

Determinação da taxa de cruzamento em *Cynodon ssp.*¹

Kevin Schefer dos Santos², Fernando Rodrigues de Oliveira³, Marco Antonio Machado^{4,5}, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites⁴, Ana Luisa Sousa Azevedo⁴

¹Agradecimento ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil

²Graduando em Biologia – Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora - CES/JF. Bolsista PIBIC CNPq

³Apoio Técnico – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

⁴Pesquisador – Embrapa Gado de Leite.

⁵Orientador

Resumo: As espécies do gênero *Cynodon* são gramíneas perenes com distribuição diversificada e importância global para a formação de gramados, produção de forragem e conservação solo. A sua via fotossintética C4, juntamente com o seu hábito de crescimento estolonífero e rizomatoso, permite-lhes produzir grande quantidade de biomassa, por isso são muito utilizadas como forrageiras. Com o objetivo de explorar essas características e desenvolver novas cultivares forrageiras para o gado leiteiro, a Embrapa iniciou há cinco anos um programa de melhoramento genético de *Cynodon*. De forma a contribuir com a geração de conhecimento básico para subsidiar as estratégias de melhoramento e auxiliar a seleção de genótipos superiores nos programas de melhoramento, o objetivo deste trabalho foi estimar a taxa de cruzamento em *Cynodon*. Para este estudo, 18 indivíduos pertencentes ao Programa de Melhoramento de *Cynodon* da Embrapa Gado de Leite foram avaliados. Para cada parental, 18 progênies foram selecionadas para avaliação molecular utilizando três marcadores microssatélites. Inicialmente foi extraído o DNA de todos os indivíduos, e as regiões de interesse foram amplificadas por PCR. A análise geral de todas as famílias permitiu a identificação de 53% das progênies contendo alelo externo, ou seja, são oriundas de cruzamento. O restante da população (47%) continha alelos compartilhados com o parental avaliado, ou seja, podem ser oriundos de autofecundação. Os valores mais baixos podem estar associados a falhas de alguns marcadores dentro das famílias ou a mecanismos inerentes aos parentais que favoreçam a autofecundação, como por exemplo, florescimento em épocas distintas e conseqüentemente menor disponibilidade de pólen externo. Os resultados apresentados são importantes para o entendimento do tipo de cruzamento presente na espécie e auxiliarão na definição de novas estratégias nos programas de melhoramento.

Palavras-chave: grama estrela; grama bermuda; marcadores microssatélites; SSR

Estimation of outcrossing rate in *Cynodon ssp*

Abstract: *Cynodon* species are perennial grasses with a diverse distribution and hold global importance for turf, forage, and soil conservation. Their C4 photosynthetic pathway together with their stoloniferous and rhizomatous growth habit enables them to produce considerable biomass, so they are often used as a forage crop. To explore these characteristics and develop new forage cultivars for dairy cattle, Embrapa started a *Cynodon* breeding program. In order to contribute with the generation of basic knowledge to subsidize breeding programs and to assist the selection of superior genotypes, the objective of this work was to estimate the outcrossing rate in *Cynodon*. For this study, 18 individuals belonging to the Embrapa Dairy Cattle Forage Breeding Program were evaluated. For each parental, 18 progenies were selected for molecular evaluation using three microsatellite markers. DNA was initially extracted from all individuals, and regions of interest were amplified by PCR. The general analysis of all families allowed the identification of 53% of progenies containing external allele, that is, they come from crossover. The rest of the population (47%) contained alleles shared with the parental evaluated, that is, they could be from self-fertilization. The lower values of outcross within some families may be associated to missing data or mechanisms inherent to the parents that favor self-fertilization, such as, flowering at different times and consequently less availability of external pollen. The results presented are important for the understanding of the type of crossing present in the species and will help in the definition of new strategies in breeding programs.

Keywords: bermudagrass; microsatellite; SSR

Introdução

As forrageiras pertencentes ao gênero *Cynodon* são amplamente utilizadas na bovinocultura de leite e as mais utilizadas são conhecidas como capim bermuda (*C. dactylon* (L.) Pers.) e capim

estrela (*C. nlemfuensis*, Vanderyst e *C. aethiopicus*, Clayton et Harlan, *C. plectostachyus*). São gramíneas perenes pertencentes à família Poaceae, com origem principalmente no continente africano (Ling Y, 2012). O gênero *Cynodon* (Gramas Estrelas e Bermudas) apresenta vantagens como a elevada produtividade e qualidade da forragem, capacidade de resposta a adubação, resistência ao pisoteio, boa capacidade de adaptação a diferentes tipos de solos e clima, boa tolerância a solos úmidos e a baixas temperaturas (Vilela, 2005).

Para atender as necessidades de cultivares com características específicas, a Embrapa Gado de Leite possui um programa de melhoramento de *Cynodon*. Iniciado há seis anos, o programa tem como objetivo obter cultivares melhoradas para as diferentes condições edafoclimáticas nacionais, que apresentem elevada produtividade e qualidade da forragem. No programa de melhoramento, são necessárias informações gerais sobre a espécie, como a sua forma de reprodução e de propagação. Essas características são de grande importância para estimar parâmetros genéticos, compreender os padrões de fluxo gênico e a diferenciação genética entre e dentro de populações (Bawa, 1974; Clegg, 1980; Hamrick, 1989; Vencovsky et al., 2001).

O *Cynodon* é uma espécie alógama e para que ocorra sucesso em qualquer programa de melhoramento genético, é necessário que haja variabilidade entre os indivíduos (FEHR, 1987). A variabilidade explorada pelo programa de melhoramento é obtida utilizando-se cruzamentos entre indivíduos para que seja produzida uma população que apresente variabilidade para que a seleção ocorra.

