

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Identificação e confirmação de hibridação da safra 2015/2016 em *Paspalum* L. (Poaceae) com marcadores SSR e ISSR

Marcela Mauruto Lopes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba - MG

Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Identificação e confirmação de hibridação da safra 2015/2016 em *Paspalum* L. (Poaceae) com marcadores SSR e ISSR

Marcela Mauruto Lopes

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

Co-orientadora: Dra. Bianca Baccili Zanotto Vigna

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba - MG

Julho – 2018

Dedico este trabalho aos meus avós paternos e maternos, “In Memoriam”, pela existência de meus pais, Carmem e Enéas, pois sem eles este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam.

AGRADECIMENTOS

A minha família que sempre foram e serão a base de tudo.

Aos meus amigos da faculdade que fizeram essa fase ser a melhor da minha vida.

Aos meus amigos de São Carlos que mesmo de longe deram apoio de alguma forma.

Ao meu namorado João Vitor que sempre esteve ao meu lado me apoiando.

Aos Professores da UFU- Pontal pela atenção, amizade e puxões de orelha.

Ao Dr. Frederico de Pina Matta pelo material fornecido e discussões ao longo da execução do trabalho e ao Dr. Wilson Malagó Junior pelo apoio técnico.

À Embrapa que deu a oportunidade do estágio, o espaço fornecido e o material.

À Dra. Bianca pela orientação e conhecimento passado.

Aos demais técnicos dos Laboratórios da Embrapa.

À Dra. Alessandra Pereira Fávero e à Dra. Fernanda Ancelmo de Oliveira, membros da banca examinadora, por aceitarem o convite para fazerem parte da avaliação deste trabalho, pelas sugestões e opiniões dadas ao trabalho apresentado.

E agradeço as pessoas que de alguma forma fizeram parte desse trabalho.

Resumo

O sistema de produção animal em pasto, no Brasil, usa um número reduzido de cultivares de gramíneas forrageiras tropicais. Por conta das alterações climáticas globais, a situação tende a se agravar e espécies nativas podem ser boas alternativas para superar tais problemas. Algumas espécies do gênero *Paspalum* são nativas do Brasil e possuem grande potencial forrageiro. O objetivo deste estudo é confirmar a obtenção de híbridos em cruzamentos realizados dentro do Programa de Melhoramento Genético de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste, utilizando marcadores microssatélites (SSR) e inter-microssatélites (ISSR). Foram analisadas 33 famílias do gênero *Paspalum*, com oito marcadores, quatro SSR (PR15, Pp-UNICAMP06, Pp-UNICAMP08 e PA01B7) e quatro ISSR (1, 8, 9 e 10). De acordo com a literatura, as amostras foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e submetidos a eletroforese para visualização das bandas. Foram identificados 44 híbridos com os marcadores SSR PR15 e PpUNICAMP06 e todos os ISSRs. Os marcadores ISSR se mostraram mais informativos para certificação de híbridos, os quais serão avaliados agronomicamente no programa de melhoramento.

Palavras-chave: forrageiras; produção animal; espécies nativas; teste de paternidade

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
5. TABELA 1.....	16
6. TABELA 2.....	17
7. TABELA 3.....	18
8. TABELA 4.....	19
9. FIGURA 1.....	20
10. FIGURA 2.....	21
11. FIGURA 3.....	22
12. FIGURA 4.....	23
13. FIGURA 5.....	24
14. ANEXO 1.....	25

1. INTRODUÇÃO

Nos 40 anos anteriores à 2006, houve uma perda de aproximadamente 54% das pastagens nativas no Brasil (cerca de 37 milhões de hectares - Censo Agropecuário IBGE, 2006), ou seja, houve uma enorme perda em diversidade vegetal, principalmente de plantas herbáceas, componentes naturais da paisagem nas formações campestres e base alimentar de herbívoros. É evidente que ao se observar os números, percebe-se que o cultivo de pastagens favoreceu a expansão da pecuária no Brasil, por outro lado, perdeu-se em diversidade vegetal. Tendo em vista a atual situação, é necessário buscar opções forrageiras que se orientem em direção a maior e melhor sustentabilidade da pecuária (Cidade 2011).

O interesse pelo cultivo de boas espécies forrageiras nativas é crescente, devido, basicamente, à adaptação destas às condições edafoclimáticas da sua região de origem (Nabinger 1997). De acordo com Jacques & Nabinger (2006) o manejo adequado do pastoreio e o uso mínimo de insumos permitiriam a muitas espécies nativas, maior produtividade quando comparadas às espécies exóticas, o que é mais sustentável e economicamente viável (Jacques e Nabinger 2006). Dentre as espécies forrageiras nativas, o gênero *Paspalum* ocupa um lugar de destaque.

O gênero *Paspalum* faz parte da tribo Paniceae, e da família Poaceae, possui de 330 espécies (Zuloaga e Morrone, 2005). Essas espécies vivem em clima quente, tropical, subtropical e temperado quente. A maioria tem origem americana, e é encontrada em diversos países, principalmente Brasil, Paraguai, norte da Argentina e Uruguai. Como o clima de, pelo menos, a maior parte do Brasil é favorável para o seu crescimento e estabelecimento, muitas espécies desse gênero são encontradas nesse país. Estima-se a ocorrência de 214 espécies no Brasil (Flora do Brasil 2020).

Esse gênero possui uma grande importância econômica devido a sua alta capacidade de se adaptar aos diferentes ecossistemas e a sua grande diversidade, apresentando potencial como forragem e como gramados. Na maioria das formações vegetais estudadas, esse gênero é dominante e responsável pela maior taxa de forragem produzida e disponível (Batista e Regitano-Neto 1999).

A maioria das espécies do gênero *Paspalum* é poliploide apomítica, ou seja, possuem mais de dois conjuntos de cromossomos homólogos e uma reprodução na qual não ocorre fecundação e sim uma clonagem da semente, originando uma planta idêntica a planta-mãe. Algumas espécies são sexuais ou apresentam genótipos sexuais, já que podem ocorrer apomixia e sexualidade dentro da mesma espécie (Ortiz et al. 2013). Cruzamentos interespecíficos e intraespecíficos tem sido obtido (Novo et al. 2017).

