IDENTIFICAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO EM *PASPALUM* COM MARCADORES MICROSSATELITES E INTERMICROSSATELITES

Natalia DANIEL[1]
Cristiana G. PEZZOPANE[2]
Bianca B. Z VIGNA[3]

RESUMO: A pesquisa justifica-se em extrair, quantificar e genotipar o DNA das amostras coletadas de progênies F_1 de cruzamentos intra e interespecíficos com marcadores moleculares, a fim de confirmar sua condição híbrida ou não. O projeto foi executado na Embrapa Pecuária Sudeste, onde usando *P. regnellii* e híbridos de *P. regnellii* como genitores femininos, e as seguintes espécies foram usadas como genitores masculinos: *(P. plicatulum x P. guenoarum); P. atratum; P. malacophyllum; P. regnellii; P. lenticulare; P. plicatulum; e P. guenoarum.* Destes cruzamentos, 159 progênies F_1 foram pré-selecionadas visualmente pelo melhorista e foram analisadas neste trabalho. O DNA foi extraído de acordo com o protocolo CTAB, a quantificação dos DNAs extraídos foi realizada em espectrofotômetro e sua qualidade foi verificada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (10%). Com base em estudos anteriores foram selecionados doze marcadores moleculares para a realização da genotipagem dos possíveis híbridos. A partir daí realizou-se a PCR e os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e gel de Agarose a 2%. A presença de alelos exclusivos do genitor masculino na progênie foi utilizada como critério de ocorrência de hibridação.

PALAVRAS-CHAVE: identificação; hibridação; marcador microssatélite, marcador intermicrossatélite.

Introdução.

Segundo estimativas do Censo Agropecuário Brasileiro de 2017 (IBGE, 2019), entre áreas plantadas e naturais de pastagens, numeram um território no Brasil de aproximadamente 160 milhões de hectares. O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovino do mundo representado por 214,69 milhões de cabeças de gado (ABIEC, 2020) . A pecuária brasileira tem como característica a maior parte de seu rebanho ser criado a pasto (Ferraz e Felício, 2010) e compreende 8,7% do PIB do país (ABIEC, 2020).

Uma das formas de melhorar a formação de pastagens é utilizando plantas selecionadas pelo melhoramento genético e associá-las em sistemas integrados de agricultura–

pecuária. Pode-se definir o melhoramento genético de plantas como “a arte e a ciência que objetivam a modificação gênica das plantas para torná-las úteis ao homem” (BORÉM, 1998).

No melhoramento genético vegetal incluem-se todas as técnicas, métodos, estratégias ou recursos que de certa forma alguma evolução seja agregada a uma espécie vegetal. Esta evolução, de maneira geral, se relaciona com o aperfeiçoamento do conteúdo genético da espécie trabalhada e sua relação direta com o ambiente onde será cultivada (BORÉM, 1997). Tem como característica ser o ajuste aos componentes físicos, químicos, biológicos, econômicos e sociais do ambiente (MIRANDA FILHO, 1994).

Um dos maiores gêneros da família Poaceae é o *Paspalum*. O gênero tem sua importância evidenciada por se adaptar a diferentes ecossistemas, reduzindo o risco de causar desequilíbrio biológico por sua diversidade genética ser grande, assegurando maior estabilidade ao ecossistema (STRAPASSON et al., 2000). As gramíneas desse gênero são abundantes nas regiões tropicais e subtropicais das Américas, a grande maioria de suas espécies é perene e algumas apresentam-se como excelente forrageira natural para pastagem, com potencial de melhoramento genético bastante elevado (QUARÍN; VALLS; URBANI, 1997; SARTOR; QUARÍN; ESPINOZA, 2009). Essa gramínea tem como características suas espiguetas plano-convexas, distribuídas parcialmente sobre a ráquis, sendo em pares ou isoladas compondo uma panícula racemosa e pela gluma superior abaxial à ráquis (CLAYTON, W.D.& RENVOIZE, S.A. 1986).

Devido aos divergentes níveis de ploidia e pelo seu comportamento reprodutivo, em que populações diplóides reproduzem-se sexualmente, enquanto poliplóides se reproduzem por apomixia; esse grupo configura um exemplo interessante para estudos de variabilidade genética (SARTOR et al., 2011).

O Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG) da Embrapa Pecuária Sudeste, localizada no município de São Carlos – SP, possui cerca de 390 acessos de mais de 450

espécies diferentes, separadas em 17 grupos botânicos informais (ALELO 2020). As espécies do grupo informal Virgata disponíveis no BAG e que apresentam boa produção de forragem são tetraploides sexuais, podendo ser utilizadas em cruzamentos nesse nível de ploidia com genótipos apomíticos de interesse.

O objetivo desse trabalho foi identificar híbridos nas progênies F_1 de cruzamentos intra e interespecíficos realizados com *Paspalum regnellii* como genitor feminino dentro do Programa de Melhoramento de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste utilizando marcadores moleculares microssatélites e inter-microssatélites.

Material e métodos

O projeto foi executado na Embrapa Pecuária Sudeste, localizada no município de São Carlos – SP. Foram realizados dentro do programa de melhoramento de *Paspalum* desenvolvido na Embrapa, cruzamentos em 2017 e 2018, usando *P. regnellii* e híbridos de *P. regnellii* como genitores femininos. As seguintes espécies foram usadas como genitores masculinos: *(P. plicatulum x P. guenoarum); P. atratum; P. malacophyllum; P. regnellii; P. lenticulare; P. plicatulum; e P. guenoarum.* Destes cruzamentos, 159 progênies foram pré-selecionadas visualmente pelo melhorista e foram analisadas neste trabalho. O material está descrito na Tabela 1.

O DNA total das plantas foi extraído de acordo com o protocolo de extração baseado em CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Foram coletadas folhas jovens e sadias e as extrações foram realizadas em lotes de 24 amostras por vez.

Os DNAs extraídos foram quantificados pelo método da espectrofotometria em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000) e sua qualidade foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10%), corrido por 1h a 100V e visualizado sob

luz UV em fotodocumentador Bio-Rad Gel DocTM XR+. Na quantificação e na corrida do gel foram medidas/aplicadas 48 amostras por vez.

As amostras foram preparadas de acordo com o resultado da quantificação, sendo misturados 1,5 µL de tampão de corrida (azul de bromofenol e glicerol 50%), 3,5 µL de água milliQ e 1,5 µL de amostra, para amostras com concentração acima de 40 ng/uL. Quando a concentração de DNA foi menor que esse valor, foi adicionado 5 uL de amostra ao mesmo volume de tampão de corrida, sem adicionar água. A concentração das amostras foi padronizadas em 10 ng/µL, através de diluições em água milliQ para a amplificação.

