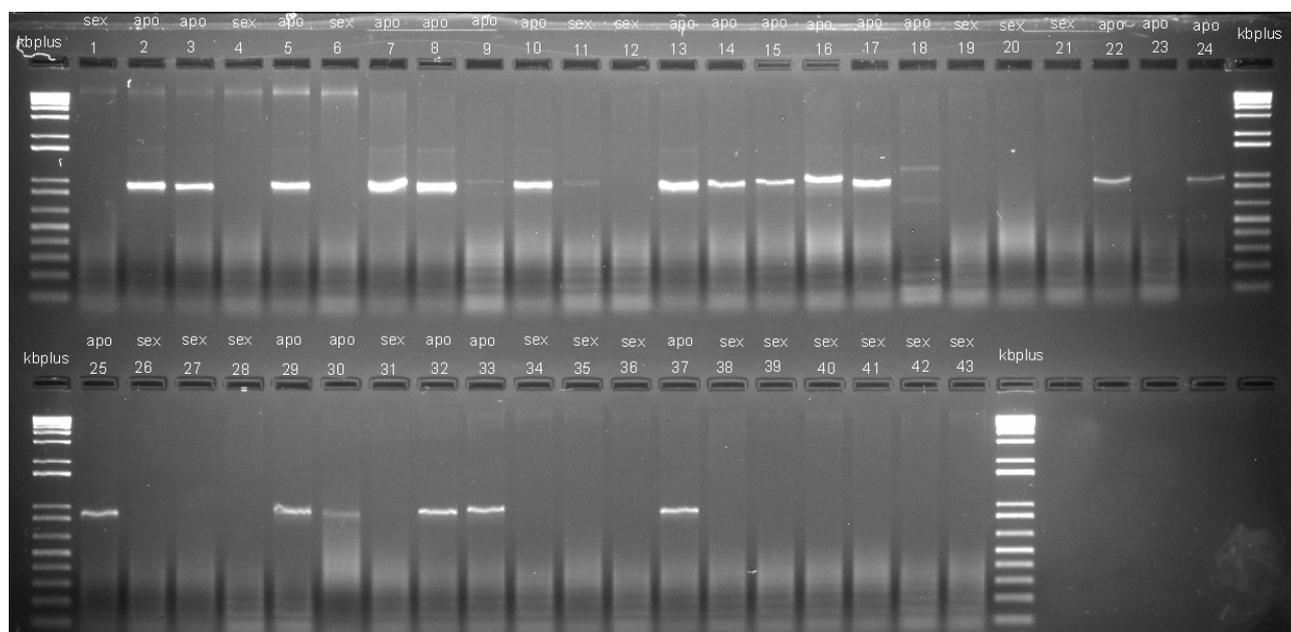


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,5 %, de PCR TD (touchdown) com temperatura de anelamento de 57°C utilizando o marcador molecular p779/p780 em indivíduos de *Brachiaria* spp., em que, apo = modo de reprodução apomítico, sex = modo de reprodução sexual.

A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) possibilita a identificação e seleção de características desejáveis em plantas cultivadas de uma forma eficiente e precoce. Ela integra dados da genética molecular com a seleção fenotípica, pela busca de alelos desejáveis utilizando marcadores moleculares que estejam ligados a características de interesse. Para que um marcador molecular seja utilizado na SAM, inicialmente tem-se a obtenção de marcadores genéticos associados com a característica fenotípica de interesse (Collard et al., 2005). Após esta etapa é realizada a validação para se verificar a eficácia deste marcador na determinação do fenótipo em indivíduos da espécie em estudo, com origens genéticas distintas (Barr et al., 2000). Quanto maior o número de indivíduos utilizados para a validação, maior será a confiabilidade do marcador para ser utilizado nos programas de melhoramento.

De acordo com Silva et al. (2007), quanto maior a eficiência de seleção (ES) de um marcador, maior será a sua contribuição na tomada de decisões pelos programas de melhoramento. Neste estudo, o marcador molecular SCAR p779/p780 teve uma eficiência de 90,6% na detecção na apomixia em indivíduos híbridos de *Brachiaria*. Poucos estudos foram realizados para se verificar a relação entre fenotipagem e a genotipagem para o modo de reprodução em gramíneas forrageiras, e todos em híbridos de *Panicum maximum* (syn. *Megathyrus maximus*). Bluma-Marques et al. (2014) utilizaram marcadores RAPD e verificaram uma eficiência de seleção entre 77,3 a 88%, sendo esta considerada boa. Em estudos com o marcador SCAR p779/p780, em híbridos de *P. maximum* oriundos de diferentes cruzamentos, Santos (2021) verificou uma eficiência de 92% deste marcador para a detecção da apomixia em indivíduos desta espécie (bastante próxima à eficiência observada no presente estudo). Santos (2021) ainda observou que este marcador não possui ligação com caracteres de importância agrônômica e que pode ser utilizado na SAM com eficiência para a detecção da apomixia.