A Embrapa Pecuária Sudeste, localizada no município de São Carlos-São Paulo, possui o Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG) que detém cerca de 450 acessos, de 50 espécies, conservados com grande diversidade genética (Alelo 2018). O BAG de *Paspalum* tem como objetivo a preservação, a caracterização e a avaliação de recursos genéticos. Essa unidade vem desenvolvendo pesquisas com a intenção de obter novas cultivares forrageiras e para gramados desse gênero, tendo apoio de diversas unidades da Embrapa, de Universidades e da Unipasto (Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Sementes Forrageiras). Desde 2015, cruzamentos controlados têm sido realizados dentro do Programa de Melhoramento de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste a fim de obter híbridos intra e interespecíficos com características de interesse agrônômico e vigor híbrido.

Os marcadores moleculares proporcionam a caracterização genética de um alto número de genótipos através de procedimentos relativamente rápidos e simples. Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (Ferreira e Grattapaglia 1998). Milach (1998a) descreve que marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente.

Existem vários tipos de marcadores descritos na literatura e um dos maiores desafios é na escolha do marcador, já que é preciso que haja uma associação entre o objetivo do projeto e o marcador molecular escolhido. Para que haja êxito na escolha do marcador é preciso conhecer bem

cada marcador disponível (Borém e Fritsche-Neto 2013). Dentre esses marcadores descritos estão os marcadores baseados em PCR.

A reação de PCR provém do inglês *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase) e consiste em uma técnica que amplifica fragmentos de DNA *in vitro* pela ação de uma enzima de replicação. Basicamente o procedimento é: (1) desnaturação do DNA de fita dupla pelo aumento da temperatura; (2) anelamento do *primer* na fita molde através de uma temperatura específica; (3) síntese da fita nova através da enzima DNA polimerase; (4) desnaturação e um novo ciclo (Borém e Fritsche-Neto 2013).

Os Marcadores Microsatélites, também chamados de SSR (*simple sequence repeats*), são regiões de DNA repetidas não codificantes compostas por pequenos motivos de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem, que ocorrem como elementos repetitivos intercalados em todos os genomas eucarióticos (Tautz e Renz 1984). Os SSR se destacam pela grande variação no número de repetições, que são resultados de eventos mutagênicos dinâmicos e complexos, por exemplo: *crossing over* desigual, retrotransposição e deslizamento de DNA polimerase (*slippage*) (Borém e Fritsche-Neto 2013).

Os Marcadores ISSR (*Inter simple sequence repeat*) são outro tipo de marcador baseado em PCR que também tem sido bastante utilizado. Essa técnica consiste na amplificação de segmentos de DNA localizados entre duas regiões microsatélites idênticas e utiliza as sequências de microsatélite como *primer* único nas reações de PCR, possibilitando a amplificação de diferentes regiões entre dois SSR, ao mesmo tempo (Zietkiewicz et al. 1994). Além disso, os ISSR usam *primers* universais, isto é, *primers* aleatórios na qual a sequência não depende da espécie estudada, esse fato torna a técnica mais acessível quando o trabalho envolve várias espécies. Essa técnica é comumente utilizada em estudos de diversidade, mapeamento e seleção assistida.

Este trabalho tem como objetivo confirmar a obtenção de híbridos em cruzamentos intra e interespecíficos do programa de melhoramento genético de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste utilizando marcadores microssatélites (SSR) e inter-microssatélites (ISSR).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Em 2016, dentro do Programa de Melhoramento Genético de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP), foram realizados diversos cruzamentos que originaram 33 famílias (Tabela: 1), compostas por um genitor feminino, um genitor masculino e um número variável de progênies F₁, totalizando 190 progênies F₁ analisadas. As progênies avaliadas foram visualmente selecionadas, pelo melhorista, dentre todas as progênies obtidas dos cruzamentos, a fim de diminuir o número de plantas avaliadas molecularmente. Foram utilizados, para comparação, quatro plantas de um mesmo genótipo de genitor masculino, e o primeiro nome citado do cruzamento sempre será o do genitor feminino.

O DNA dos indivíduos acima citados foi previamente extraído, quantificado e diluído a 10ng/ul, e estava disponível para uso no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Pecuária Sudeste. Os marcadores moleculares SSR e ISSR utilizados foram selecionados na literatura e estão descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Posteriormente os DNAs foram submetido a PCR em Termociclador C1000 Touch™, de acordo com a literatura.

Após a amplificação do material, cada marcador foi submetido a um tipo de gel em eletroforese para separação e visualização dos amplificados. Os marcadores ISSR foram aplicados no gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, submetidos à eletroforese de três a quatro horas a 100V e visualizado no Fotodocumentador Bio-Rad Universal. Para os marcadores microssatélites, foi feita uma verificação de amplificação no gel de agarose 3% corado com brometo de etídio em eletroforese por uma hora a 100V. Seguido dessa verificação, as amostras que amplificaram com sucesso foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 6% por duas a três horas a 60W, e corado com nitrato de prata, segundo protocolo de Creste et al. (2002).

Depois desses dois procedimentos, as bandas foram analisadas e comparadas. A confirmação de hibridação é realizada pela presença, nas progêneses, de bandas que são presentes no genitor masculino e são ausentes no genitor feminino de cada cruzamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de marcadores moleculares é comumente reportado na literatura para a identificação de híbridos, evidenciando a importância destes marcadores como ferramentas no programa de melhoramento vegetal. Inter-microsatélites foram utilizados em alcachofra (Bianco et al. 2011), *Texas bluegrass* (Goldman 2008) e feijão mungo (Khajudparn et al. 2012), e marcadores microsatélites na avaliação da eficiência de cruzamentos no feijão comum (Morais et al. 2016) e hibridização interespecífica do algodão (Newascar et al. 2013).

As vantagens do uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético sobre o uso de apenas marcadores fenotípicos ou morfológicos residem no fato de que os marcadores moleculares são ilimitados, geralmente facilmente detectáveis, geram um alto nível de polimorfismo entre os genótipos testados, são neutros em relação aos efeitos ambientais, com pouco ou nenhum efeito de epistasia ou pleiotropia, e geralmente se comportam como traços de herança simples e previsível (Barros e Souza 2012).

