

Utilização de marcadores moleculares para identificação de híbridos e associação com apomixia em *Brachiaria*¹

Selma dos Santos Kaeser², Fernando Rodrigues de Oliveira³, Daniele Ribeiro de Lima Reis⁴, Fausto de Souza Sobrinho⁵ e Ana Luisa Sousa Azevedo^{5,6}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

²Graduanda em Ciências Biológicas – CES-JF Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Bolsista do CNPq. E-mail: selminhasantos2009@hotmail.com

³Bolsista de Apoio Técnico Fapemig. E-mail: mrollyver@gmail.com

⁴Analista, Embrapa Gado de Leite. E-mail: daniele.reis@embrapa.br

⁵Pesquisador, Embrapa Gado de Leite. E-mail: fausto.souza@embrapa.br; ana.azevedo@embrapa.br

⁶Orientador

Resumo: O gênero *Brachiaria* contém diversas espécies forrageiras amplamente utilizadas na pecuária de leite e carne em regiões de clima tropical. A grande maioria das pastagens cultivadas no Brasil pertence ao gênero *Brachiaria* o que reforça a enorme importância econômica do gênero. A Embrapa coordena programas de melhoramento em *Brachiaria* visando a produção de materiais mais produtivos e resistente à doenças e pragas. Os programas de melhoramento utilizam diferentes estratégias para a seleção de materiais superiores e uma das estratégias consiste na formação de híbridos interespecíficos. A confirmação da hibridação é um dos problemas existentes e ferramentas moleculares podem ser utilizadas para auxiliar nesse processo de identificação. Outro fator que também pode ser auxiliado pelas ferramentas moleculares é a identificação de materiais apomíticos, característica muito importante e que pode direcionar estratégias completamente diferentes dentro de um programa de melhoramento. Este trabalho buscou identificar híbridos entre *B. brizantha* e *B. ruziziensis* em diferentes cruzamentos através da utilização de marcadores moleculares e validar marcas específicas associadas à apomixia. Foram identificados 16 híbridos em duas populações de *Brachiaria* pertencentes ao programa de melhoramento. Dois marcadores associados à apomixia apresentaram amplificação conforme o esperado e foram utilizados para identificação de cinco híbridos possivelmente apomíticos. Os marcadores moleculares mostraram-se eficientes para identificação de híbridos, e poderão auxiliar a identificação precoce de materiais apomíticos, dessa forma poderão ser utilizados amplamente na seleção dentro dos programas de melhoramento.

Palavras-chave: Apomixia, hibridação, marcadores microssatélites, melhoramento

Use of molecular markers for hybrids identification and association with apomixia in *Brachiaria*

Abstract: The genus *Brachiaria* contains several forage species widely used in dairy and beef cattle raising in tropical regions. The vast majority of Brazilian pasture crops belong to the *Brachiaria* genus, which reinforces the enormous economic importance of the genus. The breeding programs use different strategies for selection of superior materials and one of these is the interspecific hybridization. Verification of the hybridization is a problem in breeding programs and molecular tools can be used for help this issue. Another factor that can also be aided by molecular tools is the identification of apomictic materials, a very important characteristic that can guide completely different strategies within a breeding program. This work aimed to identify hybrids between *B. brizantha* and *B. ruziziensis* in different crosses through the use of molecular markers and associate specific marks with apomixia. Sixteen hybrids were identified in two *Brachiaria* populations belonging to the breeding program. Two markers associated with apomixia showed amplification as expected and were used to identify five possibly apomictic hybrids. Molecular markers have proved to be efficient for hybrids identification, and may help the early

identification of apomictic materials, so they can be used extensively in selection within breeding programs.

Keywords: Apomixis, breeding program, hybridization, microsatellite markers

Introdução

A introdução da braquiária provocou uma verdadeira revolução na produtividade das pastagens e na pecuária no Brasil (BARCELOS et al., 2008). Atualmente o Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo, é o maior exportador de carne bovina e um dos maiores produtores de leite. Porém a base genética dos pastos plantados é extremamente estreita, colocando os pastos brasileiros em uma situação de grande vulnerabilidade genética.