Com base em estudos anteriores foram selecionados marcadores moleculares de acordo com a espécie dos genitores para a realização da genotipagem dos possíveis híbridos (Tabela 2).

A reação de PCR dos SSR foi realizada de acordo Cidade et al. (2009) e de ISSR de acordo com Usandizaga et al. (2015). Posteriormente os marcadores SSR foram analisados em gel de Poliacrilamida 6%, corados com Nitrato de Prata (CRESTE et al., 2001) para genotipagem dos alelos; e os produtos do dos marcadores ISSR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo 2% corridos por 4h a 100V e visualizados sob luz UV em fotodocumentador Bio-Rad Gel DocTM XR+.

As análises foram realizadas em duas etapas. Na primeira etapa todos os indivíduos dos cruzamentos 17, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 33, 34, 35, 39 e 40 (Tabela 1) foram avaliados com os marcadores: Pp-UNICAMP6, Pp-UNICAMP15, Pp-UNICAMP21, PR15, PA01B7, ISSR9 e ISSR10 (Tabela 2); e os indivíduos dos cruzamentos 36 e 38 (Tabela 1) analisados com marcadores pré-selecionados de acordo com o polimorfismo dos marcadores em seus genitores: Pp-UNICAMP18, Pp-UNICAMP19 e ISSR7 (Tabela 2). Na segunda etapa optou-se por avaliar previamente os genitores dos cruzamentos 53, 56, 58, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 69, 72, 77 e 79 (Tabela 1) e, com base nesses resultados, avaliamos as progênies com os respectivos

marcadores que diferenciassem os seus genitores. A presença de alelos exclusivos do genitor masculino na progênie foi utilizada como critério de ocorrência de hibridação.

Resultados e discussão

Na primeira etapa analisamos oitenta e duas progênies dos cruzamentos de *P. regnellii* como genitor feminino e *P. guenoarum; P. plicatulum x P. guenoarum; P. atratum; P. malacophyllum; P. regnellii* e *P. lenticulare* como genitores masculinos. Na leitura do espectrofotômetro foi possível observar a quantidade de DNA extraído presente em cada amostra (TABELA 3) e a qualidade do DNA extraído observada em gel de Agarose 1,0% . A Figura 1 ilustra o DNA extraído das amostras 164 a 185, 60 e 61. Verificou-se a presença de DNA de boa qualidade em todas as amostras coletadas das progênies dos cruzamentos de diferentes espécies da gramínea do gênero *Paspalum*, sem degradação do ácido nucléico.

Foram realizadas as reações de PCR dos marcadores SSR e ISSR selecionados nos cruzamentos indicados para confirmação de hibridação com marcadores moleculares. O polimorfismo de cada marcador nos genitores de cada cruzamento está indicado na Tabela 4. Foram amplificados com sucesso sete marcadores, além dos marcadores PpUnicamp 19 e ISSR7 que foram eficientes somente nos cruzamentos *P. regnellii x P. regnellii e P. regnellii x (P. plicatulum x P. guenoarum).*

A Figura 2 mostra o sucesso da amplificação do marcador PR15 em algumas amostras e a Figura 3 mostra o perfil de amplificação deste marcador e do ISSR 9 ((GA)8-C).

A presença de alelos exclusivos do genitor masculino nas plantas das progênies F_1 foi utilizada como critério de ocorrência de hibridação.

Confirmaram-se híbridos nove indivíduos dos 82 indivíduos analisados na primeira etapa, um híbrido de *P. regnellii* BGP 215 x *P. malacophyllum* BGP 293 (cruzamento 22) com os marcadores PpUNICAMP15, PR15, ISSR (GA)8-C e ISSR (ATG)5-GA; um híbrido de *P.*

regnellii BGP 215 x *P. lenticulare* BGP 262 (cruzamento 20) com os marcadores PpUNICAMP06 e PpUNICAMP15; um híbrido de *P. regnellii* BGP 397 x *P. atratum* BGP 98 (cruzamento 25) com os marcadores PpUNICAMP15 e ISSR (AG)8-C; três híbridos de *P. regnellii* BGP 397 x *P. malacophyllum* BGP 293 (cruzamento 33) com os marcadores PpUNICAMP21, ISSR (GA)8-C e ISSR (ATG)5-GA e três híbridos de *P. regnellii* BGP 397 x *P. regnellii* BGP 341 (cruzamento 36) com os marcadores PR15, PpUNICAMP19 e ISSR (ATG)5-GA.

Na segunda etapa as análises foram feitas primeiramente nos genitores dos cruzamentos para otimização de tempo e custos. Os cruzamentos avaliados foram: *(P. regnellii x P. regnellii) x P. plicatulum (cruzamentos 53 e 72); (P. regnellii x P. regnellii) x P. atratum (cruzamentos 56 e 61); (P. regnellii x P. regnellii) x P. guenoarum (cruzamento 58); (P. regnellii x P. atratum) x P. plicatulum (cruzamento 61); (P. regnellii x P. atratum) x P. plicatulum (cruzamentos 62 e 64); (P. regnellii x P. atratum) x P.malacophyllum (cruzamentos 63, 65 e 66); (P. regnellii x P. regnellii) x P. malacophyllum(cruzamento 69)* e *(P. regnellii x P. malacophyllum) x P. plicatulum (cruzamentos 77 e 79).* Realizou-se as reações de PCR de todos os marcadores nos genitores dos cruzamentos citados (Tabela 5). A Figura 4 mostra a amplificação com sucesso dos marcadores PR15 e PA01B7 nos genitores da segunda etapa. Após análise dos resultados obtidos, foram selecionados os marcadores que diferenciavam os genitores de cada cruzamento (Figura 5) e, então, as progênies foram genotipadas com os respectivos marcadores polimórficos, seguindo os mesmos protocolos da primeira etapa.

Confirmaram-se híbridos vinte e oito indivíduos, de um total de 77 avaliados , três híbridos de *(P. regnellii x P. regnellii) x P. atratum* (um do cruzamento 56 e dois do cruzamento 61) com os marcadores PpUNICMP06, PpUNICAMP15, PR15 e ISSR (ATG)5-GA; quatro híbridos de *(P. regnellii x P. atratum) x P.malacophyllum* (cruzamento 63) com os marcadores PpUNICMP06, PpUNICAMP15, PR15 e ISSRR (GA)8-C48; 9 hibridos de *(P. regnellii x P.*

atratum) x P. plicatulum (oito do cruzamento 62 e um do cruzamento 64) com os marcadores PpUNICMP06, PpUNICAMP15, PR15, PR25 e ISSRR (GA)8-C48; 8 hibridos de *(P. regnellii x P. atratum) x P.malacophyllum* (quatro do cruzamento cruzamento 65 e quatro do cruzamento 66) com os marcadores PpUNICMP06, PR15, PR25, PR44, ISSR (ATG)5-GA e ISSRR (GA)8-C48; um hibrido *de (P. regnellii x P. regnellii) x P. malacophyllum* (cruzamento 69) com o marcador PR15; dois híbridos de *(P. regnellii x P. regnellii) x P. plicatulum* (cruzamento 72) com os marcadores PpUNICAMP06 e PR15 e um hibrido de *(P. regnellii x P. malacophyllum) x P. plicatulum* (cruzamento 77) com o marcador PR15.

