



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

REBECCA CAROLINE ULBRICHT FERREIRA

ESTUDOS GENÉTICO-GENÔMICOS EM *UROCHLOA DECUMBENS*:
UMA IMPORTANTE GRAMÍNEA FORRAGEIRA TROPICAL

GENETIC-GENOMIC STUDIES IN *UROCHLOA DECUMBENS*:
AN IMPORTANT TROPICAL FORAGE GRASS

CAMPINAS

2018

REBECCA CAROLINE ULBRICHT FERREIRA

ESTUDOS GENÉTICO-GENÔMICOS EM *UROCHLOA DECUMBENS*:
UMA IMPORTANTE GRAMÍNEA FORRAGEIRA TROPICAL

GENETIC-GENOMIC STUDIES IN *UROCHLOA DECUMBENS*:
AN IMPORTANT TROPICAL FORAGE GRASS

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção de título de
Doutora em Genética e Biologia Molecular na área
de Genética Vegetal e Melhoramento*

*Thesis presented to the Institute of Biology of the
University of Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Doctor in Genetics
and Molecular Biology in the area of Plant Genetics
and Genetic Breeding*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA REBECCA CAROLINE ULBRICHT
FERREIRA E ORIENTADA PELA PROFESSORA
DOUTORA ANETE PEREIRA DE SOUZA.

Orientadora: Anete Pereira de Souza

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES; FAPESP, 2008/52197-4

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F413e Ferreira, Rebecca Caroline Ulbricht, 1988-
Estudos genético-genômicos em *Urochloa decumbens* : uma importante gramínea forrageira tropical / Rebecca Caroline Ulbricht Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Anete Pereira de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Brachiaria decumbens*. 2. Técnicas de genotipagem. 3. Mapeamento genômico vegetal. 4. Marcadores moleculares. I. Souza, Anete Pereira de, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Genetic-genomic studies in *Urochloa decumbens* : an important tropical forage grass

Palavras-chave em inglês:

Brachiaria decumbens

Genotyping techniques

Plant genome mapping

Molecular markers

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Anete Pereira de Souza [Orientador]

Bianca Baccili Zanotto Vigna

Maria Imaculada Zucchi

Rodrigo Gazaffi

Rosângela Maria Simeão Resende

Data de defesa: 01-03-2018

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 01 de março de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (orientadora)

Dra. Bianca Baccili Zanotto Vigna

Dra. Maria Imaculada Zucchi

Dra. Rosangela Maria Simeão Resende

Dr. Rodrigo Gazaffi

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Ao meu pai, Roberto Ferreira, que de onde estiver deve estar muito orgulhoso
À minha mãe, Angela Ulbricht, com todo amor
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Anete Pereira de Souza, minha orientadora, por abrir as portas do seu laboratório e me dar a oportunidade de crescer tanto pessoal como profissionalmente. Agradeço pela confiança depositada em mim e por me fazer acreditar que no final tudo daria certo.

À minha co-orientadora Dra. Lucimara Chiari, que me apresentou o curioso mundo genético-molecular das forrageiras tropicais ainda durante a Iniciação Científica. Obrigada por todos os ensinamentos e pela confiança.

À Universidade Estadual de Campinas e ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos membros do Exame de Qualificação e Banca de Defesa de Tese: Dra. Prianda Laborda, Prof. Dr. Rodrigo Gazaffi, Prof. Dr. Michel Vincentz, Dra. Rosangela Maria Simeão, Prof. Dr. Marcelo Brandão, Dra. Bianca Vigna. Muito obrigada pelas críticas, sugestões, ensinamentos e disponibilidade.

Aos pesquisadores da Embrapa Gado de Corte, Dr. Sanzio Barrios e Dra. Cacilda Borges do Valle, por disponibilizarem a progênie de *Urochloa decumbens* para a realização desta importante etapa da minha vida, e por todos os ensinamentos durante este período.

À Dra. Rosangela Maria Simeão da Embrapa Gado de Corte, você é a responsável por eu ter me apaixonado pelas forrageiras. Obrigada pela oportunidade de iniciar no mundo científico e por me mostrar que todo o esforço vale a pena.

Ao Prof. Dr. Antonio Augusto Franco Garcia por me receber em seu laboratório durante os últimos meses do doutorado, e a todos os seus alunos que tornaram os meus dias muito mais agradáveis.

À querida Dra. Letícia Lara pela paciência, disponibilidade e inestimável ajuda com a análise dos dados e construção do mapa genético.

Aos técnicos do laboratório LAGM: Aline, Danilo, Juver, Carlão e Pathy, obrigada por sempre fazerem mais do que o necessário. Em especial, agradeço à Aline por estar ao meu lado durante a construção e sequenciamento das bibliotecas GBS. Seu apoio, incentivo e ajuda fizeram toda a diferença.

Aos colegas do LAGM/CBMEG, sem os quais a conclusão deste trabalho não seria possível. Obrigada pelo companheirismo, pela troca de conhecimentos e por me ajudarem em diversos momentos. Vocês se tornaram a minha segunda família.

Em especial, agradeço as amigas queridas que conquistei durante esse período: Fernanda, Stephanie, Isabela, Aline, Melina, Prianda, Bia, Mari, e ao amigo Jean. Obrigada por tornarem os meus dias, dentro e fora do laboratório, mais alegres.

Agradeço aos meus amigos de longa data, em especial minhas amigas Rubia e Marília, e à minha família, por todo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus amados irmãos Renan e Gabriel, vocês são os melhores presentes que os nossos pais me deram, e à Puma, filhota de quatro patas, minha grande companheira.

Ao meu pai, meu grande herói, pelo amor incondicional e por estar sempre comigo, onde quer que esteja.

À minha mãe, pelo amor incondicional e por ser meu porto seguro. Obrigada pela paciência, pelo incentivo e pelo apoio em todos os momentos.

RESUMO

Urochloa decumbens (sinonímia *Brachiaria decumbens*) é uma gramínea forrageira de origem africana, predominantemente tetraploide e apomítica, que desempenha papel relevante na pecuária brasileira. Apesar da enorme importância, estudos em nível molecular são limitados devido à complexidade genética da espécie, falta de investimentos, além do programa de melhoramento ser muito recente. Nesse contexto, aplicações práticas de ferramentas genômicas estão notadamente atrasadas, em contraste com outras espécies que já avançam para seleção assistida por marcadores e seleção genômica. Esse trabalho objetivou contribuir para um melhor entendimento genético-genômico de *U. decumbens*, a fim de fornecer informações úteis aos programas de melhoramento genético da espécie. Para tanto, um conjunto de marcadores microssatélites foi desenvolvido a partir de uma biblioteca genômica enriquecida em motivos repetitivos. Cento e treze locos microssatélites foram desenvolvidos, dos quais 89 foram polimórficos entre os 34 genótipos analisados. A transferibilidade dos locos foi avaliada nas espécies *U. dictyoneura*, *U. humidicola*, *U. brizantha* e *U. ruziziensis*, sendo que as maiores taxas de amplificação foram observadas nessas duas últimas, confirmando a proximidade genética com *U. decumbens* reportada em trabalhos anteriores. Um mapa genético integrado foi construído utilizando-se marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) oriundos da técnica de GBS (*Genotyping-by-Sequencing*) e locos relacionados à resistência à cigarrinha-das-pastagens (*Notozulia entriperiana*) foram mapeados. Para a descoberta dos marcadores SNPs foram utilizados cinco pseudo-referências: genoma de *Panicum hallii*, genoma de *P. virgatum*, genoma de *Setaria viridis*, genoma de *S. italica* e um transcriptoma de *U. decumbens*. A ploidia e a dosagem de cada loco bi-alélico foi estimada pelo *software* SuperMASSA. Após as filtrações, o alinhamento que possibilitou a identificação do maior número de marcadores SNPs foi com o pseudo-referência *S. viridis*. O *Software* TetraploidSNPMap permitiu mapear 1000 marcadores com diferentes dosagens alélicas, distribuídos em nove grupos de homologia. A extensão total do mapa foi 1335,2 cM com densidade de um marcador a cada 1,3 cM. O grupo de homologia 9 (GH9) apresentou 187 marcadores SNPs, sendo o grupo mais saturado, enquanto que o GH6 foi o que apresentou menos marcadores, 63. Utilizando o mapeamento por intervalo (IM), três QTLs para resistência as cigarrinhas-das-pastagens foram mapeados. A proporção da variação explicada pelo QTL variou de 4,66% a 6,24%. Este estudo é o primeiro a reportar o desenvolvimento de marcadores microssatélites específicos para *U. decumbens*, a construção de um mapa genético intraespecífico para a espécie com SNPs com diferentes

dosagens alélicas, bem como o mapeamento de QTLs. Essas ferramentas poderão auxiliar na elaboração de estratégias a serem introduzidas nos programas de melhoramento, de forma a aumentar a eficiência dos processos de seleção e acelerar o desenvolvimento de novas cultivares.

Palavras-chave: *Brachiaria decumbens*, GBS, mapa genético, marcadores moleculares, QTL.

ABSTRACT

Urochloa decumbens (syn. *Brachiaria decumbens*) is a forage grass of African origin, predominantly tetraploid and apomictic, that plays a relevant role in Brazilian livestock production. Despite the enormous importance, studies at the molecular level are limited due to the genetic complexity of the species, lack of investments, and the breeding program is very recent. In this context, practical applications of genomic tools are markedly delayed, in contrast to other species that are already advancing for marker-assisted selection and genomic selection. This work aimed to contribute to a better genetic-genomic understanding of *U. decumbens*, in order to provide useful information to the breeding program of the species. For this, a set of microsatellite markers was developed from a genomic library enriched in repetitive motifs. One hundred and thirteen microsatellite loci were developed, of which 89 were polymorphic among the 34 genotypes analyzed. The transferability of the loci was evaluated in the species *U. dictyoneura*, *U. humidicola*, *U. brizantha* and *U. ruziziensis*, and the highest amplification rates were observed in the latter two, confirming the genetic proximity with *U. decumbens*, already reported in previous studies. An integrated genetic map was constructed using SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) from the GBS (Genotyping-by-Sequencing) technique and loci related with spittlebug (*Notozulia entreriana*) resistance were mapped. For the discovery of the SNPs markers four pseudo-references were used: *Panicum hallii* genome, *P. virgatum* genome, *Setaria viridis* genome, *S. italica* genome and a *U. decumbens* transcriptome. Ploidy and dosage of each bi-allelic loci was estimated using the SuperMASSA software. After the filtrations, the alignment that allowed the identification of a greater number of SNPs markers was the genome of *S. viridis*. TetraploidSNPMap Software allowed mapping of 1000 markers, with different allelic dosages, distributed in nine homology groups. The total length of the map was 1335,2 cM with density of one marker every 1.3 cM in average. Homology group nine (G9) presented 187 SNPs markers, the most saturated group, whereas HG6 was the one with the lowest markers, 63. Using interval mapping (IM), three QTLs for resistance to spittlebug were mapped. The proportion of variation explained by QTL ranged from 4.66% to 6.24%. This study is the first to report the development of specific microsatellite markers to *U. decumbens*, as well as to construct an intraspecific genetic map for the species with the SNPs with different allelic dosages as well as the mapping of QTL. These tools can be helpful to establish strategies in breeding programs and increase the efficiency of selection processes and accelerate the development of new cultivars.

Keywords: *Brachiaria decumbens*, GBS, genetic map, molecular markers, QTL.

SUMÁRIO

Introdução	13
Revisão Bibliográfica	16
Relevância econômica das forrageiras tropicais.....	16
O gênero <i>Urochloa</i>	17
<i>Urochloa decumbens</i>	19
Contexto do melhoramento genético de <i>Urochloa decumbens</i>	21
Marcadores moleculares: dos microssatélites aos SNPs.....	24
Genotipagem-por-sequenciamento: inovação para genomas poliploides.....	28
Mapeamento genético com ênfase no gênero <i>Urochloa</i>	29
Mapeamento de QTLs.....	33
Objetivos	36
Objetivo Geral.....	36
Objetivos Específicos.....	36
Capítulo I	37
Microsatellite loci for <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) R.D. Webster and cross-amplification in other <i>Urochloa</i> species.....	37
Resultados Complementares I.....	61
Capítulo II	66
First genetic and QTL mapping in <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) R.D. Webster using SNP tetraploid dosage.....	66
Resultados Complementares II.....	97
Material Suplementar	102
Resumo dos Resultados	112
Conclusões Gerais	114
Perspectivas	115
Referências Bibliográficas	116
Anexos	132

INTRODUÇÃO

As gramíneas forrageiras ocupam extensas áreas de pastagens no Brasil, hoje estimadas em cerca de 167 milhões de hectares (ABIEC, 2016), e são a base da alimentação animal da pecuária bovina nacional, contribuindo para o baixo custo de produção de carne e leite (Dias-Filho, 2016). Neste cenário, o Brasil detém a condição de maior exportador e segundo maior produtor de carne bovina do mundo (ABIEC, 2016). Em paralelo, o desenvolvimento de pastagens melhoradas tem garantido a expansão do mercado brasileiro de sementes forrageiras tropicais, o que destaca o país como maior produtor, consumidor e exportador dessas sementes, movimentando cerca de 500 milhões de reais por ano (Lazia, 2012).

Segundo Simeão et al. (2015), 90% das pastagens tropicais cultivadas no Brasil são de *Urochloa brizantha*, *U. decumbens* e *Megathyrsus maximus* (sinonímia *Panicum maximum*), representadas por um número restrito de cultivares comercializadas. No caso de *U. decumbens*, há somente duas cultivares registradas no Registro Nacional de Cultivares – RNC, sendo apenas uma comercializada, a cultivar ‘Basilisk’ (MAPA, 2018). Tal fato faz com que existam extensas áreas cobertas por uma única cultivar, o que aumenta a susceptibilidade do sistema de produção a fatores bióticos e abióticos, tornando imprescindível o desenvolvimento de novas cultivares com ampla base genética.

Urochloa decumbens (Stapf) R.D. Webster (sinonímia *Brachiaria decumbens* Stapf) é uma espécie de origem africana altamente difundida nas pastagens brasileiras por possuir diversos atributos agronômicos relevantes, como a tolerância a solos ácidos e de baixa fertilidade (Valle et al., 2009). Devido à sua importância para a pecuária brasileira, a equipe de melhoristas da Embrapa Gado de Corte (Campo Grande- MS) estabeleceu um programa de melhoramento genético da espécie que visa, principalmente, o desenvolvimento de novas cultivares que diversifiquem as pastagens com produtividade, sustentabilidade e qualidade, aliadas a características superiores, como a resistência às cigarrinhas-das-pastagens (Jank et al., 2013).

O sucesso da poliploidização de um acesso sexual diploide de *U. decumbens* possibilitou a geração de uma população base para a espécie e, assim, a exploração de uma variabilidade genética antes conservada pela apomixia, permitindo um importante avanço para o melhoramento da espécie. Essa progênie, resultante do cruzamento entre o genitor masculino

INTRODUÇÃO

apomítico D62 (cultivar Basilisk) e o genitor feminino sexual (D24/27), ambos tetraploides, é inédita no mundo e permitiu a exploração de novas combinações genótípicas dentro da espécie (Simioni e Valle, 2009).

Para o avanço desse programa de melhoramento é fundamental o desenvolvimento e o uso de ferramentas moleculares, a fim de dinamizar o lançamento de novas cultivares forrageiras para o mercado tropical. Até o momento, o conhecimento da influência genética sob as características agronômicas de interesse é praticamente nulo, assim como o mecanismo envolvido nestas relações genótipo-fenótipo (Jank et al., 2011). Os principais trabalhos com *U. decumbens* englobam aspectos morfo-agronômicos (Bitencourt et al., 2011; Barrios et al., 2013; Mendonça et al., 2013; Mateus et al., 2013; Mateus et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Monteiro et al., 2016a; Monteiro et al., 2016b), enquanto que aspectos no âmbito genético-molecular ainda são escassos.

Os trabalhos moleculares publicados com essa espécie abrangem, principalmente, suas relações genéticas com diferentes espécies do gênero *Urochloa* e gêneros relacionados (Almeida et al., 2011; Santos et al., 2015; Pessoa-Filho et al., 2017; Trivino et al., 2017), além de um transcriptoma montado e anotado de *U. decumbens* cv. Basilisk sob estresse por alumínio tóxico (Salgado et al., 2017). Outra carência em relação ao conhecimento genético-molecular da espécie é o fato de existir apenas um mapa de ligação interespecífico entre *U. decumbens* x *U. ruziziensis* (Worthington et al., 2016). O primeiro conjunto de marcadores microssatélites específicos para *U. decumbens* foi desenvolvido neste trabalho, abrindo caminho para uma gama de estudos como, por exemplo, a análise da diversidade genética presente nos bancos de germoplasma da espécie e de espécies relacionadas.

Os marcadores moleculares e, mais recentemente, as tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), fornecem informações valiosas que possibilitam que vários estudos moleculares sejam realizados, dentre eles a construção de mapas genéticos saturados. Os mapas genéticos são importantes ferramentas na identificação e posicionamento de genes (ou locos) em regiões genômicas responsáveis pela expressão de caracteres de importância agronômica. Assim, representam um enorme avanço para espécies importantes economicamente e com poucas informações genéticas disponíveis, como *U. decumbens*. Neste trabalho, foi desenvolvido um mapa intraespecífico com marcadores SNPs com diferentes dosagens alélicas

INTRODUÇÃO

para tetraploides, a partir do qual foi possível detectar QTLs relacionados à resistência à cigarrinha-das-pastagens (*N. entneriana*).

Neste contexto, espera-se que o mapa genético desenvolvido para *U. decumbens* seja útil ao fornecer informações a respeito da organização genômica da espécie e, futuramente, contribua para uma seleção mais precoce e eficiente de genótipos superiores nos programas de melhoramento.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Relevância econômica das forrageiras tropicais

As forrageiras tropicais tiveram uma rápida expansão no Brasil e atualmente cobrem cerca de 167 milhões de hectares de pastagens, sendo a base da produção de bovinos de corte, além de contribuírem muito na produção de leite (Macedo, 2006; Valle et al., 2008; Dias-Filho, 2016; ABIEC, 2016). Essas pastagens, somadas com as áreas de pastos naturais, equivalem a quase 49% de toda a área agrícola no Brasil (ABIEC, 2016).

As pastagens brasileiras alimentam cerca de 209 milhões de cabeças de gado, posicionando o país como principal exportador e segundo maior produtor de carne bovina do mundo (ABIEC, 2016). Neste cenário, o setor agropecuário é responsável por aproximadamente um terço do produto interno bruto (PIB) do país, destacando-se como um dos setores mais importantes da economia brasileira (IBGE, 2015).

Mais da metade dos pastos cultivados são formados por gramíneas do gênero *Urochloa* (Macedo 2006), as quais provêm energia, proteína e fibras para promover a mastigação, ruminação e saúde do animal (Leopoldino, 2000). A criação de animais em pastos representa competitividade tanto para o mercado interno quanto para a exportação, já que o mercado consumidor exige, cada vez mais, qualidade associada a segurança alimentar e diminuição de problemas sanitários (Souza, 2008). Ademais, é a forma mais econômica e prática de produzir e oferecer alimentos para os bovinos (Dias-Filho, 2016), tornando a carne brasileira mais competitiva no mercado externo.

A demanda interna por sementes forrageiras para suprir esse grande mercado impulsionou a tecnificação da produção de sementes e posicionou o Brasil como o maior produtor, exportador e consumidor de sementes de forrageiras tropicais. Este comércio no país está estimado em US\$ 240 milhões anuais (Andrade, 2001). Segundo Valle et al. (2009), mais de 70% das sementes de forrageiras comercializadas no Brasil são de cultivares do gênero *Urochloa*.

Apesar da grande importância das forrageiras tropicais, os programas de melhoramento genético são recentes, portanto ainda há possibilidade de um aumento da eficiência, sem alterar a área de pastagem utilizada (Valle et al., 2009). Além disso, existe variabilidade genética suficiente para que sejam desenvolvidas cultivares de forrageiras mais produtivas e tolerantes

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

a condições ambientais adversas para a manutenção e superação dos patamares atuais de produtividade nas condições tropicais do Brasil (Valle et al., 2008). É neste contexto que espera-se que os estudos moleculares possam ajudar a alavancar os programas de melhoramento genético de espécies forrageiras tropicais.

O Gênero *Urochloa*

O gênero *Urochloa* P. Beauv. (sinonímia *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) pertence à família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae* e tribo *Paniceae*. Este gênero abrange diversas espécies de plantas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, sobretudo no continente africano (Monteiro et al., 1974; Renvoize et al., 1996), e em habitats variados, desde várzeas inundáveis até savanas (Valle et al., 2009).

No Brasil existem cerca de 24 espécies desse gênero, entre exóticas e nativas, sendo que as quatro mais utilizadas como gramíneas forrageiras são *U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. ruziziensis* e *U. humidicola*, todas de origem africana e com níveis de ploidia variados (Flora do Brasil 2020, 2018).

Inicialmente, algumas espécies do gênero *Urochloa*, tais como *U. decumbens*, *U. humidicola* e *U. brizantha*, pertenciam ao gênero *Brachiaria*, porém uma nova classificação foi realizada para distinguir as espécies pertencentes a estes dois gêneros. Essa classificação foi baseada nas seguintes características: o tipo de articulação da espiguetas, a simetria da inflorescência, textura e ornamentação do antécio superior e, presença ou ausência de crista, arístula, prolongamento e forma do calo na base do antécio superior (Morrone e Zuloaga, 1992). Ambas as classificações, *Brachiaria* ou *Urochloa*, podem ser utilizadas para estas espécies, porém no presente trabalho optamos por adotar a classificação *Urochloa*.

As gramíneas forrageiras do gênero *Urochloa* foram introduzidas mais recentemente nas Américas, em comparação com outros gêneros como *Panicum* (capim-colonião), *Pennisetum* (capim-elefante) e *Melinis* (capim-gordura), trazidos da África na época colonial (Parsons, 1972). Umas poucas espécies africanas, como *U. plantaginea* e provavelmente *U. mutica*, foram introduzidas durante o período colonial, como cama para os escravos em navios negreiros (Parsons, 1972; Sendulsky, 1978).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A primeira introdução oficial de uma gramínea forrageira do gênero *Urochloa* no Brasil se deu em 1952, com um acesso de *U. decumbens* (cv. Ipean), porém, devido à baixa produção de sementes, este não obteve importância comercial no país. Na década de 60, uma segunda cultivar de *U. decumbens*, denominada Basilisk, foi introduzida e demonstrou excelente adaptação às condições locais, tornando-se a principal espécie forrageira no país (Pizarro et al., 1996). Nesta mesma época, também foram introduzidas no Brasil cultivares de *U. ruziziensis*, *U. humidicola* e *U. arrecta*, cultivares que ainda hoje são comercializadas no país, com exceção dessa última (Valle et al., 2008).

Alguns problemas ocorridos nessas extensas áreas formadas com *U. decumbens*, como à suscetibilidade as cigarrinhas-das-pastagens e a fotossensibilização, causaram grandes prejuízos à pecuária brasileira, fazendo com que ocorresse a busca por novas cultivares. A liberação de uma nova cultivar conhecida como *U. brizantha* cv. Marandu (Nunes et al., 1984) em 1984, que apresenta resistência às cigarrinhas-das-pastagens, fez com que ocorresse gradual substituição das áreas de pastagens implantadas com *U. decumbens*, constituindo-se um novo monocultivo (Valle et al., 2008).

A fim de reunir variabilidade genética devido à grande busca pela diversificação de pastagens, viagens de coleta foram realizadas em 1984 e 1985 no leste africano, centro de maior diversidade e dispersão do gênero *Urochloa* (Valle et al., 2008). Parte da coleção reunida pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (Keller-Grein et al., 1996; Miles e Valle, 1996) foi introduzida no país pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), constituindo a coleção de trabalho para a realização de seleção e melhoramento da Embrapa Gado de Corte (Valle, 1990).

Após essa coleta e anos de estudos envolvendo um total de 455 acessos, mais cinco cultivares foram lançadas no mercado pela Embrapa: *U. brizantha* cv. Xaraés (2003), cv. BRS Piatã (2006) e cv. BRS Paiaguás (Valle et al., 2013), *U. humidicola* cv. BRS Tupi (2011), e o primeiro híbrido interespecífico BRS RB331 Ipyporã, lançado em 2017, resultante do cruzamento entre *U. brizantha* e *U. ruziziensis*. Outras quatro cultivares foram lançadas por outras empresas: cv. Mixe Drwn 12, cv. Mixe LN 45 e cv. Mulato, resultantes de cruzamentos entre *U. ruziziensis* x *U. brizantha*, e cv. Mulato II, uma cultivar híbrida formada por genitores de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *U. decumbens*. Portanto, existem 11 cultivares do gênero *Urochloa* disponíveis no mercado até o momento.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Apesar da enorme importância para a economia do Brasil, as pastagens são formadas essencialmente por cultivares de reprodução apomítica constituindo, assim, extensos monocultivos clonais, cuja vulnerabilidade coloca em risco todo o sistema produtivo. Além disso, em comparação com culturas economicamente importantes, existem poucas cultivares disponíveis no mercado, o que torna difícil a diversificação de pastagens, a qual busca diminuir a vulnerabilidade quanto à queda de produtividade e outros riscos típicos da monocultura (Valle et al., 2009; Jank et al., 2011).

Nesse sentido, o melhoramento genético e o lançamento de novas cultivares surgem como possível solução para a diversificação das pastagens brasileiras (Jank et al., 2011) e, consequentemente, para aumentar a competitividade de toda a pecuária nacional. Além disso, existe uma alta incidência de pastagens degradadas no Brasil, portanto existe a necessidade de uma produção mais eficiente, isto é, produzir maior quantidade de carne ou de leite em menores áreas de pastagem (Dias-Filho, 2014). Esse cenário pode ser alcançado, dentre outras possibilidades, com a utilização de novas cultivares provenientes de programas de melhoramento.

Urochloa decumbens

A espécie *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster é originária da África, apresentando uma distribuição mais restrita à região central e ao leste deste continente (Uganda, Quênia, Ruanda e Burundi) (Keller-Grein et al., 1996), caracterizadas por campos e margens de matas caducifólias (Valle et al., 2008). Suas plantas formam relvado de folhas junto ao solo e são bastante procuradas pelo gado, além de suportarem uma pressão de pastejo considerável (Bodgan, 1977).

As plantas de *U. decumbens* caracterizam-se como herbáceas, perenes, de porte semi-ereto e prostrado, rizomatosas e estoloníferas. Produzem raízes nos entrenós. Podem apresentar de 0,6 à 1 metro de altura. Suas folhas apresentam coloração verde brilhante, são lanceoladas e moderadamente pilosas, e as inflorescências são racemosas, com 2 à 7 racemos. As espiguetas são elípticas, dispostas em duas fileiras, em ráquis achatadas (Peters et al., 2003; <http://www.tropicalforages.info/>, acessado em 14 de julho de 2017).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A boa adaptabilidade aos solos ácidos e pobres, a fácil multiplicação por sementes, associada à agressividade na competição com invasoras e o bom desempenho animal, comparado às pastagens nativas, explicam a rápida expansão dessa gramínea forrageira nos trópicos. Embora não se estabeleça em regiões mal drenadas e apresente alta suscetibilidade à cigarrinha-das-pastagens (Peters et al., 2003), os pastos formados por *U. decumbens* ocupam o segundo lugar em extensão territorial no Brasil, o que faz dessa espécie uma das mais importantes economicamente (Valle et al., 2008).

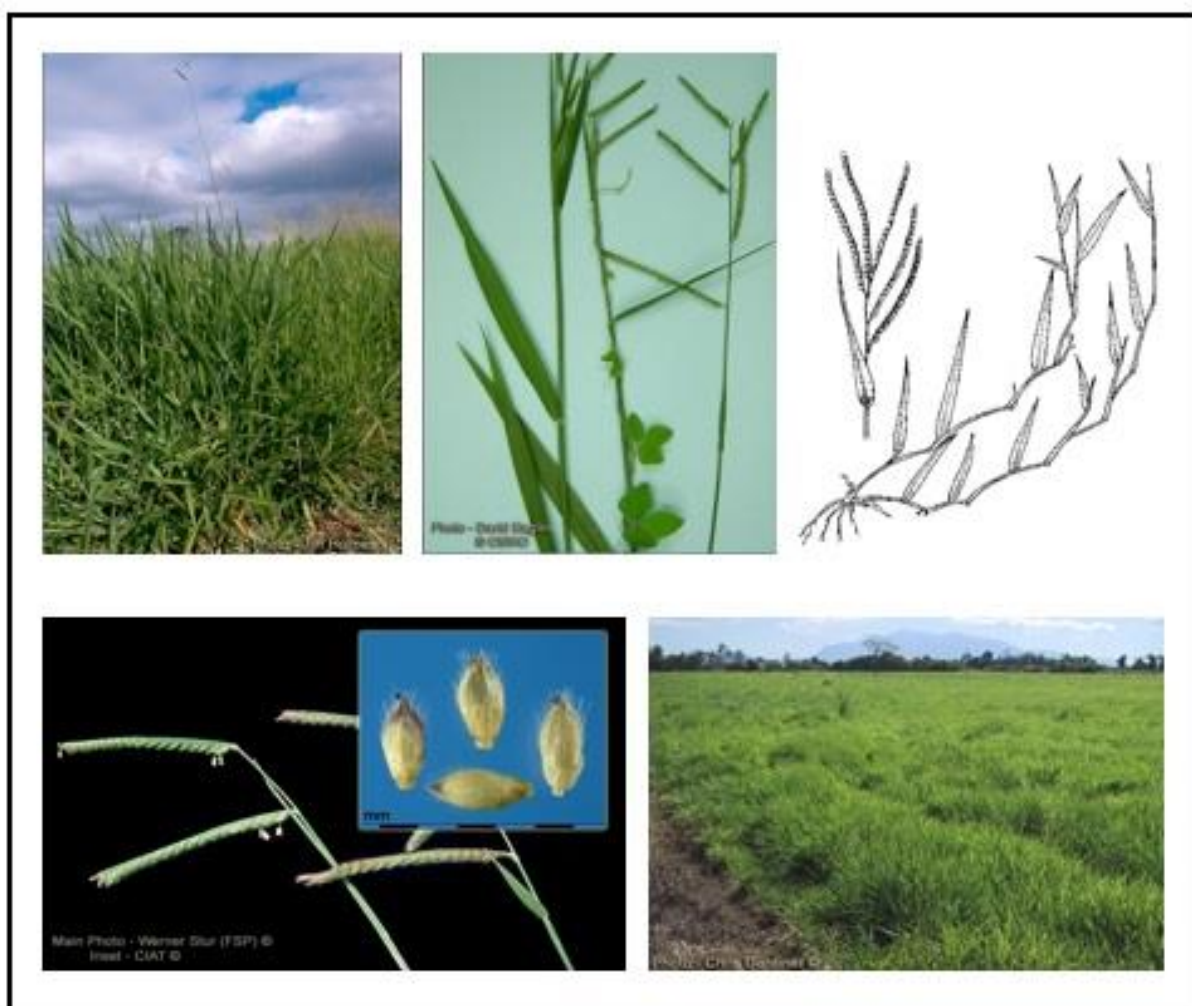


Figura 1. Aspectos vegetativos e reprodutivos de *U. decumbens*. No canto superior, à esquerda, é apresentada uma foto da planta. Ao centro, é apresentada uma foto das folhas e das inflorescências da planta. No canto superior direito, é mostrada uma ilustração das inflorescências, folhas e raízes da espécie. No canto inferior esquerdo, é apresentada uma foto com a inflorescência e o perfil das sementes da planta. E no canto inferior direito, é apresentada uma foto com um campo formado por *U. decumbens*. A ilustração e as fotos foram retiradas do site Tropical Forages (<http://www.tropicalforages.info/>, acessado em 14 de julho de 2017).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O banco de germoplasma (BAG) da Embrapa Gado de Corte (Campo Grande –MS) é mantido no campo e possui 51 acessos de *U. decumbens*, com níveis de ploidia variando de 2 à 5 (Valle e Pagliarini, 2009; Valle et al., 2008). Estudos citológicos revelaram que o número cromossômico básico apresentado por esta espécie é $x = 9$ e que se trata de uma espécie tetraplóide ($2n = 4x = 36$) (Junqueira et al., 2003; Mendes-Bonatto et al., 2003; Risso-Pascotto et al., 2003; Gallo et al., 2007). Organismos poliploides apresentam três ou mais conjuntos de cromossomos e desempenham um papel muito importante na origem e evolução de plantas silvestres e cultivadas (Schifino-Wittmann, 2004, Tate et al., 2005). Há evidências de que *U. decumbens* seja um alopoliploide (Mendes-Bonato et al., 2002; Worthington et al., 2016), originado da duplicação de genomas diferentes.

U. decumbens é uma espécie cujo o modo de reprodução predominantemente é o apomítico, embora também existam acessos diploides sexuais no banco de germoplasma. Na apomixia, o embrião desenvolve-se em sementes férteis a partir de divisões mitóticas de uma célula do nucelo, sem a união prévia de gametas. A manipulação deste processo reprodutivo permite fixar características de interesse, pois espécies apomíticas apresentam todas as sementes com o mesmo genótipo da planta mãe (Savidan, 2000; Dall’Agnol e Schifino-Wittmann, 2005). Nesse sentido, a apomixia tem grande importância tanto na história evolutiva das plantas, bem como no processo de melhoramento genético de cultivares (Dall’Agnol e Schifino-Wittmann, 2005).

Contexto do Melhoramento genético de *U. decumbens*

Como já dito anteriormente, *U. decumbens* foi a primeira gramínea forrageira do gênero *Urochloa* a ser introduzida no Brasil, no ano de 1952, erroneamente com o nome de *Brachiaria brizantha*. Novas introduções dessa espécie ocorreram treze anos depois, tornando-a conhecida como cultivar Ipean, porém devido a sua baixa produção de sementes esse material não ganhou importância comercial no país. Na década de 60, outro ecótipo de *U. decumbens*, originário da Uganda e levado para a Austrália em 1930, onde foi registrado como cv. Basilisk, foi introduzido no Brasil pelo Instituto de Pesquisas Internacionais (IRI) em Matão- SP. Nessa época, com incentivos governamentais e intensa importação de sementes da cv. Basilisk, extensos monocultivos foram formados nos cerrados brasileiros (Valle et al., 2008).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para a espécie *U. decumbens*, existem duas cultivares registradas no Registro Nacional de Cultivares – RNC, sendo que apenas a cultivar Basilisk está disponível no mercado brasileiro (MAPA, 2018), que responde por milhões de hectares plantados e cerca de 30% de toda semente exportada para a América Latina. Essa cultivar é muito conhecida e utilizada por sua excelente adaptação a solos ácidos e pobres, boa produção de forragem palatável e por formar pastagens que suportam alta pressão de pastejo e pisoteio (Keller-Grein et al., 1996).

A cultivar Basilisk foi obtida apenas por meio de seleção baseada na variabilidade natural, já que até recentemente não era possível realizar cruzamentos intraespecíficos devido às barreiras de ploidias entre os acessos apomíticos (poliploides) e sexuais (diploides). Assim, até o sucesso da poliploidização de acessos sexuais da coleção de germoplasma, o melhoramento genético esteve restrito ao uso da cv. Basilisk como doadora de pólen em cruzamentos interespecíficos com *U. ruziziensis* tetraploide (Simioni e Valle, 2009).