A área plantada com braquiária está dividida entre quatro principais espécies, todas elas de origem africana: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. As espécies *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. humidicola* são espécies tetraploides com reprodução predominantemente apomítica (VALLE E SAVIDAN, 1996). Já *B. ruziziensis* é diploide e se reproduz de forma sexual. Os métodos convencionais de melhoramento genético não são aplicados de maneira intensiva em poliploides, pois há dificuldade de desenvolver cruzamentos que promovam a recombinação gênica e a produção de progênies estáveis. A formação de híbridos interespecíficos e a geração de populações segregantes para a característica reprodutiva (sexual x apomítica) é uma estratégia utilizada para geração de novos materiais.

Em *Brachiaria* muitas ferramentas moleculares já são utilizadas para auxiliar os programas de melhoramento (SILVA et al. 2013, AZEVEDO et al. 2011, ZORATTO et al. 2010, Jungmann et al. 2010, AMBIEL et al. 2010) e a continuidade desses trabalhos favorecerá diretamente a seleção de genótipos superiores.

Diante das necessidades encontradas dentro do programa de melhoramento, o objetivo deste trabalho foi identificar a formação de híbridos em cruzamentos controlados e validar marcadores moleculares associados à apomixia em *Brachiaria*, através da utilização de marcadores moleculares.

Material e Métodos

A extração do DNA assim como a genotipagem foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Leite. A extração do DNA foi realizada a partir de folhas novas coletadas no campo e foi utilizado o kit de extração Nucleon PhytoPure (GEHealthcare). Os marcadores moleculares foram marcados com uma fluorescência para posterior detecção no sequenciador automático de DNA MegaBACE 1000.

Marcadores microssatélites previamente identificados em *B. ruziziensis* (SILVA et al. 2013) foram selecionados de acordo com o polimorfismo e utilizados em diferentes amostras para a confirmação da formação de híbridos após a realização de cruzamentos controlados.

População 1: Foram obtidos 13 indivíduos provenientes de cruzamento entre *B. brizantha* (Piatã, Marandu e Xaraes) e *B. ruziziensis*. Sete marcadores microssatélites foram selecionados baseado no padrão de amplificação encontrado entre as cultivares de *B. brizantha*. As 13 progênies foram avaliadas para confirmar a hibridação entre as duas espécies de *Brachiaria* e para a identificação do parental masculino.

População 2: Foram obtidas 11 progênies a partir de cruzamento entre *B. ruziziensis* e a cultivar Ipyorã. Dez marcadores microssatélites foram utilizados para a confirmação da hibridação. Os híbridos obtidos foram avaliados com marcadores associados à apomixia (Akiyama et al. 2011), visando identificar precocemente qual material herdou a característica presente no parental masculino (Ipyorã).

Resultados e Discussão

A população 1 foi obtida a partir de cruzamentos direcionados entre uma população de *Brachiaria ruziziensis* (progênie feminina) e cultivares de *Brachiaria brizantha* – Piatã, Marandu e Xaraes (progênies masculinas – doadoras de pólen). As sementes colhidas a partir desses cruzamentos foram plantadas e os indivíduos avaliados para confirmar a hibridação, visto que existe a possibilidade de cruzamento entre indivíduos de *B. ruziziensis* ou mesmo autofecundação. Para confirmar a formação dos híbridos e posteriormente a identificação do

parental masculino, as progênies obtidas foram genotipadas com sete marcadores do tipo microssatélites.

Foram identificados 28 alelos a partir da genotipagem de seis parentais de *B. ruziziensis* e das três cultivares de *B. brizantha*. Baseado no padrão de amplificação dos marcadores microssatélites, foi possível identificar entre as 13 progênies avaliadas que sete realmente eram híbridas. A identificação do parental masculino também foi possível em seis híbridos e somente para um indivíduo permaneceu uma dúvida entre as cultivares Marandu e Piatã. Para solucionar essa dúvida seria necessária a realização de novas genotipagens, porém a simples confirmação de hibridação já foi suficiente para a continuidade dos trabalhos.