Nessa etapa os marcadores utilizados não permitiram a identificação de híbridos somente em um dos cruzamentos avaliados *(P. regnellii x P. regnellii) x P. guenoarum*) (cruzamento 58).

Todos os híbridos identificados são materiais inéditos no programa de melhoramento genético de *Paspalum* e representam cruzamentos com combinações genéticas entre espécies ainda não identificadas na literatura.

Conclusão

A taxa de hibridação observada está de acordo com o esperado segundo dados da literatura para cruzamentos em *Paspalum*.

Os híbridos identificados até o momento representam materiais inéditos e serão avaliados dentro do programa de melhoramento de *Paspalum*.

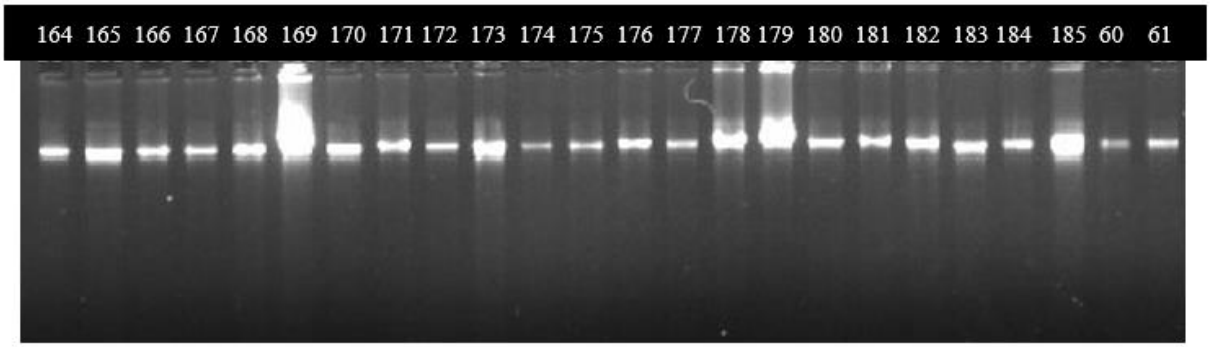

Figura 1. Captura de imagem do gel de Agarose 1,0% corado com brometo de etidio (10%)

para avaliar a qualidade do DNA extraído das amostras 164, 165 do cruzamento *P. regnellii x P. atratum*; 166, 167, 168, 169, 170, 171 172, 173, 174, 175 do cruzamento *P. regnellii x P. malacophyllum*; 176, 177, 178, 179, 180 do cruzamento *P. regnellii x P. atratum*; 181, 182, 183, 184, 185 do cruzamento *P. regnellii x P. regnellii* e 60, 61 do cruzamento *P. regnellii x P. guenoarum*. Foi aplicado no gel 3,0ul de produto PCR de cada amostra.

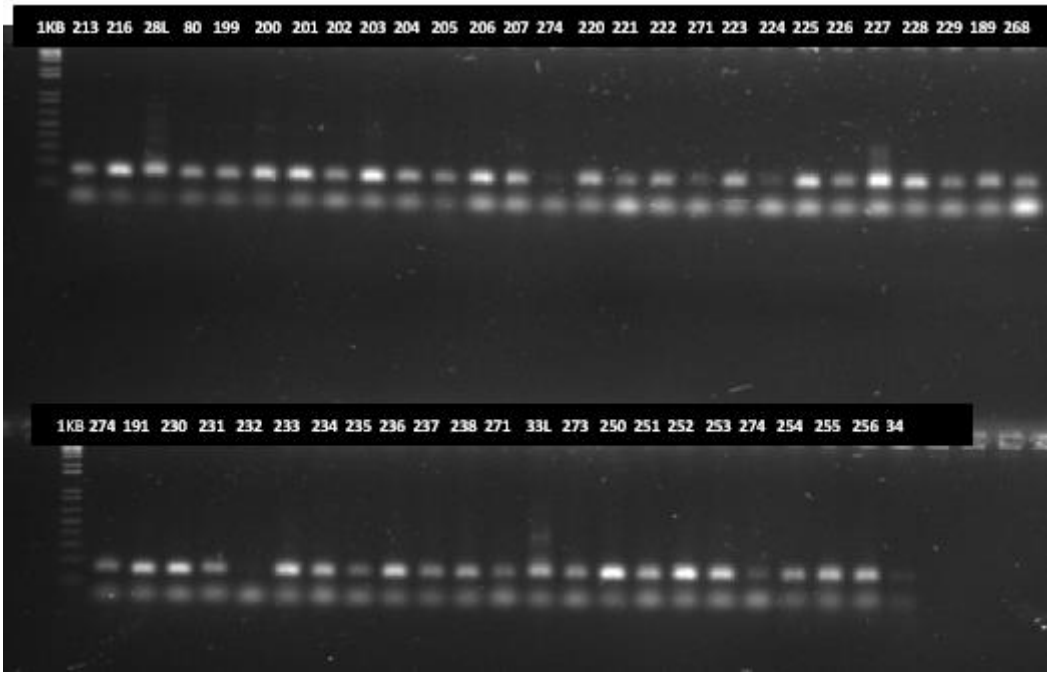

Figura 2. . Confirmação da amplificação do marcador PR 15 (tamanho esperado de amplificação entre 152 e 166 pb) em gel de Agarose 1,5% corado com Brometo de Etídio (10%), foi aplicado no gel 3,0ul de PCR. Os padrões de peso molecular estão indicados, em pares de base (pb). M1: padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen) e M2: padrão de peso molecular 50bp Ludwing.