Os oito marcadores moleculares avaliados neste trabalho amplificaram com sucesso, sendo que seis foram eficientes na detecção de 44 híbridos nas famílias analisadas (Tabela 4), o que representa 23,15% das progêneses avaliadas. Como as progêneses avaliadas foram visualmente selecionadas a partir do número total de progêneses obtidas nos cruzamentos, fica difícil comparar a taxa de obtenção de híbridos com dados da literatura. Os híbridos foram obtidos a partir dos cruzamentos *P. virgatum* x *P. atratum* e de *P. regnellii* com *P. plicatulum*, *P. malacophyllum*, *P. atratum*, *P. lenticulare* e *P. regnellii*.

Dentre estes os marcadores que foram informativos, dois são do tipo microsatélites, sendo que foram analisados num total de quatro marcadores desse tipo, e quatro são do tipo inter-microsatélites,

obtendo total aproveitamento desse tipo de marcador. As Figuras 1-5 mostram, em algumas famílias, as bandas que indicam hibridação, ou seja, que estão presentes nas progênes e nos genitores masculinos e ausentes nos genitores femininos.

Os marcadores SSR PR15 e ISSR 1, 8, 9 e 10 foram analisados em todas as famílias, adquirindo bons resultados na identificação (Tabela 4). Por conta do curto período de execução e da carga horária reduzida, os marcadores SSR Pp-UNICAMP06 e Pp-UNICAMP08 foram os únicos avaliados apenas em quatro famílias (29, 30, 31 e 32), sendo que apenas o marcador Pp-UNICAMP06 identificou híbridos na família 31 (Figura 5). Os microssatélites Pp-UNICAMP08 e PA01B7 utilizados nesse experimento não foram eficientes na identificação de híbridos nas famílias em estudo.

Os marcadores ISSR foram mais eficientes na identificação, provavelmente porque esses marcadores usam *primers* universais, ou seja, *primers* aleatórios que independem das espécies estudadas, e por apresentarem muitas bandas.

Estes novos híbridos representam novas e importantes combinações genéticas, sendo que, até o momento, não haviam sido descritos na literatura híbridos F₁ com a maioria das combinações genéticas estudadas neste trabalho. Os novos híbridos serão incorporados no Programa de Melhoramento Genético de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste, os quais serão avaliados quanto a resistência de pragas, produtividade e outras características de interesse.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Alelo (2017) **Sistema Informatizado de Recursos Genéticos**. Disponível em: <<http://alelo.cenargen.embrapa.br/>>. Acesso em: Jun. 2018.

Barros EG e Souza TLPO (2012) Biotecnologia na cultura do feijoeiro. In Cançado GMA e Londe LN (eds) **Biotecnologia aplicada à agropecuária**. Editora Epamig, Caldas, p. 351-370.

Barreto, IL. O Gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul. Tese Livre Docência - UFRGS. 258p. 1974.

Batista AR e Regitano Neto A (1999) Espécies do gênero *paspalum* com potencial forrageiro. In: **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMANA DO ESTUDANTE, 13., 1999, São Carlos, SP. Utilização de forrageiras para intensificação da produção de carne e leite-anais. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 1999. p. 59-71. Editado por Rogerio T. Barbosa, Armando A. Rodrigues, Eli Schiffler, Luciano A. Correa, Sergio Esteves, 2000.

Bered F, Barbosa Neto JF e Carvalho, FIF (1997) Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural. Santa Maria 27**: 513-520.

Bianco CL, Fernández AJ, Migliaro D, Crinò P e Egea-Gilabert C (2011) Identification of F₁ hybrids of artichoke by ISSR markers and morphological analysis. **Molecular Breeding 27**: 157–170.

Borém, A e Fritsche-Neto R (2013) **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema. 336p.

Borém A e Miranda GV (2005) **Melhoramento de Plantas**. Editora UFV, Viçosa. 523p.

Brugnoli EA, Urbani MH, Quarin CL, Martínez EJ e Acuña CA (2013) Diversity in diploid, tetraploid, and mixed diploid–tetraploid populations of *Paspalum simplex*. **Crop Science 53**: 1509-1516.

Chase A (1929) **The North American Species of Paspalum**. United States National Herbarium, Washington, 310p.

Cidade FW (2011) **Estudos genéticos-moleculares no gênero Paspalum L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae)**. Tese de Doutorado em Genética e Biologia Molecular- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP.

Cidade FW, Dall’Agnol M, Bered F e Souza-Chies TT (2008) Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flüggé (Paniceae: Panicoideae). **Genetic resources and crop evolution 55**: 235-246.

Cidade FW, Souza-Chies TT, Batista LAR, Dall’Agnol M, Zucchi MI, Jungmann L e Souza AP (2009a) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Paspalum notatum* Flügge (Poaceae). **Conservation Genetics** 10: 1977–1980.

Cidade FW, de Souza-Chies TT e Souza, AP (2009b) Desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélite para *Paspalum regnellii* Mez a partir de biblioteca genômica enriquecida. In: 60° Congresso Nacional de Botânica, 60° Congresso Nacional de Botânica, Feira de Santana.

Cidade FW, Souza-Chies TT, Souza FHD, Batista LAR, Dall’Agnol M, Valls JFM, Zucchi MI e Souza AP (2010) Microsatellite loci for *Paspalum atratum* (Poaceae) and cross-amplification in other species. **American Journal of Botany** 97: 107-110

Ferreira ME e Grattapaglia D (1998) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília. p.220.

Goldman JJ (2008) The use of ISSR markers to identify Texas bluegrass interspecific hybrids. **Plant breeding** 127: 644-646.

IBGE. Censo Agropecuário. 2006. Disponível em:<
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default.shtm>> .
Acesso em: 20 de Jun. 2018

Jacques AVA e Nabinger C (2006) O ecossistema pastagens naturais. I Simpósio de Forrageiras e Produção Animal. **Importância e potencial produtivo da pastagem nativa**. Anais... p.7-10, Porto Alegre: Editora da ULBRA.

Khajudparn P, Prajongjai T, Poolsawat O e Tantasawat PA (2012) Application of ISSR markers for verification of F1 hybrids in mungbean (*Vigna radiata*). **Genetics and Molecular Research** 11: 3329-3338.

Milach SCK (1998a) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS. 140p.