Entre 2005 e 2006, a partir de um protocolo de micropropagação desenvolvido para na Embrapa Gado de Corte (Rodrigues-Otubo et al., 2000), foi possível aplicar tratamentos com colchicina por meio de cultura de tecidos contendo os segmentos basais dos explantes enraizados. No banco de germoplasma de *U. decumbens* da Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande, MS, foram identificados 20 acessos sexuais diploides (Valle, 1990), sendo que dez desses foram cultivados *in vitro* e submetidos à duplicação somática de seus cromossomos. Embora apresente baixo vigor agrônômico, o acesso duplicado pode viabilizar o melhoramento da espécie, através de cruzamentos com os acessos apomíticos tetraploides naturais, e isso possibilita o acesso à variabilidade genética na espécie que está fixada pela apomixia (Valle et al., 2008; Simioni e Valle, 2009).

As plantas resultantes do processo de poliploidização foram avaliadas por análises mitóticas em pontas de raiz e análises meióticas em inflorescências jovens. De um total de 86 plantas, três tornaram-se tetraploides a partir do acesso sexual D24, sendo que todas essas mantiveram o modo de reprodução sexual (Valle et al., 2008; Simioni e Valle, 2009). Essas plantas tetraploidizadas foram utilizadas como genitores femininos nos cruzamentos intraespecíficos em que o genitor masculino foi o acesso tetraploide apomítico cv. Basilisk (D62), e um desses cruzamentos originou os híbridos avaliados no presente estudo, formando a população base para o melhoramento genético da espécie.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

De modo geral, o objetivo do programa de melhoramento é o lançamento de cultivares que não sejam apenas mais produtivas que as já comercializadas, mas que proporcionem maior eficiência na produção animal. Mais especificamente, os objetivos são selecionar acessos e híbridos superiores quanto à produtividade e a resistência a estresses bióticos, como pragas e doenças, e abióticos, como tolerância a seca e/ou alagamento, com alto valor nutritivo e produção animal sob pastejo, com vistas ao lançamento de novas cultivares (Valle et al., 2008; Valle et al., 2009). Dentre as características mais importantes para o avanço do melhoramento genético de *U. decumbens* estão a determinação do modo de reprodução e a resistência às cigarrinhas-das-pastagens (Valle et al., 2008; Valle et al., 2009).

O modo de reprodução de uma planta pode ser analisado por meio de avaliações morfológicas em teste de progênie, análise de ovário em microscopia, citometria de fluxo, teste com auxina, métodos bioquímicos (isoenzimas) e moleculares (Valle et al., 2004). Entretanto, a maioria das opções acima necessitam aguardar o ciclo completo de crescimento da planta, pois envolvem a observação de características na planta adulta, o que leva muito tempo, além de necessitarem de treinamento específico. Nesse sentido, a utilização de marcadores moleculares que co-segregam com a apomixia representa enorme potencial, pois não dependem do crescimento e florescimento da planta para a identificação do modo de reprodução, possibilitando a triagem rápida de progênies. Portanto, existe a necessidade da identificação de ferramentas moleculares para a detecção precoce e segura do modo de reprodução.

Por outro lado, cultivares resistentes à cigarrinha-das-pastagens, especialmente *Notozulia entreriana* (Berg), a principal praga que ataca *U. decumbens*, são necessárias para aumentar a quantidade e qualidade de forragem disponível para os ruminantes. O comprometimento das pastagens atacadas por esses insetos tem constituído problema relevante dentro da bovinicultura de corte brasileira, e os programas de melhoramento vêm buscando por alternativas de controle, como o lançamento de cultivares resistentes a esse inseto sugador (Valério et al., 2009). A identificação de gramíneas resistentes pode ser realizada com marcadores moleculares que co-segraram com a característica, sendo que essa análise poderá ser realizada a partir de sementes ou plântulas, diminuindo o tempo de detecção de genótipos suscetíveis.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Portanto, ganhos adicionais exigirão, cada vez mais, estudos que visem o melhor conhecimento da biologia da espécie (Souza, 2001; Valle et al., 2009), principalmente em nível molecular. Nesse contexto, ferramentas como os marcadores moleculares surgem para auxiliar e otimizar os estudos, visando o melhor entendimento genético-genômico da espécie e, consequentemente, aumentando a eficiência do melhoramento convencional.

Marcadores moleculares: dos microssatélites aos SNPs

Os marcadores moleculares podem ser definidos como sequências de DNA que estão espalhadas no genoma e que podem atuar como sinalizadores na procura por regiões genômicas de interesse. Por se tratarem de variantes alélicas, essas marcas permitem o reconhecimento de indivíduos em nível molecular e, dessa forma, representam uma forma indireta de avaliar e comparar genótipos (Laborda, 2011).

Desde o surgimento do primeiro tipo de marcador molecular, na década de 70, até os dias atuais, estão disponíveis diversos tipos de marcadores que se diferenciam pela tecnologia utilizada, custo relativo, facilidade de uso e, principalmente, pela sua capacidade de detectar diferenças entre indivíduos (Souza, 2012). Mas, independente do tipo de marcador, essa detecção é possível a partir de qualquer tipo de tecido em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e sem influência do ambiente.

Dentre os marcadores moleculares disponíveis destacam-se os microssatélites, também conhecidos como repetições de sequências simples (SSR, do inglês *Simple Sequence Repeat*). Podemos caracterizá-los como pequenas regiões compostas de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em *tandem*, distribuídos aleatoriamente no genoma dos eucariotos (Litt e Luty, 1989). Esses marcadores possuem diversos atributos, como a herança codominante e o multialelismo, cuja variação dá-se da variação do número de motivos repetitivos e, consequentemente, fornecem um elevado nível de informações genéticas. Outras características que merecem destaque são a alta reprodutibilidade via reações em cadeia da polimerase (PCR- *Polymerase Chain Reaction*) e a abundância (Kalia et al., 2011; Miah et al., 2013; Vieira et al., 2016).

O marcador SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) também é muito utilizado e trata-se de variações de uma única base em uma sequência de DNA, sendo considerada a mais

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

abundante fonte de variação entre genomas, incluindo plantas (Deschamps et al., 2012; Mammadov et al., 2012). Estudos mostram que a frequência de SNPs em algumas plantas pode ser maior do que a encontrada no genoma humano, como é o caso do sorgo, com pelo menos três SNPs a cada Kb (Feltus et al., 2004).

Esse marcador possui importantes atributos, como o fato de estar disperso ao longo de todo o genoma e ocorrer tanto em regiões codificadoras como em regiões não codificadoras, sendo mais predominantes nessas últimas (Hayashi et al., 2004). Em regiões codantes, um SNP é dito “não sinônimo” quando resulta em mudança na sequência de aminoácidos, podendo ocorrer modificações estruturais e funcionais na proteína, enquanto que quando não há alteração da sequência de aminoácido da proteína correspondente é dito “sinônimo” (Kwok, 1999).

Os SNPs comportam-se predominantemente como marcadores bialélicos, e as mutações com maior incidência ocorrem entre apenas dois nucleotídeos (Brookes, 1999). Este comportamento faz com que um único loco SNP apresente conteúdo informativo menor se comparado com marcadores multialélicos (Gupta et al. 2001), como os microssatélites. Deste modo, é necessária a utilização de um maior número de SNPs em estudos genéticos para assegurar a cobertura de grande parte do genoma.

Devido à sua alta frequência e distribuição, os SNPs são uma importante ferramenta para a obtenção de mapas genéticos com alto poder de resolução e, por geralmente estarem próximos a sítios responsáveis por variação fenotípica no genoma (Vignal et al., 2002), podem estar relacionados a características importantes para um programa de melhoramento.

Esses dois marcadores moleculares citados podem ser utilizados para as mais diversas finalidades, desde análises de diversidade genética e estudos de estrutura populacional, até a construção de mapas de ligação e identificação de regiões associadas a características de interesse (Hodel et al., 2016; Vieira et al., 2016). Esses estudos fornecem informações detalhadas a respeito da organização genômica e auxiliam na compreensão da arquitetura genética de vários caracteres nas mais diversas espécies vegetais (Schlötterer, 2004).

Para um programa de melhoramento genético, o uso de marcadores moleculares pode diminuir o tempo de desenvolvimento de uma cultivar, uma vez que permite a identificação precoce de características a serem selecionadas em uma geração, usando a Seleção Assistida por Marcadores (SAM) (Collard e Mackill, 2008; Mammadov et al., 2012; He et al., 2014).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Ademais, são imprescindíveis em estudos básicos como a identificação de híbridos, caracterização molecular de cultivares, quantificação de fluxo gênico e diversidade genética (Hodel et al., 2016; Vieira et al., 2016). Portanto, marcadores moleculares contribuem fortemente para um melhor entendimento genético-genômico de espécies economicamente importantes, como as gramíneas forrageiras.

Recentemente, as pesquisas com o gênero *Urochloa* começaram a se beneficiar das metodologias associadas aos marcadores moleculares. Silva et al. (2013) identificaram o primeiro conjunto de marcadores microsatélites para *U. ruziziensis*, um total de 85.567 locos, a partir do sequenciamento parcial do genoma. Os outros trabalhos envolvendo o desenvolvimento de marcadores microsatélites para espécies do gênero *Urochloa* foram realizados pelo nosso grupo de pesquisa (LAGM- Unicamp) em parceria com a Embrapa Gado de Corte. Dentre esses, podemos citar os conjuntos de marcadores desenvolvidos para *Urochloa humidicola* (Jungmann et al., 2009a; Vigna et al., 2011a; Santos et al., 2015; Vigna et al., 2016b) e *Urochloa brizantha* (Jungmann et al., 2009b). Além desses, o primeiro conjunto de marcadores microsatélites desenvolvido para *U. decumbens* (Ferreira et al., 2016) será apresentado no primeiro capítulo desta tese.

O desenvolvimento de marcadores moleculares microsatélites específicos para espécies de *Urochloa* foi um importante passo para aumentar o conhecimento da diversidade genética das principais espécies do gênero, planejar cruzamentos, identificar falsos híbridos e compreender melhor as relações genéticas entre diferentes espécies do gênero (Vieira et al., 2016). Além disso, a disponibilidade de um conjunto de marcadores transferíveis para espécies relacionadas representa uma grande economia de custo e tempo, tão demandados no desenvolvimento dos mesmos (Miah et al., 2013).

Em um outro trabalho genético-molecular, foi analisado pela primeira vez o conjunto de transcritos presentes em raízes de *U. decumbens* submetidas ao estresse por alumínio tóxico. Dentre os resultados, foram identificados 13.375 microsatélites que são interessantes por estarem em regiões transcritas, podendo assim estarem relacionados a genes envolvidos em vias metabólicas importantes (Salgado et al., 2017). Parte desses marcadores formaram o segundo conjunto de marcadores microsatélites caracterizados em *U. decumbens* (Souza et al., 2018). Um segundo transcriptoma, dessa vez de folhas de *U. humidicola*, possibilitou a identificação

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

de 4.489 marcadores microssatélites funcionais que podem estar associados com importantes genes (Vigna et al., 2016a).

A maioria dos estudos com marcadores microssatélites envolvendo espécies do gênero *Urochloa* abrange a análise de diversidade genética (Jungmann et al., 2010; Vigna et al., 2011b; Triviño et al., 2017), embora ainda não exista uma análise completa da variabilidade genética presente no BAG de *U. decumbens*. No estudo mais recente, Triviño et al. (2017) avaliaram um total de 257 genótipos de 14 espécies do gênero *Urochloa*, além de 4 cultivares de *Panicum maximum*. Ao todo, foram utilizados 39 marcadores microssatélites na genotipagem, o que gerou um total de 701 bandas polimórficas. Os resultados confirmaram a proximidade genética das espécies *U. decumbens*, *U. ruziziensis* e *U. brizantha*, além da proximidade entre *U. humidicola* e *U. dictyoneura*, já descritos em trabalhos anteriores (Jungmann et al., 2010; Vigna et al., 2011; Santos et al., 2015; Ferreira et al., 2016).

Ainda em relação aos estudos envolvendo marcadores microssatélites, até o momento há apenas um mapa de ligação intraespecífico de *U. humidicola*, construído com 89 marcadores SSRs (Vigna et al., 2016b). Recentemente, foi publicado um estudo de filogenia envolvendo quatro espécies do gênero (*U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. humidicola* e *U. ruziziensis*), no qual também foram utilizados marcadores microssatélites (Pessoa-Filho et al., 2017).

Em relação ao uso de marcadores SNPs em trabalhos com o gênero *Urochloa*, existe apenas um mapa de ligação construído a partir de uma progênie interespecífica entre *U. decumbens* e *U. ruziziensis*, no qual foi possível mapear genes candidatos a apomixia (Worthington et al., 2016). Esse mapa foi construído com marcadores SNPs baseados em genotipagem-por-sequenciamento (GBS), uma técnica que vem sendo explorada com sucesso em genomas complexos, como é o caso da nossa espécie de estudo.

A análise do transcriptoma de *U. humidicola* também possibilitou a identificação de 560,298 novos marcadores SNPs, sendo alguns deles envolvidos em vias metabólicas importantes, tais como a biossíntese de celulose e lignina (Vigna et al., 2016a). Ademais, no trabalho de filogenia de Pessoa-Filho e colaboradores (2017), também foram identificados marcadores SNPs entre quatro espécies de *Urochloa*, em sua maioria de regiões intergênicas, que poderão ser explorados em futuros trabalhos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Genotipagem-por-Sequenciamento: inovação para genomas poliploides

O advento da tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) promoveu grandes avanços nas áreas de genômica. A enorme demanda por uma análise mais completa do genoma exigiu o desenvolvimento de técnicas robustas para possibilitar a genotipagem de milhares de marcadores moleculares cobrindo grande parte do genoma e obtidos, preferencialmente, em um experimento único, simples e de baixo custo (Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012; Glaubitz et al., 2014).

Uma das metodologias baseadas em NGS é conhecida como Genotipagem-por-Sequenciamento (do inglês, *Genotyping-by-Sequencing* - GBS) e combina a descoberta de milhares de polimorfismos e genotipagem de forma simultânea. Essa tecnologia baseia-se na redução da complexidade genômica da amostra de DNA total utilizando-se uma ou mais enzimas de restrição. Cada amostra de DNA a ser genotipada recebe adaptadores com sequências indexadoras específicas (*barcodes*) que possibilitam o rastreamento das sequências geradas para cada amostra e, assim, a realização de um sequenciamento multiplex a custos relativamente baixos (Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012; Glaubitz et al., 2014). Em técnicas anteriores buscavam-se polimorfismos no sítio de restrição das enzimas, enquanto que pelo GBS são gerados dados de sequências adjacentes aos sítios de restrição, o que possibilita a identificação de um maior número de polimorfismo (Kim et al., 2015).

Após o sequenciamento, a filtragem e a seleção dos SNPs são realizadas com a utilização de *softwares* específicos e seguindo vários critérios, a fim de se obter SNPs confiáveis, em quantidade significativa e com elevado polimorfismo. Especificamente em organismos poliploides, é possível estimar a dosagem alélica dos SNPs encontrados e o nível de ploidia de cada loco, agregando importantes informações genéticas nas análises. Neste cenário, destaca-se o *software* SuperMASSA (Serang et al., 2012; Garcia et al., 2013).

Uma inovação da técnica GBS é a possibilidade de ser aplicada tanto em organismos modelos, que possuem um genoma de referência, quanto em organismos com ausência de informações genômicas preexistentes (Davey et al., 2011; Poland e Rife, 2012), como é o caso de *U. decumbens*, que ainda não possui o genoma sequenciado. Além disso, as sequências obtidas a partir do sequenciamento são dinâmicas, e isso possibilita que os dados brutos sejam reanalisados conforme as técnicas de bioinformática evoluem (Poland e Rife, 2012).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No entanto, existem algumas limitações que merecem destaque como, por exemplo: (i) a grande quantidade de dados perdidos; (ii) a dificuldade de alinhamento com sequências quando há regiões repetitivas no DNA; (iii) densidade de marcadores restrita a regiões específicas do genoma; e (iv) necessidade de um sequenciamento de elevada profundidade para organismos poliploides, visando uma estimativa adequada das dosagens alélicas dos SNPs identificados (Beissinger et al., 2013; Garcia et al., 2013; Heffelfinger et al., 2014; Jiang et al., 2016).

Apesar dessas limitações, a técnica de GBS tem ganhado popularidade nos últimos anos, sendo aplicada em estimativas de diversidade genética, estudos evolutivos, desenvolvimento de mapas genéticos com alta densidade e mapeamento de QTLs (Grover e Sharma, 2014). Especialmente para os poliploides, essa técnica pode representar um avanço nos estudos genômicos, em que as análises tradicionais enfrentam grandes desafios.

Mapeamento genético com ênfase no gênero *Urochloa*

Os mapas genéticos, também conhecidos como mapas de ligação, são importantes ferramentas para o avanço da genética e genômica de plantas. O principal objetivo de se obter um mapa de ligação é determinar a posição linear de genes ou marcadores correspondente à sua ordem linear nos cromossomos e, assim, identificar regiões associadas a características de importância econômica (Ball et al., 2010).

Os primeiros mapas genéticos publicados foram baseados em marcadores morfológicos e citológicos, seguido por aqueles construídos através das isoenzimas e, finalmente, pelos construídos a partir de marcadores de DNA (Carneiro e Vieira, 2002).

O desenvolvimento dos marcadores moleculares baseados em polimorfismos de DNA possibilitou a construção de mapas genéticos saturados para as mais diversas espécies cultivadas, tais como milho (Helentjaris et al., 1986), arroz (McCouch et al., 1988), trigo (Chao et al., 1989), batata (Gebhardt et al., 1989) e tomate (Tanksley et al., 1992), fornecendo informações importantes para os programas de melhoramento genético. Ademais, com as novas tecnologias de sequenciamento e, conseqüentemente, com a elevada disponibilidade de marcadores moleculares altamente polimórficos a baixos custos, mapas genéticos de diversas

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

espécies vegetais estão com uma resolução cada vez maior (Baxter et al., 2011; He et al., 2014; Nie et al., 2017). Aliado a isso, a evolução de procedimentos estatísticos e de bioinformática cada vez mais complexos e específicos, têm facilitado a obtenção de mapas genéticos mais robustos.

Os mapas genéticos podem ser aplicados em estudos de cunho teórico e no melhoramento genético de plantas. Podemos citar seu emprego em estudos de mapeamento de QTLs, como ferramenta na Seleção Assistida por Marcadores (SAM), no mapeamento comparativo entre espécies evolutivamente relacionadas, na clonagem de genes e na montagem de genomas (Carneiro e Vieira, 2002; Collard e Mackill, 2008; Ball et al., 2010; He et al., 2014).

Para a construção de um mapa genético é necessário, primeiramente, a escolha da população de mapeamento, que deve ser originada de genitores distantes geneticamente, visando explorar ao máximo o polimorfismo a ser revelado na progênie segregante (Paterson et al., 1991). Posteriormente essa progênie segregante é genotipada com os marcadores moleculares, e estes são agrupados nos chamados grupos de ligação (correspondente aos cromossomos), através da estimação da ordem e da distância entre os marcadores dentro destes grupos.

Para espécies poliploides como *U. decumbens*, a construção de mapas genéticos é dificultada pela necessidade de aplicação de técnicas genético-estatísticas muito mais complexas do que a utilizada em diploides devido, (1) a ampla variedade de possíveis genótipos gerados na progênie segregante, (2) aos vários modos de formação de gametas e pareamento preferencial dos vários cromossomos homeólogos, (3) por diversas frequências dos gametas não serem identificadas com confiança em razão da segregação dos alelos com diferentes níveis de dosagem, (4) e pela constituição do genoma ainda não ser clara devido à complexidade do mesmo (Wu et al., 1992; Milboure et al., 2008).

Além disso, a maioria dos mapas genéticos são baseados em populações provenientes de cruzamentos entre linhagens endogâmicas e esse tipo de delineamento é impraticável para espécies poliploides, pois seriam necessárias inúmeras gerações de autofecundações para obter homozigose (Lin et al., 2003). Para *U. decumbens*, além da poliploidia, a apomixia também não permite a obtenção de linhagens endogâmicas, portanto o mapeamento deve ser feito com uma progênie F₁ de irmãos-completos (Maliepaard et al., 1997).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Até recentemente, o mapeamento de espécies poliploides era realizado abordando o uso de marcadores em dose única (*single-dose markers*, SDM), segregando 1:1 ou 3:1, como proposto por Wu et al. (1992). Portanto, a informação de dosagem alélica não era considerada e os marcadores codominantes, tais como os SSRs e os SNPs, eram tratados como marcadores dominantes. Esse tipo de abordagem foi primordial para o surgimento dos primeiros mapas de poliploides, mas forneceram informações genéticas muito limitadas, quando comparados aos mapas de diploides.

Com o desenvolvimento de tecnologias NGS e o avanço de métodos genético-estatísticos, surgiram novas possibilidades que permitem acessar o complexo genoma de poliploides. A avaliação dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) ao longo do genoma pode ser mais completa com a possibilidade de se analisar a abundância relativa de cada alelo, ou seja, estimar a dosagem alélica de SNPs (Serang et al., 2012; Garcia et al., 2013; Mollinari e Serang, 2013). Para espécies tetraploides, as doses podem ser classificadas em cinco classes: nulliplex (aaaa), simplex (Aaaa), duplex (AAaa), triplex (AAAa) e quadriplex (AAAA).

O *software* SuperMASSA (Serang et al., 2012) permite classificar a dosagem alélica para qualquer nível de ploidia, mesmo quando a ploidia é desconhecida. Além disso, a população pode assumir três pressupostos: Modelo Hardy-Weinberg, Modelo F1 ou Modelo de População Generalizada. A inclusão da dosagem alélica correta é essencial para o avanço dos estudos genéticos em espécies poliploides e permite a construção de mapas mais acurados e robustos, além de aumentar a possibilidade de detecção de QTLs significativos.

Os mapas genéticos para o gênero *Urochloa* começaram a ser construídos recentemente, devido a vários fatores como, a precocidade dos programas de melhoramento genético, a inexistência de progênies para as análises, falta de investimentos e devido a complexidade genética das espécies.

O primeiro mapa genético construído para o gênero *Urochloa* foi baseado em dados de 89 marcadores microssatélites, a partir de uma progênie intraespecífica de *U. humidicola*. Esse mapa consiste em 49 grupos de ligação e apresenta um comprimento total de 1702,82 cM, com uma densidade média de 10,6 marcador/cM. Nesse mapa, o loco que controla a aposporia foi mapeado em um dos grupos de ligação, a uma distância de 19,4 cM do marcador (loco) mais próximo (Vigna et al., 2016b).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Um segundo mapa genético de uma progênie interespecífica entre uma cultivar híbrida de *U. brizantha* x *U. ruziziensis* (cv. Mulato) e uma cultivar de *U. ruziziensis* (cv. Miyaokikoku) foi construído com marcadores AFLP (*amplified fragment-length polymorphism*), baseado na estratégia do duplo pseudo-testcross. O mapa referente ao genitor masculino, cv. Mulato, possui 272 marcadores AFLP distribuídos em 29 grupos de ligação, totalizando 1423,2 cM. Um loco relacionado a apomixia foi mapeado no grupo de ligação 2, além de QTLs relacionados a caracteres agrônômicos relevantes (Thaikua et al., 2016).

No mesmo período, um mapa genético interespecífico entre *U. ruziziensis* e *U. decumbens* foi construído com marcadores SNPs baseados em GBS, a partir do qual foi possível identificar locos relacionados à apomixia (Worthington et al., 2016). Esse mapa também seguiu a estratégia do duplo pseudo-testcross, na qual dois mapas de ligação são fornecidos, sendo que em cada um deles há marcadores segregando exclusivamente para um determinado genitor. O mapa do genitor sexual BRX 44-02 (*U. ruziziensis*) contém 34 grupos de ligação em 1985 cM, enquanto que o mapa do genitor apomítico CIAT 606 (*U. decumbens*) contém 36 grupos de ligação e um comprimento total de 2693 cM. Até o momento, esse é o único mapa genético envolvendo a espécie *U. decumbens*.

Os mapas genéticos citados acima foram construídos com marcadores em dose única (MDU) (Wu et al., 1992), visando contornar as limitações devido à dosagem alélica em poliploides. Este cenário se estende para outros trabalhos recentes de mapeamento envolvendo organismos poliploides (McCallum et al., 2016; Rajput et al., 2016; Balsalobre et al., 2017; Shirasawa et al., 2017), e também pode ser justificado pela limitação dos *softwares* que não consideram todas as segregações possíveis.

Recentemente, Hackett et al. (2017) desenvolveram o *software* TetraploidSNPMap que possibilita a construção de mapas genéticos para espécies tetraploides usando informações de dosagem alélica, ou seja, são consideradas todas as segregações possíveis para um tetraploide (Tabela 1).

Essa metodologia foi a escolhida para a construção do mapa genético de *U. decumbens* que será apresentado no presente trabalho.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Possíveis configurações genotípicas em espécies tetraploides.

Tipo	Genitor 1	Genitor 2	Probabilidades de dosagens				
			AAAA 0	AAAB 0,25	AABB 0,5	ABBB 0,75	BBBB 1,0
Null (N)	AAAA	BBBB	0	0	1	0	0
Simplex (S)	AAAA	AAAB	1/2	1/2	0	0	0
Simplex (S)	ABBB	BBBB	0	0	0	1/2	1/2
Triplex (T)	AAAA	ABBB	0	1/2	1/2	0	0
Triplex (T)	AAAB	BBBB	0	0	1/2	1/2	0
Duplex (D)	AAAA	AABB	1/6	4/6	1/6	0	0
Duplex (D)	AABB	BBBB	0	0	1/6	4/6	1/6
Double- simplex (SS)	AAAB	AAAB	1/4	2/4	1/4	0	0
Double- simplex (SS)	ABBB	ABBB	0	0	1/4	2/4	1/4
X-double-simplex (XSS)	AAAB	ABBB	0	1/4	2/4	1/4	0
Simplex-duplex (SD)	AAAB	AABB	1/12	5/12	5/12	1/12	0
Duplex-simplex (DS)	AABB	ABBB	0	1/12	5/12	5/12	1/12
Double-duplex (DD)	AABB	AABB	1/36	8/36	18/36	8/36	1/36

Tabela adaptada de Hackett et al. (2013).

Mapeamento de QTLs

Os caracteres de importância agrônômica, em sua maioria, podem ser classificados como quantitativos e caracterizam-se por serem controlados por vários genes, os quais possuem a expressão altamente influenciada pela ação do ambiente. As regiões cromossômicas que contém esses genes (ou locos) controladores de caracteres poligênicos, com padrão contínuo de variação fenotípica, são denominadas QTLs (*Quantitative Trait Loci*) (Falconer e Mackay, 1996; Liu, 1998; Lynch e Walsh, 1998).

Com o advento dos marcadores moleculares e o aprimoramento das metodologias genético-estatísticas, foi possível uma melhor compreensão da arquitetura genética dos caracteres quantitativos de diversas culturas importantes. A identificação desses caracteres possibilita o aumento da eficácia dos programas de melhoramento, especialmente para caracteres de baixa herdabilidade (Lander e Botstein, 1989), melhor entendimento da evolução

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

desses caracteres e a identificação de genes de interesse (Falconer e Mackay, 1996). Assim, a detecção precisa desses genes que controlam características agrônômicas importantes pode conduzir a chamada Seleção Assistida por Marcadores (SAM) (Falconer e Mackay, 1996). Dessa forma, mapear QTLs em *U. decumbens* pode ser muito útil aos programas de melhoramento genético

Mapear QTL significa fazer inferências em todo o genoma sobre as relações entre o fenótipo de caracteres quantitativos (obtidos em experimentos de campo) e o genótipo (obtido em avaliações do genoma baseadas em marcadores moleculares). Portanto, é necessário uma progênie que apresente variabilidade genética e elevado desequilíbrio de ligação. As inferências citadas acima geram informações sobre a posição, número, efeitos e interações alélicas entre (epistasia) e dentro de locos (dominância) de diferentes regiões (Zeng et al., 1999). Estudos de mapeamento de QTLs são usualmente realizados em duas etapas. Inicialmente, as médias fenotípicas ajustadas são obtidas e, posteriormente, essas médias são utilizadas para buscar associações com marcadores moleculares ao longo de mapas genéticos (Pastina et al., 2010).

O mapeamento de QTLs requer o uso de técnicas genético-estatísticas sofisticadas, além de um bom suporte computacional devido à complexidade das análises (Pastina et al., 2010). Dentre as metodologias disponíveis para tanto, destacam-se o Mapeamento por Intervalo (*Interval Mapping*, IM) (Lander e Botstein, 1989), o Mapeamento por Intervalo Composto (*Composite Interval Mapping*, CIM) (Zeng, 1994) e o Mapeamento por Múltiplos Intervalos (*Multiple Interval Mapping*, MIM) (Kao et al., 1999).

Essas metodologias comumente baseiam-se em populações experimentais provenientes de linhagens endogâmicas, porém algumas espécies como *U. decumbens* não possuem linhagens endogâmicas à disposição. Nesse caso, assim como na construção de mapas genéticos, o mapeamento de QTLs baseia-se em populações oriundas de cruzamento biparental entre indivíduos não homozigóticos, resultando em uma progênie segregante de irmãos-completos (Gazaffi et al., 2014).

Os métodos estatísticos para mapeamento de QTLs foram desenvolvidos para organismos diploides, o que significa que são considerados apenas os marcadores segregando em dose única. O *software* TetraploidSNPMap, desenvolvido recentemente por Hackett et al. (2017), permite a detecção de QTLs em populações tetraploides a partir de SNPs com informações de dosagem alélica, utilizando o modelo de Mapeamento por Intervalo. Nesse

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

modelo, através de um par de marcadores adjacentes são feitas inferências sobre a presença de um provável QTL dentro deste intervalo utilizando informações de um mapa genético. Uma limitação desse modelo é o fato de não permitir a análise da interação entre QTLs presentes em diferentes intervalos de mapeamento dentro do genoma, devido a utilização de um par de marcas por vez, o que pode resultar no mapeamento de QTLs falsos positivos (Doerge, 2002). Além disso, o mapeamento considerando apenas a informação de dois marcadores pode levar a redução do número de QTLs mapeados (Zeng, 1994). Apesar dessas limitações, atualmente essa é a única abordagem que permite mapear QTLs com dosagens tetraploides.

Até o momento, existe apenas um trabalho publicado associando dados fenotípicos e marcadores moleculares dentro do gênero *Urochloa*. Thaikua et al. (2016) compararam duas metodologias de mapeamento de QTLs: mapeamento por intervalo e mapeamento por intervalo composto. Como parte dos resultados, detectaram QTLs envolvidos em caracteres agronômicos importantes, tais como largura foliar e diâmetro do caule, em híbridos oriundos do cruzamento entre uma cultivar híbrida de *U. brizantha* x *U. ruziziensis* e uma cultivar de *U. ruziziensis*.

Portanto, o mapeamento de QTLs é inédito numa progênie de *U. decumbens* e contribuirá para aprimorar o conhecimento da arquitetura genética de caracteres quantitativos relevantes. Dessa forma, os resultados obtidos poderão ser incorporados nos programas de melhoramento, com intuito de torná-los mais eficientes.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Gerar ferramentas genético-genômicas que contribuam para o melhor conhecimento de *Urochloa decumbens* e que possam ser úteis aos programas de melhoramento genético da espécie.

Objetivos específicos

- Desenvolver um conjunto de marcadores microssatélites específicos para *U. decumbens*;
- Genotipar com marcadores microssatélites uma progênie resultante do cruzamento intraespecífico entre *U. decumbens* D62 x *U. decumbens* D24/27;
- Detectar marcadores SNPs baseados em Genotipagem-por-Sequenciamento na mesma progênie de *U. decumbens*;
- Construir um mapa genético-molecular a partir da progênie de *U. decumbens* descrita acima;
- Mapear QTLs envolvidos no controle de características agronômicas importantes para o melhoramento de *U. decumbens*.

CAPÍTULO I

Microsatellite loci for *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster and cross-amplification in other *Urochloa* species

R.C.U. Ferreira, L.J. Cançado, C.B. do Valle, L. Chiari, A.P. de Souza

*O trabalho foi publicado pela revista BMC Research Notes (2016) 9: 152

DOI: 10.1186/s13104-016-1967-9

Received 2015 Oct 2. Accepted 2016 Mar 1. Published online 2016 Mar

R.C.U. Ferreira.¹ University of Campinas (Unicamp), Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), CP 6010, Campinas, SP 13083-970, Brazil.

L.J. Cançado. EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology, Brazilian Agricultural Research Corporation, CP 02372, Brasília, DF CEP 70770-900 Brazil.

C.B. do Valle. EMBRAPA Beef Cattle, Brazilian Agricultural Research Corporation, CP 154, Campo Grande, MS CEP 79002-970 Brazil

L. Chiari. EMBRAPA Beef Cattle, Brazilian Agricultural Research Corporation, CP 154, Campo Grande, MS CEP 79002-970 Brazil

A.P. de Souza. University of Campinas (Unicamp), Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), CP 6010, Campinas, SP 13083-970, Brazil; University of Campinas (Unicamp), Biology Institute, Plant Biology Department, CP 6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil.

CAPÍTULO I

Abstract

Background: Forage grasses of the African genus *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) are the basis of Brazilian beef production, and there is a strong demand for high quality, productive and adapted forage plants. Among the approximately 100 species of the genus *Urochloa*, *Urochloa decumbens* is one of the most important tropical forage grasses used for pastures due to several of its agronomic attributes. However, the level of understanding of these attributes and the tools with which to control them at the genetic level are limited, mainly due to the apomixis and ploidy level of this species. In this context, the present study aimed to identify and characterize molecular microsatellite markers of *U. decumbens* and to evaluate their cross-amplification in other *Urochloa* species.

Findings: Microsatellite loci were isolated from a previously constructed enriched library from one *U. decumbens* genotype. Specific primers were designed for one hundred thirteen loci, and ninety-three primer pairs successfully amplified microsatellite regions, yielding an average of 4.93 alleles per locus. The polymorphism information content (PIC) values of these loci ranged from 0.26 to 0.85 (average 0.68), and the associated discriminating power (DP) values ranged from 0.22 to 0.97 (average 0.77). Cross-amplification studies demonstrated the potential transferability of these microsatellites to four other *Urochloa* species. STRUCTURE analysis revealed the existence of three distinct groups, providing evidence in the allelic pool that *U. decumbens* is closely related to *U. ruziziensis* and *U. brizantha*. The genetic dissimilarity values determined using Jaccard's coefficient ranged from 0.06 to 0.76.

Conclusions: The microsatellite markers identified in this study are the first set of molecular markers for *U. decumbens* species. Their availability will facilitate understanding the genetics of this and other *Urochloa* species and breeding them, and will be useful for germplasm characterization, linkage mapping and marker-assisted selection.