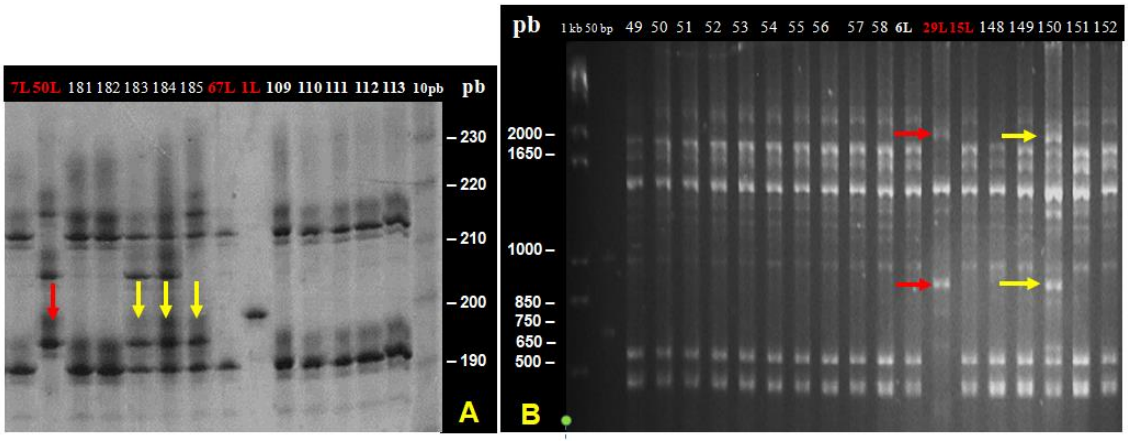

Figura 3. Perfil de amplificação dos marcadores (A) SSR PR15 em gel de Poliacrilamida 6% e (B) ISSR 9 (GA)8-C em gel de Agarose 2%. Setas vermelhas indicam bandas que diferenciam os genitores do cruzamento e setas amarelas indicam a presença dessa banda nas progênies, confirmando a hibridação dos indivíduos. Progênies do cruzamento *P. regnellii* BGP 397 (7L) x *P. regnellii* BGP 341 (50L) que se confirmaram híbridas: amostras 183, 184 e 185 (A). Progênie do cruzamento de *P. regnellii* BGP 215 (29L) x *P. malacophyllum* BGP 293 (15L) que se confirmou híbrida: amostra 150 (B). Os padrões de peso molecular estão indicados, em pares de base (pb). M1: padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen) e M2: padrão de peso molecular 50bp Ludwing.

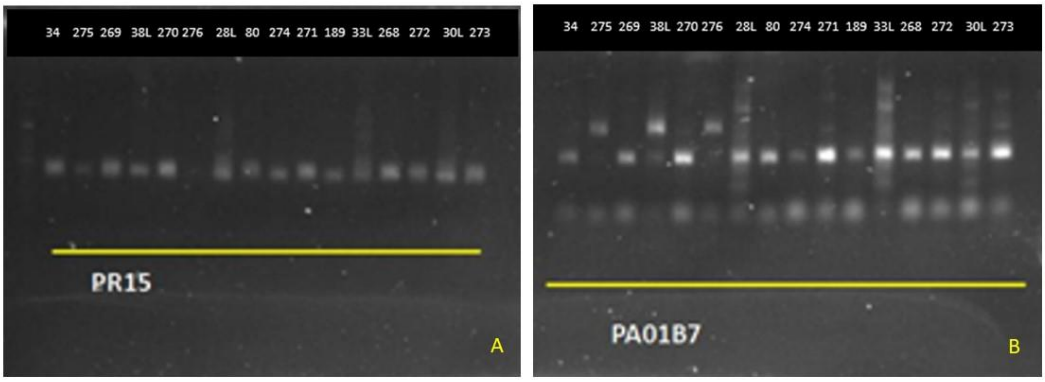

Figura 4. Capturas de imagem dos géis de Agarose 1,5% corados com brometo de etidio (10%) para avaliar a amplificação da reação de PCR dos marcadores moleculares (A) SSR PR15 (tamanho esperado de amplificação entre 188 e 255 pb) e (B) SSR PA01B7 (tamanho esperado

de amplificação entre 239 e 279 pb) realizadas nos genitores femininos e masculinos dos cruzamentos selecionados. Os códigos das amostras conforme indicado na Tabela 1 estão indicados em branco na parte superior da imagem.

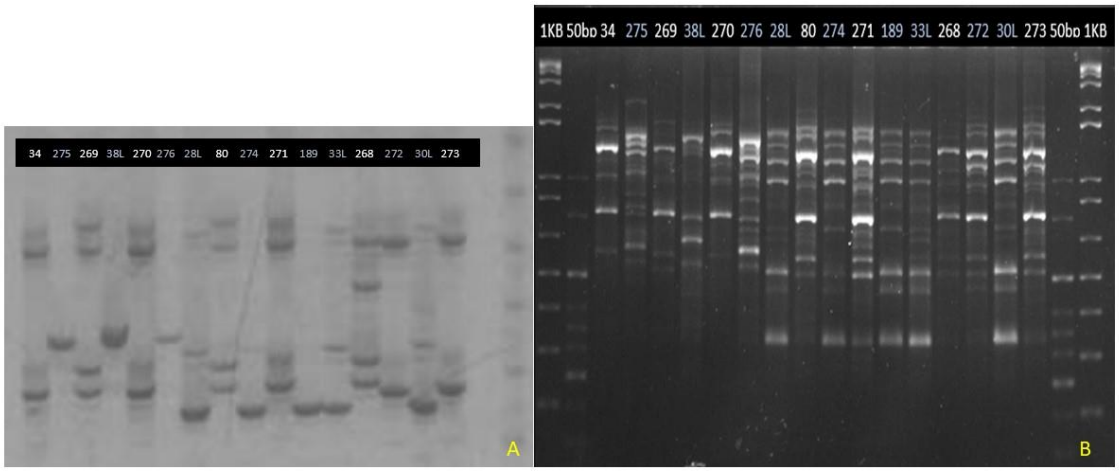

Figura 5. Perfil de amplificação dos genitores masculinos e femininos utilizando os marcadores (A) SSR PR15(tamanho esperado de amplificação entre 188 e 255 pb) em gel de Poliacrilamida 6%, os padrões de peso molecular estão indicados, em pares de base (pb). L: padrão de peso molecular 10 pb (Invitrogen) e (B) ISSR (GA)8-C (tamanho esperado de amplificação entre 1500 e 650 pb) em gel de Agarose 2%, os padrões de peso molecular estão indicados, em pares de base (pb). M1: padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen) e M2: padrão de peso molecular 50bp Ludwing.. Os códigos das amostras conforme indicado na Tabela 1 estão indicados em branco na parte superior da imagem.