Morais SRP, Vieira AF, Almeida LCS, Rodrigues LA, Melo PGS, Faria LC, Melo LC, Pereira HS e Souza TLPO (2016) Application of microsatellite markers to confirm controlled crosses and assess genetic identity in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 16: 234-239.

Nabinger C (1997) **Princípios da exploração intensiva das pastagens**. In: PEIXOTO, A. M., MOURA, J. C., FARIA, V. P. (Eds.). Simpósio sobre manejo de pastagens: produção animal a pasto, 13, Anais... p. 15-95. Piracicaba.

Newaskar GS, Chimote VP, Mehetre SS e Jadhav AS (2013) Interspecific hybridization in *Gossypium* L.: characterization of progenies with different ploidy-confirmed multigenomic backgrounds. **Plant Breeding** 132: 211-216.

Oliveira FA, Cidade FW, Fávero AL, Vigna BBZ e Souza AP (2016) First microsatellite markers for *Paspalum plicatum* (Poaceae) characterization and cross-amplification in different *Paspalum* species of the Plicatula group. **BMC research notes** 9: 511p.

Ortiz JPA, Quarin CL, Pessino SC, Acuña CA, Martínez EJ, Espinoza F, Hojsgaard DH, Sartor ME, Cáceres ME e Pupilli F (2013) Harnessing apomictic reproduction in grasses: What we have learned from *Paspalum*. **Ann. Bot. (Lond.)** 112: 767–787.

Paspalum in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13432>>. Acesso em: 27 Jun. 2018

Paterson AH, Tanksley SD e Sorrells ME (1991b) DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy** 46: 39-90p.

Tautz D e Renz M (1984) As seqüências simples são componentes repetitivos onipresentes de genomas eucarióticos. **Ácidos Nucleicos Res** 12: 4127–4138

Usandizaga SCF, Brugnoli EA, Weiss AI, Zilli AL, Schedler M, Pagano EM, Martínez EJ e Acuña CA (2015) Genetic and morphological characterization of *Acroceras macrum* Stapf. **Grass and forage Science** 70: 695-704p.

Zietkiewicz E, Rafalski A e Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20: 176–183.

Zuloaga FO e Morrone O (2005) **Revisión de las espécies de *Paspalum* para América Del Sur Austral** (Argentina, Bolivia, Sur Del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Missouri: Botanical Garden Press. 297 p.

Tabela 1: Famílias e número de progênies analisadas e genitores utilizados nos cruzamentos.

Famílias	Nº de progênies	Cruzamentos
1	2	<i>P. virgatum</i> BGP 343 x <i>P. atratum</i> BGP 308
2	3	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. atratum</i> BGP 308
3	11	<i>P. regnellii</i> BGP 258 x <i>P. atratum</i> BGP 341
4	4	<i>P. regnellii</i> BGP 258 x <i>P. atratum</i> BGP 15
5	2	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. atratum</i> BGP 15
6	6	<i>P. regnellii</i> BGP 344 x <i>P. guenoarum</i> BGP 159
7	5	<i>P. regnellii</i> BGP 345 x <i>P. guenoarum</i> BGP 159
8	4	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. guenoarum</i> BGP 159
9	2	<i>P. regnellii</i> BGP 344 x <i>P. plicatulum</i> BGP 164
10	9	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. plicatulum</i> BGP 164
11	12	<i>P. regnellii</i> BGP 344 x <i>P. malacophyllum</i> BGP 293
12	2	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. malacophyllum</i> BGP 293
13	4	<i>P. regnellii</i> BGP 345 x <i>P. plicatulum</i> BGP 160
14	12	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. plicatulum</i> BGP 160
15	3	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. atratum</i> BGP 98
16	5	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. atratum</i> BGP 98
17	12	<i>P. regnellii</i> BGP 345 x <i>P. guenoarum</i> BGP 11
18	3	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. guenoarum</i> BGP 11
19	2	<i>P. regnellii</i> 22811 x <i>P. guenoarum</i> BGP 11
20	5	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. atratum</i> BGP 123
21	2	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. sp.</i> BGP 342
22	7	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. plicatulum</i> BGP 163
23	2	<i>P. regnellii</i> BGP 345 x <i>P. sp.</i> BGP 406
24	5	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. lenticulare</i> BGP 262
25	2	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. atratum</i> BGP 298
26	17	<i>P. regnellii</i> BGP 397 x <i>P. atratum</i> BGP 298
27	6	<i>P. regnellii</i> BGP 258 x <i>P. regnellii</i> BGP 341
28	13	<i>P. regnellii</i> BGP 258 x <i>P. atratum</i> BGP 93
29	2	<i>P. virgatum</i> BGP 343 x <i>P. atratum</i> BGP 95
30	8	<i>P. regnellii</i> BGP 345 x <i>P. atratum</i> BGP 95
31	15	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. malacophyllum</i> BGP 293
32	2	<i>P. virgatum</i> BGP 343 x <i>P. umbrosum</i> BGP 227
33	1	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. atratum</i> BGP 93

Tabela 2: Marcadores microssatélites utilizados nas análises.

Marcadores SSR	Temperatura de amplificação (C°)	Tamanho amplificado (pb)	Referências
PR15	60	255-188	Cidade et al. (2009b)
Pp-UNICAMP08	51	154-174	Oliveira et al. (2016)
Pp-UNICAMP06	51	174-144	
PA01B7	60	282-242	Cidade et al. (2010)

Tabela 3: Marcadores inter-microsatélites utilizados nas análises.

Marcadores ISSR	Sequência do <i>primer</i> 5'-3'	Temperatura de amplificação (C°)	Referências
ISSR 1	(CT)8-G	49	Cidade et al. (2008), Brugnoli et al. (2013)
ISSR 8	(CA)8-G	48	Brugnoli et al. (2013), Usandizaga et al. (2015)
ISSR 9	(ATG)5-GA	42	Usandizaga et al. (2015)
ISSR 10	(GA)8-C	48	Usandizaga et al. (2015)

Tabela 4: Resultado da confirmação de hibridação com os marcadores moleculares avaliados, indicando quais marcadores identificaram as hibridações.