Keywords: Enriched library, Forage, Signalgrass, Simple sequence repeat, Transferability

Background

It has been estimated that 167 million hectares of pasture land in Brazil is used to feed a herd of approximately 208 million head of cattle [1]. These pastures consist mainly of forage grasses of the genus *Urochloa* (syn. *Brachiaria*), which were introduced from Africa [2]. These forage grasses have greatly contributed to the development of the national cattle industry of Brazil, establishing Brazil as the second largest beef producer and the main beef exporter in the world. The competitive advantage of cattle production in Brazil is the exclusive use of pasture [3]. Moreover, Brazil is the largest producer and exporter of tropical forage seeds in the world [2].

One of the most widely cultivated species of *Urochloa* is *U. decumbens* Stapf., particularly *U. decumbens* cv. ‘Basilisk’. This species exhibits exceptional adaptation to the poor and acidic soils that are typical of the tropics and lead to good animal performance [4]. However, the molecular genetic information regarding this species is limited, mainly due to its reproducing predominantly via apomixis and because its ploidy levels range from diploid to pentaploid [5].

The need for new more productive and efficient cultivars has inspired the search for new tools to facilitate the selection process [3]. Thus, genetic and genomic studies are essential to advancing breeding programs via a better understanding of the genetic structure of the species. These types of studies can be conducted by using molecular tools, such as molecular markers.

Among all molecular markers, one of the most effective for plant genetics studies is the microsatellite, also known as the SSR (*Simple Sequence Repeat*). These markers are highly informative due to their multi-allelic nature, co-dominant inheritance, high transferability and broad distribution in the genomes of the species [6-8].

Whereas some microsatellite markers for *Urochloa* species have been developed [9-13], specific microsatellite markers for *Urochloa decumbens* have not been reported. Specific microsatellite molecular markers can be very useful in assessing the genetic diversity of germplasms, performing linkage mapping, identifying quantitative trait loci (QTL), performing genome-wide selection and marker-assisted selection, and facilitating molecular based breeding to improve the economically importance characteristics of a species [6,7]. Moreover, microsatellite markers identified in species with little genome information may be used for cross-amplification between related species [14].

CAPÍTULO I

The aims of the present study were to identify and characterize the first set of microsatellite markers for *Urochloa decumbens* and to test their transferability to four other *Urochloa* species (*U. brizantha*, *U. dictyoneura*, *U. humidicola* and *U. ruziziensis*).

Methods

Thirty-four *Urochloa* genotypes were obtained from the Embrapa Beef Cattle (EBC) collection, in Campo Grande, MS, Brazil for marker validation. Twenty of these genotypes are represented by *U. decumbens* germplasm accessions, six genotypes are intra-specific hybrids of the same species and the other eight genotypes are represented by two different germplasm accessions each from *U. brizantha*, *U. humidicola*, *U. dictyoneura* and *U. ruziziensis*. These other *Urochloa* species were used for the cross-amplification tests. The annotation numbers, accession numbers (as recorded in the Embrapa Beef Cattle- EBC- and in the Center for Tropical Agriculture- CIAT- databaes), genotypes, species identified, their mode of reproduction and the origin of the genotypes are shown in Table 1.

Genomic DNA was isolated from fresh leaves using the CTAB method [15]. The purity and concentration of the isolated DNA were determined using a NanoDrop1000 (Thermo) spectrophotometer and by electrophoresis in a 0.8% agarose gel that was subsequently stained with ethidium bromide (5 µg/mL⁻¹).

In a previous study, a microsatellite-enriched library of one *U. decumbens* genotype was constructed using the method described by Billotte *et al.* [16]. The sequences were then treated as described previously [9]. The microsatellites were identified using MISA software [17], and only mononucleotides with 12 or more repeats, dinucleotides with six or more repeats, trinucleotides with four or more repeats, and tetra, penta, and hexanucleotides with three or more repeats were considered. The DNA sequences determined in this study were deposited in GenBank under the accession numbers shown in Table 2.

After the primer pairs were designed using Primer3Plus software [18], we added a M13 tail (5' CACGACGTTGTAAAACGAC-3') to each forward primer. Polymerase chain reaction (PCR) assays were conducted as described previously [9]. The amplified products were separated by electrophoresis through 3% agarose gels prior to vertical electrophoresis through 6% denaturing polyacrylamide gels. The gels were then silver stained [19], and the product

CAPÍTULO I

sizes were determined by comparison to those of a 10 bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

We considered only the strongest bands because the less intense bands might have been stutter bands and an SSR was considered transferable when a band of the expected size was amplified via PCR and an appropriate SSR pattern was observed. Each SSR allele was treated as dominant due to the high ploidy levels of the genotypes; thus, this analysis was based on the presence (1) or absence (0) of a band in the polyacrylamide gels.

Table 1: Genotypes of *U. decumbens* and four species of the genus *Urochloa* that were used to characterize the microsatellite markers and analyze their levels of transferability

AN	CIAT	BRA	EBC	Origin	MR	Genotype	Species
1	16494	004448	D005	Kenya	SEX	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
2	16495	004456	D006	Kenya	SEX	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
3	16497	004472	D007	Kenya	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
4	16498	004481	D008	Kenya	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
5	16499	004481	D009	Kenya	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
6	16500	004502	D010	Kenya	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
7	16501	004511	D011	Kenya	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
8	16504	004545	D014	Kenya	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
9	26295	004651	D024	Kenya	SEX	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
10	26300	004707	D028	Rwanda	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
11	26304	004740	D032	Rwanda	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
12	26308	004782	D035	Rwanda	SEX	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
13	16491	004421	D036	Kenya	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
14	26306	004766	D040	Rwanda	SEX	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
15	06370	000116	D059	Unknown	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
16	16100	001961	D061	Unknown	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
17	NA	001996	D070	Unknown	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
18	06298	000060	D077	Unknown	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
19	-	-	D024/27	CNPGC	SEX	Tetraploidized accession	<i>U. decumbens</i>
20	00606	001058	D062	Uganda	APO	Germplasm accession	<i>U. decumbens</i>
21	-	-	R10	CNPGC	NA	Hybrid	<i>U. decumbens</i>
22	-	-	R44	CNPGC	APO	Hybrid	<i>U. decumbens</i>
23	-	-	R125	CNPGC	NA	Hybrid	<i>U. decumbens</i>
24	-	-	R144	CNPGC	APO	Hybrid	<i>U. decumbens</i>
25	-	-	R146	CNPGC	NA	Hybrid	<i>U. decumbens</i>
26	-	-	R182	CNPGC	NA	Hybrid	<i>U. decumbens</i>
27	16186	007889	DT157	Ethiopia	APO	Germplasm accession	<i>U. dictyoneura</i>
28	16188	007901	DT159	Ethiopia	APO	Germplasm accession	<i>U. dictyoneura</i>
29	NA	NA	R044	Unknown	SEX	Germplasm accession	<i>U. ruziziensis</i>

30	26163	005568	R102	Burundi	SEX	Germplasm accession	<i>U. ruziziensis</i>
31	16125	002844	B112	Ethiopia	APO	Germplasm accession	<i>U. brizantha</i>
32	26110	004308	B178	Burundi	APO	Germplasm accession	<i>U. brizantha</i>
33	26149	005118	H016	Burundi	APO	Germplasm accession	<i>U. humidicola</i>
34	06369	000370	H126	Unknown	APO	Germplasm accession	<i>U. humidicola</i>

AN: annotation number.

CIAT: Center for Tropical Agriculture.

BRA: codes from Embrapa.

CNPGC: National Center for Research on Beef Cattle.

EBC: codes from Embrapa Beef Cattle.

MR: mode of reproduction- apomictic or sexual.

NA: not available

The genetic dissimilarity among the genotypes was evaluated according to Jaccard's coefficient [20] based on a binary matrix constructed using the molecular data. This analysis was conducted using the software package NTSYSpc 2.11X [21]. An unrooted tree was constructed using the weighted neighbor-joining method (NJ) using DARwin 6.0.010 software [22].

The set of molecular data was also analyzed using the admixture model of STRUCTURE software version 2.3.4 [23] to infer the population structure of the 34 genotypes. The admixture model was tested using a period of burn-in with 100,000 iterations and a run length of 200,000. The number of K (clusters) was set from 2 to 20. To infer the appropriate number of clusters in our data, we used the ΔK statistic, which represents the rate of change in the log probability of the data between successive K values rather than the log probability of the data [24]. We retained the K value corresponding to the highest value of ΔK obtained using the online tool Structure Harvester [25]

The polymorphism information content (PIC) values were calculated to evaluate the levels of marker informativeness and to help choose primers for future studies [26]. To compare the efficacies of the markers used for varietal identification, a discriminating power (DP) value was determined for each primer [27].

Results

We analyzed 281 contigs, of which 128 were found to contain SSR. One hundred fifty-five SSR motifs were found, with the perfect microsatellite being the most abundant. Dinucleotide repeats were the most abundant class of microsatellite detected (59.36%),

CAPÍTULO I

followed by tetranucleotide (18.71%), trinucleotide (12.26%), mononucleotide (3.87%), hexanucleotide (3.22%) and pentanucleotide (2.58%) repeats. Furthermore, 22% of the microsatellite motifs were classified as class I motifs (>20bp), and 78% were classified as class II motifs (from 12 to 20bp).

A total of 113 specific primer pairs were designed, and 93 SSR markers amplified from *U. decumbens*, with 82 of these being polymorphic. A total of 459 bands were scored, and the number of bands per locus was found to range from 1 to 10, with an average of 4.93 bands per locus (Table 2).

Table 2: Description of the 93 SSR markers developed for *U. decumbens*

SSR locus	GenBank accession number	Primer sequences (5'-3')	Repeat motif	Ta (°C) ^a	Size (bp)	NA ^b	PIC ^c	DP ^d
Dec01	KT587691	F_CAAACGACTGCTGATGATGG R_TGAGAGGCTAAGAG/CAACCTG	(AC) ₁₆	65°	250-280	5	0.68	0.89
Dec03	KT587692	F_AACTGAACGCTGCTTGGTCT R_GGTCCGGAATAAAAAGCACA	(GT) ₆	65°	240-260	3	0.58	0.63
Dec05	KT587693	F_GGGCTCCTCATCAGCAGTAG R_GATGCCTCTCGGGACTATCA	(GAC) ₄	65°	132-140	4	0.61	0.54
Dec06	KT587694	F_GTTCATGGGGGCAATCAGT R_CGTGATGTCTGAACGGATGA	(CTGG) ₃	65°	120-130	4	0.70	0.54
Dec07	KT587695	F_CGAACACATTCACATACAACA R_CTGTTCGGATTTATTTGCATTA	(AC) ₇	65°	226-242	5	0.74	0.87
Dec09	KT587696	F_GCCCAACTGGAATGTGCTA R_CGACGTCCTTGTGTTTGTGTC	(TC) ₉	65°	240-280	5	0.72	0.91
Dec10	KT587697	F_GACGTCGAGGACAAACAACA R_TCCTTACCCTTGCGATTACAC	(CAAG) ₃	65°	216-256	6	0.79	0.86
Dec11	KT587698	F_GGGGGAAAATGAGACAGACA R_GCTAACCAGACAGCCACCAC	(AG) ₁₆	65°	154-198	8	0.80	0.94
Dec12	KT587699	F CTCACACCCCTCCTTCTGCTG R_CGATCGCTCCCTACTAGTGC	(GT) ₉	65°	196-226	9	0.82	0.97
Dec13	KT587700	F_CCCCCGTAAAACAGACAAAA R_ACCATGATACAACGCTGCAA	(TA) ₆	65°	166-178	5	0.72	0.89
Dec14	KT587701	F_AAACGGAGAAAGGGGATCAT R_GAGCATAACATGCAGCAGTGG	(GAC) ₄	65°	290-310	3	0.62	0.22
Dec17	KT587702	F_CCTTCGTCCATTACCCTGAA R_ATCCACCAGTGCACGTATGA	(TG) ₉	65°	224-248	6	0.63	0.72
Dec18	KT587703	F_ACGCACACACACGAACAAAT R_ATTTTCGACATGCCTGCAACT	(CGAT) ₃	65°	180-202	6	0.78	0.96
Dec19	KT587704	F_AGGTTCGATAATCGGCACAC	(GT) ₇	65°	220-236	6	0.79	0.95

		R_CGCAAGTGGTCAAGCAATTA							
Dec20	KT587705	F_ACCTTGAACTCCTGCTTTTGT	(AC) ₁₀	65°	150-168	6	0.75	0.92	
		R_AGCACTATCACCAATCAGCAA							
Dec21	KT587706	F_GCCGACATCAACTTCCATTT	(GT) ₇	65°	176-190	5	0.76	0.85	
		R_CTCCTTGGTCCAATTCCTCA							
Dec22	KT587707	F_GTGTGTACGTGATGCTATGTG	(CTT) ₄	65°	186-192	4	0.47	0.57	
		R_ATCGATCTCACTGACCATGT							
Dec24	KT587708	F_TAAAGAAACATGGGCCGGTA	(GCC) ₅	65°	210-226	5	0.73	0.86	
		R_TTATTCCTGGGATTGGGTTG							
Dec26	KT587709	F_TCGGAAAACGCAGGAGAG	(CA) ₆	65°	180-190	4	0.68	0.59	
		R_GTTCAGTGGGTCTGGCTTGT							
Dec27	KT587710	F_TGTACATGAATGGCAGCACA	(AGAT) ₃	65°	248-262	6	0.73	0.76	
		R_AACAGCAGCAGAGATGACGA							
Dec28	KT587711	F_GTTCCTCCCAAGAAACCACA	(AC) ₆	65°	146-180	8	0.78	0.84	
		R_CCCAACATTCACCTGGTTCT							
Dec29	KT587712	F_TGTTATAATCATCACCATGCTC	(GTA) ₄	65°	170-184	6	0.70	0.67	
		R_ACAGCTATTGCCACTACTTGA							
Dec30	KT587713	F_CATTACGAGCACGCAGTCC	(CA) ₇	65°	152-164	5	0.71	0.59	
		R_TACCACTGCTGGACACGAGA							
Dec31	KT587714	F_CGTTGTCAGCACACACACAC	(TCTA) ₃	65°	136-146	5	0.70	0.79	
		R_TACTACCACTGCTGGACACGA							
Dec33	KT587715	F_TGTCGTGTGCGTTTTGTTTT	(CTT) ₄	60°	274-336	8	0.78	0.94	
		R_CTAAGATCCCCACTCCCAACA							
Dec35	KT587716	F_TTCTTGACACACAGCCTTG	(TG) ₄	65°	274-290	6	0.72	0.88	
		R_GGGCTGAAAACATCATCACC							
Dec36	KT587717	F_GAAGGTGATGATCGGCAGTT	(GCAG) ₃	65°	280	1	0.00	0.00	
		R_GTGTGCGTTGCTGCCTACTA							
Dec37	KT587718	F_CCTCTCTTCCGTTTGCTCTG	(GTG) ₅	65°	198-218	5	0.70	0.81	
		R_TGAACAGGCACGGATTGATA							
Dec39	KT587719	F_TAGGTGTCCCATTGGTTCGAT	(GT) ₇	55°	166-182	5	0.64	0.34	
		R_AGGAGAGCTGCGTGTCATTT							
Dec42	KT587720	F_CACGTCATGTACTGCGATCC	(GT) ₆	65°	220-230	3	0.56	0.68	
		R_GCGTCACACATACACACACG							
Dec43	KT587721	F_CAGTCATCAGCATTCAGGTAT	(TG) ₁₁ (AG) ₆	65°	212-228	5	0.74	0.91	
		R_ATAACTTGCGTATGTGCTCTC							
Dec44	KT587722	F_CATGCTTAATCCAGAAATCAG	(AC) ₁₂	65°	182-226	6	0.78	0.94	
		R_TGTAAACCGGAAAGTGTACTG							
Dec45	KT587723	F_TGGAGATGGAGATGGGAGTC	(GGAT) ₃	65°	210	1	0.00	0.00	
		R_CCCAAGGAATGGGATAGGTT							
Dec47	KT587724	F_AGAGAGCTGATGGTCGTGGT	(GA) ₉	65°	210	1	0.00	0.00	
		R_TGGAAACTTGGGAGGATCTG							
Dec48	KT587725	F_CTAACGCTATTGCTTTGCTT	(CT) ₄₅	65°	144-190	10	0.85	0.94	
		R_TGCAGAGAGAGAGAAGAGAGA							
Dec49	KT587726	F_CAATGCATGCTTGGAAGTTG	(GT) ₆	65°	166-180	5	0.65	0.74	
		R_CATCGGAGGGTAGATTGGTC							
Dec50	KT587727	F_GAAACAGGACCATCAGATAGCA	(CA) ₆	65°	164-180	5	0.76	0.84	

		R_GGAATCTGCAGGTTTGAAG						
Dec51	KT587728	F_GCTGATCCTCGGATTGTGTT	(TG) ₂₁	65°	248-262	5	0.69	0.92
		R_TAACTTGGACGCGCTAAAGG						
Dec52	KT587729	F_CACGAATGCACATGCAATAA	(GT) ₆	65°	289-292	2	0.00	0.00
		R_AGTGAACCAAAGTCCAGAA						
Dec54	KT587730	F_GCCCTCTTTAACTCTGCTTTA	(CA) ₈	65°	236-252	5	0.75	0.92
		R_GTATCTTCTTTTCGGATGACCT						
Dec55	KT587731	F_AGCACCATCATCTTTAACAAA	(ACACC) ₃	65°	212-224	6	0.78	0.73
		R_CAAGGAATTTGCACTAAAAGA						
Dec56	KT587732	F_GAACTTAATGGCGGAGTAGAC	(AG) ₁₄	55°	220-230	2	0.00	0.00
		R_CACAGATTGCTGAATTGTTTC						
Dec58	KT587733	F_ATTAGGATTGCGCACTGGTC	(GT) ₆	65°	286-298	5	0.64	0.8
		R_ATCCGCATTACACAACCTCTC						
Dec59	KT587734	F_GGTTAAAATGGTTCGCTGGA	(GT) ₇	65°	184-220	5	0.73	0.92
		R_ACCTAGGCTCGCATGACAAT						
Dec60	KT587735	F_ATTTTCAGTTGCACATTCCA	(GT) ₆	55°	220-230	2	0.00	0.00
		R_TCCAAAACCTAGCTCAGAAAG						
Dec62	KT587736	F_AGGAAGGGTACGGTGTAGGC	(CA) ₇	65°	216-238	4	0.41	0.59
		R_TCTACATGCACATCCGGAAG						
Dec63	KT587737	F_GGGATATTTTCCGGATGT	(CTT) ₄	65°	218-226	3	0.51	0.7
		R_CAGAGCTCAGAAAGTCGTTAC						
Dec65	KT587738	F_TCGGATTCTTGGACAACCTC	(GGCC) ₃	65°	180	1	0.00	0.00
		R_CCTCTACGCGAAAGATGGTC						
Dec69	KT587739	F_GATGGCTACCTGCATTGGAT	(CCAT) ₃	55°	168-180	6	0.79	0.96
		R_ATAAGGGGAGCCCTCAAAAA						
Dec70	KT587740	F_AGCTGCCTCCACTTGACAAT	(TG) ₇	65°	256-268	5	0.72	0.62
		R_AGGCCCTGATAGTCCCCTAA						
Dec71	KT587741	F_GAGCTTCCCTGTGTCTGATA	(TG) ₁₀	55°	234-254	4	0.62	0.84
		R_ATGACAATGACTATGCTGACC						
Dec75	KT587742	F_ACAGGAGCCTTTATGCATGG	(ATGC) ₃	65°	150-166	5	0.68	0.69
		R_GTCCTGTGTTGGTCGTTCTT						
Dec76	KT587743	F_GTCACGTGCCATCACAAATC	(TAGC) ₃	65°	270	1	0.00	0.00
		R_GCACACATGCATGATGACAA						
Dec77	KT587744	F_TCCAAATGTACCGTCAATAAA	(AG) ₁₂	55°	234-260	7	0.76	0.9
		R_CGTGTCTGCATTCAAAGTG						
Dec78	KT587745	F_GCTTACCACATCCGGTGATT	(AC) ₈	65°	246-260	5	0.66	0.71
		R_GAGAATGCTTCCCGTTCTTG						
Dec83	KT587746	F_GGCTTGCTCCAAGAGATGAG	(CA) ₂₀	65°	174-198	4	0.66	0.72
		R_TAGCTTGGCCTTTGTGTGTG						
Dec84	KT587747	F_GGCTTGCTCCAAGAGATGAG	(AC) ₉	65°	220-250	7	0.78	0.95
		R_TTCGTCACGTCAAAACAAGC						
Dec86	KT587748	F_CCACCTCCCAGGATAGATGA	(TG) ₇	55°	140-180	9	0.80	0.94
		R_AGATTGGGGGAGGAAGAAGA						
Dec89	KT587749	F_CTGTTGCATCCACCACTTTTT	(TC) ₈	65°	146-180	4	0.55	0.41
		R_CGGCAGCCTAAAGTGATTGT						
Dec90	KT587750	F_CGGTGCTCCATGATTAGGAT	(GT) ₈	65°	278-326	7	0.77	0.82

		R_GCGTAGCATCATCGAGAACA							
Dec91	KT587751	F_GCCTCATCTGTTTCATTTCATT	(TG) ₇	55°	290-330	3	0.26	0.22	
		R_TGGCACTCTAACTTGTAGGC							
Dec92	KT587752	F_AGCAATCCAAGCTGAAAGGA	(AC) ₇	65°	264-290	7	0.79	0.92	
		R_TTCCGCATGAAACAAAACCTG							
Dec93	KT587753	F_TTCGGTCAAAATCGAAAAGG	(AC) ₆	65°	226-244	5	0.72	0.95	
		R_GCATTGTTTCAGAGGCTTCG							
Dec95	KT587754	F_AGCAACCCAAAGGTCAGCTA	(CT) ₂₄	65°	178-208	6	0.71	0.89	
		R_AGGAGGGATTCAAGGGAGAA							
Dec96	KT587755	F_CATTCTGGTATGGCACGTTG	(CA) ₆	65°	148-154	4	0.66	0.85	
		R_ATTTACCGACCAGGCTGAAG							
Dec97	KT587756	F_GGGCAGGCACTAGATTGATT	(TCTT) ₃	65°	176-184	4	0.61	0.72	
		R_TTGCTTGCTTGAGTTTGTGG							
Dec98	KT587757	F_TAGGTGACAAGGCACGATCA	(AG) ₁₀	65°	252-272	7	0.76	0.95	
		R_GGGCCAACATACCAAAGAGA							
Dec99	KT587758	F_TAAGAGACGAGTGCTCTGAAA	(AGCAGG) ₃	65°	210-228	7	0.77	0.91	
		R_TTGTGAATCGGTACTTTTGTG							
Dec101	KT587759	F_CTCTAACTTTTCGGCGTGGTC	(GGCC) ₃	65°	224-230	3	0.53	0.71	
		R_GGACGGTCCGACTTGTCTAA							
Dec103	KT587760	F_ATGACGAACTTGCTCCCTACA	(AC) ₈	55°	176-206	4	0.51	0.71	
		R_ATCGATTCAAGAGCCGCTTC							
Dec105	KT587761	F_CCTTCTGTTTCATTGCAGTCC	(TG) ₈	65°	174-180	4	0.56	0.65	
		R_TGGTACCACAATGCCAAATC							
Dec106	KT587762	F_TCACGAACAACGATCAGAGC	(TG) ₇	55°	180-230	7	0.74	0.93	
		R_TCTTTACCCGTGCTGTTTCC							
Dec108	KT587763	F_CATCACCGCATTTATGCAAG	(AG) ₈	65°	184-200	6	0.68	0.85	
		R_ACACACGTCTCTGCTCTCCT							
Dec109	KT587764	F_CAGCACACTGAATCCTCTGC	(GT) ₆	65°	216-220	3	0.39	0.59	
		R_CCGTTGTTCCATCAGAACCT							
Dec110	KT587765	F_CTCCGAAGATCCGAGCTATG	(GT) ₇	65°	178-184	4	0.31	0.41	
		R_CCCCTGGAGGCTATAAAAGG							
Dec111	KT587766	F_TGATTAGGTGCTGACTGCTG	(ATTT) ₃	65°	178-186	5	0.50	0.57	
		R_CTGGAAGATGTATTTGGTGTGA							
Dec112	KT587767	F_CCTCAAGAAGCTCTGGGATTT	(TGTT) ₃	55°	238-244	4	0.57	0.72	
		R_TGTGCAAACGTCAGTAGAGCA							
Dec113	KT587768	F_TGGACTAACTGCACTGCCTGT	(GT) ₉	65°	208-224	7	0.74	0.94	
		R_CATGAGGAGCACAGCGAATA							
Dec114	KT587769	F_CAAAGGCCATGCCTTGACT	(GT) ₁₁	65°	214-220	4	0.62	0.72	
		R_CACTGCTCAGCCAATCCTAAG							
Dec115	KT587770	F_GGCATATGTCTGAGTAAGTGTG	(TCT) ₄	55°	160-174	6	0.76	0.6	
		R_CCTGTTTCCATTGATTCTTTT							
Dec116	KT587771	F_TCACTTCATCCATTGCTTG	(TG) ₁₇	65°	274	1	0.00	0.00	
		R_AACATGACCGACTCCTACGG							
Dec118	KT587772	F_ACACACCCCAACTCACACAA	(AC) ₆	65°	208-226	6	0.75	0.83	
		R_TGGTCATGGCAAAAGATGAA							
Dec121	KT587773	F_TGCACAATGATGAACACAGG	(GT) ₇	65°	226-264	6	0.74	0.74	

		R_AGTGAACCAAAGTCCAGAA							
Dec122	KT587774	F_CCTGCGTCACTCGAGAAAA	(TCTG) ₃	65°	268-292	6	0.76	0.93	
		R_CAATGTCATCGCCATTCTG							
Dec123	KT587775	F_TGAGCAAACTGGAGAATGG	(TC) ₉	65°	248-280	9	0.80	0.94	
		R_CGTACATGACAGGAGGGTGT							
Dec124	KT587776	F_AGAAGCCCCAGATGTTCTGA	(GT) ₉	65°	270-306	4	0.52	0.69	
		R_GCTAGTCGCGTCTACCGTTC							
Dec125	KT587777	F_TCTGGGGTGGAAATGTTGAT	(CT) ₁₁	65°	202-214	4	0.61	0.34	
		R_CCCTTCACCTTGAGAAAGCA							
Dec126	KT587778	F_GGATGGATTGATGGATGCTT	(GGCC) ₃	65°	268-304	7	0.77	0.93	
		R_AACCCGAAAGGCCTAAGCTA							
Dec127	KT587779	F_CGTTGATCACACGTCTCAGG	(TTGC) ₃	65°	250-280	4	0.65	0.75	
		R_GATTCGCCACCAACATTCT							
Dec131	KT587780	F_CTTGTTACCTTCTGCACAATAAA	(GAA) ₅	65°	160-170	3	0.00	0.00	
		R_ATTAGTCTTCCGTCCTTGTC							
Dec132	KT587781	F_GTATCGGGTAGCAAGGCAAG	(AAGC) ₃	65°	220-240	2	0.00	0.00	
		R_GGAAATTCCTTACCCCGAAG							
Dec133	KT587782	F_GGATGGAAGAGCACAAAAGC	(CT) ₇	65°	218-228	5	0.68	0.81	
		R_GCGTGTGTGTGTGTGTTTGA							
Dec134	KT587783	F_CAGGCTTCCCCTCTCTCTCT	(AC) ₇	65°	220-260	8	0.76	0.93	
		R_GCAACCGGAAGAATTCATGT							
Total average						4.93	0.68	0.77	

^aAmplification temperature (°C).

^bMaximum number of alleles observed.

^cPolymorphism information content.

^dDiscrimination power.

The PIC values of the 82 polymorphic loci ranged from 0.26 to 0.85 (average of 0.68), and the discriminating power values ranged from 0.22 to 0.97 (average of 0.77) (Table 2).

Two genotypes of four other species of the genus *Urochloa* (*U. brizantha*, *U. humidicola*, *U. dictyoneura* and *U. ruziziensis*) (Table 1) were used to evaluate the transferability of the 93 SSR markers. All of the loci were tested using the same PCR conditions used for analysis of *U. decumbens*. Fifty-six percent of the loci were amplified in at least one *U. dictyoneura* genotype, 38% were amplified in *U. humidicola*, 99% were amplified in *U. ruziziensis*, and 92% were amplified in *U. brizantha*. Amplification of 31% of the microsatellite markers was achieved for all of the evaluated species. The microsatellite markers Dec07, Dec31, Dec33, Dec77 and Dec108 were only transferable for *U. ruziziensis* species (Additional File 1).

CAPÍTULO I

Based on the allelic frequencies determined using STRUCTURE software [23], 28% of the alleles are rare (frequency < 0.05), 57% of these alleles are of intermediate abundance (0.05 < frequency < 0.30), and 15% are abundant alleles (frequency > 0.30). We observed 43 rare alleles that are specific for *U. decumbens*, eight rare alleles specific for *U. humidicola*, seven specific for *U. dictyoneura*, four alleles specific for *U. brizantha* and two rare alleles specific for *U. ruziziensis*.

The Bayesian analysis performed using STRUCTURE software [23] revealed that the 34 *Urochloa* genotypes could be distributed into three distinct clusters (Figure 1), as determined from the ΔK values that were generated using Structure Harvester software [24,25]. Using a K value of three, 15 genotypes were allocated into Cluster I (6 to 9), 13 genotypes were grouped into Cluster II (21 to 19) and six genotypes were allocated into Cluster III (27 to 32) (Figure 1).

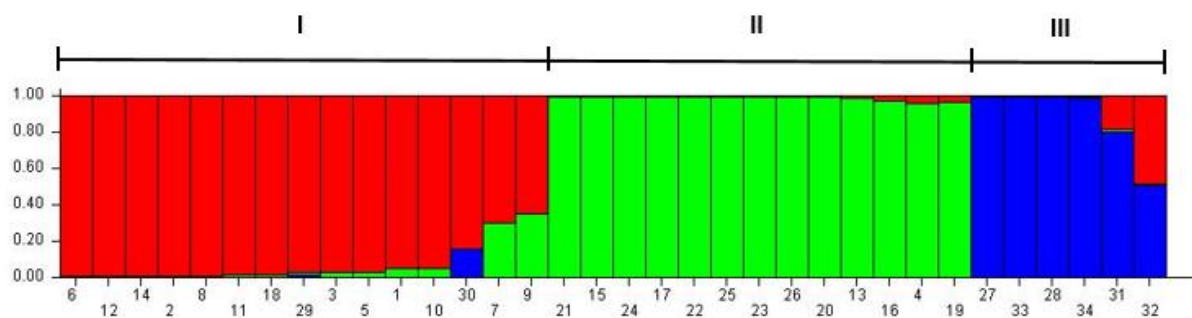


Fig. 1 Analysis performed using an admixture model in STRUCTURE 2.3.4 software with correlated allele frequencies. The clustering profile obtained at K = 3 is indicated by different colors. Each of the 34 genotypes is represented by a single column broken into colored segments with lengths proportional to each of the K inferred gene pools. The scale on the left indicates the membership coefficients (Q) used to allocate the genotypes into clusters. The genotypes were named according to the annotated numbers listed in Table 1. Cluster I (from 6 to 9), Cluster II (from 21 to 19) and Cluster III (from 27 to 32)

The genetic distance values that were determined using Jaccard's coefficient ranged from 0.06 (D062 and R10) to 0.76 (H016 and D009). The unrooted neighbor-joining tree successfully discriminated all of the tested genotypes (Figure 2).

Discussion

In this report, we have described the first set of microsatellite markers for *U. decumbens*, which is an important tropical forage grass for which there is limited genomic information. The

CAPÍTULO I

availability of a robust set of informative molecular markers is essential to accelerating its breeding programs as well as for germplasm characterization, genetic map development and marker-assisted selection.

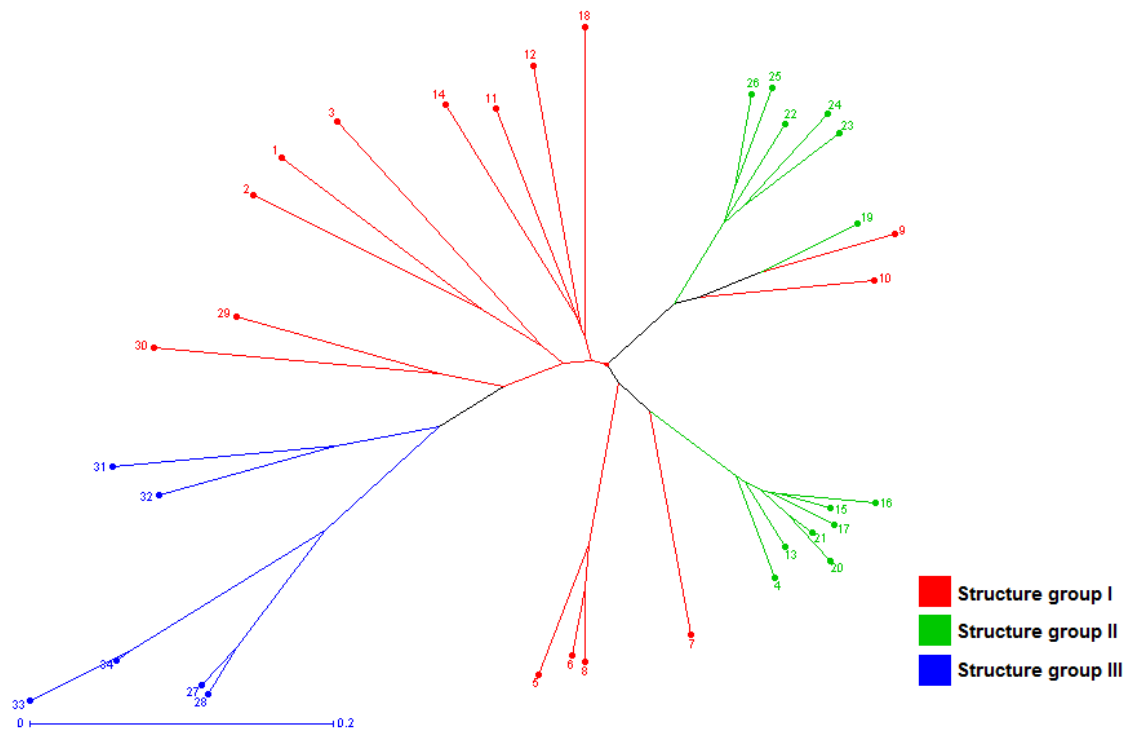


Fig. 2 Unrooted neighbor-joining tree based on Jaccard's coefficient for the 34 genotypes of the *Urochloa* species. The genotypes were named according to the annotated numbers listed in Table 1. The color of the branches represent the clusters identified in Fig. 1, as follows: red Cluster I; green Cluster II; blue Cluster III.

In the present study, dinucleotide repeats were the most abundant class of microsatellites detected, followed by tetra, tri, mono, hexa and pentanucleotide repeats. Dinucleotide motifs have been found to be the most abundant type of microsatellites in plant genomes [28,29]. Notably, the high occurrence of dinucleotide motifs can be attributed to both of the evaluated libraries having been enriched using (CT)₈ and (GT)₈ probes.