Família/Cruzamento	Data	Genitor feminino	Genitor masculino	Espécies dos genitores	Número de plantas selecionadas	Código das plantas selecionadas	Código do laboratório (extração DNA)	Data extração DNA
						18_17_1	49	15/01/2019
						18_17_2	50	15/01/2019
						18_17_3	51	15/01/2019
						18_17_4	52	15/01/2019
17	01/04/2017	227_19186	123_23540	*P. regnellii x P. malacophyllum*	10	18_17_5	53	15/01/2019
						18_17_6	54	15/01/2019
						18_17_7	55	15/01/2019
						18_17_8	56	15/01/2019
						18_17_9	57	15/01/2019
						18_17_10	58	15/01/2019
20	23/03/2018	230_19186	120_22926	*P. regnellii x P. lenticulare*	1	18_20_1	28	10/01/2019
						18_21_1	145	29/01/2019
21	28/03/2017	230_19186	121_23540	*P. regnellii x P. malacophyllum*	3	18_21_2	146	28/01/2019
						18_21_3	147	29/01/2019
						18_22_1	148	29/01/2019
						18_22_2	149	29/01/2019
22	28/03/2017	230_19186	123_23540	*P. regnellii x P. malacophyllum*	5	18_22_3	150	28/01/2019
						18_22_4	151	28/01/2019
						18_22_5	152	28/01/2019
						18_25_1	161	29/01/2019
						18_25_2	162	28/01/2019
25	30/03/2018	242_21377	66_9610	*P. regnellii x P. atratum*	5	18_25_3	163	28/01/2019
						18_25_4	164	28/01/2019
						18_25_5	165	29/01/2019
						18_26_1	166	28/01/2019
						18_26_2	167	28/01/2019
26	29/03/2017	245_21377	125_23540	*P. regnellii x P. malacophyllum*	5	18_26_3	168	28/01/2019
						18_26_4	169	28/01/2019
						18_26_5	170	29/01/2019
						18_27_1	171	29/01/2019
						18_27_2	172	28/01/2019
27	29/03/2017	245_21377	127_23540	*P. regnellii x P. malacophyllum*	5	18_27_3	173	29/01/2019
						18_27_4	174	28/01/2019
						18_27_5	175	28/01/2019
28	28/03/2017	245_21377	177_12483	*P. regnellii x P. guenoarum*	2	18_28_1	30	10/01/2019
						18_28_2	31	10/01/2019
29	29/03/2017	245_21377	183_12483	*P. regnellii x P. guenoarum*	13	18_29_1	32	10/01/2019

						18_29_2	33	10/01/2019
						18_29_3	34	10/01/2019
						18_29_4	35	10/01/2019
						18_29_5	36	10/01/2019
						18_29_6	37	10/01/2019
						18_29_7	38	10/01/2019
						18_29_8	39	10/01/2019
						18_29_9	40	10/01/2019
						18_29_10	41	10/01/2019
						18_29_11	42	10/01/2019
						18_29_12	43	10/01/2019
						18_29_13	44	10/01/2019
						18_32_1	121	24/01/2019
32	29/03/2017	249_21377	130_23540	*P. regnellii x P. malacophyllum*	3	18_32_2	122	24/01/2019
						18_32_3	123	24/01/2019
						18_33_1	124	24/01/2019
33	01/04/2017	250_21377	131_23540	*P. regnellii x P. malacophyllum*	3	18_33_2	125	24/01/2019
						18_33_3	126	24/01/2019
						18_34_1	127	24/01/2019
34	01/04/2017	251_21377	123_23540	*P. regnellii x P. malacophyllum*	3	18_34_2	128	24/01/2019
						18_34_3	129	24/01/2019
						18_35_1	176	28/01/2019
						18_35_2	177	28/01/2019
35	30/03/2018	251_21377	66_9610	*P. regnellii x P. atratum*	5	18_35_3	178	28/01/2019
						18_35_4	179	28/01/2019
						18_35_5	180	28/01/2019
						18_36_1	181	28/01/2019
						18_36_2	182	28/01/2019
36	01/04/2017	252_21377	39_9300	*P. regnellii x P. regnellii*	5	18_36_3	183	29/01/2019
						18_36_4	184	28/01/2019
						18_36_5	185	28/01/2019
						18_38_1	109	22/01/2019
						18_38_2	110	22/01/2019
38	26/01/2018	263_22811	298_F1 37	*P. regnellii x (P. plicatulum x P. guenoarum)*	5	18_38_3	111	22/01/2019
						18_38_4	112	22/01/2019
						18_38_5	113	22/01/2019
						18_39_1	69	15/01/2019
39	30/03/2018	269_22811	66_9610	*P. regnellii x P. atratum*	2	18_39_2	70	15/01/2019
						18_40_1	114	22/01/2019
						18_40_2	115	22/01/2019
40	01/04/2017	271_22811	123_23540	*P. regnellii x P. malacophyllum*	7	18_40_3	116	22/01/2019
						18_40_4	117	22/01/2019
						18_40_5	118	22/01/2019

						18_40_6	119	22/01/2019
						18_40_7	120	22/01/2019
53	22/03/2018	318_B3	107_12645	*(P. regnellii x P. regnellii) x P. plicatulum*	1	18_53_1	191	27/08/2019
56	22/03/2018	331_B8	97_11681	*(P. regnellii x P. regnellii) x P. atratum*	1	18_56_1	192	27/08/2019
58	22/03/2018	340_B14	183_12483	*(P. regnellii x P. regnellii) x P. guenoarum*	1	18_58_1	193	27/08/2019
61	22/03/2018	340_B14	91_11681	*(P. regnellii x P. regnellii) x P. atratum*	5	18_61_1	194	27/08/2019
						18_61_2	195	27/08/2019
						18_61_3	196	27/08/2019
						18_61_4	197	27/08/2019
						18_61_5	198	27/08/2019
62	13/03/2018	352_C8	107_12645	*(P. regnellii x P. atratum) x P. plicatulum*	9	18_62_1	199	27/08/2019
						18_62_2	200	27/08/2019
						18_62_3	201	27/08/2019
						18_62_4	202	27/08/2019
						18_62_5	203	27/08/2019
						18_62_6	204	27/08/2019
						18_62_7	205	27/08/2019
						18_62_8	206	27/08/2019
						18_62_9	207	27/08/2019
63	13/03/2018	352_C8	121_23540	*(P. regnellii x P. atratum) x P.malacophyllum*	14	18_63_1	208	27/08/2019
						18_63_2	209	27/08/2019
						18_63_3	210	27/08/2019
						18_63_4	211	27/08/2019
						18_63_5	212	27/08/2019
						18_63_7	214	27/08/2019
						18_63_9	213	27/08/2019
						18_63_11	215	29/09/2019
						18_63_12	216	29/09/2019
						18_63_13	217	29/09/2019
						18_63_14	218	29/09/2019
						18_63_15	219	29/09/2019
64	14/03/2018	355_C9	107_12645	*(P. regnellii x P. atratum) x P. plicatulum*	1	18_64_1	220	29/09/2019
	15/03/2018	355_C9	107_12645	*(P. regnellii x P. atratum) x P. plicatulum*	2	18_64_3	221	29/09/2019
						18_64_4	222	29/09/2019
65	19/03/2018	355_C9	127_23540	*(P. regnellii x P. atratum) x P.malacophyllum*	7	18_65_1	223	29/09/2019
						18_65_2	224	29/09/2019
						18_65_3	225	29/09/2019
						18_65_4	226	29/09/2019
						18_65_6	227	29/09/2019