Família	Cruzamento	Nº de progênies analisadas	Nº de híbridos identificados	%	Marcadores que identificaram
10	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. plicatulum</i> BGP 164	10	6	60.0	ISSR 9 e 10
11	<i>P. regnellii</i> BGP 344 x <i>P. malacophyllum</i> BGP 293	12	11	91.7	ISSR 8 e 9; PR 15
20	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. atratum</i> BGP 123	5	1	20.0	ISSR 10
22	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. plicatulum</i> BGP 163	7	1	14.3	ISSR 8
24	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. lenticulare</i> BGP 262	5	3	60.0	ISSR 9 e 10
25	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. atratum</i> BGP 298	2	1	50.0	ISSR 9
26	<i>P. regnellii</i> BGP 397 x <i>P. atratum</i> BGP 298	17	3	17.6	ISSR 9
27	<i>P. regnellii</i> BGP 258 x <i>P. regnellii</i> BGP 341	6	2	33.3	ISSR 8
28	<i>P. regnellii</i> BGP 258 x <i>P. atratum</i> BGP 93	13	2	15.4	ISSR 8 e 9
29	<i>P. virgatum</i> BGP 343 x <i>P. atratum</i> BGP 95	2	1	50.0	ISSR 9
30	<i>P. regnellii</i> BGP 345 x <i>P. atratum</i> BGP 95	8	8	100.0	ISSR 9
31	<i>P. regnellii</i> BGP 215 x <i>P. malacophyllum</i> BGP 293	10	5	50.0	ISSR 1, 8, 9 e 10; Pp-UNICAMP06; PR15
Total		97	44	45.4	

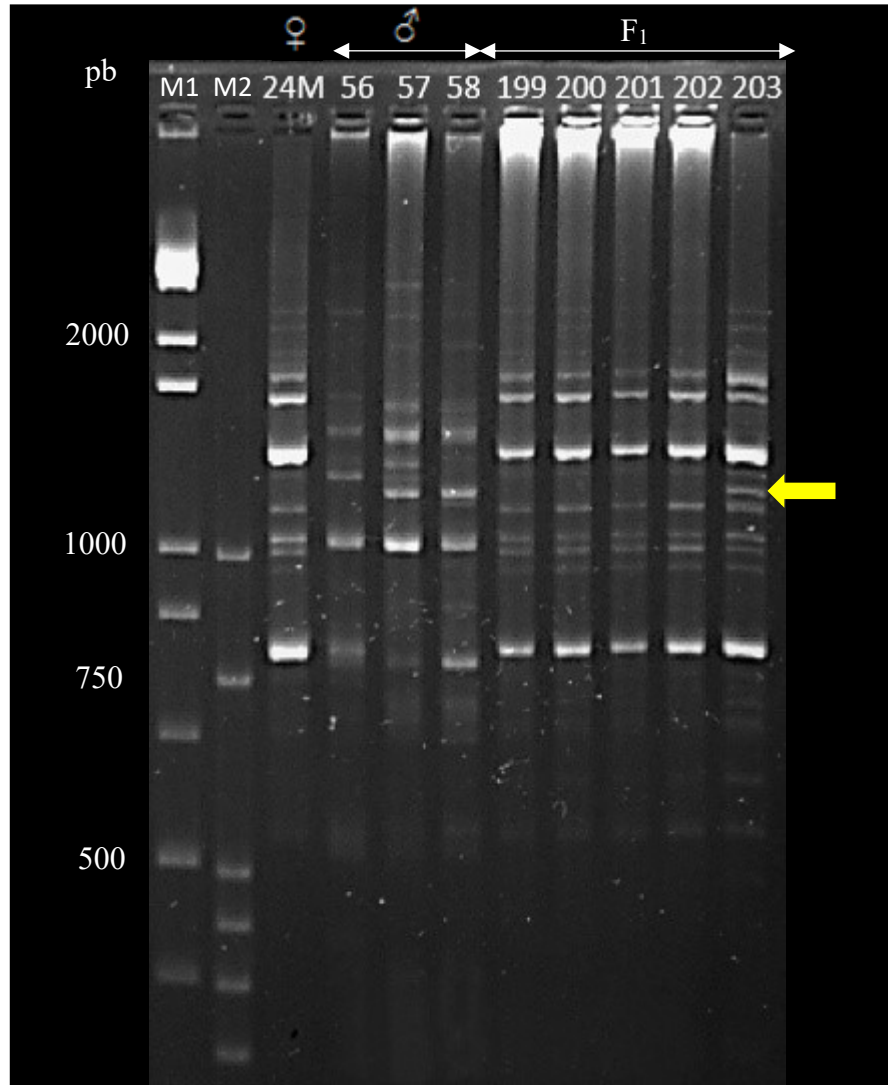


Figura 1: Perfil de amplificação do marcador ISSR 10, em gel de agarose 2%, na Família 20. A progênie 203 foi identificada como sendo híbrida pela banda indicada pela seta amarela. Os padrões de tamanho utilizados estão indicados, em pb, dos marcadores de peso molecular 1kb Plus Invitrogen (M1) e 50pb Ludwig (M2)