In total, 93 SSR markers were characterized, 82 of which were found to be polymorphic (88%). The loci that did not exhibit polymorphism in the genotypes that we evaluated may be useful in other studies.

The Polymorphism Information Content (PIC) is an index used to qualify a marker for genetic studies and reflects the level of polymorphism detected. Seventy-seven markers tested

CAPÍTULO I

in *U. decumbens* genotypes were found to be highly informative ($PIC > 0.5$) and five markers were found to be moderately informative ($0.25 < PIC < 0.5$), based on a previously proposed classification system [30] (Table 2). The Dec48 marker had the highest PIC value, 0.85, and the Dec91 marker had the lowest value, 0.26. The average PIC values for all of the markers was 0.68 (Table 2), indicating a high level of polymorphism.

To determine whether these molecular markers could discriminate the genotypes of *U. decumbens*, the discrimination power (DP) of each SSR locus was computed. The DP values ranged from 0.22 (Dec14 and Dec91) to 0.97 (Dec12), with an average value of 0.77.

The most informative loci in this panel of SSRs were Dec12, Dec48, Dec86 and Dec97 because they had the highest PIC and DP values (Table 2). In contrast, the DEC91 locus had low PIC and DP values (0.26 and 0.22, respectively), as expected due to its low levels of polymorphism and cross- amplification in all of the other *Urochloa* species tested, which suggests that this locus is a conserved region [11].

STRUCTURE analysis showed that the genotypes were distributed in three clusters and that each cluster was characterized by a set of allele frequencies at each locus and was represented by different colors (red, green and blue) as shown in Figure 1. The best K number of clusters was determined using the ΔK method [24] and implemented in the online tool Structure Harvester [25] (See Additional File 2).

Cluster I included fifteen *U. decumbens* genotypes plus the *U. ruziziensis* genotypes, Cluster II contained only *U. decumbens* genotypes, and Cluster III contained the others *Urochloa* species, including *U. dictyoneura*, *U. humidicola* and *U. brizantha* (Figure 1). The clustering of some of the *U. decumbens* genotypes with *U. ruziziensis* genotypes may be explained by the genetic proximity of these species [11, 13, 31, 32]. This fact is reflected in the allelic pools that are identified with different colors in Figure 1.

Cluster II included genotypes 19 and 20, and 6 hybrids derived from crosses between these two genotypes that were grouped together (Figure 1). These hybrids are members of an F_1 population that will be mapped using the polymorphic SSRs described in this study. In Cluster III, which included three different *Urochloa* species, the predominant allelic pool is represented in blue, and only the *U. brizantha* genotypes showed some percentage of the red allelic pools, demonstrating their genetic proximity to *U. decumbens* (Figure 1).

CAPÍTULO I

The tree constructed based on Jaccard's coefficient successfully discriminated all of the tested genotypes (Figure 2) and showed a distribution of these genotypes similar to that obtained using STRUCTURE analysis (Figure 1), although the two types of analysis used different statistical approaches. Moreover, this tree and the allelic pools that were determined indicated that *U. decumbens* and *U. ruziziensis* are more closely related to one another than to the other species (Figures 1 and 2).

Based on the genetic values obtained using Jaccard's coefficient, the lowest genetic distance was observed between the D062 and R10 genotypes (0.06). The R10 genotype should correspond to a hybrid that originated from a cross between D062 and D24/27, but the genetic distance observed shows that it is likely a false hybrid, which demonstrates the importance of using molecular markers to discriminate genotypes. The highest genetic distance (0.76) was observed between the D009 and H016 genotypes, representing *U. decumbens* and *U. humidicola* species, respectively, which are genetically distant species [11, 13, 31, 32] (See Additional File 3).

All of the microsatellite markers were transferable to at least one different species of the *Urochloa* genus, and 31% of the markers were successfully amplified in all of the species, indicating their absolute transferability. The highest level of transferability was observed in *U. ruziziensis*, followed by *U. brizantha*, *U. dictyoneura* and *U. humidicola* (see Additional File 1). The higher proportion of successful PCR amplification for the *U. ruziziensis* and *U. brizantha* genotypes indicates the closer phylogenetic distance between these species and *U. decumbens*. Thus, *U. brizantha*, *U. decumbens* and *U. ruziziensis* form an agamic complex and produce fertile hybrids [33, 34], enhancing the *Urochloa* breeding program.

Silva *et al.* [12] developed 198 microsatellite markers for *U. ruziziensis* and found that the percentages of markers potentially transferable to *U. decumbens* and *U. humidicola* were 92.9% and 42.9%, respectively, corroborating our results. Others studies showed that *U. brizantha* and *U. ruziziensis* are more closely related to *U. decumbens* than to *U. humidicola* and *U. dictyoneura* [11, 13, 31, 32]. Marker transferability is effective in reducing the time and cost of initial studies aimed at identifying microsatellite markers in related species; thus, these markers could be used in genetics studies, such as in those concerning intra-species molecular characterization, species differentiation, molecular identification, and characterization of interspecific hybrids [14].

CAPÍTULO I

The success of a breeding program can be accelerated by the effective use of molecular markers. Thus, the SSR markers developed in this study will be useful for *U. decumbens* breeding programs and possibly for those of other related *Urochloa* species.

Additional File 1. Transferability of the SSR markers developed for *Urochloa decumbens*

Transferability ^{a, b}				
SSR locus	<i>U. dictyoneura</i>	<i>U. ruziziensis</i>	<i>U. brizantha</i>	<i>U. humidicola</i>
Dec01	1/2	1/2	1/2	0/2
Dec03	2/2	1/2	2/2	2/2
Dec05	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec06	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec07	0/2	1/2	0/2	0/2
Dec09	0/2	0/2	1/2	1/2
Dec10	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec11	1/2	1/2	1/2	0/2
Dec12	1/2	2/2	1/2	1/2
Dec13	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec14	2/2	2/2	2/2	1/2
Dec17	2/2	2/2	2/2	1/2
Dec18	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec19	1/2	2/2	2/2	0/2
Dec20	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec21	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec22	0/2	2/2	0/2	1/2
Dec24	2/2	2/2	2/2	0/2
Dec26	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec27	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec28	0/2	2/2	2/2	0/2

Dec29	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec30	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec31	0/2	2/2	0/2	0/2
Dec33	0/2	2/2	0/2	0/2
Dec35	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec36	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec37	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec39	0/2	2/2	1/2	2/2
Dec42	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec43	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec44	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec45	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec47	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec48	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec49	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec50	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec51	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec52	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec54	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec55	2/2	2/2	2/2	1/2
Dec56	2/2	2/2	2/2	0/2
Dec58	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec59	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec60	2/2	2/2	2/2	0/2
Dec62	2/2	1/2	0/0	0/0
Dec63	2/2	2/2	2/2	0/2
Dec65	2/2	2/2	2/2	0/2
Dec69	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec70	2/2	2/2	2/2	2/2

Dec71	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec75	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec76	2/2	2/2	2/2	0/2
Dec77	0/2	2/2	0/2	0/2
Dec78	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec83	2/2	2/2	1/2	1/2
Dec84	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec86	1/2	2/2	2/2	2/2
Dec89	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec90	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec91	1/2	1/2	2/2	2/2
Dec92	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec93	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec95	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec96	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec97	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec98	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec99	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec101	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec103	1/2	2/2	2/2	0/2
Dec105	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec106	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec108	0/2	2/2	0/2	0/2
Dec109	2/2	2/2	2/2	0/2
Dec110	0/2	2/2	1/2	1/2
Dec111	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec112	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec113	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec114	2/2	2/2	2/2	0/2

Dec115	2/2	2/2	2/2	0/2
Dec116	2/2	2/2	2/2	0/2
Dec118	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec121	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec122	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec123	2/2	2/2	2/2	0/2
Dec124	2/2	2/2	2/2	2/2
Dec125	2/2	2/2	2/2	0/2
Dec126	1/2	2/2	1/2	0/2
Dec127	0/2	2/2	2/2	0/2
Dec131	1/2	2/2	1/2	0/2
Dec132	2/2	2/2	2/2	0/2
Dec133	0/2	2/2	1/2	0/2
Dec134	1/2	2/2	2/2	0/2

^aNumber of successfully amplified genotypes/Number of tested genotypes.

^bNomenclatural classification: *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster, *Urochloa dictyoneura* (Figure & De Not.) Veldkamp, *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins, *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster, *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga.

Abbreviations

AN: annotation number; bp: base pairs; CAPES: Coordination of Improvement of Higher Education Personnel; CTAB: cetyltrimethyl ammonium bromide; DNA: deoxyribonucleic acid; DP: discrimination power; EBC: Embrapa Beef Cattle; EMBRAPA: Brazilian Agricultural Research Corporation; K: number of clusters; MCMC: Markov Chain Monte Carlo; NA: number of alleles; NJ: neighbor joining; PCR: polymerase chain reaction; PIC: polymorphism information content; Q: association coefficient determined using STRUCTURE analysis; QTL: quantitative trait loci; SSR: simple sequence repeat; Syn: synonym; Ta (°C): annealing temperature.

Authors' contributions

LJC developed the microsatellite-enriched libraries. RCUF conducted the bioinformatics searches to identify the microsatellites, designed the flanking primers, validated the

CAPÍTULO I

microsatellite markers, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. CBV and LC participated in the design and implementation of the study. LC helped draft the manuscript. APS conceived and supervised the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa de SP (FAPESP 08/52197-4) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES—Computational Biology Program) for grants; the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA Beef Cattle) for providing the *Urochloa* genotypes used. RCUF is a recipient of a graduate fellowship from CAPES-EMBRAPA Program.

References

1. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC). Estatísticas: balanço da pecuária. <http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=8> (2014). Accessed 15 July 2015.
2. Valle CB do, Jank L, Resende RMS. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. *Rev. Ceres*. 2009; 56(4):460-72.
3. Jank L, do Valle CB, Resende RMS. Breeding tropical forage. *Crop Breed. Appl Biotechnol*. 2011; S1:27-34.
4. Mateus RG, Barrios SCL, Figueiredo UJ, do Valle CB. Agronomic evaluation of 324 intraspecific hybrids of *Brachiaria decumbens* in Brazil. *Trop Grasslands- Forrajes Tropicales*. 2013; 1:99-100.
5. Penteado MIO, dos Santos ACM, Rodrigues IF, do Valle CB, Seixas MAC, Esteves A. Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria*. 2000. <http://www.embrapa.br/gado-de-corte/busca-de->

CAPÍTULO I

publicacoes/-/publicacao/324069/determinacao-de-ploidia-e-avaliacao-da-quantidade-de-dna-total-em-diferentes-especies-do-genero-brachiaria. Accessed 30 July 2015.

6. Kalia RK, Raí MK, Kalia S, Rohtas S, Dhawan AK. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 2011; doi: 10.1007/s10681-010-0286-9.
7. Gao C, Ren X, Mason AS, Li J, Wang W, Xiao M, Fu D. Revisiting an important component of plant genomes: microsatellites. *Funct Plant Biol*. 2013; doi: 10.1071/FP12325.
8. Haq SU, Jain R, Sharma M, Kachhwaha S, Kothari SL. Identification and characterization of microsatellites in expressed sequence tags and their cross transferability in different plants. *Int J Plant Genomics*. 2014; doi: 10.1155/2014/863948
9. Jungmann L, Vigna BBZ, Paiva J, Sousa ACB, do Valle CB, Laborda PR, Zucchi MI, de Souza AP. Development of microsatellite markers for *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. *Conserv Genet Res*. 2009; doi: 10.1007/s12686-009-9111-y.
10. Jungmann L, Sousa ACB, Paiva J, Francisco PM, Vigna BBZ, Valle CB do, Zucchi MI, Souza AP de. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stap. *Conserv Genet*. 2009; doi: 10.1007/s10592-009-9839-7.
11. Vigna BBZ, Alleoni GC, Jungmann L, do Valle CB., Souza AP. New microsatellite markers developed from *Urochloa humidicola* (Poaceae) and cross amplification in different *Urochloa* species. *BMC Res Notes*. 2011; 4:523.
12. Silva PIT, Martins AM, Gouvea EG, Pessoa-Filho M, Ferreira ME. Development and validation of microssatélite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. *BMC Genomics*. 2013; doi: 10.1186/1471-2164-14-17.

CAPÍTULO I

13. Santos JCS, Barreto MA, Oliveira FA, Vigna BBZ, Souza AP. Microsatellite markers for *Urochloa humidicola* (Poaceae) and their transferability to other *Urochloa* species. BMC Res Notes. 2015; 8:83.
14. Azevedo ALS, Costa PP, Machado JC, Machado MA, Pereira AV, Léo FJS. Cross species amplification of *Pennisetum glaucum* microsatellite markers in *Pennisetum purpureum* and genetic diversity of napier grass accessions. Crop Sci. 2012; doi: 10.2135/cropsci2011.09.0480.
15. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 1987; 19:11-5.
16. Billotte N, Lagoda PJR, Risterucci AM, Baurens FC. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits. 1999; 54:277-88.
17. Thiel T. MISA: MicroSatellite identification tool. Version 1.0. In: MISA-MicroSatellite identification tool. Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. 2001. <http://pgrc.ipkgatersleben.de/misa/misa.html>. Accessed 15 August 2014.
18. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res. 2007; doi:10.1093/nar/gkm306.
19. Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denature polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Mol Bio Rep. 2001; doi: 10.1007/BF02772828.
20. Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull Soc Vaudoise Sci Nat. 1908, 44:223–270.

CAPÍTULO I

21. Rohlf FJ. NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Applied Biostatistics; 2000, Version 2.11X.
22. Perrier X, Stephens M, Donnelly P. DARwin software. Computer program and documentation distributed by the author 2015. <http://darwin.cirad.fr>. Accessed 10 Aug 2015.
23. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000; 155:945–59.
24. Evanno G, Regnaut S, Goudet J: Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 2005,14:2611-2620.
25. Earl DA, vonHoldt BM. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Res*. 2012; doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
26. Mateescu RG, Zhang Z, Tsai K, Phavaphutanon J, Burton Wursten NI, Lust G, Quass R, Murphy K, Acland GM, Todhunter RJ. Analysis of allele fidelity, polymorphic information content, and density of microsatellites in a genome-wide screening for hip dysplasia in a crossbreed pedigree. *J Hered*. 2005; doi:10.1093/jhered/esi109.
27. Tessier C, David J, This P, Boursiquot JM, Charrier A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor Appl Genet*. 1999; 98:171–7
28. Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol*. 2002; doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x.
29. Morgante M, Hanafey M, Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet*. 2002; doi: 10.1038/ng822.

CAPÍTULO I

30. Anderson JA, Churchill GA, Sutrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*. 1993; doi: 10.1139/g93-024.
31. Renvoize SA, Clayton WD, Kabuye CHS. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB, editors. *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*. EMBRAPA/ CIAT;1996. p.1-15.
32. Jungmann L, Vigna BB, Boldrini KR, Sousa AC, do Valle CB, Resende RM, Pagliarini MS, Zucchi MI, de Souza AP. Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass *Brachiaria humidicola* based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and geographical origin. *Genome*. 2010; doi: 10.1139/g10-055.
33. Valle CB, Savidan Y. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB, editors. *Brachiaria: biology, agronomy, and improvement*. EMBRAPA/CIAT; 1996. p. 147-163.
34. Valle, C.B.; Miles, J.W. 2001. Breeding of apomictic species. In: Savidan Y, Carman JG, Dresselhaus T, editors. *The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. Mexico, DF: CYMMYT/IRD; 2001. p. 137-152.

RESULTADOS COMPLEMENTARES I

A população de mapeamento de *U. decumbens*, uma progênie que consta de 239 indivíduos coletados, foi gerada a partir de um cruzamento intraespecífico entre o acesso sexual D24/27 (tetraploidizado com o uso de colchicina) e a cultivar apomítica Basilisk (D62), ambos $2n = 4x = 36$.

Dos 89 marcadores microssatélites desenvolvidos e apresentados no Capítulo I, 41 foram polimórficos entre os genitores da progênie de *U. decumbens* e, portanto, utilizados na genotipagem da mesma. Além deles, foram utilizados na genotipagem mais seis marcadores microssatélites obtidos do transcriptoma de *U. decumbens* (Salgado et al., 2017; Souza et al., 2018), totalizando 47 marcadores SSRs.

Os marcadores foram amplificados por reação de PCR utilizando temperaturas que variaram de 55° a 65°C. Antes da separação por tamanho em gel de poli-acrilamida 6,5%, os produtos de PCR foram desnaturados por 5 minutos a 94°C. O genotipador Li-Cor 4300 DNA Analyzer (Schuelke, 2000) foi utilizado na genotipagem da progênie. Na figura 1 temos o perfil de amplificação observado na genotipagem do marcador Dec95.



Figura 1. Gel virtual de acrilamida gerado pelo Li-Cor com o perfil de amplificação do loco microssatélite Dec95. As duas primeiras colunas são os genitores da progênie, D24/27 e D062, seguidos por alguns híbridos.

Os 47 locos polimórficos entre os genitores, e seus respectivos motivos de repetição, temperaturas de anelamento, tamanho esperado dos produtos amplificados, sequências dos *primers* e número de alelos por loco, estão apresentados na Tabela 1.

No total, foram geradas 152 bandas. O loco Dec92 foi o que amplificou o maior número de bandas, seguido dos locos Dec44, Dec51, Dec69 e Dec122 (Tabela 1). Esses locos foram

RESULTADOS COMPLEMENTARES I

altamente polimórficos nas análises com acessos de *U. decumbens* e de outras quatro espécies do gênero *Urochloa*, apresentadas no Capítulo I (Ferreira et al., 2016).

Tabela 1. Descrição dos 47 marcadores microsatélites utilizados na genotipagem da progênie de *U. decumbens*.

Locos SSR	Iniciador Foward/Reverse	Motivo	Ta	Tamanho	Alelos
Dec1	F_CAAACGACTGCTGATGATGG R_TGAGAGGCTAAGAG/CAACCTG	(AC) ₁₆	65°	275	2
Dec5	F_GGGCTCCTCATCAGCAGTAG R_GATGCCTCTCGGGACTATCA	(AC) ₁₆	65°	145	2
Dec7	F_CGAACACATTACATACAACA R_CTGTCGGATTTATTTGCATTA	(AC) ₇	65°	225	3
Dec12	F_CTCACACCCTCCTTCTGCTG R_CGATCGCTCCCTACTAGTGC	(GT) ₉	65°	200	3
Dec18	F_ACGCACACACACGAACAAAT R_ATTTGACATGCCTGCAACT	(CGAT) ₃	65°	180	4
Dec19	F_AGGTTCGATAATCGGCACAC R_CGCAAGTGGTCAAGCAATTA	(GT) ₇	65°	230	2
Dec21	F_GCCGACATCAACTTCCATTT R_CTCCTTGGTCCAATTCCTCA	(GT) ₇	65°	190	4
Dec24	F_TAAAGAAACATGGGCCGGTA R_TTATTCCTGGGATTGGGTTG	(GCC) ₅	65°	220	3
Dec26	F_TCGGAAAACGCAGGAGAG R_GTTTCAGTGGGTCTGGCTTGT	(CA) ₆	65°	175	3
Dec27	F_TGTACATGAATGGCAGCACA R_AACAGCAGCAGAGATGACGA	(AGAT) ₃	65°	260	2
Dec29	F_TGTTATAATCATCACCATGCTC R_ACAGCTATTGCCACTACTTGA	(GTA) ₄	65°	180	2
Dec30	F_CATTACGAGCACGCAGTCC R_TACCACTGCTGGACACGAGA	(CA) ₇	65°	160	3
Dec31	F_CGTTGTCAGCACACACACAC R_TACTACCACTGCTGGACACGA	(TCTA) ₃	65°	145	3
Dec43	F_CAGTCATCAGCATTCAGGTAT R_ATAACTTGCGTATGTGCTCTC	(TG) ₁₁ (AG) ₆	65°	220	2
Dec44	F_CATGCTTAATCCAGAAATCAG R_TGTAAACCGGAAAGTGTACTG	(AC) ₁₂	65°	200	5
Dec50	F_GAAACAGGACCATCAGATAGCA R_GGAATCTGCAGGTTTGGGAAG	(CA) ₆	65°	170	4
Dec51	F_GCTGATCCTCGGATTGTGTT R_TAACTTGGACGCGCTAAAGG	(TG) ₂₁	65°	245	5
Dec54	F_GCCCTCTTTAACTCTGCTTTA R_GTATCTTCTTTCGGATGACCT	(CA) ₈	65°	240	3

Dec55	F_AGCACCATCATCTTTAACAAA R_CAAGGAATTTGCACTAAAAGA	(ACACC) ₃	65°	210	4
Dec59	F_GGTAAATGGTTCGCTGGA R_ACCTAGGCTCGCATGACAAT	(GT) ₇	65°	210	4
Dec69	F_GATGGCTACCTGCATTGGAT R_ATAAGGGGAGCCCTCAAAAA	(CCAT) ₃	55°	175	5
Dec71	F_GAGCTTCCCTGTGTCTGATA R_ATGACAATGACTATGCTGACC	(TG) ₁₀	55°	240	4
Dec75	F_ACAGGAGCCTTTATGCATGG R_GTCCTGTGTTGGTCGTTCCCT	(ATGC) ₃	65°	150	3
Dec78	F_GCTTACCACATCCGGTGATT R_GAGAATGCTTCCCCTTCTTG	(AC) ₈	65°	250	4
Dec83	F_GGCTTGCTCCAAGAGATGAG R_TAGCTTGGCCTTTGTGTGTG	(CA) ₂₀	65°	180	2
Dec84	F_GGCTTGCTCCAAGAGATGAG R_TTCGTCACGTCAAAACAAGC	(AC) ₉	65°	250	4
Dec90	F_CGGTGCTCCATGATTAGGAT R_GCGTAGCATCATCGAGAACA	(GT) ₈	65°	280	3
Dec92	F_AGCAATCCAAGCTGAAAGGA R_TTCCGCATGAAACAAAACCTG	(AC) ₇	65°	270	6
Dec93	F_TTCGGTCAAAATCGAAAAGG R_GCATTGTTTCAGAGGCTTCG	(AC) ₆	65°	230	3
Dec95	F_AGCAACCCAAAGGTCAGCTA R_AGGAGGGATTCAAGGGAGAA	(CT) ₂₄	65°	190	4
Dec96	F_CATTCTGGTATGGCACGTTG R_ATTTACCGACCAGGCTGAAG	(CA) ₆	65°	150	4
Dec98	F_TAGGTGACAAGGCACGATCA R_GGGCCAACATACCAAAGAGA	(AG) ₁₀	65°	250	3
Dec99	F_TAAGAGACGAGTGCTCTGAAA R_TTGTGAATCGGTACTTTTGTC	(AGCAGG) ₃	65°	210	2
Dec101	F_CTCTAACTTTTCGGCGTGGTC R_GGACGGTCCGACTTGTCTAA	(GGCC) ₃	65°	225	4
Dec108	F_CATCACCGCATTTATGCAAG R_ACACACGTCCTCGTCTTCCT	(AG) ₈	65°	190	3
Dec109	F_CAGCACACTGAATCCTCTGC R_CCGTTGTTCCATCAGAACCT	(GT) ₆	65°	220	2
Dec113	F_TGGACTAACTGCACTGCCTGT R_CATGAGGAGCACAGCGAATA	(GT) ₉	65°	215	3
Dec114	F_CAAAGGCCATGCCTTGTAAT R_CACTGCTCAGCCAATCCTAAG	(GT) ₁₁	65°	220	4
Dec118	F_ACACACCCCAACTCACACAA R_TGGTCATGGCAAAAGATGAA	(AC) ₆	65°	220	4
Dec122	F_CCTGCGTCACTCGAGAAAA R_CAATGTCATCGCCATTTCTG	(TCTG) ₃	65°	270	5
Dec133	F_GGATGGAAGAGCACAAAAGC R_GCGTGTGTGTGTGTGTTGA	(CT) ₇	65°	220	3

DecE211	F: GTATTAATTCACTGGGTGTCGCT R: CCATCACCTCCATCATAGGC	(TTG) ₅	60°	180	2
DecE218	F: TATCTCTATCTGGGGATTGGAGC R: AAACAAAACCAAATCGCGG	(GCG) ₆	60°	185	4
DecE223	F: CGCAGCATCACCTCTTCTGTA R: TGTAGCTCTGGCAAATCCATCT	(CCG) ₆	55°	175	2
DecE239	F: GTACCCTTACGACAGCCACC R: CAAATCCATTTTTGTCAGTGGTT	(CAG) ₅	62°	170	2
DecE246	F: CGTCTTGGAGGAGGATGAAG R: GGACCTGGATGTCCGCAT	(GGA) ₅	62°	160	4
DecE267	F: ACGCCCAACCAACAAGGAC R: TCCAGGAGAGGGTCCTGAG	(GGCTCC) ₄	55°	190	2

A identificação segura e precoce de híbridos de populações de mapeamento pode ser realizada com o uso de marcadores moleculares. A genotipagem da progênie com 47 marcadores SSRs permitiu identificar 22 falsos híbridos. Essa comprovação foi possível devido a observação de alelos que não estavam presentes nos genitores da progênie (Figura 2). Assim, foram excluídos os genótipos que apresentaram contaminações em, pelo menos, três locos.

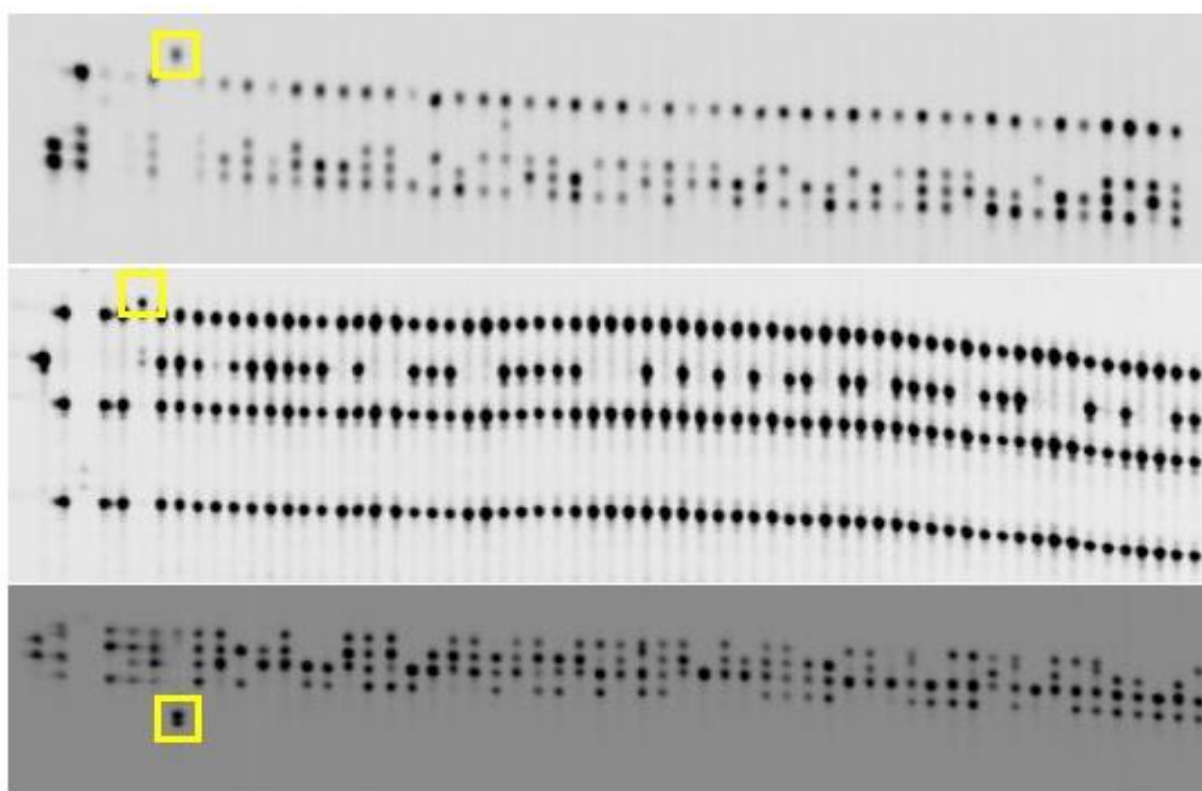


Figura 2. Perfil de amplificação dos locos Dec21, Dec69 e Dec59, respectivamente. Em destaque estão os alelos que não são comuns nos genitores e, portanto, possibilitaram caracterizar esses indivíduos como falsos híbridos.

RESULTADOS COMPLEMENTARES I

Os seguintes falsos híbridos foram identificados: R9, R33, R39, R45, R86, R94, R123, R127, R138, S13, S16, S19, T11, T13, T14, T44, T58, T63, T64, T65, T70 e T87.

De acordo com os pesquisadores responsáveis pelo experimento, houve contaminação no bloco de cruzamentos e alguns desses híbridos tiveram como genitor paterno *U. brizantha* cv. Marandu, e não *U. decumbens* cv. Basilisk, como esperado. A identificação precoce dos híbridos e o teste de paternidade são extremamente importantes nos programas de melhoramento, pois evitam a seleção de falsos híbridos ou híbridos oriundos de cruzamentos indesejados, bem como a incorporação desses em análises genéticas posteriores.

Devido às limitações do *Software* TetraploidSNPMap (Hackett et al., 2017) utilizado para a construção do mapa genético de *U. decumbens*, ainda não foi possível inserir os marcadores microssatélites nas análises de mapeamento.

CAPÍTULO II

First Genetic and QTL Mapping in *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster using SNP Tetraploid Dosage

Rebecca Caroline Ulbricht Ferreira¹, Letícia Aparecida de Castro Lara², Lucimara Chiari³,
Sanzio Carvalho Lima Barrios³; Cacilda Borges do Valle³, José Raul Valério³, Fabrícia
Zimmermann Vilela Torres³, Antonio Augusto Franco Garcia²; Anete Pereira de Souza^{1,4}

¹ Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), University of Campinas
(UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

² Genetics Department, ESALQ, University of São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brazil

³ Embrapa Beef Cattle, Brazilian Agricultural Research Corporation, Campo Grande, MS, Brazil

⁴ Plant Biology Department, Biology Institute, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

CAPÍTULO II

Abstract

Urochloa decumbens (syn. *Brachiaria decumbens*) is one of the most important forage grasses in Brazilian beef production; therefore, genomic studies are essential to advance breeding programs by gaining a better understanding of the genetic structure of this tetraploid species. A high-resolution genetic map is essential for a wide range of genetics and genomics studies such as comparative genomics analysis and QTL mapping. The objective of this study was to obtain an integrated genetic map for a *U. decumbens* full-sib cross family with GBS-based markers with allelic dosage as well as to detect QTL for resistance to pasture spittlebugs (*Notozulia entreriana*). We used five pseudo-genome references to align the GBS reads and selected 4,240 high-quality SNP markers identified in the *Setaria viridis* genome. Of these markers, 1,000 were distributed throughout nine homologous groups with a cumulative map length of 1,335.2 cM and an average marker density of 1.33 cM. The map contains SNP markers with different configurations: simplex (S), duplex (D), double-simplex (SS), X-double-simplex (XSS), duplex-simplex (DS), and double-duplex (DD). Three QTLs for resistance to spittlebugs were detected on three HGs, explaining 4.66- 6.24 of the variations. Because this map is the first map of *U. decumbens* to include SNP dosage data and QTL detections it will be useful for future evolutionary studies, genome assembly, and other quantitative trait locus analysis in *Urochloa* spp. These approaches will improve the efficiency and accuracy of selection in *U. decumbens* molecular breeding.

Keywords: Allelic dosage, Linkage map, Polyploidy, Signalgrass, SNPs, Quantitative traits.

Introduction

Brazilian cultivated pastures are the basis for the production of beef cattle and cover extensive areas, most of which are populated by grasses of the genus *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) (Jank et al., 2011; ABIEC, 2016). This genus belongs to the Poaceae family and comprises approximately 100 species of plants distributed in tropical and subtropical regions, mainly in the African continent (Renvoize et al., 1996; Valle et al., 2009).

CAPÍTULO II

One of the most widely cultivated species of this genus is *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster, also known as signalgrass. This forage grass has relevant agronomic attributes, such as exceptional adaptation to the poor and acidic soils that are typical of the tropics, leading to good animal performance (Valle et al., 2010). However, the species is susceptible to spittlebug (*Notozula entreriana* (Berg)) (Hemiptera: Cercopidae), the most damaging pest for tropical pastures (Gusmão et al., 2016), that reduce biomass production, loss of palatability, and reduce carrying capacity of pastures (Valério and Nakano, 1988).

Genetic breeding of this species is recent and has proven challenging because this grass is predominantly tetraploid ($2n = 4x = 36$) and apomictic (Naumova et al., 1999; Valle et al., 2008). In this scenario, the number of currently available molecular genetic resources is limited. Previous molecular studies have been performed to increase knowledge of *U. decumbens* genetics, such as the development of the sets of microsatellite markers (Ferreira et al., 2016; Souza et al., 2018) and the first transcriptome (Salgado et al., 2017) of the species, as well as linkage maps from an interspecific population of *U. decumbens* x *U. ruziziensis* (Worthington et al., 2016). Other studies with molecular markers have analyzed the genetic relationships of this species to other species in the genus *Urochloa* (Almeida et al., 2011; Pessoa-Filho et al., 2017, Trivino et al., 2017).

Until recently, it was not possible to perform intraspecific crossings due to the ploidy barriers between apomictic (polyploid) and sexual (diploid) accessions, but this restriction changed when diploid accessions were artificially tetraploidized using colchicine (Simioni and Valle, 2009). This advance allowed the generation of a base population for the species and the exploration of a genetic variability previously conserved by apomixis, favoring new molecular studies, such as construction of specific genetic maps, to increase genetic knowledge of the species.

Genetic maps are essential tools for genetics and genomics research, and they are becoming increasingly common in polyploid species, mainly due to the development of next-generation-sequencing (NGS) technologies and advances in genetic and statistical methods (Garcia et al., 2013). In this scenario, we highlight the genotyping-by-sequencing (GBS) technique, which allows the discovery of hundreds of thousands of SNPs, abundant markers in

CAPÍTULO II

the plant genome, at low cost (Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012). Allied to this, robust software has been developed for polyploid organisms, such as programs that can estimate the allelic dosage of SNPs, providing more genetic information to generate linkage maps with much higher marker densities (Serang et al., 2012; Garcia et al., 2013; Mollinari and Serang, 2013; Bourke et al., 2016).