66	19/03/2018	355_C9	131_23540	*(P. regnellii x P. atratum) x P.malacophyllum*	10	18_65_7	228	29/09/2019
						18_65_8	229	29/09/2019
						18_66_1	230	29/09/2019
						18_66_2	231	29/09/2019
						18_66_3	232	29/09/2019
						18_66_4	233	29/09/2019
						18_66_5	234	29/09/2019
						18_66_6	235	29/09/2019
						18_66_7	236	29/09/2019
						18_66_9	237	29/09/2019
						18_66_10	238	29/09/2019
69	14/03/2018	364_C33	125_23540	*(P. regnellii x P. regnellii) x P. malacophyllum*	11	18_69_1	239	03/09/2019
						18_69_2	240	03/09/2019
						18_69_3	241	03/09/2019
						18_69_4	242	03/09/2019
						18_69_5	243	03/09/2019
						18_69_6	244	03/09/2019
						18_69_7	245	03/09/2019
						18_69_8	246	03/09/2019
						18_69_9	247	03/09/2019
						18_69_10	248	03/09/2019
						18_69_11	249	03/09/2019
72	14/03/2018	371_C35	107_12645	*(P. regnellii x P. regnellii) x P. plicatulum*	4	18_72_1	250	03/09/2019
						18_72_3	251	03/09/2019
						18_72_4	252	03/09/2019
						18_72_5	253	03/09/2019
77	22/03/2018	397_D27	107_12645	*(P. regnellii x P. malacophyllum) x P. plicatulum*	3	18_77_1	254	03/09/2019
						18_77_2	255	03/09/2019
						18_77_3	256	03/09/2019
79	22/03/2018	397_D27	97_11681	*(P. regnellii x P.malacophyllum) x P.plicatulum*	11	18_79_1	257	03/09/2019
						18_79_2	258	03/09/2019
						18_79_3	259	03/09/2019
						18_79_4	260	03/09/2019
						18_79_5	261	03/09/2019
						18_79_6	262	03/09/2019
						18_79_7	263	05/09/2019
						18_79_8	264	05/09/2019
						18_79_9	265	05/09/2019
						18_79_10	266	05/09/2019
						18_79_11	267	05/09/2019

Tabela 2. Marcadores moleculares microssatélites (SSR) e intermicrossatélites (ISSR) selecionados de acordo com a espécie dos genitores usados nas diferentes combinações de cruzamentos.

Marcador	Espécie para o qual foi desenvolvido	Temperatura de amplificação (ºC)	Tamanho esperado (pb)	Referência
PA01B7	*P. atratum*	60	239-279	Cidade et al. (2013)
Pp-UNICAMP06	*P. plicatulum*	51	155-169	Oliveira et al. (2016)
Pp-UNICAMP15		55	152-166	
Pp-UNICAMP18		65	119-153	
Pp-UNICAMP19		57	203-241	
Pp-UNICAMP21		55	145-205	
ISSR 7 (AG)8-C	-	49	~2500 a 350	Brugnoli et al. (2013)
ISSR 9 ((ATG)5-GA)	-	42	~2500 a 650	Usandizaga et al. (2015)
ISSR 10 ((GA)8-C)		48	~1500 a 650	
PR15	*P. regnellii*	60	188-255	Cidade et al. (2009b)
PR25			137-146	
PR44			157-130	

Tabela 3. Concentraões do DNA total extraído de 159 amostras de progênies de *Paspalum* estimadas em espectrofotômetro.

Código da amostra	ng/µl	260/280	260/230	Código da amostra	ng/µl	260/280	260/230	Código da amostra	ng/µl	260/280	260/230
28	283,57	1,76	0,97	**149**	224,02	1,96	1,26	**216**	490,68	1,99	1,83
30	354,82	1,94	1,54	**150**	215,84	2,08	0,84	**217**	507,02	1,98	1,47
31	259,15	1,99	1,64	**151**	146,11	1,95	1,16	**218**	942,10	2,59	0,43
32	265,25	1,99	1,66	**152**	172,86	1,98	1,34	**219**	744,86	2,04	1,84
33	252,23	1,92	1,28	**161**	433,08	2,05	1,78	**220**	368,39	2,01	2,01
34	209,27	1,92	1,43	**162**	159,16	1,99	1,05	**221**	498,52	1,98	1,73
35	232,40	1,96	1,45	**163**	324,05	2,27	0,59	**222**	769,74	2,05	2,05
36	282,72	1,98	1,76	**164**	161,52	2,21	0,54	**223**	451,63	2,00	1,89