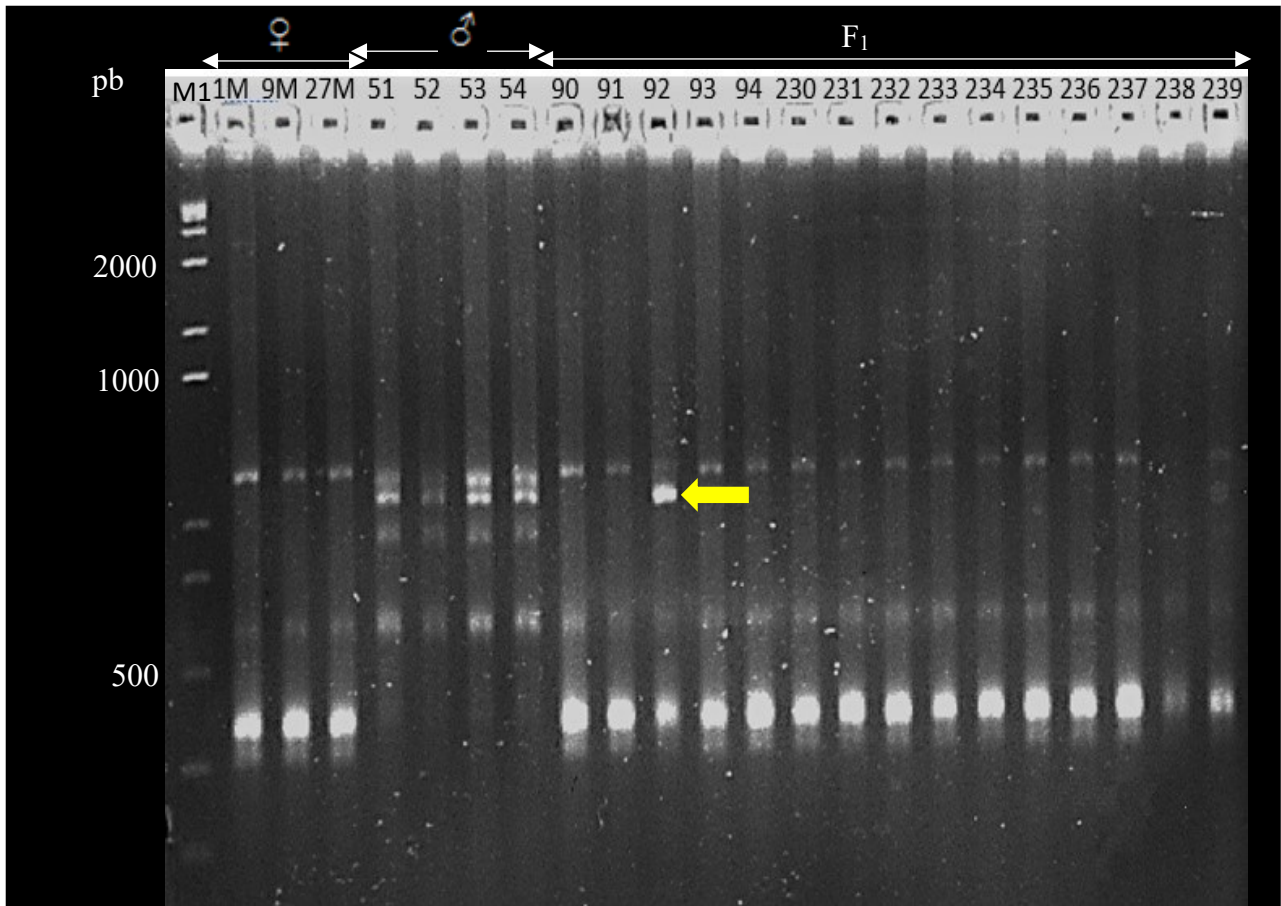


Figura 2: Perfil de amplificação do marcador ISSR 1, em gel de agarose 2%, na Família 31. A progênie 92 foi identificada como sendo híbrida pela banda indicada pela seta amarela. Os padrões de tamanho utilizados estão indicados, em pb, dos marcadores de peso molecular 1kb Plus Invitrogen (M1).

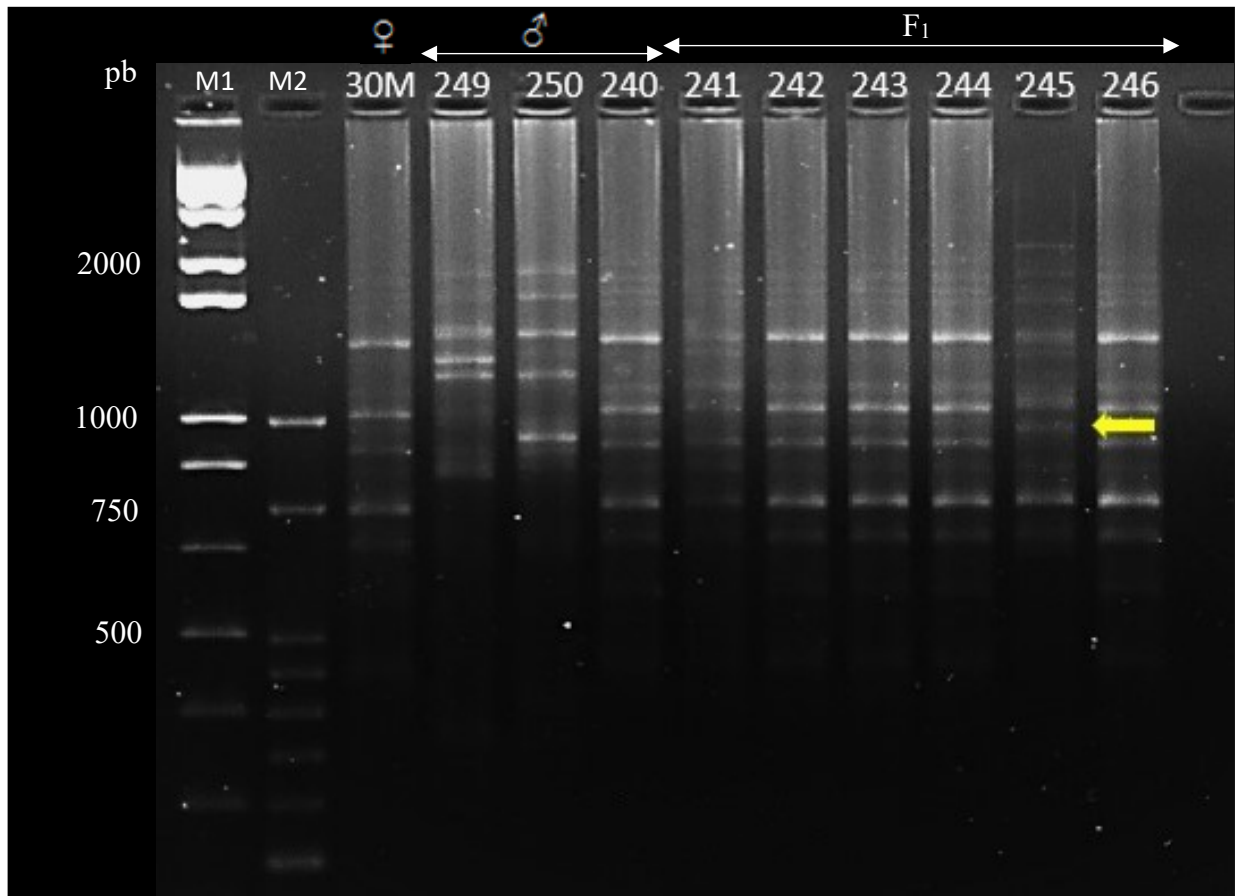


Figura 3: Perfil de amplificação do marcador ISSR 8, em gel de agarose 2%, na Família 22. A progênie 245 foi identificada como sendo híbrida pela banda indicada pela seta amarela. Os padrões de tamanho utilizados estão indicados, em pb, dos marcadores de peso molecular 1kb Plus Invitrogen (M1) e 50pb Ludwig (M2).