The mapping process is more complex in polyploid species, mainly because of the larger number of possible genotypes (Ripol et al., 1999; Vigna et al., 2016). Most polyploid genetic maps have been limited to the use of single-dose markers (SDMs). In this case, either each marker is considered as a single-allele copy from only one of the parents of the cross, with a 1:1 segregation ratio, or the SDMs in both parents segregate in a 3:1 ratio (Wu et al., 1992). This method has been developed and successfully adopted for various forage grass species, such as *Panicum maximum* (Ebina et al., 2005), *Paspalum notatum* (Stein et al., 2007), *Panicum virgatum* (Okada et al., 2010), and *Urochloa humidicola* (Vigna et al., 2016). However, the use of only SDMs represents a loss of genetic information, because in tetraploid species, such as *U. decumbens*, five possible dosage classes exist: nulliplex (aaaa), simplex (Aaaa), duplex (AAaa), triplex (AAAa), and quadruplex (AAAA). Thus, many other marker segregations can be considered. Knowledge of the dosage of an SNP is essential for genetic studies in polyploid species and can significantly increase the information imparted by each locus, providing greater genome coverage (Voorrips et al., 2011; Garcia et al., 2013; Bourke et al., 2016).

High-resolution genetic linkage mapping for polyploid species can identify beneficial trait loci and permit genome-based breeding (Shirasawa et al., 2017). Especially in *U. decumbens*, the identification of loci involved in spittlebug resistance is a promising tool for characterizing the genetic architecture of this trait. Besides that, it can assist in the design of strategies to be introduced into breeding programs to increase the efficiency of selection processes and accelerate the release of new cultivars (Valle et al., 2009).

This study is the first to report on the development and application of GBS for mapping studies in a tetraploid *U. decumbens* population. To the best of our knowledge, there have been no reports on QTL mapping in signalgrass. Our goals were to (i) construct the first GBS-based integrated genetic map using tetraploid allelic dosage information in this bi-parental population, and (ii) identify QTLs related to resistance to spittlebug on the integrated genetic map.

CAPÍTULO II

Materials and methods

Plant material and DNA extraction

The full-sib population was generated from a cross between *U. decumbens* cv. Basilisk (tetraploid apomictic cultivar, used as pollen donor) and D24/27 (sexual accession tetraploidized by colchicine); therefore, both parents were tetraploid. This population was obtained from Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) Beef Cattle (EBC) and consisted of 217 F₁ hybrids.

Leaf samples from each hybrid and both parents were collected, and genomic DNA was extracted using the DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen GmbH, Germany). Concentrations were determined using a Qubit fluorometer (Thermo Fisher).

GBS library construction and sequencing

The GBS library was prepared at the University of Campinas following the protocol described by Elshire et al. (2011), with some modifications. Samples from both parents of the population were replicated five times for sequencing. Each individual within a library was part of a 96-plex reaction. Each DNA sample (300 ng) was digested with the restriction enzyme NsiI (NEB) and then ligated to a unique barcoded adapter plus a common adapter. The 96-plex libraries were sequenced as 150-bp single-end reads on the Illumina NextSeq 500 platform.

SNP calling

SNP discovery and genotype calling were performed with the Tassel-GBS pipeline (Glaubitz et al., 2014). Because this pipeline requires a reference genome, and the *U. decumbens* genome has not yet been sequenced, we aligned the GBS tags using five alternative pseudo-genomes: (i) the *Panicum hallii* genome (v 2.0; ~554 Mb arranged in 9 chromosomes and 8,405 scaffolds; diploid forage), (ii) the *Panicum virgatum* genome (v 1.0; ~1,230 Mb arranged in 18 chromosomes and 220,646 contigs; tetraploid forage), (iii) the *Setaria viridis* genome (v 1.0; ~394.9 Mb arranged in 9 chromosomes and 724 scaffolds; diploid forage), (iv)

CAPÍTULO II

the *Setaria italica* genome (v 2.2; ~405 Mb arranged in 336 scaffolds; diploid forage), and (v) the transcriptome of *U. decumbens* obtained by Salgado et al. (2017) (164,920 sequences). These genomes are available from the Phytozome website (<http://www.phytozome.net/>) (Goodstein et al., 2012). The Bowtie2 algorithm (Langmead and Salzberg, 2012) was used to align tags against each reference with -D and -R parameters defined as 20 and 4, respectively, and with the very-sensitive-local argument. The Tassel-GBS pipeline (Glaubitz et al., 2014) was modified to obtain the original count of the number of reads for each SNP allele.

Allelic dosage estimation and data filtering

SuperMASSA software (Serang et al., 2012) was used to estimate the correct tetraploid allelic dosage (number of copies of each allele) of each individual. The minimum overall depth considered was 25 reads, and the model used was F₁ Population Model. Markers were fitted and filtered to ploidy 4. Posteriorly, markers were selected manually (using R software) with up to 25% missing data and monomorphic markers were removed.

Linkage map construction

The linkage map was constructed using the TetraploidSNPMap software (Hackett et al., 2017). Linkage groups were constructed separately using the SNPs identified on each relative *S. viridis* chromosome. Markers with significance of the χ^2 goodness-of-fit statistic less than 0.001 for simplex and 0.01 for higher segregations were considered to be distorted and were removed.

Considering the ordination of markers, a 2-point analysis was used to calculate the recombination frequency and LOD score for each pair of SNPs in each possible phase by an expectation-maximization (EM) algorithm to maximize the likelihood and to infer the most likely phase as the one with the highest likelihood among those with a recombination frequency < 0.5. Duplicate and near-duplicate SNPs were removed in this step. The recombination frequencies were converted to map distances using Haldane's mapping function, and then a multidimensional scaling analysis (MDS) was used to calculate the best order for the SNPs in

CAPÍTULO II

the linkage group. After this step, we excluded some SNPs that showed low LOD scores or that were distant from the rest of the linkage group (Hackett et al., 2017).

Some phases of the ordered SNPs were inferred by the automated phase analysis in TetraploidSNPMap and completed manually based on the most likely phase for previous informative pairs prior to carrying out QTL analysis.

A genetic linkage map was drawn using MapChart 2.32 (Voorrips et al., 2002), and SNP configurations were identified with different colors.

Phenotypic evaluation

The resistance of *U. decumbens* to spittlebug was evaluated in a greenhouse experiment at Embrapa Beef Cattle, Brazil. A total of 12 randomized block design experiments were used to analyze 349 individuals, in which 157 are hybrids of the mapping population, with four common checks (H331, D62, B30, and M2). The evaluation of the nymphal survival (number of nymphs that reached the adult stage), in percentage, was evaluated as described by Lapointe et al. (1992) and Valério et al. (1997), in two consecutive years (five experiments in the first year and seven experiments in the second year). The phenotypic model is:

$$y_{ijkl} = \mu + t_i + b_{j(l)} + p_l + a_k + ta_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

where y_{ijkl} is the phenotype of the i -th individual, at j -th block, l -th experiment, and k -th year; μ is the overall mean; t_i is the random effect of the i -th individual ($t_i \sim N(0, \sigma_t^2)$); $b_{j(l)}$ is the random effect of the j -th block within the l -th experiment ($b_{j(l)} \sim N(0, \sigma_b^2)$); p_l is the random effect of the l -th experiment ($p_l \sim N(0, \sigma_p^2)$); a_k is the fixed effect of the k -th year; ta_{ik} is the random effect of the i -th individual by k -th year interaction ($ta_{ik} \sim N(0, \sigma_{TA}^2)$); ε_{ijkl} is the residual error ($\varepsilon_{ijkl} \sim N(0, \sigma_E^2)$).

The analysis was performed in the R package ASReml (Butler et al., 2009) and the heritability was calculated using the index proposed by Cullis et al. (2006):

$$H_C^2 = 1 - \frac{PEV}{2\sigma_G^2}$$

where PEV is the prediction error variance and σ_G^2 is the genetic variance.

CAPÍTULO II

QTL mapping

TetraploidSNPMap software performed the QTL analysis for each linkage group separately using the integrated linkage map with phase information. It requires the SNP data for the linkage group and the phenotypic trait dataset (Hackett et al., 2017). The model used was Interval mapping (IM) based in tetraploid dosage information.

Software displayed the LOD profile along chromosomes, giving the LOD score statistical and percentage variation explained. A permutation test with 1000 permutations evaluated the significance of the QTL peak. Simple models for the genotype estimated at the most probable QTL position were calculated using the Schwarz Information Criteria (SIC) (Schwarz, 1978). Models with the lowest value for SIC were considered the best models (Hackett et al., 2014).

Results

SNP calling

A total of 1,183,089,925 sequence reads were obtained from four NextSeq 500 lanes for the *U. decumbens* mapping population, of which 94% contained high-quality bases (phred score 20) (Patel and Jain, 2012). The alignment results using *P. virgatum*, *P. hallii*, *S. viridis*, *S. italica*, and the transcriptome of *U. decumbens* showed that overall alignment ranged from 11.84% to 18.96% of tags. The transcriptome of *U. decumbens* was the pseudo-reference genome that resulted in the highest overall alignment rate and the highest unique alignment rate (Table S1).

Considering all pseudo-references, 262,449 markers were obtained by the Tassel-GBS pipeline with a minimum minor allele frequency of 0.01 and minimum minor allele count of 1000. The alignment that identified the most markers in this step was the *P. virgatum* pseudo-reference genome, while the alignment with the transcriptome of *U. decumbens* identified the fewest SNPs (Table 1).

CAPÍTULO II

The output of the Tassel-GBS pipeline was used as the input for the SuperMASSA software, using the F₁ Population Model and fitting and filtering for ploidy 4. A total of 41,470 markers were selected with a minimum overall depth of 25 reads (Table 1).

Table 1. Number of markers obtained with the Tassel-GBS pipeline, estimation of allelic dosage with SuperMASSA software and data filtration analysis.

Reference genomes	Tassel-GBS	SuperMASSA	Excluded missing data and filtered polymorphic sites
<i>Panicum virgatum</i>	60,683	8,303	3,501
<i>Panicum hallii</i>	49,603	7,748	3,153
<i>Setaria viridis</i>	58,370	9,345	4,240
<i>Setaria italic</i>	56,713	8,960	4,049
Transcriptome	37,080	7,114	3,043
Total	262,449	41,470	17,986

Using three different SNP markers, Figure 1 shows how the SuperMASSA software uses the ratio of the intensity of two alleles to classify individuals according to their genotypes using a probabilistic graphical model (Serang et al., 2012). The markers were named with the dosage allelic configuration, the chromosome number, and the position of the SNP in the chromosome. In this step, the *S. viridis* alignment revealed the highest number of markers, followed by that of *S. italica*. Afterward, markers with up to 25% missing data and monomorphic markers were removed. The final number of markers was 17,986, including all the pseudo-reference genomes (Table 1). The highest number of markers, 4,240, was obtained by alignment with the *S. viridis* genome (Table 1). These markers were used in the subsequent steps.

CAPÍTULO II

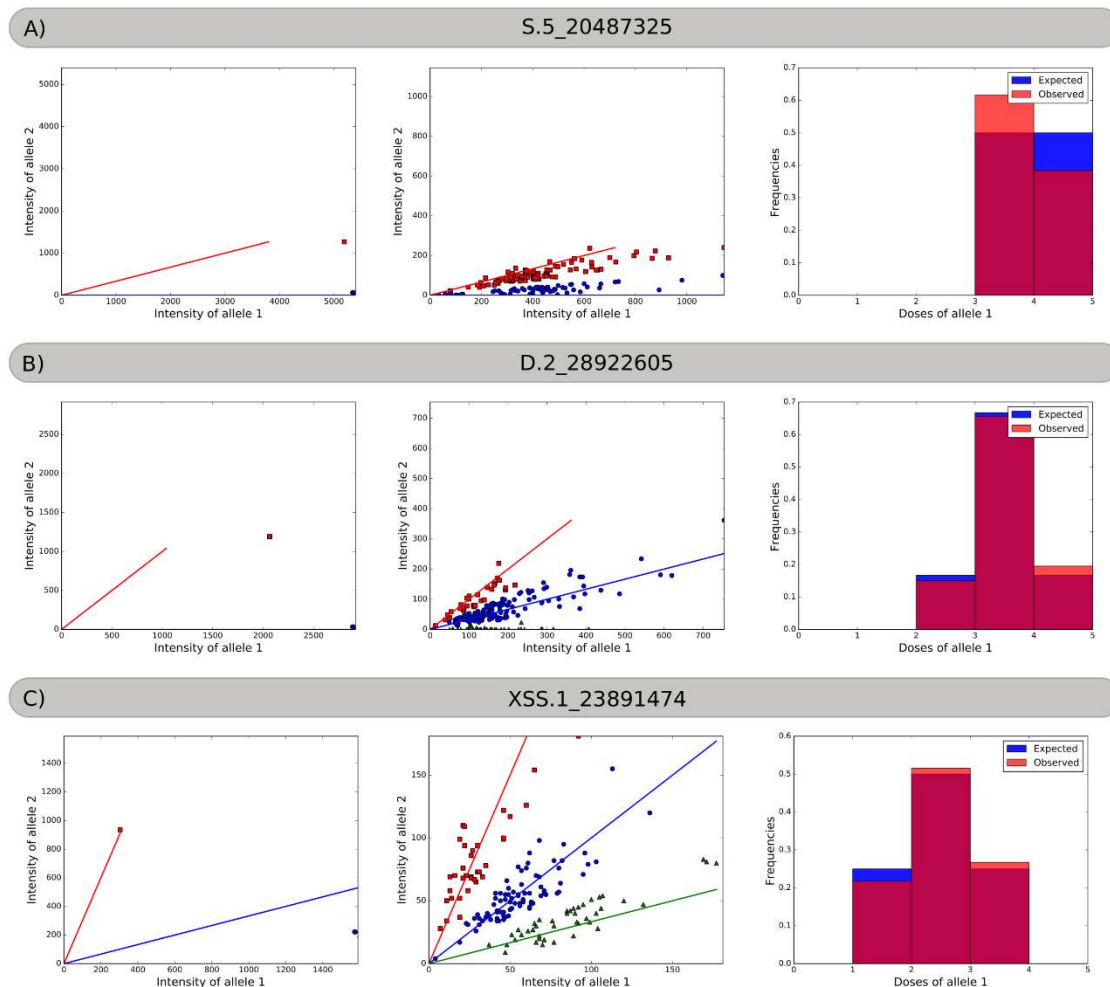


Figure 1. Allelic dosages of parents, allelic dosages of progeny and frequency histograms. A) Marker S.5_20487325. Red squares represent Aaaa (simplex) offspring, and blue circles represent aaaa (nulliplex, or dose 0 of A) offspring. B) Marker D.2_28922605. Red squares represent AAaa (duplex) offspring, blue circles represent Aaaa (simplex) offspring, and green triangles represent aaaa (nulliplex) offspring. C) Marker XSS.1_23891474. Red squares represent AAAa (triplex) offspring, blue circles represent AAaa (duplex) offspring, and green triangles represent Aaaa (simplex) offspring.

The complete redundancy among markers was inspected after quality and ploidy filtration (Figure 2). The five pseudo-references (*Panicum hallii* genome, *P. virgatum* genome, *Setaria viridis* genome, *S. italica* genome, and *U. decumbens* transcriptome) showed some similarities, especially between *S. italica* and *S. viridis*. This result is expected due to the phylogenetic proximity of these groups. The highest number of markers classified as unique were found for the *Panicum* genome and *U. decumbens* transcriptome pseudo-

CAPÍTULO II

references. These species remain largely undomesticated, and this fact is reflected in their greater genomic variability, favoring breeding programs.

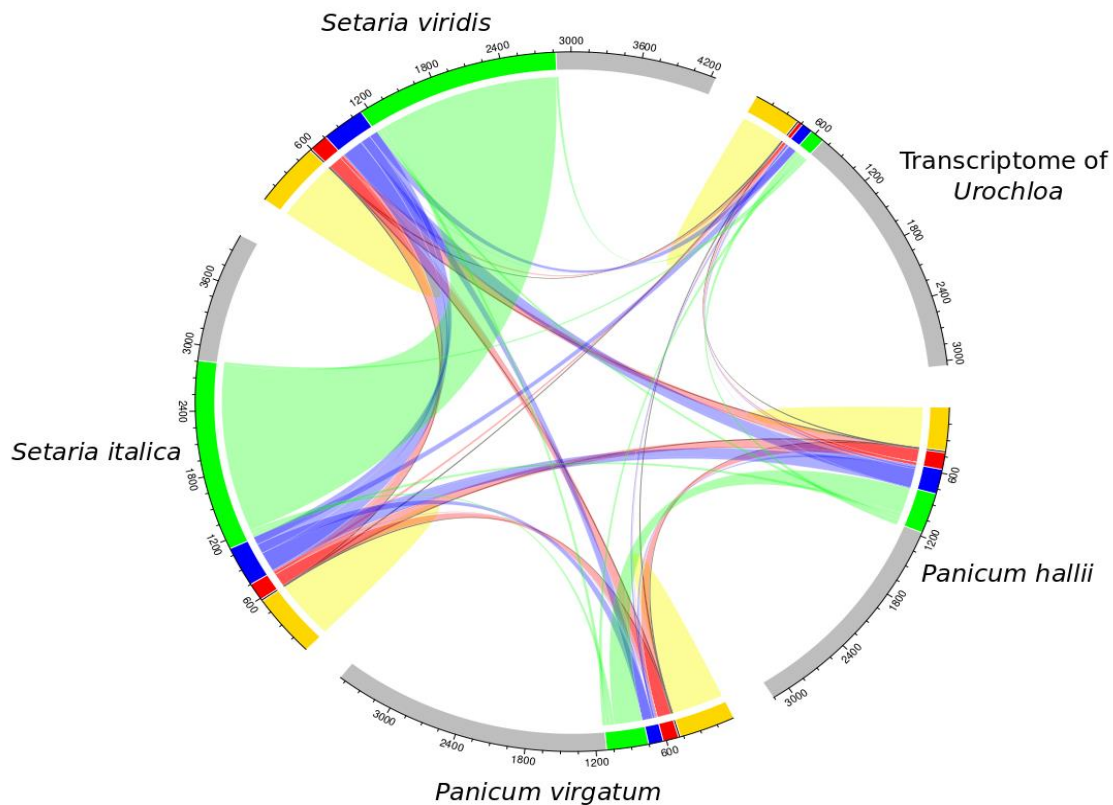


Figure 2. Circular plot showing the amount of complete redundancy among the markers (Gu et al., 2014) in the five pseudo-references (*Panicum hallii* genome, *P. virgatum* genome, *Setaria viridis* genome, *S. italica* genome, and *Urochloa decumbens* transcriptome) that were used to align the GBS signalgrass tags. The yellow regions represent redundancy within each pseudo-reference, whereas the black, red, blue, and green regions represent redundancy between five, four, three, and two pseudo-references, respectively. The remaining grey regions represent the markers with unique information in each reference.

Genetic map

An integrated genetic map was constructed using 217 full sibs obtained from a cross between *U. decumbens* cv. Basilisk (apomictic cultivar) and D24/27 (sexual accession). Of the

CAPÍTULO II

4,240 markers used for linkage analysis, 1,239 showed significance of the χ^2 goodness-of-fit statistic, and 1,000 were placed in the linkage map (Table 2).

The markers were distributed throughout nine chromosomes (homologous groups), with a cumulative map length of 1,335.2 cM and an average marker density of 1.33 cM. The length of each group ranged from 129.7 cM (HG5) to 166.6 cM (HG9), with an average of 148 cM (Table 2; Figure 3). The number of markers varied from 63 to 187 among the nine homologous groups (Table 2). The distance between adjacent markers on the genetic map were plotted as a histogram (Figure S1). A majority of markers are within 1 cM of each other. Gaps were present between some mapped markers. The two largest gaps were located on homology group eight and had lengths of 11.2 cM and 12.4 cM. The ninth homology group was the most saturated and the one with the fewest gaps (Figure 3).

Table 2. Number of GBS-based markers after significance testing, number of mapped markers within each homology group (HG), and length and marker density of each HG (cM) in the genetic map.

HG	No. GBS-based markers*	No. mapped markers	Length of HG (cM)	Marker density (cM)
1	132	100	136.7	1.37
2	181	121	165	1.36
3	219	138	151.6	1.10
4	169	101	139.7	1.38
5	183	123	129.7	1.05
6	100	63	161.7	2.57
7	154	99	140.1	1.41
8	82	68	144.1	2.12
9	295	187	166.6	0.89
Total	1,239	1,000	1,335.2	1.33

*Markers were selected if the χ^2 goodness-of-fit statistic was higher than 0.001 for simplex and 0.01 for higher segregations.

CAPÍTULO II

In Figure 3, the possible genotype configuration of each marker is indicated by the marker name prefix and the different colors. For example, markers with the prefix S and color black represent the simplex configuration (Table 3). Four homologous groups showed all configurations (HG1, HG3, HG5 and HG9), and simplex markers (S) were the most frequent. X-double-simplex (XSS) was the less frequent configuration (Table 3; Figure 3).

Table 3. Distribution of SNPs into genotype classes.

Parent 1	Parent 2	Type	P1 dosage	P2 dosage	Initial count	Final count
AAAA	BBBB	Null (N)	4	0	8	0
AAAA	AAAB	Simplex (S)	4	3	1,332	591
ABBB	BBBB	Simplex (S)	1	0		
AAAA	ABBB	Triplex (T)	4	1	126	0
AAAB	BBBB	Triplex (T)	3	0		
AAAA	AABB	Duplex (D)	4	2	720	172
AABB	BBBB	Duplex (D)	2	0		
AAAB	AAAB	Double-simplex (SS)	3	3	1,013	78
ABBB	ABBB	Double-simplex (SS)	1	1		
AAAB	ABBB	X-double-simplex (XSS)	3	1	65	8
AAAB	AABB	Simplex-duplex (SD)	3	2	11	0
AABB	ABBB	Duplex-simplex (DS)	2	1	773	116
AABB	AABB	Double-duplex (DD)	2	2	192	35
Total					4,240	1,000

QTL mapping

QTL analysis was performed for resistance to spittlebugs (*Notozulia entreriana*) by applying an IM model to the integrated genetic map. Thus, we detected three significant QTLs for the studied trait on homologous groups 1, 2 and 6. The statistical analysis showed that the heritability for the trait was high ($H_c^2 = 0.79$).

On chromosome 1, the QTL had LOD score of 4.68, explained 4.80 of the trait variation for resistance to spittlebugs. This LOD score was above the upper 95% LOD permutations threshold of 3.11, and this first QTL was located at position 95 cM (Figure S2). Analyses of different simple genetic models were performed with TetraploidSNPMap to determine the best simple fitting model for the studied trait. For this QTL, the best model was a duplex genotype

CAPÍTULO II

(AAAA x BBAA), with the allele B present on parent 2 associated with the decrease in spittlebug resistance. This model had the lowest SIC (SIC = 85.34) in comparison with the full model (SIC= 102.99) (Table 4).

On chromosome 2, the maximum LOD score was 4.39 and this QTL explained 4.66 of the phenotypic variation for spittlebug resistance. The LOD peak was located at position 60 cM and its score was above the upper 95% LOD permutation threshold of 3.29 (Figure S3). Again, the analysis with the simpler models estimated a duplex genotype (AAAA x BBAA), with the resistance allele presents on parent 2. This model had the lowest SIC (SIC = 93.03) in comparison with the full model (SIC= 89.55) (Table 4).

The last detected QTL on chromosome 6 had the maximum LOD score of 5.49, explained 6.24 of the trait variation and was above the 95% LOD permutation upper threshold of 2.79 (Figure S4). The QTL peak was located at 23 cM and analysis of different genetic models indicated that an allele explains the trait variation. The QTL is linked to a simplex SNP (AAAA X ABAA), with the B allele present on parent 2 associated with a decrease in spittlebug resistance. This model had the lowest SIC of 99.07 as compared to the full model with SIC of 115.47 (Table 4).

Table 4. QTL information for the trait analyzed in the *U. decumbens* population.

Trait	Chr	QTL Position (cM)	LOD	Variance Explained (%)	SIC	Configuration	Homologous Chr
Spittlebug	1	95	4.68	4.80	85.33	Duplex (D)	h5 + h6
Spittlebug	2	60	4.39	4.66	93.03	Duplex (D)	h5 + h6
Spittlebug	6	23	5.49	6.24	99.07	Simplex (S)	h6

Chr, chromosome; QTL, quantitative trait loci; LOD, logarithm of the odds; SIC, Schwarz Information Criterion.

Discussion

The development of GBS technology allows the identification of thousands of SNP markers across the genome at a relatively low cost. This advance represents an evolution in the genetic studies of several species, since a larger part of the genome can be represented, favoring

CAPÍTULO II

approaches such as the construction of genetic maps. The map reported here is the first map developed for an intraspecific population of *U. decumbens* that also includes SNPs with allelic dosages, using an approach never previously employed in a forage grass species. This map provides important information about the genome of this species and allowed the detection of QTLs involved in spittlebug resistance. QTL mapping is a useful tool to evaluate genotypes of putative relevance for breeding programs.

In addition, we reported the first application of GBS in an intraspecific population of *U. decumbens*. The total number of sequence reads obtained in this study using the GBS protocol of Elshire et al. (2011) with the NsiI (NEB) restriction enzyme was greater than that obtained in Worthington et al. (2016), where the authors considered an interspecific population between *U. ruziziensis* and *U. decumbens* and used the GBS protocol of Heffelfinger et al. (2014) with the HincII restriction enzyme. However, both protocols have provided satisfactory results for the construction of robust genetic maps in complex polyploid species.

We used five pseudo-references from species genetically close to *U. decumbens* to discover GBS-based markers (Table 1). The highest final number of markers (4,240) was detected in the alignment with the genome of *S. viridis* (green foxtail) (Table 1), a member of the Poaceae, or grass, family. The reason that the transcriptome of *U. decumbens* did not show the greatest number may be that it covers only the markers found in the expressed regions of the genome, even though some of these may be exclusive to *U. decumbens*. In a previous analysis, we tested the pipeline UNEAK (Universal Network-Enabled Analysis Kit) as implemented in the TASSEL-GBS software program (Glaubitz et al., 2014) for identifying SNPs, but this method detected fewer markers (1,210) than alignment with a pseudo-reference did (Table 1). After filtering, Worthington et al. (2016) detected 3,912 SNP markers using the UNEAK pipeline, that is, an amount of markers equivalent to that detected by us using a pseudo-reference genome (Table 1). Most likely, the cross between two different species (*U. decumbens* x *U. ruziziensis*) favored the discovery of more SNPs with UNEAK, in addition to the different methodology used for GBS library construction (Worthington et al., 2016).

Previous polyploid genetic maps have been developed with markers scored as presence/absence, but this method does not make use of all the information available in the SNP dosages. The GBS data obtained here were sufficient in terms of read depth coverage to call allele dosage in 41,470 markers, considering all pseudo-references (Table 1). The

CAPÍTULO II

SuperMASSA software provided the distribution of alleles in the population and the relative intensities of each allele (Serang et al., 2012; Garcia et al., 2013). Approximately 55% (2,345) of the markers identified followed the parental genotype configurations simplex (AAAA X AAAB, BBBB X BBBB) and double-simplex (AAAB X AAAB, BBBB X BBBB). Slightly less than 1% of the identified markers followed the nulliplex (AAAA X BBBB) and simplex-duplex (AAAB X AABBB) configurations (Table 3). Our results were satisfactory, but a GBS library construction methodology with more than one restriction enzyme might provide a greater depth of coverage and, accordingly, increase the accuracy of the allelic dosage estimation and the number of markers detected.

The map contains 1000 SNP markers distributed on nine homologous groups, with a total length of 1,335.2 cM and an average map density of 1.33 cM (Table 2; Figure 3). Three previous genetic maps have been published in the genus *Urochloa* (Thaikua et al., 2016; Vigna et al., 2016; Worthington et al., 2016). Vigna et al. (2016) constructed a genetic map for hexaploid *U. humidicola* using 89 SSR markers based on simplex and double-simplex markers. The map consisted of 49 linkage groups (LGs) and had a total length of 1,702.82 cM with an average map density of 10.6 cM. Our map is more saturated and informative than this, because we identified SNPs covering much of the genome and with multiple allelic dosages. In another study, genetic maps for *U. decumbens* x *U. ruziziensis* were constructed with GBS-based markers (Worthington et al., 2016), and 1,916 SDA (single-dose allele) markers were distributed across the parental linkage maps. The genetic map developed in our study has a higher marker density than those of other genetic maps for tetraploid species (Stein et al., 2007; Rajupt et al., 2016; Thaikua et al., 2016).

The density of markers per homology groups ranged from 63 (HG6) to 187 (HG9) (Table 2). In a study by Worthington et al. (2016), a greater number of markers was also mapped in the HG9. The greater density of markers for certain HGs may correspond to a greater recombination frequency. On the other hand, less saturated groups may have fewer SNPs in these regions and/or correspond to highly homozygous regions that have lower recombination frequencies (Bai et al., 2016).

The largest gap, 12.4 cM, was observed on chromosome eight (Figure 3), one of the chromosomes with the fewest mapped markers. These gap regions in the genetic map may be homozygous in both parents, and hence, no recombination can be detected in this case.

CAPÍTULO II

Additionally, it is possible that the number of hybrids in the mapping population was not sufficient to observe recombination in these gap regions (Ma et al., 2014). One possibility to fill these gaps is use different combinations of enzymes to enlarge the sequencing pools and will thereby enable the capture other genomic regions and to obtain a density close to saturation. Furthermore, we mapped only markers identified in the alignment with the *S. viridis* genome. Therefore, these gaps could contain markers that are exclusive to the *U. decumbens* genome and thus could not be represented with the methodology used.

Among the 1000 mapped SNPs, 59% (591) followed the simplex parental genotype configuration (Table 3; Figure 3). This configuration was also the most common in other studies (Hackett et al., 2013; da Silva et al., 2017). The least common configuration was X- double-simplex (XSS) (0.8%) (Table 3). Overall, the map displays most of the possible configurations, and these data significantly increase the information of each locus and provide several advantages for genetic analysis (Garcia et al., 2013). Therefore, the use of markers with dosage allelic information allows the development of highly saturated and robust genetic maps, favoring the detection of significant QTLs (Hackett et al., 2013; da Silva et al., 2017).

The percentage of unlinked markers (19.3%) is higher than those obtained in other *Urochloa* maps (Thaikua et al., 2016; Worthington et al., 2016), and this result may reflect the different methodologies used. The association of SNPs with other types of molecular markers, such as microsatellites, could decrease the number of unlinked markers, since microsatellites are similar to anchors, linking previously unlinked SNPs (Ball et al., 2010). In addition, the association between these two types of markers may enable the generation of more robust maps (Ball et al., 2010). Moreover, we mapped the markers according to the *S. viridis* chromosomes and translocation events may have occurred in signalgrass, altering the chromosome arrangement (Aitken et al., 2014). Therefore, advances in the assembly of complex polyploid genomes are expected to enable the use of the full signalgrass genome as a reference for future studies (Margarido and Heckerman, 2015).

The integrated genetic map associated with phenotypic data allow QTL mapping studies. There are no QTL mapping studies in *U. decumbens* and this reflects the precocity of breeding program for this species. One of the most important agronomic trait to advance the *U. decumbens* breeding program is the spittlebug (*Notozulia entreriana*) resistance, because it causes severe damage in this forage grass (Valle et al., 2009).

CAPÍTULO II

There is only one work of quantitative trait loci mapping for agronomic traits in *Urochloa* hybrids from the crossing between cv. ‘Mulato’ and cv. ‘Miyaokikoku’. They identified QTL for leaf width, leaf shape ratio (width/length), stem diameter and percentage of filled seeds using simple interval mapping and composite interval mapping (Thaikua et al., 2016). In our study, QTL mapping was performed by applying the statistical model IM (Interval Mapping) for a tetraploid population (Hackett et al., 2017). There are more accurate models, however these consider few possible segregations that is usually applied for diploids, and this approach represents loss of genetic information to polyploid mapping studies (Hackett et al., 2014). In this study, we report the detection of QTLs for resistance to spittlebug as well as consider all possible segregations for tetraploid *Urochloa decumbens*.

For QTL analysis, we performed a permutation test to obtain the threshold for declaring significant QTLs. Three QTLs were identified, and their LODs ranged from 4.39 to 5.49 (Table 4). The number of QTLs found was low, but represents a great gain since it is the first genetic architecture study with *U. decumbens* population. The QTL are on chromosomes 1, 2 and 6; and located at 95 cM, 60 cM and 23 cM, respectively (Figure 3). On chromosome 1, the SNP D.1_40431816 was located at 0.6 cM from the first QTL. The second QTL was located on chromosome 2 at 0.4 cM from the SNP DS.2_39902899. On chromosome 6, the last QTL was located between the SNPs D.6_25761630 and S.6_35357677, at 0.8 cM and 1.8 cM, respectively (Figure 3; Table 4). The region that gave rise to this marker could be evaluated for future applications by signalgrass breeding programs.

Although *U. decumbens* is considered a susceptible species to pasture spittlebugs, these results show that a combination of different alleles in each parent segregates and contributes to the observed polymorphism in progeny allowing the detection of QTLs. In addition, our results are very useful because it is possible to identify, in each parent, the alleles that contribute to increased values of the phenotypic trait.

The percentage of phenotypic variations explained by each QTL ranged from 4.66 to 6.24 (Table 4). These percentage were relatively low, which indicate that no major loci were detected and the resistance spittlebug trait can be regulated by genes of small effect. Miles et al. (1995) reported that spittlebug resistance in brachiariagrasses is probably not complex genetically, but more than a single major resistance gene are likely involved. The values of phenotypic variation and the small number of detected QTLs may be due to factors such as low

CAPÍTULO II

genetic variability in the population for spittlebugs resistance, methodology used for QTL detection and/or map saturation. Since the experiments were preliminaries, the results obtained are satisfactory and come from phenotypic data evaluated only for two years.

U. decumbens still does not have the genome sequenced and genomic research is still at the beginning. Therefore, the detection of these QTLs is the first step in the advancement of genomic studies involving resistance to the spittlebugs. The annotation of sequences that originated markers with mapped QTLs will be important for identify putative candidate genes involved in spittlebug resistance in *U. decumbens* aiming to contribute for new insights and open new fronts of research with these genes of interest.

The sequences obtained by GBS libraries are dynamic, allowing the raw data to be reanalyzed with the evolution of bioinformatics techniques (Poland and Rife, 2012). The possibility of estimating the tetraploid dosage of each SNP greatly increases genetic information and represents an important evolution for polyploid genetic maps, including those of important crops (Bourke et al., 2016). Furthermore, the molecular data developed here can be applied in future studies such as evolutionary history, genome assembly, and other QTL analysis in *U. decumbens* and related species. These studies are the first step towards possible marker-assisted selection (MAS), an object of great interest in genetic improvement programs for economically important plant species.



Figure 3. Linkage map for *U. decumbens*: homologous groups from 1 to 4. The genotype configuration of each marker is indicated by the marker name prefix and color (Table 3). The QTLs are identified in HG1 and HG2.