37	221,47	1,98	1,51	**165**	343,35	2,02	1,62	**224**	567,41	1,96	1,83
38	257,81	1,97	1,75	**166**	132,05	1,96	1,12	**225**	401,51	2,00	1,87
39	222,77	1,99	1,57	**167**	168,89	1,97	1,26	**226**	429,16	2,01	1,96
40	257,49	1,96	1,80	**168**	196,99	1,96	1,10	**227**	419,66	2,00	1,86
41	346,73	1,89	1,46	**169**	175,44	1,89	0,94	**228**	415,78	2,01	1,90
42	338,45	2,02	1,56	**170**	198,39	1,98	1,41	**229**	452,45	1,93	1,60
43	307,56	1,81	1,04	**171**	196,53	2,04	1,64	**230**	476,55	2,00	2,03
44	190,57	1,96	1,74	**172**	216,12	1,95	1,21	**231**	386,81	2,00	1,84
49	192,78	2,00	1,45	**173**	347,09	1,97	1,57	**232**	569,25	1,98	2,10
50	153,74	1,98	1,07	**174**	244,19	2,00	1,39	**233**	388,42	1,95	1,67
51	139,75	1,78	1,29	**175**	143,72	1,93	1,06	**234**	670,18	2,07	1,99
52	261,07	1,91	1,38	**176**	217,62	1,97	1,44	**235**	539,02	2,00	1,99
53	102,58	1,88	1,19	**177**	148,57	2,00	1,12	**236**	93,74	1,90	1,53
54	141,36	1,93	1,33	**178**	150,46	2,03	1,26	**237**	573,85	1,95	1,85
55	278,73	1,95	1,47	**179**	138,06	1,95	1,26	**238**	489,80	2,01	2,01
56	163,89	1,98	1,03	**180**	154,54	1,98	1,26	**239**	414,23	1,96	1,78
57	186,34	1,87	1,00	**181**	157,52	2,06	1,53	**240**	472,10	1,91	1,17
58	160,79	1,93	1,20	**182**	262,96	2,03	1,58	**241**	251,49	1,95	1,58
69	266,30	1,99	1,52	**183**	178,66	1,97	1,33	**242**	378,29	1,98	1,59
70	41,19	1,85	0,87	**184**	113,07	2,02	1,04	**243**	528,30	1,95	1,76
109	224,81	1,99	1,40	**185**	135,75	2,00	1,23	**244**	196,85	1,99	1,52
110	220,53	1,91	1,18	**191**	425,09	2,01	2,00	**245**	197,80	2,02	1,71
111	238,49	1,92	1,16	**192**	490,68	1,99	1,83	**246**	207,80	1,98	1,58
112	240,14	2,00	1,33	**193**	507,02	1,98	1,47	**247**	400,73	1,96	1,50
113	182,10	1,94	1,32	**194**	942,10	2,59	0,43	**248**	346,28	2,03	1,83
114	280,34	2,01	1,36	**195**	744,86	2,04	1,84	**249**	274,63	1,94	1,47
115	293,46	1,92	1,52	**196**	368,39	2,01	2,01	**250**	340,16	1,99	1,59
116	191,61	1,94	1,32	**197**	498,52	1,98	1,73	**251**	360,00	1,99	1,78
117	175,41	1,92	1,19	**198**	769,74	2,05	2,05	**252**	438,91	1,91	1,41
118	365,76	1,96	1,54	**199**	451,63	2,00	1,89	**253**	371,89	1,96	1,71
119	327,07	1,93	1,23	**200**	567,41	1,96	1,83	**254**	258,97	1,98	1,44
120	260,82	1,97	1,45	**201**	401,51	2,00	1,87	**255**	342,01	1,99	1,68
121	411,48	2,05	1,57	**202**	429,16	2,01	1,96	**256**	209,53	1,97	1,60
122	173,50	1,94	1,25	**203**	419,66	2,00	1,86	**257**	253,40	2,00	1,62
123	139,83	1,95	1,00	**204**	415,78	2,01	1,90	**258**	382,98	1,99	1,75
124	235,22	1,98	1,41	**205**	452,45	1,93	1,60	**259**	297,10	1,95	1,45
125	178,61	1,99	1,30	**206**	476,55	2,00	2,03	**260**	356,57	1,98	1,51
126	200,07	1,99	1,19	**207**	386,81	2,00	1,84	**261**	409,38	1,99	1,73
127	211,06	1,96	1,24	**208**	569,25	1,98	2,10	**262**	59,97	1,87	0,59
128	200,84	1,93	1,29	**209**	388,42	1,95	1,67	**263**	526,02	1,87	1,29
129	200,61	2,01	1,37	**210**	670,18	2,07	1,99	**264**	353,66	1,90	1,22
145	272,96	2,64	0,41	**211**	539,02	2,00	1,99	**265**	395,09	2,22	0,59

146	134,15	2,00	1,31	**214**	489,80	2,01	2,01	**266**	373,25	1,96	0,93
147	252,37	2,03	1,47	**213**	573,85	1,95	1,85	**267**	183,08	1,80	1,15
148	219,50	1,98	1,41	**215**	425,09	2,01	2,00				

Tabela 4 – Resultado da análise de polimorfismo dos marcadores moleculares avaliados para cada cruzamento com base em dados de projetos anteriores.

Cruzamento (N° do cruzamento)	**PA01B7**	**PpUnicamp06**	**PpUnicamp15**	**PpUnicamp18**	**PpUnicamp19**	**PpUnicamp21**	**PR15**	**PR25**	**PR44**	**ISSR7**	**ISSR9**	**ISSR10**
***P. regnellii x P. malacophyllum* (17)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. lenticulare* (20)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. malacophyllum* (21)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. malacophyllum* (22)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. atratum* (25)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. malacophyllum* (26)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. malacophyllum* (27)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. guenoarum* (28)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. guenoarum* (29)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. malacophyllum* (32)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. malacophyllum* (33)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. malacophyllum* (34)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. atratum* (35)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. regnellii* (36)**	ND	D	D	ND	D	ND	D	NI	NI	D	ND	ND
***P. regnellii x (P. plicatulum x P. guenoarum)* (38)**	D	D	D	ND	D	ND	D	NI	NI	D	ND	D
***P. regnellii x P. atratum* (39)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D
***P. regnellii x P. malacophyllum* (40)**	D	D	D	NI	NI	D	D	NI	NI	NI	D	D

***(P. regnellii x P. regnellii) x P. plicatulum* (53)**	D	D	D	NI	NI	D	D	ND	D	ND	D	D
***(P. regnellii x P. regnellii) x P. atratum* (56)**	ND	D	D	NI	NI	D	D	ND	D	D	D	D
***(P. regnellii x P. regnellii) x P. guenoarum* (58)**	D	D	D	NI	NI	D	D	D	D	D	D	D
***(P. regnellii x P. regnellii) x P. atratum* (61)**	ND	D	D	NI	NI	D	D	D	D	D	D	D
***(P. regnellii x P. atratum) x P. plicatulum (*62)**	D	D	D	NI	NI	D	D	D	D	X	D	D
***(P. regnellii x P. atratum) x P.malacophyllum* (63)**	D	D	D	NI	NI	D	D	D	D	D	D	D
***(P. regnellii x P. atratum) x P. plicatulum* (64)**	D	D	D	NI	NI	D	D	D	D	D	D	D
***(P. regnellii x P. atratum) x P.malacophyllum* (65)**	D	D	D	NI	NI	D	D	D	D	D	D	D
***(P. regnellii x P. atratum) x P.malacophyllum* (66)**	D	D	D	NI	NI	D	D	D	D	D	D	D
***(P. regnellii x P. atratum) x P. malacophyllum* (69)**	D	D	D	NI	NI	D	D	D	D	D	D	D
***(P. regnellii x P. atratum) x P. plicatulum* (72)**	D	D	D	NI	NI	D	D	ND	D	D	D	D
***(P. regnellii xP .malacophyllum) x P. plicatulum* (77)**	D	D	D	NI	NI	ND	D	D	D	ND	D	D
***(P. regnellii x P.malacophyllum) x P. plicatulum*(79)**	ND	D	D	NI	NI	D	D	D	D	D	D	D

D - marcador difere o perfil do genitor feminino do masculino

ND - marcador não difere o perfil do genitor femino do genitor masculino

NI - não nformativo pois o marcador não é especifico para a especie

Dedicatória

"Dedico esse trabalho a quem não pode estar fisicamente comigo nesse momento, mas que esta espiritualmente presente em toda minha trajetória de vida. Meu amor por vocês, Pai Fernando, Vó Tereza e Vô Sebastião é infinito e tenho certeza que estão orgulhosos por mais esta minha conquista."