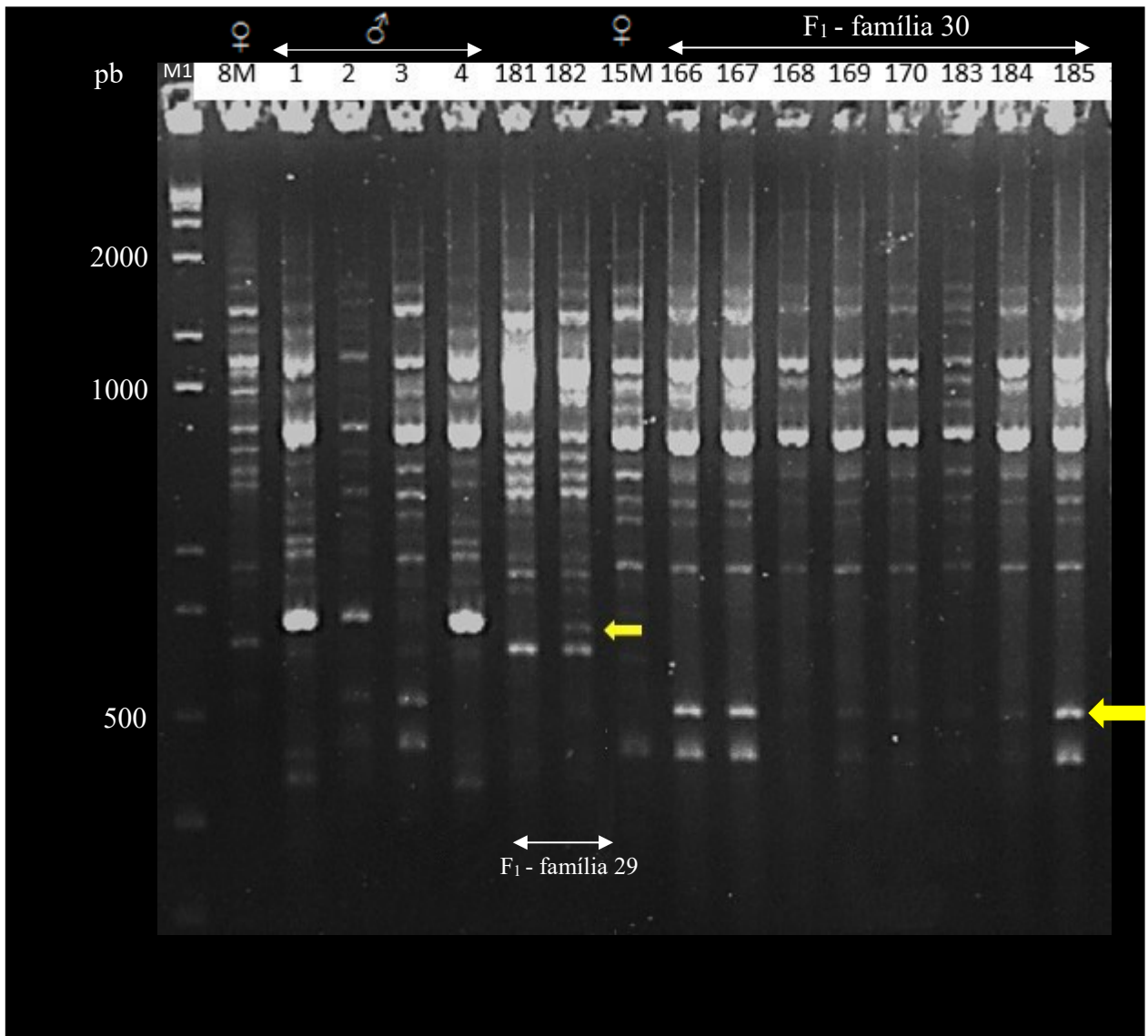


Figura 4: Perfil de amplificação do marcador ISSR 9, em gel de agarose 2%, na Família 29 a progênie 182 foi identificada como sendo híbrida pela banda indicada pela seta amarela. E na Família 30 todas as progênes foram identificadas como híbridas. Os padrões de tamanho utilizados estão indicados, em pb, dos marcadores de peso molecular 1kb Plus Invitrogen (M1).