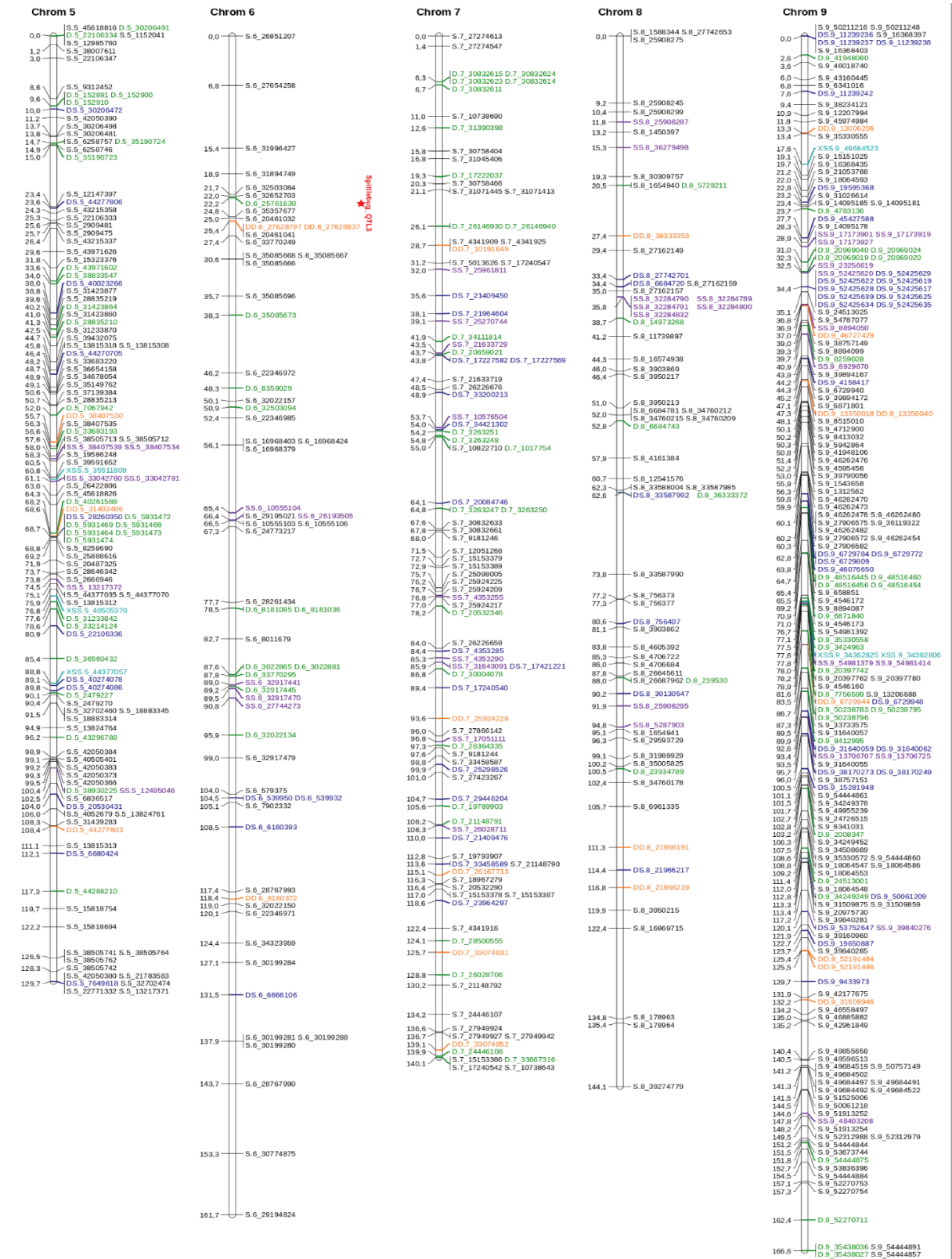


Figure 3, cont. Linkage map for *U. decumbens*: homologous groups from 5 to 9. The genotype configuration of each marker is indicated by the marker name prefix and color (Table 3). A QTL is identified in HG6.

CAPÍTULO II**References**

- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC). (2016). *Perfil da Pecuária do Brasil: Relatório anual* [Online] Available: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf> Accessed 15 Nov 2017.
- Aitken, K.S., McNeil, M.D., Berkman, P.J., Hermann, S., Kilian, A., Bundock, P.C., et al. (2014). Comparative mapping in the Poaceae family reveals translocations in the complex polyploid genome of sugarcane. *BMC Plant Biol.* 14, 190. doi: 10.1186/s12870-014-0190-x.
- Almeida, M.C.C., Chiari, L., Jank, L., and Valle, C.B. (2011). Diversidade genética molecular entre Cultivares e híbridos de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum*. *Cienc. Rural* 41, 1998-2003.
- Bai, Z.Y., Han, X.K., Liu, X.J., Li, Q.Q., and Li, J.L. (2016). Construction of a high-density genetic map and QTL mapping for pearl quality-related traits in *Hyriopsis cumingii*. *Sci. Rep.* 6, 32608. doi: 10.1038/srep32608.
- Ball, A.D., Stapley, J., Dawson, D.A., Birkhead, T.R., Burke, T., Slate, J. (2010). A comparison of SNPs and microsatellites as linkage mapping markers: lessons from the zebra fish (*Taeniopygia guttata*). *BMC Genomics* 11, 218. doi: 10.1186/1471-2164-11-218.
- Bourke, P.M., Voorrips, R.E., Kranenburg, T., Jansen, J., Visser, R.G.F., Maliepaard, C. (2016). Integrating haplotype-specific linkage maps in tetraploid species using SNP markers. *Theor. Appl. Genet.* 129, 2211-2226. doi: 10.1007/s00122-016-2768-1.
- Butler, D.G., Cullis, B.R., Gilmour, A.R., Gogel, B.J. (2009). Mixed models for S language environments: ASReml-R reference manual, 149p.
- Cullis, B. R., A. B. Smith, and N. E. Coombes.(2006). On the design of early generation variety trials with correlated data. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* 11, 381–393.
- da Silva, W.L., Ingram, J., Hackett, C.A., Coombs, J.J., Douches, D., Bryan, G.J., et al. (2017). Mapping loci that control tuber and foliar symptoms caused by PVY in Autotetraploid Potato (*Solanum tuberosum* L.). *G3* 7, 3587–3595. doi: 10.1534/g3.117.300264.

CAPÍTULO II

Ebina, M., Nakagawa, H., Yamamoto, T., Araya, H., Tsuruta, S., Takahara, M., et al. (2005). Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Grassl. Sci.* 51, 71–78. doi: 10.1111/j.1744-697X.2005.00011.x.

Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S., et al. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* 6, e19379. doi: 10.1371/journal.pone.0019379.

Ferreira, R.C.U., Cançado, L.J., Valle, C.B. do, Chiari, L., and Souza, A.P. de (2016). Microsatellite loci for *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster and cross-amplification in other *Urochloa* species. *BMC Res. Notes* 9, 152. doi: 10.1186/s13104-016-1967-9.

Garcia, A.A.F., Mollinari, M., Marconi, T.G., Serang, O.R., Silva, R.R., Vieira, M.L.C., et al. (2013). SNP genotyping allows an in-depth characterization of the genome of sugarcane and other complex autopolyploids. *Sci. Rep.* 3, 3399. doi: 10.1038/srep03399.

Glaubitz, J.C., Casstevens, T.M., Lu, F., Harriman, J., Elshire, R.J., Sun, Q., et al. (2014). TASSEL-GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PLoS One* 9, e90346. doi: 10.1371/journal.pone.0090346.

Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., et al. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 40, D1178–D1186. doi: 10.1093/nar/gkr944.

Gu, Z., Gu, L., Eils, R., Schlesner, M., and Brors, B. (2014). Circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btu393.

Gusmão, M.R., Valério, J.R., Matta, F.P., Souza, F.H.D., Vigna, B.B.Z., Fávero, A.P., et al. (2016). Warm-season (C4) turfgrass genotypes resistant to spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae). *J. Econ. Entomol.* doi: 10.1093/jee/tow135.

CAPÍTULO II

Hackett, C.A., Bradshaw, J.E., Bryan, G.J. (2014). QTL mapping in autotetraploids using SNP dosage information. *Theor. Appl. Genet.* 127, 1885-1904. doi: 10.1007/s00122-014-2347-2.

Hackett, C.A., Boskamp, B., Vogogias, A., Preedy, K.F., and Milne, I. (2017). TetraploidSNPMap: software for linkage analysis and QTL mapping in autotetraploid populations using SNP dosage data. *J. Hered.* 108, 438–442. doi: 10.1093/jhered/esx022.

Hackett, C.A., McLean, K., and Bryan, G.J. (2013). Linkage analysis and QTL mapping using SNP dosage data in a tetraploid potato mapping population. *PLoS One* 8, e63939. doi: 10.1371/journal.pone.0063939.

Heffelfinger, C., Fragoso, C.A., Moreno, M.A., Overton, J.D., Mottinger, J.P., Zhao, H., et al. (2014). Flexible and scalable genotyping-by-sequencing strategies for population studies. *BMC Genomics* 15, 979. doi: 10.1186/1471-2164-15-979.

Jank, L., Valle, C.B., and Resende, R.M.S. (2011). Breeding tropical forages. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 11, 27-34. doi: 10.1590/S1984-70332011000500005.

Lapointe, S.L., Serrano, M.S., Arango, G.L., Sotelo, G., Cordoba, F. (1992). Antibiosis to spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in accessions of *Brachiaria*. *J. Econ. Entomol.* 85: 1485-1490: doi: 10.1093/jee/85.4.1485.

Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923.

Ma, J.Q., Yao, M.Z., Ma, C.L., Wang, X.C., Jin, J.Q., Wang, X.M., et al. (2014). Construction of a SSR-based genetic map and identification of QTLs for catechins content in tea plant (*Camellia sinensis*). *PLoS One* 9, e93131. doi: 10.1371/journal.pone.0093131.

Miles, J.W., Lapointe, S.L., Escandón, M.L., Sotelo, G. (1995). Inheritance of resistance to spittlebug (Homoptera: Cercopidae) in interspecific *Brachiaria* spp. hybrids. *J. Econ. Entomol.* 88, 1477-1481.

CAPÍTULO II

- Margarido, G.R.A., and Heckerman, D. (2015). ConPade: genome assembly ploidy estimation from next-generation sequencing data. *PLoS Comput. Biol.* 11, e1004229. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004229.
- Mollinari, M., and Serang, O. (2015). Quantitative SNP genotyping of polyploids with MassARRAY and other platforms. *Methods Mol. Biol.* 1245, 215–241. doi: 10.1007/978-1-4939-1966-6_17.
- Naumova, T.N., Hayward, M.D., and Wagenvoort, M. (1999). Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. *Sex. Plant Reprod.* 12, 43- 52. doi: 10.1007/s004970050170.
- Okada, M., Lanzatella, C., Saha, M.C., Bouton, J., Wu, R., and Tobias, C.M. (2010). Complete switchgrass genetic maps reveal subgenome collinearity, preferential pairing and multilocus interactions. *Genetics* 185, 745–760. doi: 10.1534/genetics.110.113910.
- Patel, R.K., and Jain, M. (2012). NGS QC toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS One* 7, e30619. doi: 10.1371/journal.pone.0030619.
- Pessoa-Filho, M., Martins, A.M., and Ferreira, M.E. (2017). Molecular dating of phylogenetic divergence between *Urochloa* species based on complete chloroplast genomes. *BMC Genomics* 18, 516. doi: 10.1186/s12864-017-3904-2.
- Poland, J.A., Brown, P.J., Sorrells, M.E., and Jannink, J.L. (2012). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS One* 7, e32253. doi: 10.1371/journal.pone.0032253.
- Poland, J.A., and Rife, T.W. (2012). Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *Plant Genome J.* 5:92.
- Rajupt, S.G., Santra, D.K., and Schnable, J. (2016). Mapping QTLs for morpho-agronomic traits in proso millet (*Panicum miliaceum* L.). *Mol. Breed.* 36, 37.
- Renvoize, S.A., Clayton, W.D., and Kabuye, C.H.S. (1996). “Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.). Griseb,” in *Biology, Agronomy and Improvement*, eds. J.W. Miles, B.L. Maass, C.B. do Valle, and V. Krumble (Cali, CO: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Campo Grande, BR : Empresa Brasileira de Pesquisa

CAPÍTULO II

Agropecuaria (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), 1-15 (CIAT publication no. 259).

Ripol, M.I., Churchill, G.A., Da Silva, J.A.G., and Sorrells, M. (1999). Statistical aspects of genetic mapping in autopolyploids. *Gene* 235, 31–41. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00218-8.

Salgado, L.R., Lima, R., Santos, B.Fd, Shirakawa, K.T., Vilela, MdA., Almeida, N.F., et al. (2017). De novo RNA sequencing and analysis of the transcriptome of signalgrass (*Urochloa decumbens*) roots exposed to aluminum. *Plant Growth Regul.* 83, 157–170. doi: 10.1007/s10725-017-0291-2.

Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*. 6, 461-464.

Serang, O., Mollinari, M., and Garcia, A.A.F. (2012). Efficient exact maximum a posteriori computation for Bayesian SNP genotyping in polyploids. *PLoS One* 7, e30906. doi: 10.1371/journal.pone.0030906.

Shirasawa, K., Tanaka, M., Takahata, Y., Ma, D., Cao, Q., Liu, Q., et al. (2017). A high-density SNP genetic map consisting of a complete set of homologous groups in autohexaploid sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *Sci. Rep.* 7, 44207. doi: 10.1038/srep44207.

Simioni, C., and Valle, C.B. (2009). Chromosome duplication in *Brachiaria* (A.Rich.) Stapf allows intraspecific crosses. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 9, 328 - 334.

Souza, J.S., Chiari, L., Simeão, R.M., Vilela, M.M., Salgado, L.R. (2018). Development, validation and characterization of genic microsatellite markers in *Urochloa* species. *Am. J. Plant. Sci.* 9, 281-295. doi: 10.4236/ajps.2018.92023.

Stein, J., Pessino, S.C., Martínez, E.J., Rodriguez, M.P., Siena, L.A., Quarín, C.L., et al. (2007). A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Mol. Breed.* 20, 153–166. doi: 10.1007/s11032-007-9083-0.

Thaikua, S., Ebina, M., Yamanaka, N., Shimoda, K., Suenaga, K., and Kawamoto, Y. (2016). Tightly clustered markers linked to an apospory-related gene region and quantitative trait loci

CAPÍTULO II

mapping for agronomic traits in *Brachiaria* hybrids. *Grassl. Sci.* 62, 69–80. doi: 10.1111/grs.12115.

Triviño, N.J., Perez, J.G., Recio, M.E., Ebina, M., Yamanaka, N., Tsuruta, S., et al. (2017). Genetic diversity and population structure of *Brachiaria* species and breeding populations. *Crop Sci.* 57, 1-12.

Valle, C.B. do., Simioni, C., Resende, R.M.S., Jank, L. (2008). “Melhoramento genético de *Brachiaria*”, in *Melhoramento de Forrageiras Tropicais* 1st Edn, eds R. M. S. Resende, C. B. do Valle and L. Jank. (Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS), 13-54.

Valle, C.B., Jank, L., and Resende, R.M.S. (2009). O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. *Ceres*, 460-472.

Valle, C.B., Macedo, M.C.M., Euclides, V.P.B., Jank, L., and Resende, R. (2010). “Gênero *Brachiaria*,” in: *Plantas Forrageiras*, eds. D.M.D.F. Martuscello, and J. Azevedo. (Editora UFV, Viçosa), 30–77.

Valério, J.R., Jeller, H., Peixer, J. (1997). Seleção de introduções do gênero *Brachiaria* resistentes à cigarrinha *Zulia entreriana* (Berg) (Homoptera: Cercopidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26: 383-387.

Valério, J. R.; and Nakano, O. (1988). Influência do adulto de *Zulia entreriana* (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae) na produção e qualidade de *Brachiaria decumbens*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 23: 447–453.

Vigna, B.B.Z., Santos, J.C.S., Jungmann, L., Valle, C.B., Mollinari, M., Pastina, M.M., et al. (2016). Evidence of allopolyploidy in *Urochloa humidicola* based on cytological analysis and genetic linkage mapping. *PLoS One* 11, e0153764. doi: 10.1371/journal.pone.0153764.

CAPÍTULO II

- Voorrips, R.E. (2002). MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* 93, 77–78. doi: 10.1093/jhered/93.1.77.
- Voorrips, R.E., Gort, G., and Vosman, B. (2011). Genotype calling in tetraploid species from bi-allelic marker data using mixture models. *BMC Bioinformatics* 12, 172. doi: 10.1186/1471-2105-12-172.
- Worthington, M., Heffelfinger, C., Bernal, D., Quintero, C., Zapata, Y.P., Perez, J.G., et al. (2016). A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. *Genetics* 203, 1117–1132. doi: 10.1534/genetics.116.190314.
- Wu, K.K., Burnquist, W., Sorrells, M.E., Tew, T.L., Moore, P.H., and Tanksley, S.D. (1992). The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor. Appl. Genet.* 83, 294–300. doi: 10.1007/BF00224274.

CAPÍTULO II**Table S1.** Bowtie2 alignment results of 4,451,606 GBS tags in absolute and relative (in parentheses) values.

Reference genome	Non-aligned tags	Aligned tags		
		Overall alignment	Unique alignment	Non-unique alignment
<i>Panicum virgatum</i> genome	3,692,203 (82.94%)	759,403 (17.06%)	254,362 (5.71%)	505,041 (11.35%)
<i>Panicum hallii</i> genome	3,924,470 (88.16%)	527,136 (11.84%)	298,763 (6.71%)	228,373 (5.13%)
<i>Setaria viridis</i> genome	3,818,399 (85.78%)	633,207 (14.22%)	370,656 (8.33%)	262,551 (5.90%)
<i>Setaria italica</i> genome	3,814,455 (85.69%)	637,151 (14.31%)	356,033 (8.00%)	281,118 (6.31%)
Transcriptome of <i>Urochloa</i>	3,607,661 (81.04%)	843,945 (18.96%)	394,169 (8.85%)	449,776 (10.10%)

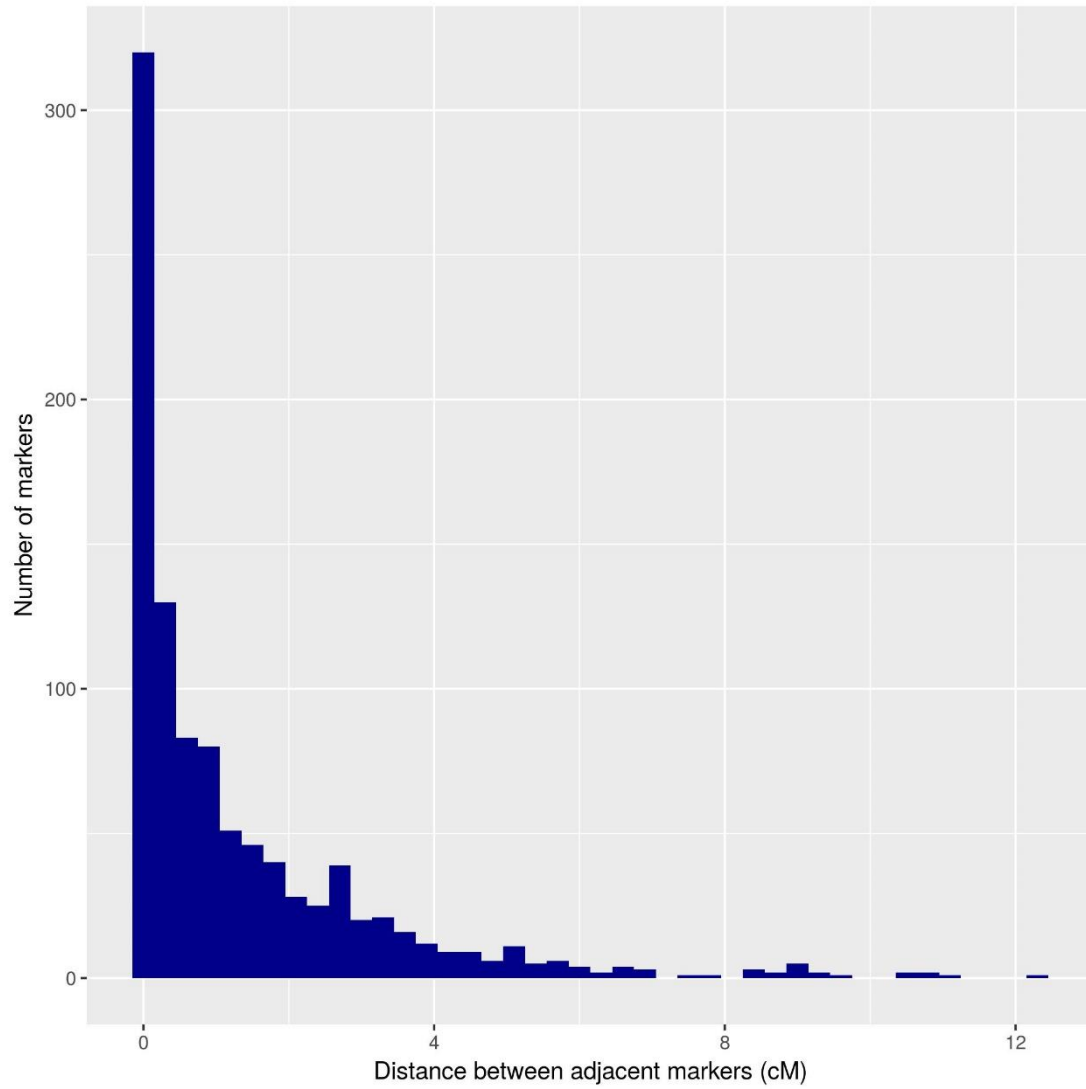


Figure S1. Histogram of the distance between adjacent markers on the *U. decumbens* genetic map.

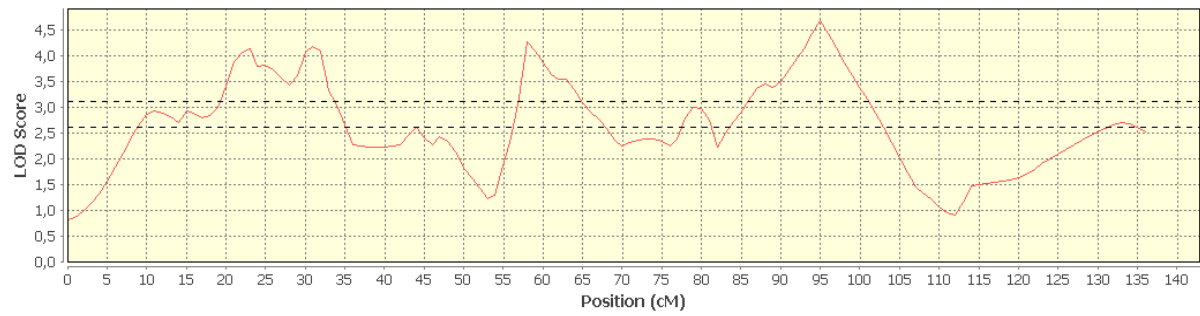


Figure S2. Interval mapping (IM) for spittlebug resistance from the *U. decumbens* mapping population in chromosome 1. Dotted lines indicate the LOD thresholds of 90% and 95%, respectively, obtained after permutation tests.



Figure S3. Interval mapping (IM) for spittlebug resistance from the *U. decumbens* mapping population in chromosome 2. Dotted lines indicate the LOD thresholds of 90% and 95%, respectively, obtained after permutation tests.

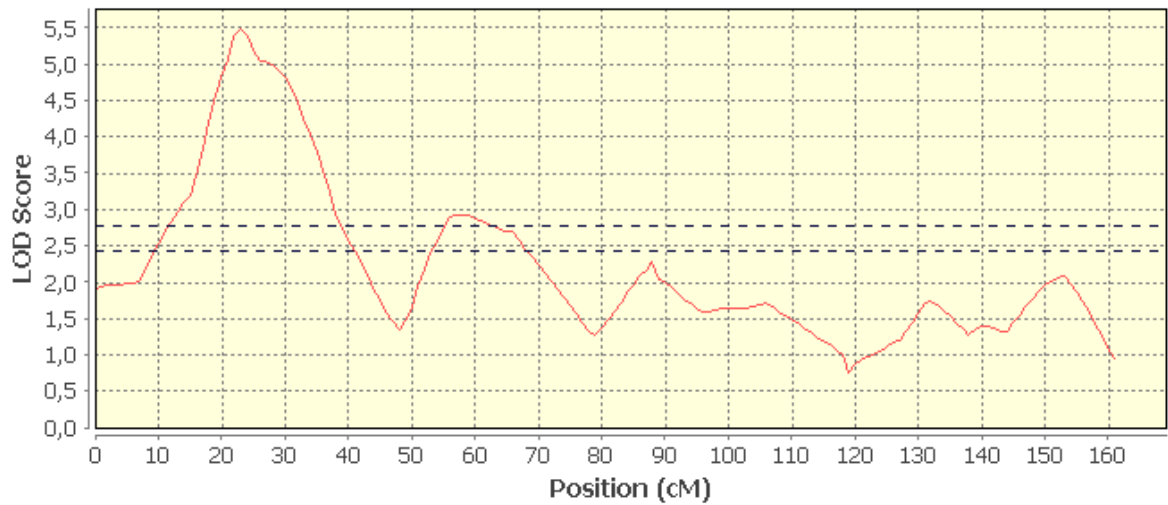


Figure S4. Interval mapping (IM) for spittlebug resistance from the *U. decumbens* mapping population in chromosome 6. Dotted lines indicate the LOD thresholds of 90% and 95%, respectively, obtained after permutation tests.

RESULTADOS COMPLEMENTARES II

Após a construção do mapa genético para *U. decumbens*, buscamos identificar locos responsáveis por caracteres de importância agrônômica para o avanço do programa de melhoramento da espécie. Dentre as características mais visadas está a determinação do modo de reprodução, apomítico ou sexual, cuja detecção segura e precoce é imprescindível para aumentar a eficiência dos programas de melhoramento.

A determinação do modo de reprodução foi realizada pela análise das características morfológicas dos sacos embrionários, por pesquisadores da Embrapa Gado de Corte. Entretanto, a dificuldade na determinação do modo de reprodução por meio de microscopia gerou algumas inconsistências nos resultados e apenas 34 híbridos puderam ser caracterizados com segurança.

Um outro experimento foi conduzido na Embrapa Gado de Corte, no qual 331 indivíduos foram analisados em campo experimental, dos quais 143 são híbridos da progênie de *U. decumbens* do presente estudo. Os caracteres agrônômicos avaliados foram: (i) peso verde de campo (PVC, g/planta), matéria seca total (MST, g/planta) e rebrota; (ii) matéria seca foliar (MSF, g/planta), porcentagem de folhas (PorcF, %) e relação folha:colmo (RFC). O primeiro grupo de caracteres foi analisado em sete cortes (dois no período da seca e cinco no período das águas) e o segundo em quatro cortes (dois no período da seca e dois no período das águas). O delineamento utilizado foi de látice 18 x 18, com duas repetições e sete testemunhas (Marandu, Basilisk, Xaraés, Piatã, D24/2, D24/27 e D24/45). A parcela constitui na média de cinco plantas clonais. O modelo misto analisado foi:

$$y_{ijkl} = \mu + t_i + b_{j(l)} + r_l + c_k + tc_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

onde, y_{ijkl} é o valor fenotípico do tratamento i , no bloco j , na repetição l e no corte k ; μ é a média geral; t_i é o efeito aleatório do tratamento i ($t_i \sim N(0, \sigma_T^2)$); $b_{j(l)}$ é o efeito aleatório do bloco j na repetição l ($b_{j(l)} \sim N(0, \sigma_B^2)$); r_l é o efeito fixo da repetição l ; c_k é o efeito fixo do corte k ; tc_{ik} é o efeito aleatório da interação tratamento i e corte k ($tc_{ik} \sim N(0, \sigma_{TC}^2)$); ε_{ijkl} é o efeito residual ($\varepsilon_{ijkl} \sim N(0, \mathbf{R})$), onde $\mathbf{R}$ consiste em um produto de Kronecker para os efeitos principais do modelo, sendo modelado diferentes estruturas de variância e covariância (VCOV)

RESULTADOS COMPLEMENTARES II

para o efeito de cortes e matriz identidade para os restantes ($\mathbf{R} = \mathbf{R}_C^{k \times k} \otimes \mathbf{I}_R^{l \times l} \otimes \mathbf{I}_B^{j \times j} \otimes \mathbf{I}_T^{i \times i}$).

As estruturas VCOV modeladas foram: identidade (ID), diagonal (DIAG), simetria composta (CS), simetria composta heterogênea (CS_{Het}), auto-regressiva de ordem 1 (AR1), auto-regressiva de ordem 1 heterogênea (AR1_{Het}) e não estruturada (US). A seleção de modelos foi realizada com base nos critérios de Akaike (AIC) (Akaike, 1974) e Schwarz (SIC) (Schwarz, 1978). Médias ajustadas foram obtidas para cada caracter e utilizadas na análise posterior de mapeamento de QTLs.

Os modelos fenotípicos foram analisados no pacote ASReml (Butler et al., 2009) do programa R. A herdabilidade para cada característica foi calculada utilizando a fórmula da herdabilidade generalizada de Cullis et al. (2006):

$$H_C^2 = 1 - \frac{PEV}{2\sigma_G^2}$$

onde PEV consiste na variância do erro de predição e σ_G^2 a variância genética.

Em geral, estruturas que modelam a heterogeneidade de variância tiveram um melhor desempenho para todos os caracteres agronômicos considerados (Tabela 1). Um exemplo claro pode ser observado no caracter rebrota em que as estruturas DIAG, CS_{Het}, AR1_{Het} e US obtiveram uma redução em mais da metade nos seus valores de AIC e SIC. Para os caracteres PVC, MSF e RFC os valores de AIC e SIC foram concordantes, selecionando-se a estrutura US para os dois primeiros caracteres e a DIAG para o terceiro. Para os caracteres MST, rebrota e PorcF, os valores de AIC e SIC diferiram quanto a seleção do modelo, sendo portanto selecionadas as estruturas que tiveram uma maior diferença entre os modelos sugeridos. Por exemplo, para rebrota, a US teve melhor ajuste para AIC e a CS_{Het} teve melhor ajuste para SIC. O valor da diferença desses modelos para AIC foi de 30,79 (208,60-177,81) e para SIC foi de 98,01 (377,44-279,43). Desta forma, para rebrota foi selecionado a estrutura CS_{Het} (considerando o valor do SIC), para MST foi selecionado a estrutura US (considerando o valor do AIC), e para PorcF foi selecionado a estrutura DIAG (considerando o valor do SIC). A herdabilidade generalizada variou de 0,5258 (RFC) a 0,8072 (MST) (Tabela 1).

RESULTADOS COMPLEMENTARES II

Tabela 1. Estruturas VCOV para efeito de cortes no resíduo (R_C), número de parâmetros (n. par) estimados, valores de AIC e SIC, e herdabilidade generalizada para os caracteres: peso verde de campo (PVC), matéria seca total (MST), rebrota, matéria seca foliar (MSF), porcentagem de folhas (PorcF) e relação folha:colmo (RFC).

Caracter	H_C^2	R_C	n. par	AIC	SIC	Modelo
PVC	0.7551	ID	1	60091,14	60116,89	
		DIAG	7	59284,22	59348,61	
		CS	2	59790,97	59823,16	
		CS _{Het}	8	58651,96	58722,79	
		AR1	2	59873,56	59905,76	
		AR1 _{Het}	8	58938,73	59009,56	
		US	28	58463,42	58663,03	selecionado
MST	0.8072	ID	1	60431,93	60457,68	
		DIAG	7	59693,79	59758,17	
		CS	2	60348,33	60380,52	
		CS _{Het}	8	59534,46	59605,28	
		AR1	2	60398,38	60430,57	
		AR1 _{Het}	8	59642,08	59712,90	
		US	28	59460,56	59660,13	selecionado
rebrota	0.7888	ID	1	512,19	537,95	
		DIAG	7	221,21	285,60	
		CS	2	503,73	535,93	
		CS _{Het}	8	208,60	279,43	selecionado
		AR1	2	512,80	545,00	
		AR1 _{Het}	8	222,49	293,32	
		US	28	177,81	377,44	
MSF	0.7142	ID	1	31960,35	31983,86	
		DIAG	4	31893,64	31934,78	
		CS	2	31901,61	31930,99	
		CS _{Het}	5	31819,69	31866,71	
		AR1	2	31928,83	31958,21	
		AR1 _{Het}	5	31845,93	31892,95	
		US	10	31784,36	31860,77	selecionado

PorcF	0.6304	ID	1	13727,52	13751,03	selecionado
		DIAG	4	13679,92	13721,07	
		CS	2	13724,56	13753,95	
		CS _{Het}	5	13677,59	13724,61	
		AR1	2	13729,18	13758,57	
		AR1 _{Het}	5	13681,84	13728,86	
		US	10	13676,88	13753,29	
RFC	0.5258	ID	1	5892,16	5915,67	selecionado
		DIAG	4	5358,63	5399,77	
		CS	2	5893,87	5923,26	
		CS _{Het}	5	5360,36	5407,38	
		AR1	2	5889,93	5919,31	
		AR1 _{Het}	5	5360,29	5407,31	
		US	10	5366,73	5443,14	

O software TetraploidSNPMap foi utilizado na busca por QTLs relacionados as características fenotípicas avaliadas, através do método de Mapeamento por Intervalo (*Interval Mapping*, IM) (Lander e Botstein, 1989; Hackett et al., 2001). A partir das frequências conjuntas de um par de marcadores adjacentes, são realizadas inferências a respeito de um possível QTL localizado dentro do intervalo entre essas marcas. Esse método combina a análise de marcas individuais com estatísticas com base em verossimilhança, através de um modelo de regressão linear simples (Lander e Botstein, 1989).

A partir dessas análises, não foi possível detectar QTLs significativos para as características agronômicas avaliadas, possivelmente devido ao número reduzido de híbridos avaliados. A progênie fenotipada é pequena e, conseqüentemente, o número de recombinantes é menor do que o necessário para se detectar QTLs, tratando-se de uma espécie poliploide. Além disso, o método de Mapeamento por Intervalo também pode ter sido ineficiente na busca por QTLs.

As Figuras 1 e 2 mostram os principais possíveis QTLs que detectamos em nossas análises, relacionados à matéria seca foliar e matéria seca total, respectivamente.

RESULTADOS COMPLEMENTARES II

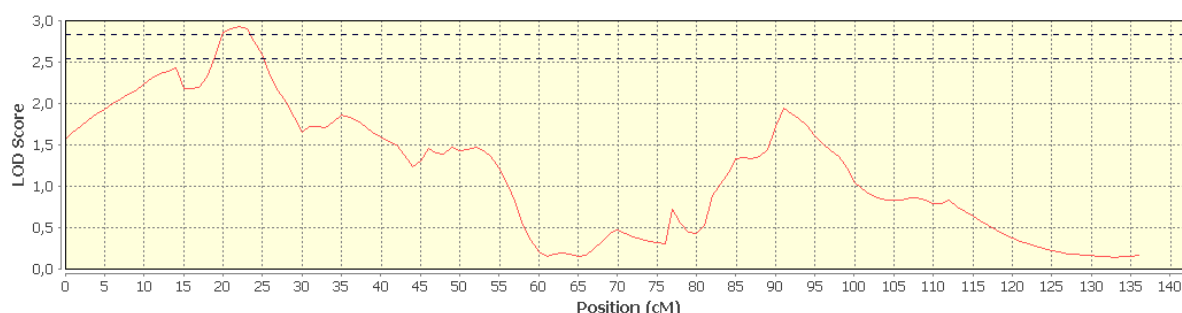


Figura 1. Perfil de QTL para matéria seca foliar (MSF) em uma progênie de *U. decumbens*. As linhas pontilhadas representam os *thresholds* de 90% e 95% do teste de permutação. Este QTL foi detectado no grupo de homologia I, na posição 22 cM, e explicou 3,98% da variância fenotípica.