O presente resultado é promissor, entretanto é necessário aumentar o número amostral para comprovar o percentual de eficiência do marcador na detecção do modo reprodutivo em espécies desse gênero. Caso a eficiência permaneça a mesma ou aumente, este marcador poderá ser incorporado na seleção assistida por marcadores moleculares nos programas de melhoramento de espécies de *Brachiaria*.

Conclusão

A alteração do protocolo convencional de PCR para a PCR TD (*touchdown*), utilizando-se a temperatura de anelamento (Ta) de 57°C, foi efetiva para garantir uma amplificação mais robusta e específica do marcador molecular SCAR p779/p780, possibilitando atingir uma eficiência de 90,6% na detecção da apomixia em híbridos de *Brachiaria*.

Referências

- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Beef REPORT: perfil da pecuária no Brasil 2023. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/catpub/impressos/>. Acesso em: 15 mai. 2024.
- AKIYAMA, Y.; GOEL, S.; CONNER, J. A.; HANNA, W. W.; YAMADA-AKIYAMA, H. Evolution of the apomixis transmitting chromosome in *Pennisetum*. **BMC Evol. Biol.**, v. 11, n. 289, p. 1-16. 2011. DOI: 10.1186/1471-2148-11-289.
- ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. London: CRC Press, Boca Raton, 1992. 298 p.
- BARR, A. R.; JEFFERIES, S. P.; WARNER, P.; MOODY, D. B.; CHALMERS, K. J.; LANGRIDGE, P. Marker Assisted Selection in Theory and Practice. Barley Genetics. In: Internaonal Barley Genetics Symposium, 8, 2000. Dept. Plant Sci., Waite Campus, Adelaide Univ., South Australia: p. 167-177.
- BEZERRA, J. D. DO V.; EMERENCIANO NETO, J. V.; ALVES, D. J. DA S.; BATISTA NETA, I. E.; GALDINO NETO, L. C.; SANTOS, R. DA S.; DIFANTE, G. DOS S. Características produtivas, morfogênicas e estruturais de cultivares de *Brachiaria Brizantha* cultivadas em dois tipos de solo. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e129972947, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.2947>.
- BITENCOURT, G. A.; CHIARI, L.; DO VALLE, C. B. Avaliação de híbridos por meio de marcadores RAPD e identificação do modo de reprodução pela anatomia de sacos embrionários em *Brachiaria humidicola*. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 16, n. 2, p. 59-70, 2012. DOI: 10.17921/1415-6938.2012v16n2p%0.
- BLUMA-MARQUES, A. C.; CHIARI, L.; AGNES, D. C.; JANK, L.; PAGLIARINI, M. S. Molecular markers linked to apomixis in *Panicum maximum* Jacq. **African Journal Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 2198-2202, 2014. DOI: 10.5897/AJB2014.13703.
- BONATO, A. L. V.; VERZIGNASSI, J. R.; RESENDE, R. M. S.; FERNANDES, C. D.; LEGUIZAMON, G. O. de C. Extração de DNA genômico de *Stylosanthes* spp.

- Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4 p. (Embrapa Gado de Corte. **Comunicado Técnico**, 78).
- BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; SEIDMAN, J. G.; STRUHL, K.; AUSUBEL, F. M.; CHANDA, V. B.; MOORE, D. D. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley; Sons, 2003. 1600 p. <https://hoclai.wordpress.com/wp-content/uploads/2015/09/current-protocols-in-molecular-biology.pdf>.
- BRUKHIN, V. Molecular and genetic regulation of apomixis. **Russ. J. Genet**, v. 53, n. 9, p. 943–964, 2017. DOI:10.1134/S1022795417090046.
- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Org.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Editora Jard, 2009. v. 1. p. 09-78.
- COLLARD, B. C. Y.; JAHUFER, M. Z. Z.; BROUWER, J. B.; PANG, E. C. K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v. 142, n. 1, p. 169-196, 2005. DOI: 10.1007/s10681-005-1681-5.
- CRUZ, R. P.; FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K. A apomixia no melhoramento de plantas. **Ciência rural**, v. 28, n. 1, p. 155-161, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84781998000100028>.
- DOMINGUES, J. L. Uso de volumosos conservados na alimentação de equinos. **R. Bras. Zootec**, v. 38, n. especial, p. 259-269, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001300026>.
- FERREIRA, L. C., & PEREIRA, J. R. O Papel da Pecuária na Formação do PIB e Geração de Empregos no Brasil. **Journal of Agricultural Economics and Development**, v. 29, n. 1, p. 85.
- GOEL, S.; CHEN, Z.; AKIYAMA, Y.; CONNER, J. Á.; BASU, M.; GUALTIER, I. G.; HANNA, W. W.; OZIAS-ATKINS, P. Comparative Physical mapping of the apospory-specific genomic region in two apomictic grasses: *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. **Genetics**, v. 173, n. 1, p. 389-400, 2006. DOI: 10.1534/genetics.105.054429.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). **Cold Spring Harb Protoc**. 2018. DOI: 10.1101/pdb.prot095133. PMID: 29717053.
- HANNA, W.W.; BASHAW, E.C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, v. 27, n. 6, p. 1136-1139. 1987. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183X002700060010x>.
- IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Pesquisa da Pecuária Municipal: tabela 3939: efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/>
- economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html. Acesso em: 15 maio. 2024.
- KAUSHAL, P.; DWIVEDI, K. K.; RADHAKRISHNA, A.; SRIVASTAVA, M. K.; KUMAR, V.; ROY, A. K.; MALAVIYA, D. R. Partitioning apomixis components to understand and utilize gametophytic apomixis. **Front Plant Sci**, v. 8, n. 10, p. 256, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00256>.
- KOLMODIN, L. A.; BIRCH, D. E. Polymerase Chain Reaction. In: CHEN, BY., JANES, H.W. (Eds) PCR Cloning Protocols. Methods in Molecular Biology™, vol 192. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. p. 3-18. DOI: <https://doi.org/10.1385/1-59259-177-9:003>
- KOLTUNOW, A. M.; BICKNELL, R. A.; CHAUDHURY, A. M. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiol**, v. 108, n. 4, p. 1345-1352, 1995. DOI: 10.1104/pp.108.4.1345.
- KORBIE, D. J.; MATTICK, J. S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nature protocols**, v. 3, n. 9, p. 1452-1456, 2008.
- KRAMER, M. F.; COEN, D. M. Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. **Curr. Protoc. Mol. Biol**. Chapter 3, Unit 3, 2006. DOI: 10.1002/0471142956.cya03ks37.
- LIMA, J. A. de; CUNHA, E. A. da. **Produção de feno de capim-elefante em pequena escala**. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/FenoElefante/index.htm>. Acesso em: 3/7/2024.
- LUTTS, S.; NDIKUMANA, J.; LOUANT, B. P. Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F1 hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. **Euphytica**, v. 78, n. 1, p. 19–25, 1994. DOI: 10.1007/BF00021394.
- LORENZ, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **J. Vis. Exp.** (63), e3998, 2012. DOI:10.3791/3998
- MONDINI, L.; NOORANI, A.; PAGNOTTA, M. A. Assessing plantgenetic diversity by molecular tools. **Diversity**, v. 1, n. 1, p. 19-35, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3390/d1010019>.
- MORAES, A. C. L.; MOLLINARI, M.; FERREIRA, R. C. U.; AONO, A., LARA, L. A. C.; PESSOA-FILHO, M.; VIGNA, B. B. Z. Advances in genomic characterization of *Urochloa humidicola*: exploring polyploid inheritance and apomixis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 136, n. 11, p. 238, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-023-04485-w>.

- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 33, n. 4, p. 10–13, 2004.
- OZIAS-AKINS, P.; ROCHE, D.; HANNA, W. W. Tight clustering and hemizygoty of apomixis linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 9, p. 5127–5132, 1998. DOI: 10.1073/pnas.95.9.5127.
- OZIAS-AKINS, P.; LUBBERS, E. L.; HANNA, W. W.; MCNAY, J. W. Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: Co-inheritance of the trait and molecular markers. **Theor. Appl. Genet.** v. 85, n. 5, p. 632–638, 1993. DOI: 10.1007/BF00220923
- 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, n. 8, p. 985–993, 1993. DOI: 10.1007/BF00215038.
- PAULA, C. M.; SOBRINHO, F. S.; TECHIO, V. H. Genomic constitution and relationship in (Poaceae) species and hybrids. **Crop Science**, v. 57, n. 5, p. 2605–2616, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.05.0307>.
- PIZARRO, E. A.; VALLE, C. B. DO; SÉLLER-GREIN, G.; SCHULTZEKRAFT, R.; ZIMMER, A. H. Regional experience with *Brachiaria*: Tropical America-savannas. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1996. p. 225–246.
- POBLETE-VARGAS J.; VALADEZ-MOCTEZUMA, E.; SANTOS, G. G. DE LOS; MARTÍNEZ-FLORES, C.; PERALTA-MARTÍNEZ, A. Differentiation of apomictic and sexual genotypes of *Brachiaria spp.*, using molecular markers. **Ecosist. Recur. Agropec.** v. 5, n. 13, p. 71–80, 2018. DOI: <https://doi.org/10.19136/era.a5n13.1180>.
- SANTOS, L. F. Validação do marcador molecular p779/p780 para a seleção precoce do modo de reprodução em *Megathyrus maximus*, 2021. 51p. Dissertação 9 (Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal. Jaboticabal.
- SAVIDAN, Y. Apomixis: genetics and breeding. **Plant Breed Rev.** v. 18, p. 13–86, 2000. DOI: 10.1002/9780470650158.ch2.
- SAVIDAN, Y. H.; VALLE, C. B. DO. Amélioration génétique des graminées fourragère tropicales. In: Guy Roberge; Bernard Toutain, eds.. (Org.). Cultures fourragères tropicales. Montpellier: La Librairie du CIRAD, 1999, v. 1, p. 53–68.
- SAVIDAN, Y. H. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). In: **Proceedings of the 14th International Grassland Congress**, Lexington, USA, p.182–184, 1983.
- SILVA, M.P.; AMARAL, Jr. A.T.; PEREIRA, M.G.; RODRIGUES, R.; DAHER, R.F.; POSSE, S.C.P. Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, n. 3, p. 531–539, 2005. DOI: 10.4025/actasciagron.v27i3
- SILVA, M. F. D.; SCHUSTER, I.; SILVA, J. F. V. D.; FERREIRA, A.; BARROS, E. G. D.; MOREIRA, M. A. Validation of microsatellite markers for assisted selection of soybean resistance to cyst nematode races 3 and 14. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1143–1150, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007000800011>.
- SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. Cap. 29, p. 939–966
- SOUZA, J.R.; DE JESUS LACERDA, J.; MORAIS, O. M.; SILVA, J. P. Potencial germinativo de sementes incrustadas de espécies forrageiras tropicais. **Ciência Rural**, v. 47, n. 2, p. 1–6, 2017. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151089>.
- VALLE, C.B. do. Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético. CNPGC - Documentos, nº 46. CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, 33 p. 1990.
- VALLE, C. B. D.; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L. VALLE, C. B. D. *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Cali, Colombia: CIAT, 1996. v. 1. p. 288.
- VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 460–472. 2009.
- WORTHINGTON, M.; EBINA, M.; YAMANAKA, N.; HEFFELFINGER, C.; QUINTERO, C.; ZAPATA, Y. P.; PEREZ, J. G.; SELVARAJ, M.; ISHITANI, M.; DUITAMA, J.; DE LA HOZ, J. F.; RAO, I.; DELLAPORTA, S.; TOHME, J.; ARANGO, J. Translocation of a parthenogenesis gene candidate to an alternate carrier chromosome in apomictic *Brachiaria humidicola*. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 41, 2019. DOI: 10.1186/s12864-018-5392-4.
- WORTHINGTON, M.; HEFFELFINGER, C.; BERNAL, D.; QUINTERO, C.; ZAPATA, Y.P.; PEREZ, J.G.; VEGA, J.; MILES, J.; DELLPORTE, S.; TOHME, J. A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Urochloa decumbens*.

Genetics, v. 203, p. 1117–1132, 2016. DOI: 10.1534/genetics.116.190314.

XIONG, J.; HU, F.; REN, J.; HUANG, Y.; LIU, C.; WANG, K. Synthetic apomixis: the beginning of a new era. **Curr Opin Biotech**, v.79, p. 102877, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102877>.

XU, Y.; JIA, H.; TAN, C.; WU, X.; DENG, X.; & XU, Q. Apomixis: genetic basis and controlling genes. **Horticulture Research**, v. 9, p. uhac150, 2022. DOI: 10.1093/hr/uhac150.

ZORZATTO, C.; CHIARI, L.; BITENCOURT, G. DE A.; VALLE, C. B. DO; LEGUIZAMON, G. O. DE C.; SCHUSTER, I.; PAGLIARIN, I. M. S. Identification of a molecular marker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Plant Breeding**, v. 129, n. 6, p. 734-736, 2010. DOI :10.1111/j.1439-0523.2010.01763.x.