A população 2 foi obtida a partir do cruzamento entre um indivíduo de *B. ruziziensis* tetraploide pertencente ao programa de melhoramento da Embrapa Gado de Leite e um indivíduo da cultivar híbrida Ipyporã. Foram obtidas 11 progênies, que posteriormente foram avaliadas para verificar se realmente era fruto do cruzamento desejado. A partir da genotipagem de toda a população com dez marcadores microssatélites foram obtidos 27 alelos e foram confirmadas nove plantas híbridas.

A cultivar Ipyporã é apomítica e o esperado na progênie obtida a partir do cruzamento da mesma com uma espécie sexual é a segregação 1:1 (OZIAS-AKINS and VAN DIJK 2007). Para verificar se os híbridos obtidos eram sexuais ou apomíticos, foram testados primers associados à apomixia já descritos na literatura (AKIYAMA et al. 2011). Dois *primers* testados apresentaram bandas do tamanho esperado associada à apomixia. Cinco híbridos foram identificados dessa forma como apomíticos, porém essa característica só será confirmada a partir da avaliação das sementes produzidas pelos mesmos. Os marcadores moleculares utilizados estão associados à apomixia em outras espécies ou outras populações, dessa forma é preciso certificar que não houve recombinação e que as marcas obtidas realmente estão associadas à apomixia na população utilizadas no presente trabalho.

Conclusões

Marcadores moleculares são eficientes para identificação de híbridos e confirmação de paternidade em cruzamentos de *Brachiaria*.

Marcadores moleculares associados à apomixia poderão auxiliar a identificação precoce de materiais apomíticos e poderão ser utilizados amplamente na seleção dentro dos programas de melhoramento.

Agradecimentos

Ao CNPq, Fapemig e Embrapa pelo apoio financeiro ao projeto.

Referências

AMBIEL, A.C.; NETO, N.B.M.; GUABERTO, L.M.; VANDERLEI, T.M. *Brachiaria* germplasm dissimilarity as shown by RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, p. 55-64, 2010.

AKIYAMA, Y.; GOEL, S.; CONMER, A. J.; HANNA, W.W.; YAMADA-AKIYAMA, H.; OZIAS-AKINS. P. Evolution of the apomixis transmitting chromosome in *Pennisetum*. **BMC Evol. Biol.**, v. 11, p. 289, 2011.

AZEVEDO, A.L.S.; COSTA, P.P.; MACHADO, M.A.; DE PAULA, C.M.P.; SOBRINHO, FS. High degree of genetic diversity among genotypes of the forage grass *Brachiaria ruziziensis* (Poaceae) detected with ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 3530-3538, 2011.

BARCELLOS, A. O.; RAMOS, A. K. B.; VILELA, L.; BUENO, G.; JUNIOR, M. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n. spe., p.51-67, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 1998. 220 p.

JUNGMANN, L.; VIGNA, B.B.Z.; BOLDRINI, K.R.; SOUSA, A. C. B.; DO VALLE, C.B.; RESENDE, R.M.S.; PAGLIARINI, M.S.; ZUCCHI, M.I.; DE 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**, v. 53, p. 698-709, 2010.

OZIAS-AKINS, P.; VAN DIJK, P. J. Mendelian genetics of apomixis in plants. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 509–537, 2007.

SILVA, P.I.T.; MARTINS, A.M.; GOUVEA, E.G.; PESSOA, 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**, v. 14, 2013.

VALLE, C.B.; SAVIDAN, Y.H. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Miles, J.W.; Maass, B.L.; Valle, C.B., eds. ***Brachiaria: biology, agronomy, and improvement***. CIAT/Embrapa, Brasília, DF, Brazil. p. 147-163, 1996.

ZORZATTO, C.; CHIARI, L.; BITENCOURT, G. D.; DO VALLE, C.B.; LEGUIZAMON, G.O.D.; SCHUSTER, I.; PAGLIARINI, M.S. Identification of a molecular marker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Plant Breeding**, v.129, p.734-736, 2010.