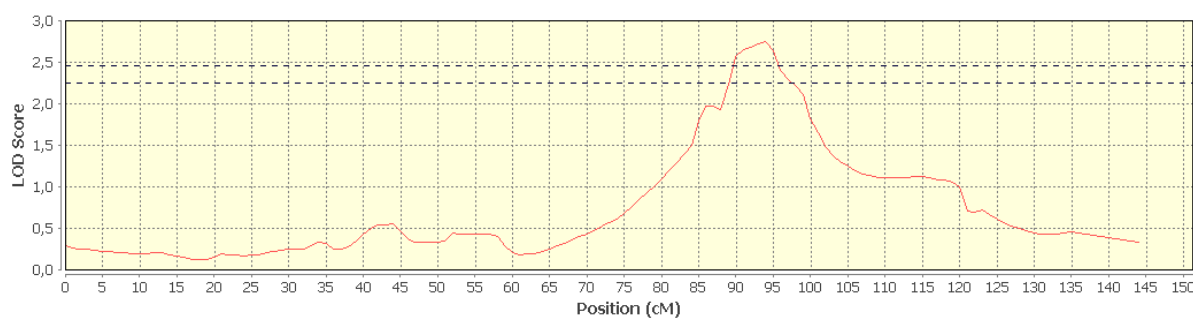


Figura 1. Perfil de QTL para matéria seca total (MST) em uma progênie de *U. decumbens*. As linhas pontilhadas representam os *thresholds* de 90% e 95% do teste de permutação. Este QTL foi detectado no grupo de homologia VIII, na posição 94 cM, e explicou 2,79% da variância fenotípica.

Existe um grande esforço pela equipe de melhoristas da Embrapa Gado de Corte na determinação do modo de reprodução dos híbridos da progênie de *U. decumbens*. A identificação de locos relacionados a essa característica poderá conduzir a chamada Seleção Assistida por Marcadores (SAM), tão buscada nos programas de melhoramento genético. Portanto, espera-se que o mapa genético obtido para *U. decumbens* seja utilizado em estudos futuros na tentativa de mapear e compreender a arquitetura genética da apomixia e de outras características de interesse.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

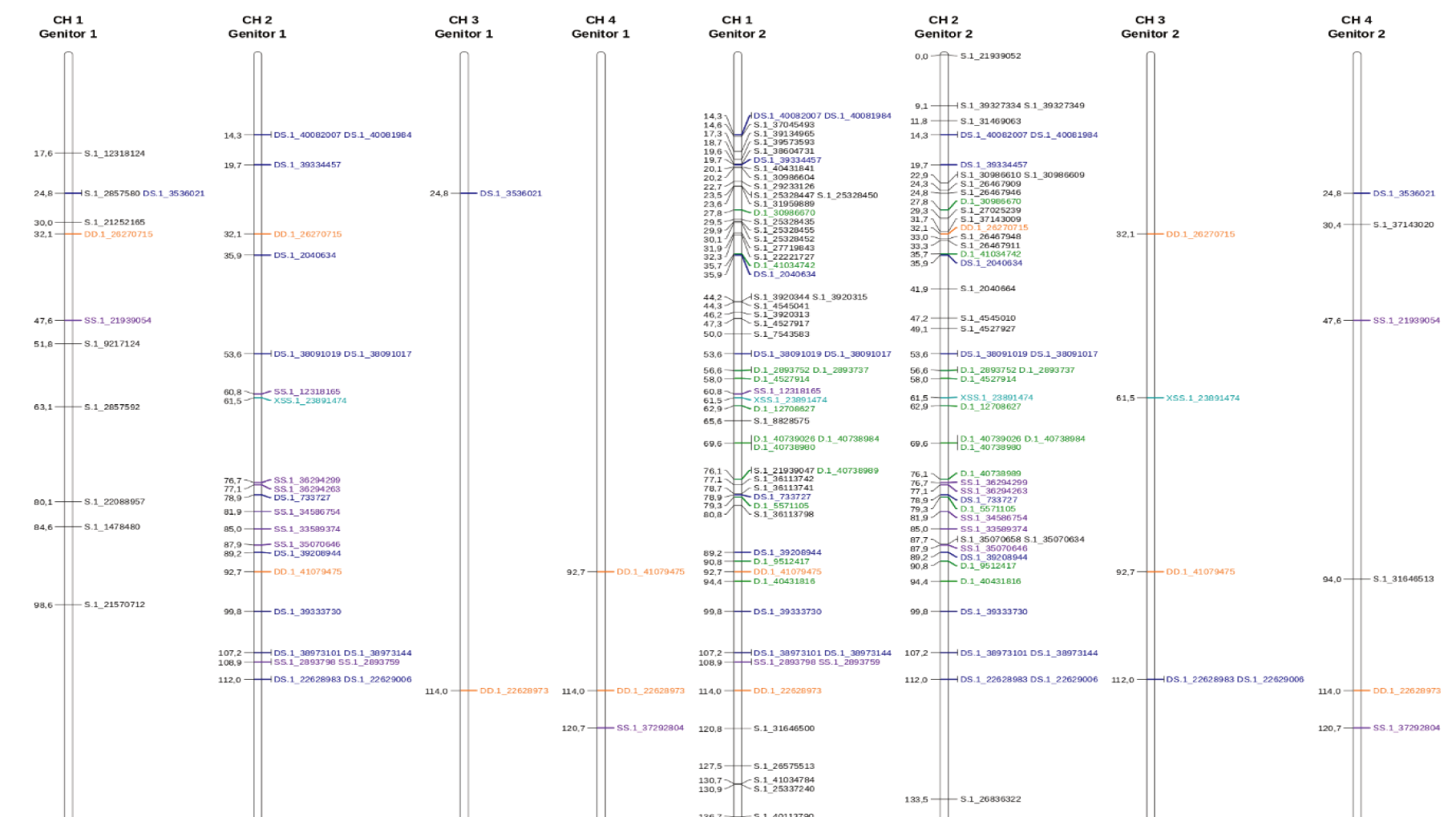


Figura Suplementar 1. Representação dos cromossomos homólogos obtidos a partir da inferência das fases de ligação dos marcadores SNPs mapeados no grupo de homologia 1 de *U. decumbens*. As siglas CH1, CH2, CH3 e CH4 correspondem a cada um dos cromossomos homólogos dos genitores D24/27 (Genitor 1) e D62 (Genitor 2). As diferentes cores correspondem ao tipo de configuração de cada marcador SNP: simplex (preto), duplex (verde), double-simplex (roxo), duplex-simplex (azul escuro), x-double-simplex (azul claro) e double-duplex (laranja).

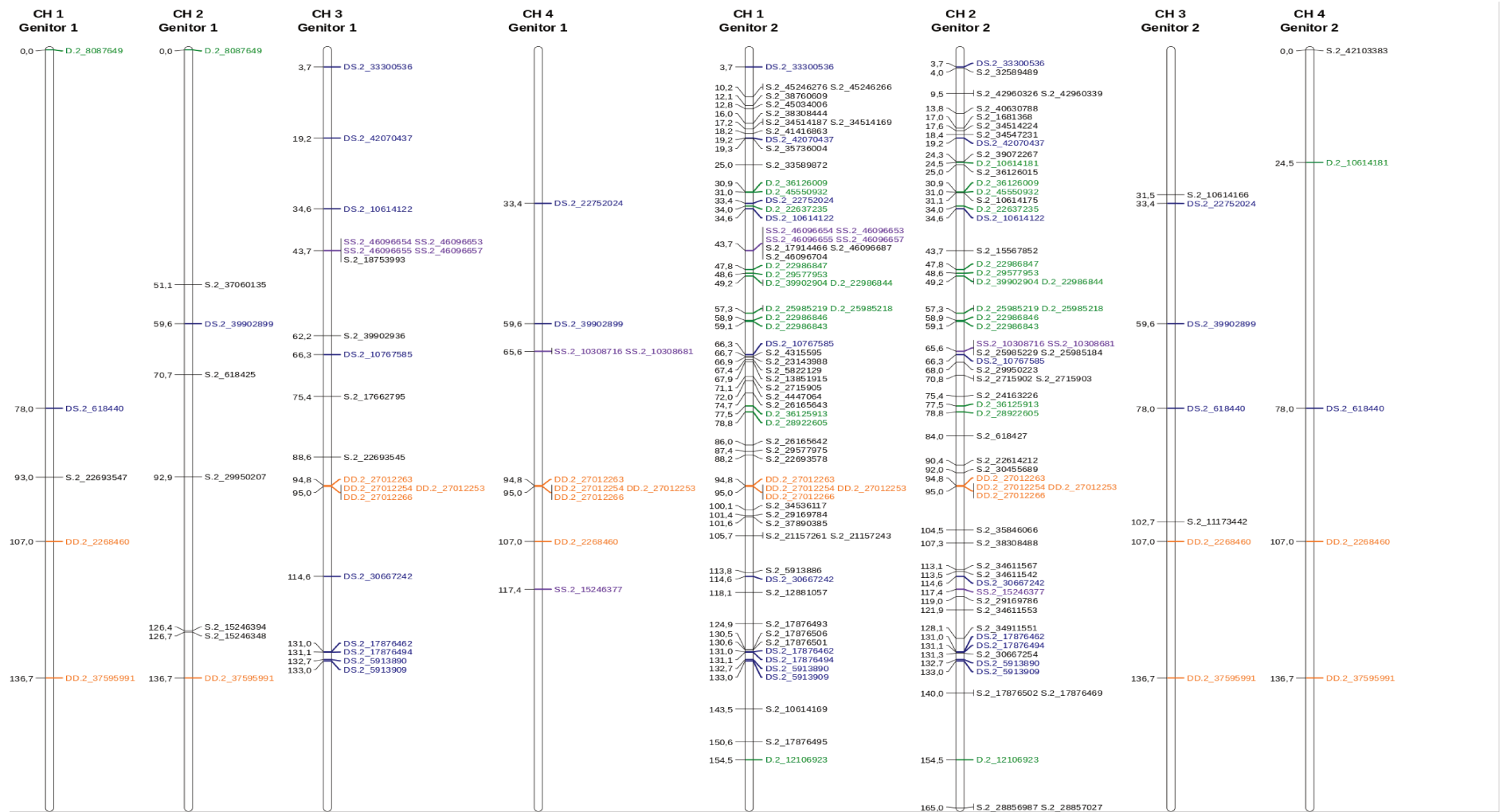


Figura Suplementar 2. Representação dos cromossomos homólogos obtidos a partir da inferência das fases de ligação dos marcadores SNPs mapeados no grupo de homologia 2 de *U. decumbens*. As siglas CH1, CH2, CH3 e CH4 correspondem a cada um dos cromossomos homólogos dos genitores D24/27 (Genitor 1) e D62 (Genitor 2). As diferentes cores correspondem ao tipo de configuração de cada marcador SNP: simplex (preto), duplex (verde), double-simplex (roxo), duplex-simplex (azul escuro), x-double-simplex (azul claro) e double-duplex (laranja).

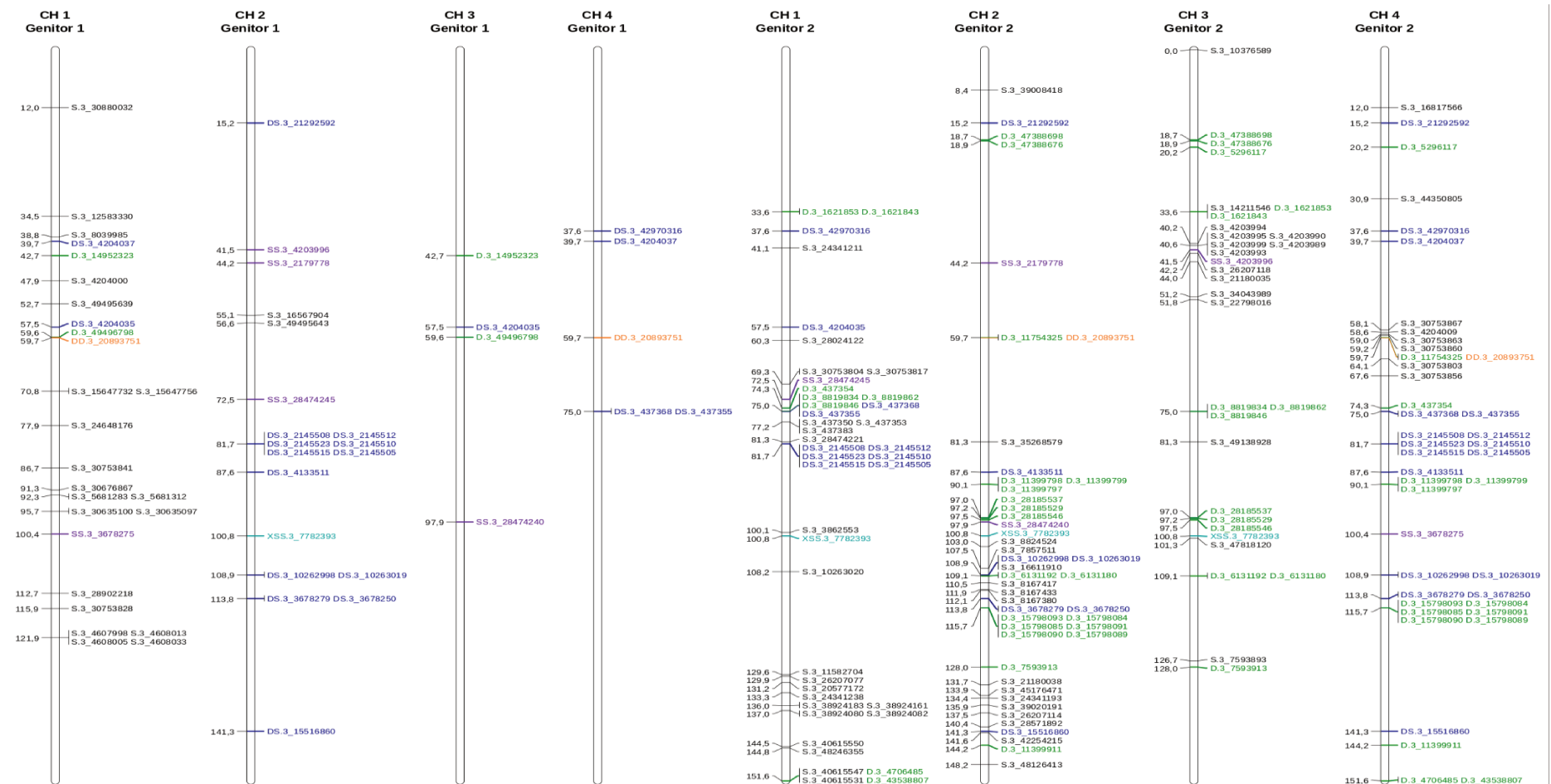


Figura Suplementar 3. Representação dos cromossomos homólogos obtidos a partir da inferência das fases de ligação dos marcadores SNPs mapeados no grupo de homologia 3 de *U. decumbens*. As siglas CH1, CH2, CH3 e CH4 correspondem a cada um dos cromossomos homólogos dos genitores D24/27 (Genitor 1) e D62 (Genitor 2). As diferentes cores correspondem ao tipo de configuração de cada marcador SNP: simplex (preto), duplex (verde), double-simplex (roxo), duplex-simplex (azul escuro), x-double-simplex (azul claro) e double-duplex (laranja).

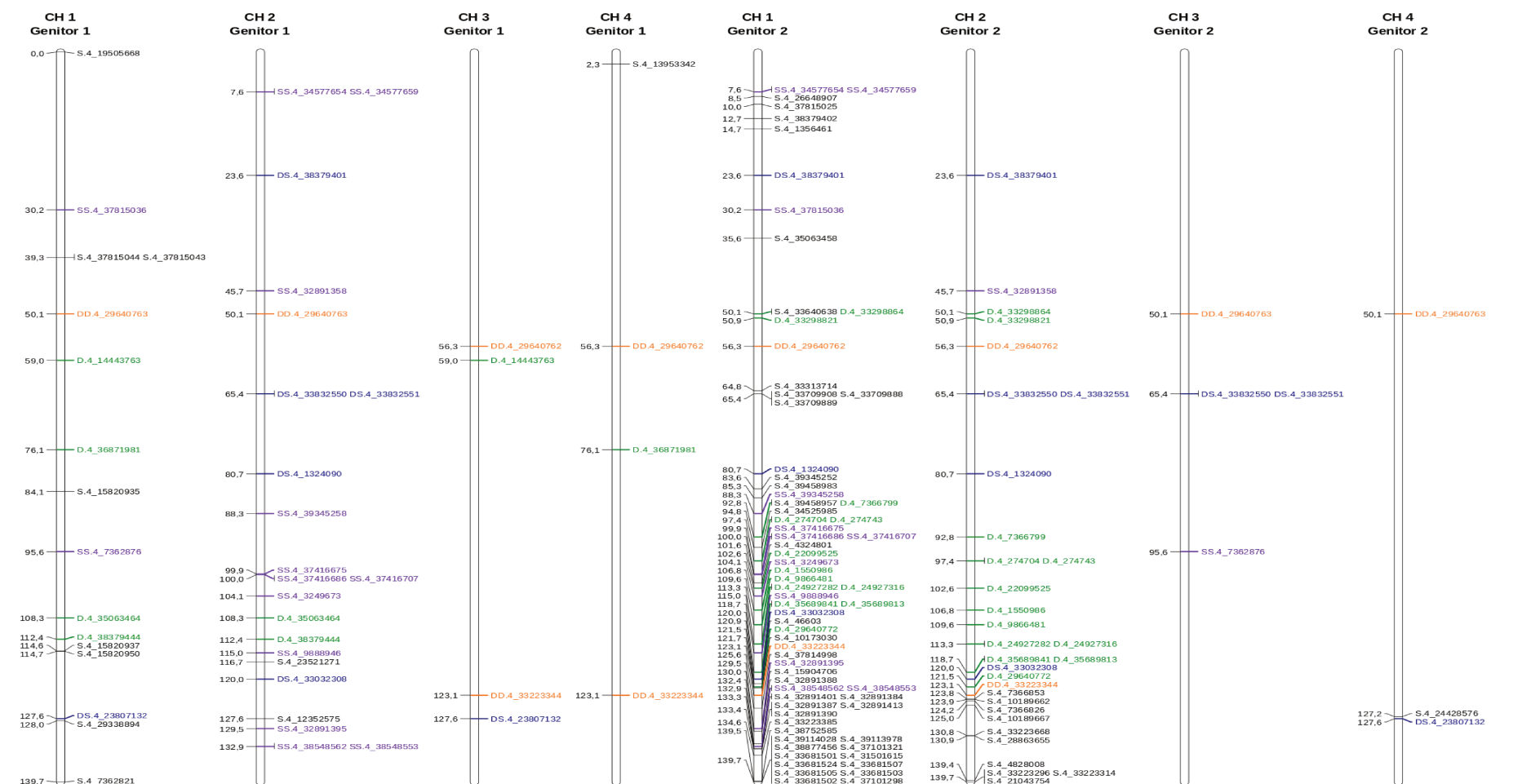


Figura Suplementar 4. Representação dos cromossomos homólogos obtidos a partir da inferência das fases de ligação dos marcadores SNPs mapeados no grupo de homologia 4 de *U. decumbens*. As siglas CH1, CH2, CH3 e CH4 correspondem a cada um dos cromossomos homólogos dos genitores D24/27 (Genitor 1) e D62 (Genitor 2). As diferentes cores correspondem ao tipo de configuração de cada marcador SNP: simplex (preto), duplex (verde), double-simplex (roxo), duplex-simplex (azul escuro), x-double-simplex (azul claro) e double-duplex (laranja).

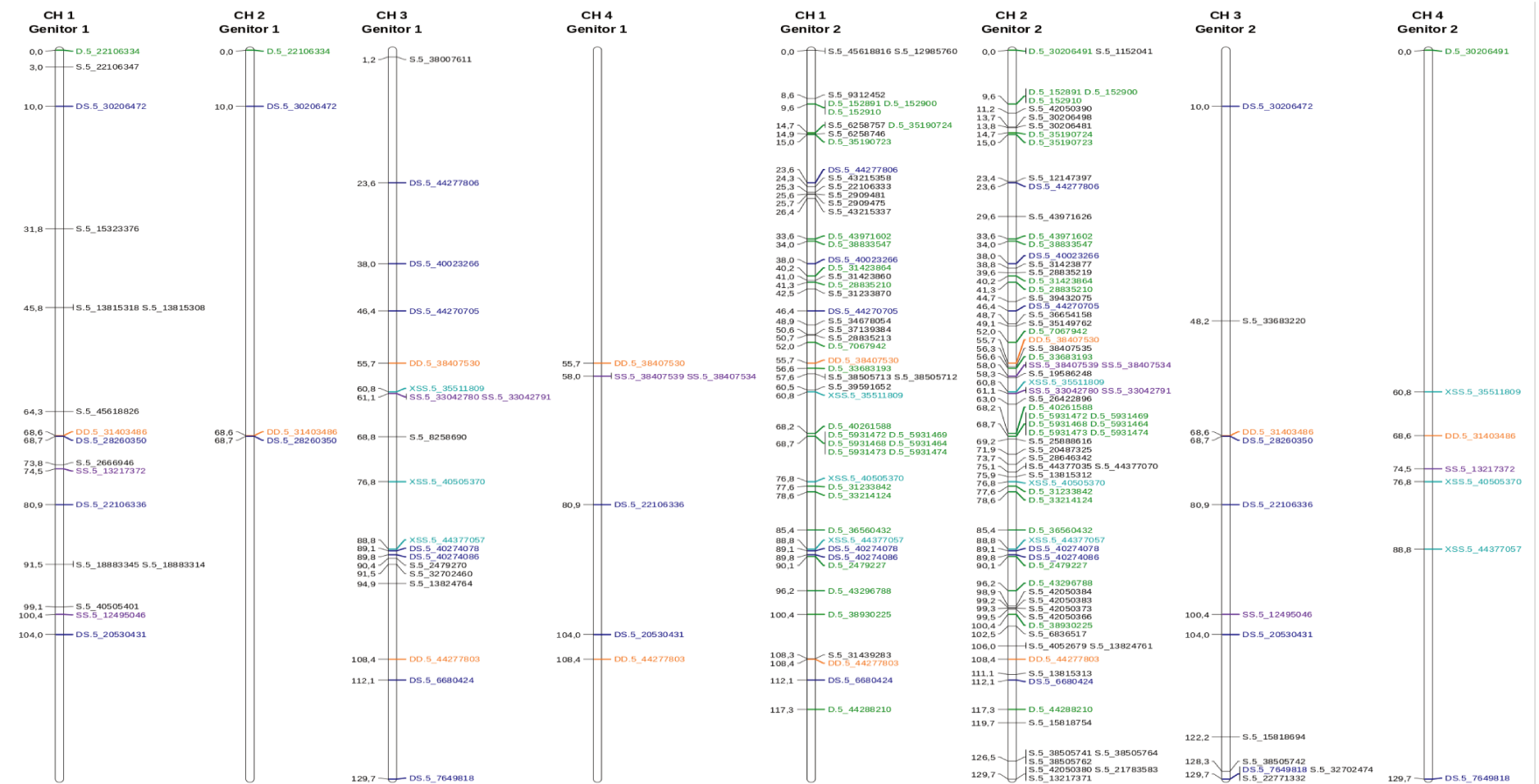


Figura Suplementar 5. Representação dos cromossomos homólogos obtidos a partir da inferência das fases de ligação dos marcadores SNPs mapeados no grupo de homologia 5 de *U. decumbens*. As siglas CH1, CH2, CH3 e CH4 correspondem a cada um dos cromossomos homólogos dos genitores D24/27 (Genitor 1) e D62 (Genitor 2). As diferentes cores correspondem ao tipo de configuração de cada marcador SNP: simplex (preto), duplex (verde), double-simplex (roxo), duplex-simplex (azul escuro), x-double-simplex (azul claro) e double-duplex (laranja).



Figura Suplementar 6. Representação dos cromossomos homólogos obtidos a partir da inferência das fases de ligação dos marcadores SNPs mapeados no grupo de homologia 6 de *U. decumbens*. As siglas CH1, CH2, CH3 e CH4 correspondem a cada um dos cromossomos homólogos dos genitores D24/27 (Genitor 1) e D62 (Genitor 2). As diferentes cores correspondem ao tipo de configuração de cada marcador SNP: simplex (preto), duplex (verde), double-simplex (roxo), duplex-simplex (azul escuro), x-double-simplex (azul claro) e double-duplex (laranja).

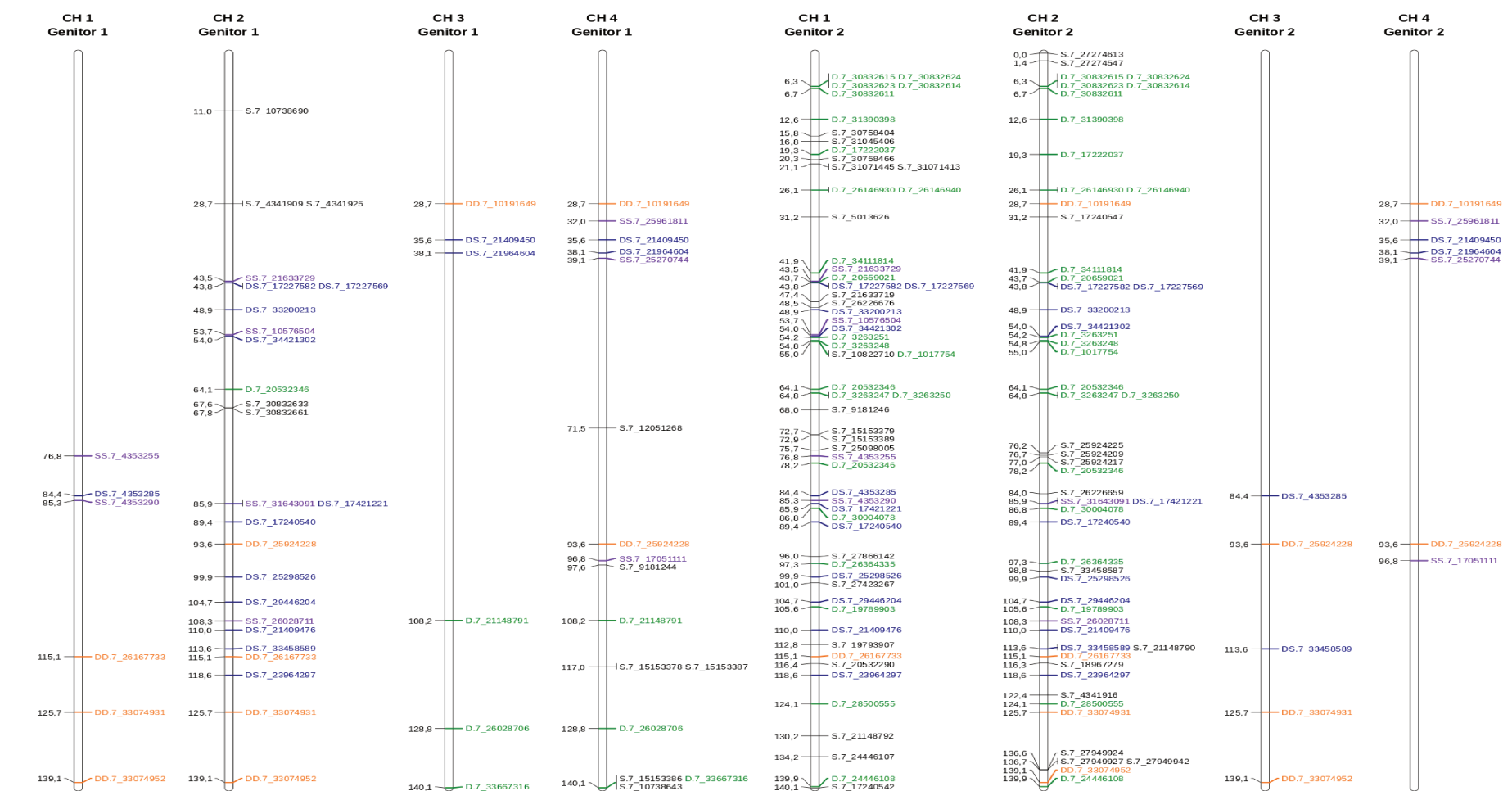


Figura Suplementar 7. Representação dos cromossomos homólogos obtidos a partir da inferência das fases de ligação dos marcadores SNPs mapeados no grupo de homologia 7 de *U. decumbens*. As siglas CH1, CH2, CH3 e CH4 correspondem a cada um dos cromossomos homólogos dos genitores D24/27 (Genitor 1) e D62 (Genitor 2). As diferentes cores correspondem ao tipo de configuração de cada marcador SNP: simplex (preto), duplex (verde), double-simplex (roxo), duplex-simplex (azul escuro), x-double-simplex (azul claro) e double-duplex (laranja).

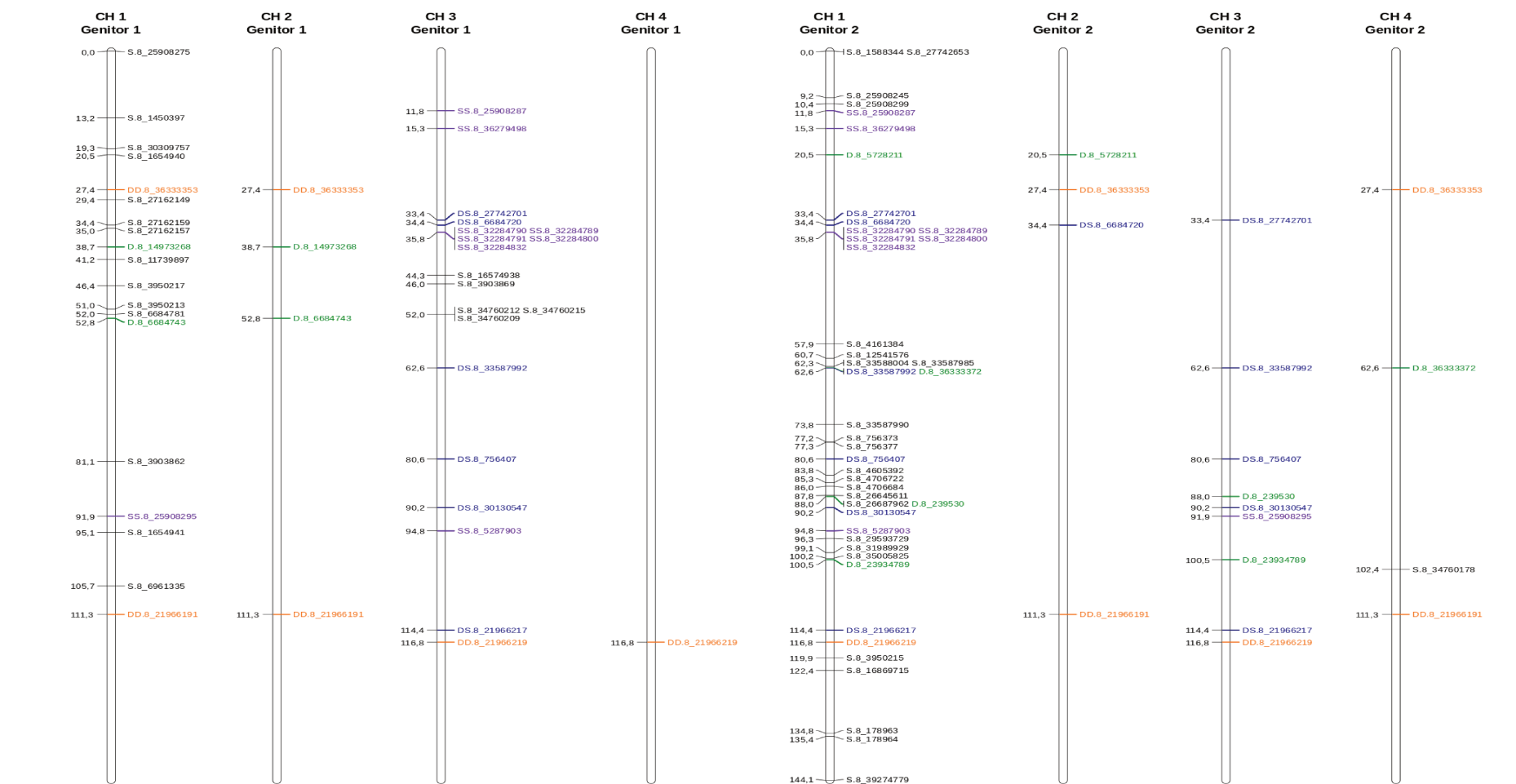


Figura Suplementar 8. Representação dos cromossomos homólogos obtidos a partir da inferência das fases de ligação dos marcadores SNPs mapeados no grupo de homologia 8 de *U. decumbens*. As siglas CH1, CH2, CH3 e CH4 correspondem a cada um dos cromossomos homólogos dos genitores D24/27 (Genitor 1) e D62 (Genitor 2). As diferentes cores correspondem ao tipo de configuração de cada marcador SNP: simplex (preto), duplex (verde), double-simplex (roxo), duplex-simplex (azul escuro), x-double-simplex (azul claro) e double-duplex (laranja).