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus por estar comigo em todos os momentos e ser a minha fonte de força e fé.

A minha querida Mãe por todo amor dedicado a mim, por ter me ensinado a ter persistência e a encarar todos os desafios que me foram propostos. Aos tantos conselhos e doses de animo que me deu me fazendo enxergar mesmo nas horas mais difíceis que eu sou capaz. Sem você eu não teria conseguido, sou imensamente grata por ter e ser de você. Amo você!

A minha irmã que vibrou a cada semestre concluído, que ajudou de tantas formas no decorrer desses cinco anos eu chegar ao final desse ciclo. Obrigada por ser tão diferente e completar exatamente tudo que falta em mim. Amo você!

A minha querida prima Cida por fazer desse meu sonho uma realidade, nada seria possível sem a sua ajuda. Gratidão eterna.

A minha Vó Ermínia por todas orações e palavras de incentivo, eu amo tanto você.

Aos meus familiares que tias, tios, primos e primas que torceram por mim nessa caminhada e por me incentivarem a ir em frente. Amo vocês.

As minhas tão queridas e amadas amigas Nayra Nascimento, Izabella Angelelli, Paloma Manente e Tatiane Silva que fizeram dessa trajetória mais alegre e mais divertida, que saudade eu vou sentir de nós sempre juntas.

Aos meus tão queridos professores, não tenho palavras pra agradecer tudo que eu aprendi com vocês nesses anos.

Aos meus colegas Embrapianos que fizeram meus dias no laboratório incríveis e por todo conhecimento eu trocamos, em especial a minha amiga-irmã Naiana Dinato que me ensinou tanto. Minhas melhores lembranças com toda certeza serão dos momentos em que a gente se divertiu, comemorou e aprendeu juntas, serei eternamente grata por ter convivido e aprendido tanto com você "miga".

Ao Sr. Wilson que gentilmente me acompanhou em tantas etapas no laboratório e que me fez ter certeza que organização é tudo rs.

A minha orientadora Cristiana por todas as conversas, concelhos e puxões de orelha. "Prof" você é maravilhosa e que sorte a minha ter o privilegio de ter você como minha mentora, obrigada por todo conhecimento compartilhado.

A minha co-orientadora do TCC e também orientadora de estágio na Embrapa Bianca, eu não sei mensurar o quanto foi incrível e enriquecedor estagiar pra você. O meu olhar sobre as questões acadêmicas tomou outro sentido depois do dia 08/12/2018, obrigada pela paciência e pelo carinho com que me acolheu na sua equipe. Obrigada pela oportunidade.

Aos meus amigos que acompanharam ao longo desses cinco anos todo o esforço e que compreenderam a minha ausência, eu amo cada um de vocês.

E a todos que diretamente ou indiretamente torceram por mim e ajudaram pra que esse sonho se tornasse realidade. Obrigada!

ABSTRACT: The research is justified in extracting, quantifying and genotyping the DNA from samples collected from F1 progeny of intra- and interspecific crossings with molecular markers in order to confirm their hybrid or non hybrid condition. The project was carried out in Embrapa Southeastern Cattle Raising, where P. regnellii and P. regnellii hybrids were used as female genitors, and the following species were used as male genitors: (P. plicatulum x P. guenoarum); P. atratum; P. malacophyllum; P. regnellii; P. lenticulare; P. plicatulum; and P. guenoarum. Of these crossings, 159 F1 progeny were visually pre-selected by the bestist and were analyzed in this work. The DNA was extracted according to the CTAB protocol, the quantification of the extracted DNAs was performed in a spectrophotometer and its quality was verified in agarose gel 1.5% stained with ethidium bromide (10%). Based on previous studies twelve molecular markers were selected for the genotyping of possible hybrids. From that point on, PCR was performed and the amplification products were separated by electrophoresis in 6% polyacrylamide gel and 2% Agaro

se gel. The presence of alleles unique to the male genitor in the progeny was used as criteria for hybridization.

Keywords: hybridization; microsatellite marker, intermicrosatellite marker

Referências bibliográficas

ABIEC. **Associação brasileira das indústrias exportadoras de carne**. Disponível em: http://www.grupogaz.com.br/editora/anuarios/lista_categoria/cat:22. Acesso em: 29 agosto 2020.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas.** Viçosa - MG: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 547p.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2. Ed. Viçosa – MG: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 453 p.

CIDADE, F. W. et al. **Isolation and characterization of microsatellite loci in Paspalum notatum Flüggé (Poaceae)**. Conservation genetics, v. 10, n. 6, p. 1977-1980, 2009.

CLAYTON, W.D.; RENVOIZE, S.A. **Genera graminum:** grasses of the world. HerMagesty's Stationary Office. London, KewBulletin Aditional Series, p.13, 1986.

CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. **Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining**. Plant Molecular Biology Reporter, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. Núcleo de Tecnologia da Informação (NTI). AleloVegetal. Disponível em: <http://alelobag.cenargen.embrapa.br/AleloConsultas/Home/index.do>. Acesso em: Março de 2020.

ESTANISLAU, M.L.L.; CANÇADO Jr., F.L. **Aspectos econômicos da pecuária de corte.** Informe Agropecuário, v.21, n.205, p. 5-16, 2000.

IBGE. **Censo Agropecuário Brasileiro**, 2017 Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro: IBGE 2019, p. 38. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: Julho de 2020.

MIRANDA FILHO, J.B. **Melhoramento genético vegetal:** princípios e métodos; melhoramento genético e melhoramento ambiental. Piracicaba: ESALQ/Departamento de Genética, 1994. p. 1-6 (Publicação Didática).

QUARÍN, C. L.; VALLS, J. F. M.; URBANI, M. H. **Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics.** Tropical Grasslands, v. 31, n. 2, p. 114-116, 1997

SARTOR, M. E.; QUARIN, C. L.; ESPINOZA, F. **Mode of reproduction of Colchicine-Induced Paspalum plicatulum tetraploids**. Crop Science, v.49, n.4, p.1270-1276, 2009.

SARTOR, M. E. *et al*. **Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species**. Plant Systematics and Evolution, v. 293, n. 1, p. 31-41, 2011.

USANDIZAGA, S. C. F, et al. **Genetic and morphological characterization of Acroceras macrum Stapf**. Grass and forage science, v. 70, n. 4, p. 695-704, 2015.

ZANINE, A.M.; MACEDO JUNIOR, G. **Importância do consumo da fibra para nutrição de ruminantes**. Revista Eletrônica de Veterinária. v.7, n.4, p.1-12, 2006.