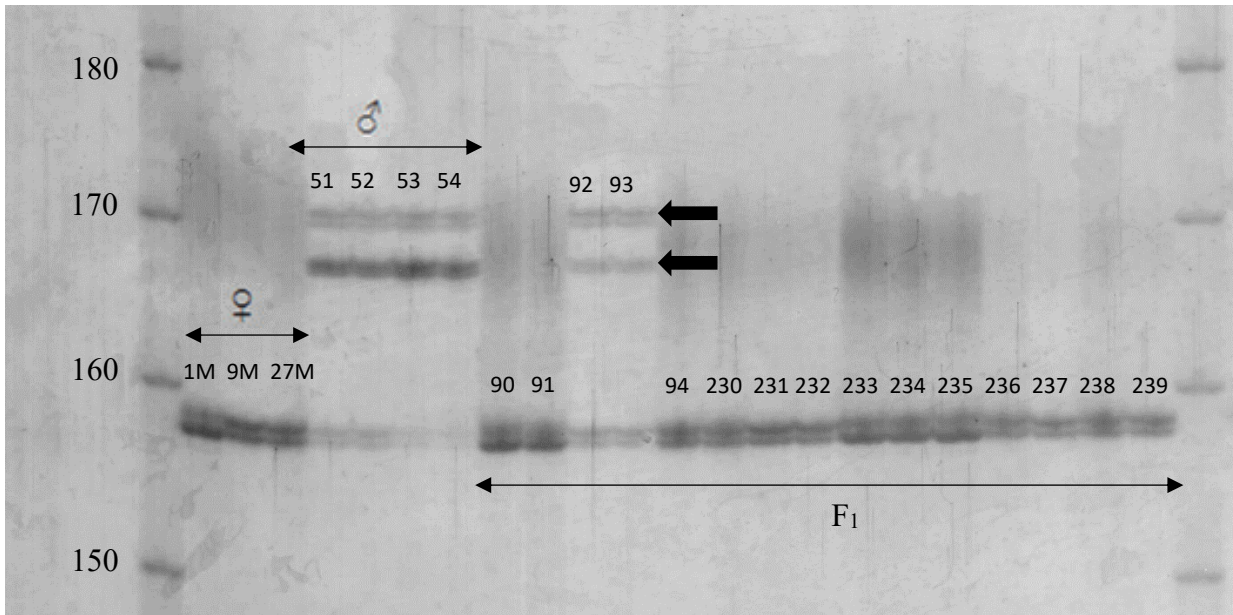


Figura 5: Perfil de amplificação do marcador microsatélite Pp-UNICAMP06, em gel de poliacrilamida 6%, na Família 31. As progênes 92 e 93 foram identificadas como sendo híbridas pelas setas. Os padrões de tamanho utilizados estão indicados, em pb, do marcador de peso molecular 10pb (Invitrogen).

ANEXO 1

A Revista *Crop Breeding and Applied Biotechnology* foi escolhida como norma para os elementos textuais do TCC. A mesma representa periódico de relevância para a área de pesquisa apresentada no TCC, o qual deve ser redigido em português, embora a revista seja publicada em inglês. As normas da revista foram retiradas do site “<http://www.scielo.br/img/fbpe/cbab/pinstruc.htm#02>” e se encontram descritas abaixo:

A **CBAB** publica artigo exclusivamente em inglês, porém faculta ao autor a possibilidade de submetê-lo em português para, após o aceite, providenciar a sua tradução. O ônus da tradução é de responsabilidade do autor, porém a **CBAB** recomenda que ela seja feita por seu tradutor oficial.

Os manuscritos deverão ser inseridos sem os nomes dos autores e seus endereços, os quais deverão ser disponibilizados em um formulário à parte.

Os trabalhos deverão ser submetidos somente em formatos compatíveis com Microsoft Word (.doc) de até 2MB de tamanho e devem ter as seguintes características: formato A4 com margens de 2cm e paginação consecutiva no topo à direita, digitado em fonte Times New Roman, tamanho 12, espaçamento duplo e alinhamento justificado.

Artigos deverão ter no mínimo 16 e no máximo 18 páginas, incluindo tabelas e figuras inseridas em páginas separadas (uma por página) ao final do texto e apresentar a seguinte sequência: **TÍTULO**, que deverá ser claro, conciso e refletir a essência do artigo, escrito com a primeira inicial maiúscula e alinhado à esquerda, não excedendo a 15 palavras digitadas em Times New Roman 14, negrito; **RESUMO** contendo no máximo 150 palavras; **PALAVRAS-CHAVE**, contendo mínimo de 3 e máximo de 5 palavras diferentes do título; **INTRODUÇÃO**, que inclua uma breve revisão de literatura sobre o tema e os objetivos da pesquisa; **MATERIAL E MÉTODOS** redigido de modo que outro pesquisador possa repetir a experiência; **RESULTADOS E DISCUSSÃO** apresentados em conjunto, para maior dinâmica de leitura (as conclusões também devem ser apresentadas nesse tópico); **AGRADECIMENTOS** (opcional) sucintos, limitados a colaboradores efetivos e agências financiadoras; Título, resumo e palavras-chave em português; **REFERÊNCIAS** (normas abaixo); **TABELAS e FIGURAS** incluídas em páginas separadas (uma por página), ao final do artigo.

As citações no texto feitas entre parênteses seguindo os exemplos: (William et al. 1990) (William et al. 1990, Liu 1998, Pereira and Amaral Júnior 2001).

REFERÊNCIAS deverão ter espaçamento duplo e serem ordenadas alfabeticamente. Os nomes dos autores serão escritos somente com iniciais maiúsculas, separados por vírgula e/ou “and” antes do nome do último autor, seguido do ano de publicação entre parênteses. **Cuidado:** não serão aceitos citações de resumos de eventos, teses, dissertações, monografias e nem artigos não publicados. Esses cuidados darão maior credibilidade ao artigo e a revista. Veja os exemplos abaixo:

1) *Artigos em periódicos*: O nome do periódico e o volume devem ser escritos em negrito e sem abreviações, seguidos de dois pontos e do intervalo de páginas.

Pereira MG and Amaral Júnior AT (2001) Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. **Crop Breeding and Applied Biotechnology 1**: 3-10

Knapp SJ, Stroup WW and Ross WM (1985) Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. **Crop Science 25**: 192-194.

2) *Livro*: O título do livro deve ser escrito em negrito, seguido do nome da editora, cidade e número de páginas.

Ramalho MAP, Ferreira DF and Oliveira AC (2000) **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Editora UFLA, Lavras, 326p.

Liu BH (1998) **Statistical genomics**. CRC Press, New York, 610p.

3) *Capítulo de livro*: Nomes dos autores, título do capítulo, nome do editor, título do livro em negrito, seguido pelo nome da editora, cidade e número de páginas

Sakiyama NS, Pereira AA and Zambolim L (1999) Melhoramento do café arábica. In: Borém A (ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Editora UFV, Viçosa, p. 189-204.

McClellan P, Gepts P and Kami J (2004) Genomics and genetic diversity in common bean. In: Wilson RF, Stalker HT and Brummer EC (eds) **Legume Crops Genomics**. AOCS Press, Champaign, p. 60-82.

4) *Congresso*:

Frey KJ (1992) Plant breeding perspectives for the 1990s. In: Stalker HT and Murphy JP (eds) **Proceedings of the symposium on plant breeding in the 1990s**. CAB, Wallingford, p. 1-13.

5) *Documentos eletrônicos*:

Cruz CD and Schuster I (2006) **GQMOL: application to computational analysis of molecular data and their associations with quantitative traits**. Version 9.1. Available at <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>. Accessed on May 3, 2009