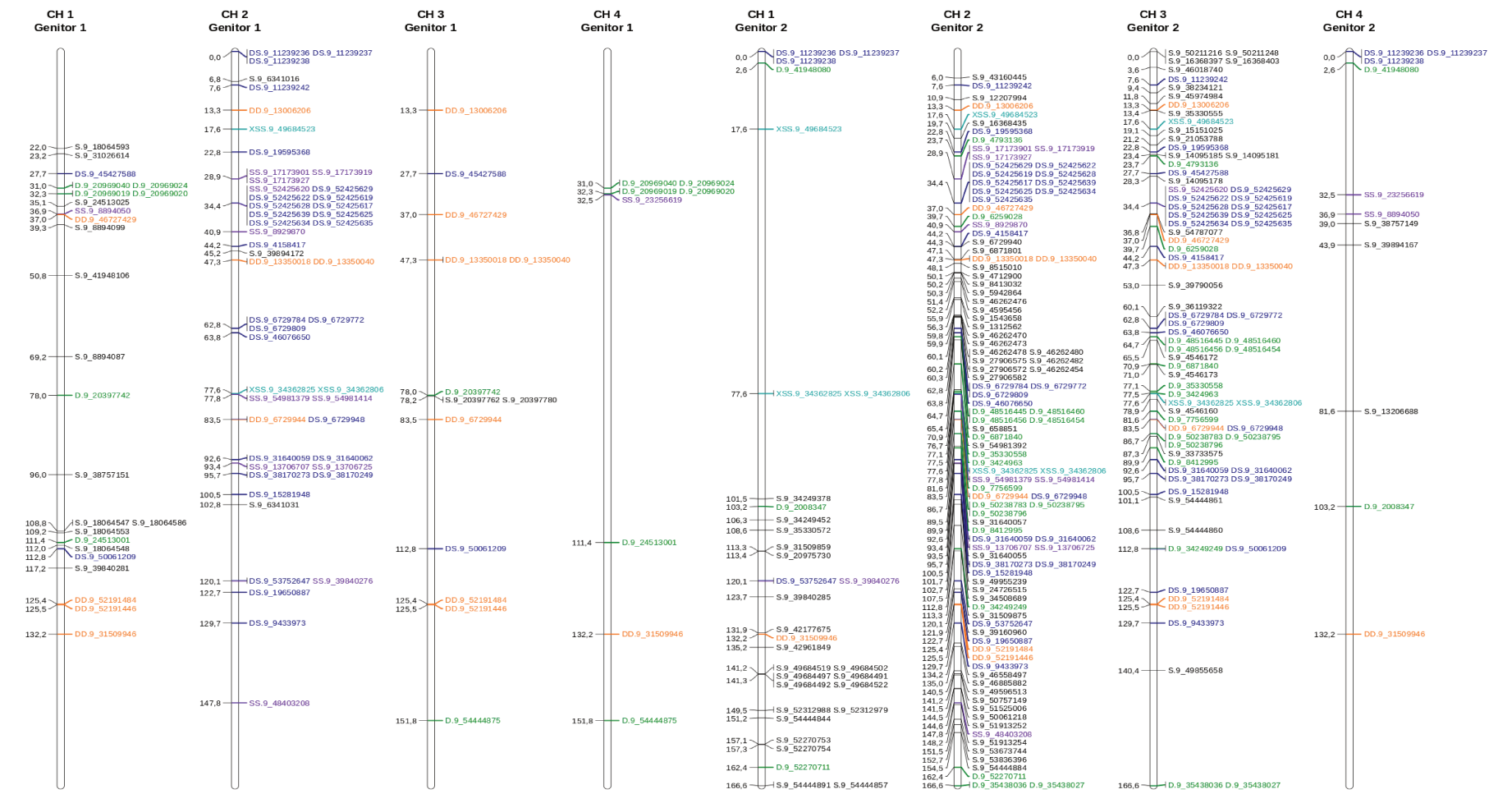


Figura Suplementar 9. Representação dos cromossomos homólogos obtidos a partir da inferência das fases de ligação dos marcadores SNPs mapeados no grupo de homologia 9 de *U. decumbens*. As siglas CH1, CH2, CH3 e CH4 correspondem a cada um dos cromossomos homólogos dos genitores D24/27 (Genitor 1) e D62 (Genitor 2). As diferentes cores correspondem ao tipo de configuração de cada marcador SNP: simplex (preto), duplex (verde), double-simplex (roxo), duplex-simplex (azul escuro), x-double-simplex (azul claro) e double-duplex (laranja).

RESUMO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos e expostos a seguir de forma resumida confirmam que os objetivos inicialmente propostos foram alcançados.

Capítulo I

- Primeiro conjunto de marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie *Urochloa decumbens*, a partir de uma biblioteca enriquecida;
- Obtenção de 89 locos microssatélites polimórficos entre os genótipos avaliados, com elevados valores de PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) e PD (Poder Discriminatório);
- Transferibilidade dos locos para outras quatro espécies do gênero *Urochloa*, sendo elas: *U. brizantha*, *U. humidicola*, *U. ruziziensis* e *U. dictyoneura*. A maior taxa de transferibilidade foi observada em *U. ruziziensis* e *U. brizantha*.

Resultados Complementares

- A progênie de *U. decumbens* foi genotipada com 47 marcadores microssatélites, que geraram um total de 152 alelos;
- A genotipagem permitiu a discriminação de 22 falsos híbridos que foram excluídos das análises posteriores.

Capítulo II

- Primeiro mapa intraespecífico para *U. decumbens* construído com marcadores SNPs oriundos de Genotipagem-por-Sequenciamento e com informações de dosagem alélica para espécie tetraploide;
- O mapa genético possui nove grupos de homologia, cobertura de 1335,2 cM e densidade de 1 marcador a cada 1,3 cM;

RESUMO DOS RESULTADOS

- O GH9 apresentou o maior número de marcadores SNPs ligados, enquanto que o GH3 apresentou o menor número de marcadores SNPs, 187 e 63, respectivamente;
- Primeiro mapeamento de QTLs para uma progênie de *U. decumbens*. Detecção de três QTLs envolvidos na resistência as cigarrinhas-das-pastagens.

Resultados Complementares

- A partir da fenotipagem de parte da progênie, buscou-se mapear locos relacionados ao modo de reprodução (apomítico ou sexual) e caracteres agronômicos, tais como matéria seca total e rebrota;
- Não foram detectados QTLs significativos para nenhuma das características citadas acima.

CONCLUSÕES GERAIS

O primeiro conjunto de marcadores microssatélites desenvolvido para *U. decumbens* foi eficiente e informativo para a espécie e outras quatro espécies do gênero *Urochloa*. Esses marcadores são importantes ferramentas a serem incorporadas em diversas etapas dos programas de melhoramento genético da espécie, desde a caracterização do banco de germoplasma e identificação de híbridos, até a construção de novos mapas genéticos.

A construção do único mapa intraespecífico para *U. decumbens* acrescenta informações a respeito da organização genômica da espécie. A utilização de marcadores SNPs em múltiplas doses foi o diferencial que agregou muito ao mapa genético.

O mapa genético integrado possibilitou a detecção de QTLs envolvidos na resistência as cigarrinhas-das-pastagens, uma importante praga que ataca as forrageiras tropicais, gerando resultados inéditos de arquitetura genética para a espécie.

As ferramentas moleculares geradas poderão auxiliar na elaboração de estratégias a serem introduzidas nos programas de melhoramento, de forma a aumentar a eficiência dos processos de seleção e acelerar o lançamento de novas cultivares.

PERSPECTIVAS

A construção do mapa genético intraespecífico para *U. decumbens* permite que novos estudos sejam realizados a partir dessa ferramenta. Por limitações do *Software* utilizado no mapeamento, os marcadores microssatélites desenvolvidos no Capítulo I não puderam ser inseridos ao mapa genético. Portanto, espera-se que novas metodologias de mapeamento permitam a combinação de marcadores SNPs com informação de dosagem alélica com marcadores microssatélites, visando a obtenção de mapas genéticos mais robustos e que forneçam mais informações a respeito da organização genômica da espécie.

A identificação de QTLs relacionados à resistência as cigarrinhas-das-pastagens abre novas possibilidades, como a validação de marcadores funcionais e a detecção de genes que governam essa característica de interesse. Ademais, um estudo mais aprofundado dessas regiões pode ser realizado utilizando-se BACs (bacterial artificial chromosome).

Com o mapa genético disponível outros QTLs também poderão ser detectados, visando o melhor entendimento da arquitetura genética de caracteres relevantes para o melhoramento da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - Associação brasileira das indústrias exportadoras de carne. **Perfil da Pecuária do Brasil: Relatório Anual**. 2016.

Akaike, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control** (19): 716–723, 1974.

Almeida, M.C.C.; Chiari, L.; Jank, L.; Valle, C.B. Diversidade genética molecular entre Cultivares e híbridos de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum*. **Ciência Rural**, v.41. p.1998-2003, 2011.

Andrade, R.P.de. Pasture seed Production Technology in Brazil. Proceeding Piracicaba, Fealq, p. 129-32, 2001.

Ball, A.D.; Stapley, J.; Dawson, D.A.; Birkhead, T.R.; Burke, T. A comparison of SNPs and microsatellites as linkage mapping markers: lessons from the zebra fish (*Taeniopygia guttata*). **BMC genomics**, 11: 218, 2010.

Balsalobre, T.W.A.; Pereira, G.S.; Margarido, G.R.A.; Gazaffi, R.; Barreto, F.Z.; Anoni, C.O.; Cardoso-Silva, C.B.; Costa, E.A.; Mancini, M.C.; Hoffmann, H.P.; Souza, A.P.; Garcia, A.A.F.; Carneiro, M.S. GBS-based single dosage markers for linkage and QTL mapping allow gete mining for yield-related traits in sugarcane. **BMC Genomics** 19:72, 2017.

Barrios, S.C.L.; Valle, C.B.; Alves, G.F.; Simeão, R.M.; Jank, L. R. Reciprocal recurrent selection in the breeding of *Brachiaria decumbens*. **Tropical Grasslands**, v. 1, p. 52-54, 2013.

Baxter, S.W.; Davey, J.W.; Johnston, J.S.; Shelton, A.M.; Heckel, D.G.; Jiggins, C.D.; Blaxter, M.L. Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism. **PLoS One** e19315, 2011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beissinger, T.M.; Hirsch, C.N.; Sekhon, R.S.; Foerster, J.M.; Johnson, J.M.; Muttoni, G.; Vaillancourt, B.; Buell, C.R.; Kaeppler, S.M.; de Leon, N. Marker density and read depth for genotyping populations using genotyping-by-sequencing. **Genetics** 193(4):1073-81, 2013
- Bitencourt, G.A.; Chiari, L.; Laura, V.A.; Vale, C.B.; Jank, L.; Moro, J.R. Aluminum tolerance on genotypes of signal grass. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa 40: 245-250, 2011.
- Bogdan, A.V. Tropical pasture and fodder plants. Longman, New York. 475pp, 1977.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Registro Nacional de Cultivares. Brasília, 2016. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/guia-de-servicos/registro-nacional-de-cultivares-rnc>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2018.
- Brookes, A.J. The essence of SNPs. **Gene** 234:177-186, 1999.
- Butler, D.G.; Cullis, B.R.; Gilmour, A.R.; Gogel, B.J. **Mixed models for S language environments: ASReml-R reference manual**, 149p, 2009.
- Carneiro, M.S.; Vieira, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia** 61: 89-100, 2002.
- Chao, S.; Sharp, P.J.; Worland, A.J.; Warham, E.J.; Koebner, R.D.M.; Gale, M.D. RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. **Theoretical Applied Genetics** 78: 495-504, 1989.
- Collard, B.C.Y.; Mackill, D.J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transaction of the Royal Society B** 363: 557-572, 2008.
- Cullis, B. R., A. B. Smith, and N. E. Coombes. On the design of early generation variety trials with correlated data. **J. Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics**. (11): 381–393, 2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dall'Agnol, M.; Schifino-Wittmann, M.T. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n.2, p. 127-133, 2005.

Davey, J.W.; Hohenlohe, P.A.; Etter, P.D.; Boone, J.Q.; Catchen, J.M.; Blaxter, M.L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews Genetics** (12): 499-510, 2011.

Deschamps, S.; Liaca, V.; May, G.D. Genotyping-by-sequencing in plants. **Biology** 460-483, 2012.

Dias-Filho, M.B. Diagnóstico das pastagens no Brasil. Documentos no. 402. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2014.

Dias-Filho, M.B. Uso de pastagens para a produção de bovinos de corte no Brasil: passado, presente e futuro. Documentos no. 418. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2016.

Doerge, R.W. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. **Nature Reviews Genetics** (3): 43-52, 2002.

Elshire, R.J.; Glaubitz, J.C.; Sun, Q.; Poland, J.A.; Kawamoto, K.; Buckler, E.S.; Mitchell, S.E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **PLoS One**, 6:e19379, 2011.

Falconer, D.S.; Mackay, T.F. **Introduction to quantitative genetics**. 4 ed. Londres: Editora Longman Group, p 464, 1996.

Feltus, F.A.; Wan, J.; Schulze, S.R.; Estill, J.C.; Jiang, N.; Paterson, A.H. An SNP Resource for Rice Genetics and Breeding Based on Subspecies Indica and Japonica Genome Alignments. **Genome Research** 14:1812-1819, 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ferreira, R.C.U.; Cançado, L.J.; Valle, C.B.; Chiari, L.; Souza, A.P. de. Microsatellite loci for *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster and cross-amplification in other *Urochloa* species. **BMC Research Notes**, 9:152, 2016.

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB20516>>. Acesso em: 04 Abr. 2018

Gallo, P.H.; Micheletti, P.L.; Boldrini, K.R.; Risso-Pascotto, C.; Pagliarini, M.S.; Valle, C.B. do. 2n gamete formation in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). **Euphytica**, 154 (1-2): 255-260, 2007.

Garcia, A.A.F.; Mollinari, M.; Marconi, T.G.; Serang, O.R.; Silva, R.R.; Vieira, M.L.C.; Costa, E.A.; Mancini, M.C.; Garcia, M.O.S.; Pastina, M.M.; Gazaffi, R.; Martins, E.R.F.; Dahmer, N.; Sforça, D.A.; Silva, C.B.C.; Bundock, P.; Henry, R.J.; Souza, G.M.; van Sluys, M.; Landell, M.G.A.; Carneiro, M.S.; Vicentz, M.A.G.; Pinto, L.R.; Vencovsky, R.; Souza, A.P. SNP genotyping allows an in-depth characterisation of the genome of sugarcane and other complex autopolyploids. **Nature Scientific reports** (3): 1–10, 2013.

Gazaffi, R.; Margarido, A.R.A.; Pastina, M.M.; Mollinari, M.; Garcia, A.A.F. A model for quantitative trait loci mapping, linkage phase, and segregation pattern estimation for a full-sib progeny. **Tree Genetics & Genomes** (10): 791-801, 2014.

Gebhardt, C.; Ritter, E.; Debener, T.; Schachtschabel, U.; Walkemeier, B.; Uhrig, H.; Salamini, F. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics** 78: 65-75, 1989.

Glaubitz, J.C.; Casstevens, T.M.; Lu, F.; Harriman, J.; Elshire, R. J.; Sun, Q.; Buckler, E. S. TASSEL-GBS: A high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. **PLoS ONE** 9: e90346, 2014.

Grover, A.; Sharma, P.C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical Reviews in Biotechnology**, 9551: 1-13, 2014.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gupta, P.K.; Roy, J.K.; Prasad, M. Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science** 80:524-535, 2001.

Hackett, C.A.; Bradshaw, J.E.; McNicol, J.W. Interval mapping of QTLs in autotetraploid species. **Genetics** 159: 1819-1832, 2001.

Hackett, C. A.; Boskamp, B.; Vogogias, A.; Preedy, K.F.; Milne, I. TetraploidSNPMap: software for linkage analysis and QTL mapping in autotetraploid populations using SNP dosage data. **Journal of Heredity** (108): 438–442, 2017.

Hayashi, K.; Hashimoto, N.; Daigen, M.; Ashikawa, I. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. **Theoretical and Applied Genetics** 108 (7): 1212–1220, 2004.

He, J.; Zhao, X.; Laroche, A.; Lu, Z.; Liu, H.; Li, Z. Genotyping-by-sequencing (GBS), na ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. **Frontiers in Plant Science**, 2014.

Heffelfinger, C.; Fragoso, C.A.; Moreno, M.A.; Overton, J.D.; Mottinger, J.P.; Zhao, J.T.; Dellaporta, S.L. Flexible and scalable genotyping-by-sequencing strategies for population studies. **BMC Genomics** 15: 979, 2014.

Helentjaris, T.; Slocum, M.; Wright, S.; Shaefer, A.; Nienhuis, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical Applied Genetics** 72: 761-769, 1986.

Hodel, R.G.J.; Segovia-Salcedo, M.C.; Landis, J.B.; Crowl, A.A.; Sun, M.; Liu, X.; Gitzendanner, M.A.; Douglas, N.A.; Germain-Aubrey, C.C.; Cheng, S.; Soltis, D.E.; Soltis, P.S. The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. **Applications in Plant Sciences** 4(6): 1600025, 2016.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal (PPM) 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15/11/2017.

Jank, L.; Valle, C.B.; Resende, R.M.S. Breeding tropical forages. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, S1: 27-34, 2011

Jank, L., Chiari, L., Valle, C.B.; Simeão, R.M. Forage breeding. In **Forage breeding and biotechnology**. Embrapa Gado de Corte, 2013.

Jiang, Z.; Wang, H.; Michal, J.J.; Zhou, X.; Liu, B.; Woods, L.C.; Fuchs. Genome wide sampling sequencing for SNP genotyping: methods, challenges and future development. *International Journal Biological Sciences* 12(1): 100-108, 2016.

Kalia, R.K.; Rai, M.K.; Kalia, S.; Singh, R.; Dhawan, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, 117: 309-334, 2011.

Lander, E.S.; Botstein, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** 121:185-199, 1989.

Liu, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis**. Boca Raton, USA: CRC Press. 611p, 1998.

Lynch, M.; Walsh, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sinauer Associates, Sunderland, 1998.

Jungmann, L.; Vigna, B.B.Z.; Paiva, J.; de Sousa, A.C.B.; Valle, C.B.; Laborda, P.R.; Zucchi, M.I.; Souza, A.P. Development of microsatellite markers for *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. **Conservation Genetics Resources**. 1(1): 475–479, 2009a.

Jungmann, L.; Sousa, A.C.B.; Paiva, J.; Francisco, P.M.; Vigna, B.B.Z.; Valle, C.B.; Zucchi, M.I.; Souza, A.P. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stap. **Conservation Genetics**. 10(6): 1873-1876, 2009b.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Jungmann, L.; Vigna, B.B.Z.; Boldrini, K.R.; Sousa, A.C.B.; Valle, C.B.; Resende, R.M.S.; Pagliarini, M.S.; Zucchi, M.I.; Souza, A.P. Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass *Brachiaria humidicola* based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and geographical origin. **Genome**. 2010; 53: 698–709.

Junqueira, R.G.; Mendes-Bonato, A.B.; Pagliarini, M.S.; Bione, N.C.P.; Valle, C.B.; Penteado, M.I.O. Absence of microspore polarity, symmetric divisions and pollen cell fate in *Brachiaria decumbens* (Gramineae). **Genome**, 46(1): 83-88, 2003.

Kao, C.H.; Zeng, Z.B.; Teasdale, R.D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics** (152): 1203-1216, 1999.

Keller- Grein, G.; Maass, B.L.; Hanson, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In J.W. Miles et al. (ed.) *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*. CIAT, Cali, Colombia, and CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brazil, p. 16-42, 1996.

Kim, C.; Guo, H.; Kong, W, Chandnani, R.; Shuang, L.S.; Paterson, A.H. Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs. **Plant Science**, 242: 1-9, 2015.

Kwok, P.Y.; Gu, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Molecular Medicine Today* 12:538-543, 1999.

Laborda, P. Marcadores moleculares microssatélites na investigação do genoma de *Drosophila mediopunctata*: desenvolvimento e construção de mapa genético de ligação. Universidade Estadual de Campinas, 2011.

Lazia, B. Produção de forrageiras. In: Portal agropecuário. 2012. Disponível em: < <http://www.portalagropecuário.com.br/bovinos/pastagens-e-alimentacao/producao-de-forrageiras/>>. Acesso em: 02. ago. 2017.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Leopoldino, W.M. Avaliação nutricional de pastagens consorciadas com leguminosas tropicais, dinâmica ruminal e produção de leite de vacas mestiças. Dissertação de Mestrado. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. 49p, 2000.
- Lin, M.; Lou, X.; Chang, M.; Wu, R. A general statistical framework for mapping quantitative trait loci in nonmodel systems: issue for characterizing linkage phases. **Genetics** 165: 901-913, 2003.
- Litt, M.; Luty, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**. 44: 397-401, 1989.
- Macedo, M.C.M. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: Barbosa, R.A (ed.) Morte de pastos de braquiárias. Campo Grande/MS: Embrapa Gado de Corte, pp.35-65, 2006.
- Maliepaard, C.; Jansen, J.; Van-Ooijen, J.W. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. **Genetic Research** 70: 237-250, 1997.
- Mammadov, J.; Aggarwal, R.; Buyyarapu, R.; Kumpatla, S. SNP markers and their impact on plant breeding. **International Journal of Plant Genomics**, 2012.
- Mateus, R.G.; Barrios, S.C.L.; Figueiredo, U.J.; Valle, C.B. Agronomic evaluation of 324 intraspecific hybrids of *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Tropical Grasslands**, v. 1, p. 99-100, 2013.
- Mateus, R.G.; Barrios, S.C.L.; Valle, C.B.; Valério, J.R.; Torres, F.Z.V.; Martins, L.B.; Amaral, P.N.C. Genetic parameters and selection of *Brachiaria decumbens* hybrids for agronomic traits and resistance to spittlebugs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, p. 227-234, 2015.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

McCallum, S.; Graham, J.; Jorgensen, L.; Rowland, L.J.; Bassil, N.V.; Hancock, J.F.; Wheeler, E.J.; Vining, K.; Poland, J.A.; Olmstead J.W.; Buck, E.; Wiedow, C.; Jackson, E.; Brown, A.; Hackett. Construction of a SNP and SSR linkage map in autotetraploid blueberry using genotyping-by-sequencing. **Molecular Breeding** 36:41, 2016.

McCouch, S.R.; Kochert, G.; Yu, Z.H.; Wang, Z.Y.; Khush, G.S.; Coffman, W.R.; Tanksley, S.D. Molecular mapping of rice chromosomes. **Theoretical Applied Genetics** 76: .815-829, 1988.

Mendes-Bonato, A.B.; Junqueira Filho, R.G.; Pagliarini, MS.; Valle, CB.; Penteado, M.I.O. Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. **Cell Biology International** 26: 641-646, 2002.

Mendes-Bonato, A.B.; Risso-Pascotto, C.; Pagliarini, M.S.; Valle, C.B. Normal microspore production after cell fusion in *Brachiaria jubata* (Gramineae). **Genetics and Molecular Biology** 26(4): 517-520, 2003.

Mendonça, S.A.; Barrios, S.C.L.; Figueiredo, U.J.; Alves, G.F.; Valle, C.B. Agronomic and nutritional evaluation of intraspecific crosses in *Brachiaria decumbens*. **Tropical Grasslands**, v.1, p. 103-105, 2013.

Miah, G.; Rafii, M.Y.; Ismail, M.R.; Puteh, A.B.; Rahim, H.A.; Islam, K.N.; Latif, M.A. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. **International Journal of Molecular Sciences** 14: 22499-22528, 2013.

Milbourne, D.; Bradshaw, J.E.; Hackett, C.A. Molecular Mapping and Breeding in Polyploid Crop Plants. In: Principles and Practices of Plant Genomics (Vol. 2: Molecular Breeding), C. Kole and A.G. Abbott, eds, pp. 355 – 394, 2008.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Miles, J.W.; Valle, C.B. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In: Miles JW, Mass BL, Valle CB (eds.). ***Brachiaria: biology, agronomy and improvement***. Colombia: CIAT. p. 164-177, 1996.
- Mollinari, M. and Serang, O. Quantitative SNP genotyping of polyploids with MassARRAY and other platforms. In ***Methods in Molecular Biology***, edited by J. M. Walker, 2013.
- Monteiro, M.C.C.; Lucas, E.D.; Souto, S.M. Estudo de seis espécies forrageiras do gênero *Brachiaria*. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, Brasília, v. 9, n. 3, p. 17-20, 1974.
- Monteiro, L.C.; Verzignassi, J.R.; Barrios, S.C.L.; Valle, C.B.; Fernandes, C.D.; Benteo, G.L.; Libório, C.B. *Brachiaria decumbens* intraspecific hybrids: characterization and selection for seed production. ***Journal of Seed Sciences***, v. 38, p. 62-67, 2016a.
- Monteiro, L.C.; Verzignassi, J.R.; Barrios, S.C.L.; Valle, C.B.; Fernandes, C.D.; Benteo, G.L.; Libório, C.B. Characterization and selection of interspecific hybrids of *Brachiaria decumbens* for seed production in Campo Grande - MS. ***Crop Breeding and Applied Biotechnology***, v. 16, p. 174-181, 2016b.
- Morrone, O.; Zuloaga, F.O. Revisión de las especies sudamericanas nativas introducidas de los géneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). ***Darwiniana***. 31(1-4): 43-109, 1992.
- Nie, H.; Yan, X.; Huo, Z.; Jiang, L.; Chen, P.; Liu, H.; Ding, J.; Yang, F. Construction of a high-density genetic map and quantitative trait locus mapping in the manila clam *Ruditapes philippinarum*. ***Nature Scientific Reports*** 7:229, 2017.
- Nunes, S.G.; Boock, A.; Penteado, M.I.O.; Gomes, D.T. *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. CNPQC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brasil. 31p, 1984.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Oliveira, K.M.B.; Barrios, S.C.L.; Chiari, L.; Laura, V.A.; Valle, C.B. Evaluation of aluminum resistance in hybrids of *Brachiaria decumbens* Stapf.. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, p. 251-257, 2015.

Parsons, J.J. Spread of African grasses to the American tropics. **Journal of Range Management**. 25(1): 12-17, 1972.

Pastina, M.M.; Pinto, L.R.; Oliveira, K.M.; Souza, A.P.; Garcia, A.A.F. **Molecular mapping of complex traits**. In: Henry R, Kole C (eds) Genetics, genomics and breeding of sugarcane, Science Publishers, Enfield, pp 117–148, 2010.

Pessoa-Filho, M.; Martins, A.M.; Ferreira, M.E. Molecular dating of phylogenetic divergence between *Urochloa* species based on complete chloroplast genomes. **BMC Genomics**. 18:516, 2017.

Peters, M.; Franco, L.H.; Schimidt, A.; Hincapie, B. Especies Forrajeras Multipropósito: Opciones para Productores de Centroamérica. CIAT Publication No. 333. CIAT, Cali, 2003.

Pizarro, E.A.; Valle, C.B.; 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**. Calli: CIAT; Campo Grande: Embrapa-CNPQC, p. 225-246, 1996.

Poland, J.A.; Brown, P.J.; Sorrells, M.E.; Jannink, J.L. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. **PLoS ONE** 7: e32253, 2012.

Poland, J.A.; Rife, T.W. Genotyping-by-Sequencing for Plant Breeding and Genetics. **The Plant Genome Journal**, 5(3):92, 2012.

Rajupt, S.G.; Santra, D.K.; Schnable, J. Mapping QTLs for morpho-agronomic traits in proso millet (*Panicum miliaceum* L.). **Molecular Breeding**: 36:37, 2016

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Renvoize, S.A.; Clayton, W.D.; Kabuye, C.H.S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: Miles, J.W; Maass, B.L; Valle, C.B. (eds.) ***Brachiaria: biology, agronomy and improvement***. Embrapa/CIAT, Cali, pp 1-15, 1996.

Risso-Pascotto, C.; Mendes-Bonato, A.B.; Pagliarini, M.S.; Valle, C.B. Comportamento citológico durante a microsporogênese em *Brachiaria ruziziensis* e *Brachiaria decumbens*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, no. 16. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 2003.

Rodrigues-Otsubo, B.M.; Pentead, M.I. de O.; Valle, C.B. Embryo rescue of interespecific hybrids of *Brachiaria* spp. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 61, n. 3, p. 175-182, 2000.

Salgado, L.R.; Lima, R.; dos Santos, B.F.; Shirakawa, K.T.; Vilela, M.A.; Almeida, N.F.; Pereira, R.M.; Nepomuceno, A.L.; Chiari, L. De novo RNA sequencing and analysis of the transcriptome of signalgrass (*Urochloa decumbens*) roots exposed to aluminum. **Plant Growth Regulation**, p. 1-14, 2017.

Santos, J.C.S.; Barreto, M.A.; Oliveira, F.A.; Vigna, B.B.Z.; Souza, A.P. Microsatellite markers for *Urochloa humidicola* (Poaceae) and their transferability to other *Urochloa* species. **BMC Research Notes**. 8:83, 2015.

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

Sendulsky, T. Chave para identificação de *Brachiaria*. **Jornal Agroceres**. 5 (56):4-5, 1978.

Serang, O.; Mollinari, M.; Garcia A.A.F. Efficient exact maximum a posteriori computation for Bayesian SNP genotyping in polyploids. **PLoS ONE** 7: e30906, 2012.

Schifino-Wittmann, M.T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**. 10(2): 151-157, 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Schlötterer, C. The evolution of molecular markers- just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics** (5): 63-69, 2004.
- Shirasawa, K.; Tanaka, M.; Takahata, Y.; Ma, D.; Cao, Q.; Liu, Q.; Zhai, H.; Kwak, S.; Jeong, J.C.; Yoon, U.; Lee, H.; Hirakawa, H.; Isobe, S. A high-density SNP genetic map consisting of a complete set of homologous groups in autohexaploid sweetpotato (*Ipomoea batatas*). **Nature Scientific Reports** 7:44207, 2017.
- Schuelke, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology** 18(2): 233-234, 2000.
- Schwarz, G. Estimating the dimension of a model. **Annals of Statistics**. 6, 461-464, 1978.
- Silva, P.I.; Martins, A.M.; Gouvea, E.G.; Pessoa-Filho, M.; Ferreira, M.E. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. **BMC Genomics**, 2013.
- Simeão, R. M.; Jank, L.; Valle, C. B.; Barrios, S. C. L.; Santos, M. F. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: Simpósio de Pastagem e Forragicultura do Campo das Vertentes, 2015, São João del Rei. Anais... São João del Rei: UFSJ, 2015. p. 114-130.
- Simioni, C.; Valle, C.B. Chromosome duplication in *Brachiaria* (A.Rich.) Stapf allows intraspecific crosses. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v.9, p.328 - 334, 2009.
- Souza, A. P de. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; de Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. (Eds.). **Recursos Genéticos & Melhoramento - Plantas**, Rondonópolis, Fundação MT. p. 549-602, 2001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Souza, F.P. O mercado da carne bovina no Brasil. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais** 6: 427-434, 2008.

Souza, L. **Mapa genético-molecular para *Hevea brasiliensis* e mapeamento de QTL's para características de importância econômica**. Universidade Estadual de Campinas, 2012.

Tanksley, S.D.; Ganai, M.W.; Prince, J.P.; Vicente, M.C.; Bonierbale, M.W.; Broun, P.; Fulton, T.M.; Giovannoni, J.J.; Grandillo, S.; Martin, G.B.; Messeguer, R.; Miller, J.C.; Miller, L.; Paterson, A.H.; Pineda, O.; Roder, M.S.; Wing, R.A.; Wu, W.; Young, N.D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics** 132(4): 1141-1160, 1992.

Tate, J.A.; Soltis, D.E.; Soltis, P.S. Polyploidy in Plants. In: Gregory TR (Ed.) *The Evolution of the Genome*. Elsevier, p. 371-426, 2005.

Thaikua, S.; Ebina, M.; Yamanaka, N.; Shimoda, K.; Suenaga, K.; Kawamoto, Y. Tightly clustered markers linked to an apospory-related gene region and quantitative trait loci mapping for agronomic traits in *Brachiaria* hybrids. **Grassland Science** (62): 69-80, 2016.

Triviño, N.J.; Perez, J.G.; Recio, M.E; Ebina, M.; Yamanaka, N.; Tsuruta, S.; Ishitani, M.; Worthington, M. Genetic diversity and population structure of *Brachiaria* species and breeding populations. **Crop Science**. v.57, p.1-12, 2017.

Valério, J.R. Cigarrinhas-das-pastagens. Documentos no. 179. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 2009.

Valle, C.B. Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético. Documentos no. 46. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 1990.

Valle, C.B.; Bonato, A.L.V.; Pagliarini, M.S.; Resende, R.M.S.; Jank, L. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: Carneiro, V.T.de C.; Dusi, D. M. de A. (eds.).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia. Brasília: Embrapa, 2004. p. 47-65.

Valle, C.B.; Simioni, C.; Resende, R.M.S.; Jank, L. Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: Resende RMS, Valle CB, Jank L (eds.) Melhoramento de Forrageiras Tropicais. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. pp 13-54, 2008.

Valle, C.B.; Jank, L.; Resende, R.M.S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v.56. 2009.

Valle, C.B.; Pagliarini, M.S. Biology, cytogenetics and breeding of *Brachiaria*. In: Singh RJ (ed.) Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement: Forage crops. CRC Press, Boca Raton, 103-151, 2009.

Valle, C.B.; Euclides, V.P.B.; Montagner, D.B.; Valério, J.R.; Fernandes, C.D.; Macedo, M.C.M.; Verzignassi, J.R.; Machado, L.A.Z. BRS Paiaguás: A new *Brachiaria* (*Urochloa*) cultivar for tropical pastures in Brazil. **Tropical Grasslands- Forrajes Tropicales**, v.1, pp. 121-122, 2013.

Vieira, M.L.C.; Santini, L.; Diniz, A.L.; Munhoz, C.F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology** 39: 312-328, 2016.

Vigna, B.B.Z.; Alleoni, G.C.; Jungmann, L.; Valle, C.B.; Souza, A.P. New microsatellite markers developed from *Urochloa humidicola* (Poaceae) and cross amplification in different *Urochloa* species. **BMC Research Notes** (4): 5–23, 2011a.

Vigna, B.B.Z.; Jungmann, L.; Francisco, P.M.; Zucchi, M.I.; Valle, C.B. Genetic diversity and population structure of the *Brachiaria brizantha* germplasm. **Tropical Plant Biology** (4): 157-169, 2011b.

Vigna, B.B.Z.; Oliveira, F.A.; Toledo-Silva, G.; Silva, C.C.; Valle, C.B.; Souza, A.P. Leaf transcriptome of two highly divergent genotypes of *Urochloa humidicola* (Poaceae), a tropical

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

polyploid forage grass adapted to acidic soils and temporary flooding áreas. **BMC Genomics** 17:910, 2016.

Vigna, B.B.Z.; Santos, J.C.S.; Jungmann, L.; Valle, C.B.; Mollinari, M.; Pastina, M.M.; Pagliarini, M.S.; Garcia, A.A.F.; Souza, A.P. Evidence of allopolyploidy in *Urochloa humidicola* based on cytological analysis and genetic linkage mapping. **PLoS ONE** 11: e0153764, 2016b.

Vignal, A.; Milan, D.; SanCristobal, M.; Eggen, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution** (34): 275-305, 2002.

Worthington, M.; Heffelfinger, C.; Bernal, D.; Quintero, C.; Zapata, Y. P.; Perez, J. G.; de Vega, J.; Miles, J.; Dellaporta, S.; Tohme, J. A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. **Genetics**, v. 203. 2016.

Wu, K.K.; Burnquist, W.; Sorrells, M.E.; Tew, T.L.; Moore, P.H.; Tanksley, S.D. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. **Theoretical and Applied Genetics** 83: 294–300, 1992.

Zeng, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics** (136): 1457-1468, 1994.

Zeng, Z.B.; Kao, C.H.; Basten, C.J. Estimating the genetic architecture of quantitative traits. **Genetical Research** (74): 279-289, 1999.

ANEXOS



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "***Estudos genético-genômicos em Urochloa decumbens: uma importante gramínea forrageira tropical***", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Rebecca Ferreira
Nome do(a) aluno(a): Rebecca Caroline Ulbricht Ferreira

Assinatura: Anete Pereira de Souza
Nome do(a) orientador(a): Anete Pereira de Souza

Data: 23/04/2018

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Estudos genético-genômicos em *Urochloa decumbens*: uma importante gramínea forrageira tropical**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 23 de abril de 2018

Assinatura : Rebecca Ferreira
Nome do(a) autor(a): **Rebecca Caroline Ulbricht Ferreira**
RG n.º 36.827.169-9

Assinatura : Anete Pereira de Souza
Nome do(a) orientador(a): **Anete Pereira de Souza**
RG n.º 8680325