O sistema reprodutivo das plantas é o ponto principal na análise de organização genética das populações. É um dos mais importantes traços da história de vida de espécies vegetais (Merotto Júnior et al., 2009), determinando os padrões pelos quais os gametas são transportados de geração para geração, controlando as distribuições das frequências genotípicas e o potencial de recombinação das populações (Allard, 1971; Lopes et al., 2002).

Estudos envolvendo a determinação da taxa de cruzamento são realizados de forma rápida e precisa através da utilização de marcadores moleculares analisados nas progênes (Muchugi et al., 2008; Ferreira et al., 2010; Adugna et al., 2013; Bressan et al., 2013). Normalmente são utilizados marcadores codominantes, como os microssatélites, devido ao seu alto polimorfismo (Adugna et al., 2013). Neste estudo, foi estimada a taxa de cruzamento em populações de *Cynodon* por meio do uso de marcadores microssatélites.

Material e Métodos

Este estudo foi realizado em 18 famílias de (*Cynodon* ssp), cada uma contendo 18 progênes, totalizando uma população de 342 indivíduos. O DNA de todos os indivíduos selecionados foi extraído no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite. Para cada planta, aproximadamente 300 mg de folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido ou picotadas em um microtubo de 2 mL contendo tampão de lise. A extração de DNA foi realizada utilizando protocolo adaptado de Sambrook e Russel, (2001). A qualidade e a concentração do DNA foram estimadas por leitura em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Foram utilizados três primers para amplificação do DNA das amostras de *Cynodon* ssp. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 25 µL como descrito: 1X GoTaq reaction buffer (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 0,8 µM de cada primer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), 1 unidade de GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 5% (v/v) de DMSO, e 45 ng de DNA genômico. As reações em cadeia da polimerase foram realizadas em termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) com o seguinte perfil: desnaturação inicial a 95 °C (15 min), seguido de 5 ciclos a 94 °C (30s), temperatura de ligação específica de cada primer (90s), e 72 °C (1 min), com decréscimo de 1 °C na temperatura de ligação por ciclo; 25 ciclos a 94 °C (30s), temperatura de ligação específica de cada primer (90 s), e 72 °C (1 min); e um ciclo final de extensão de 60 min a 60 °C.

A taxa de cruzamento foi estimada utilizando o programa MLTR 3.1 (Ritland, 2004), baseando-se em um modelo misto descrito por Ritland e Jain (1981).

Resultados e Discussão

Foram identificados 24 alelos distribuídos entre os três marcadores microssatélites avaliados. O marcador Cy15 foi o mais informativo com 10 alelos identificados e todas as 18 famílias foram avaliadas (Figura 1). Já os marcadores Cy20 e Cy25 apresentaram falhas em 4 famílias distintas e por isso não foram tão eficientes (Tabela 1).

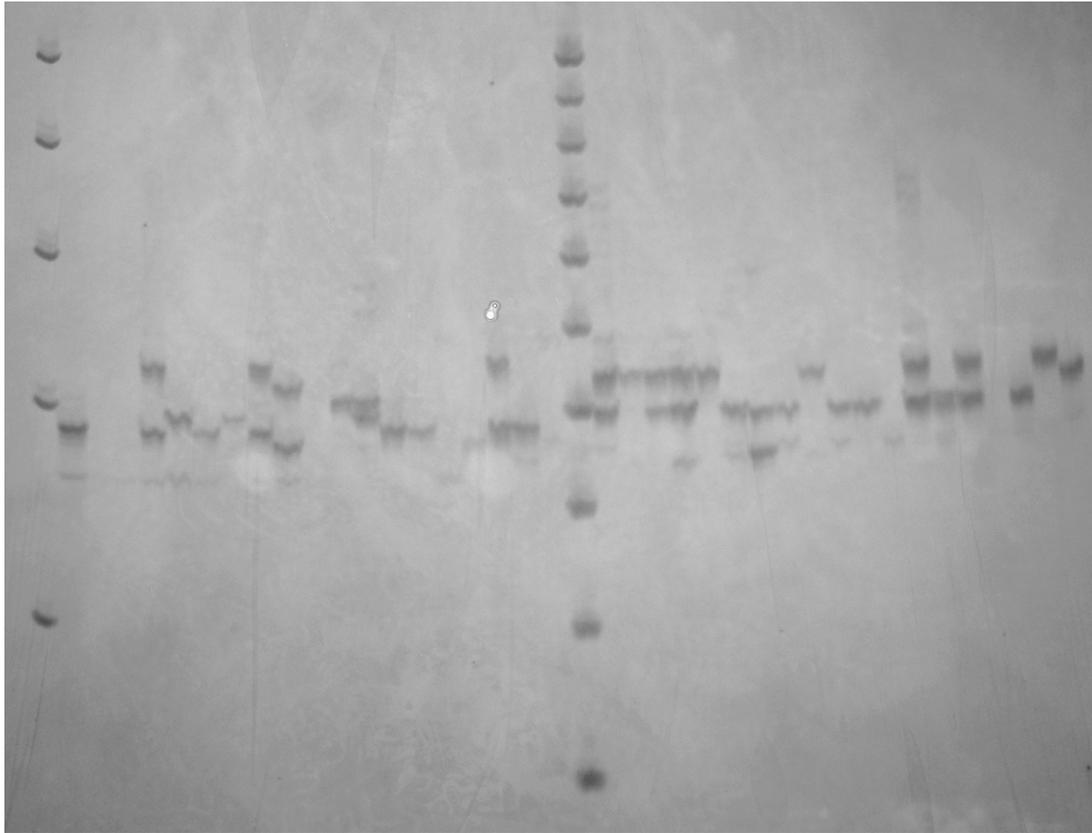


Figura 1. Gel de poliacrilamida contendo as famílias 236 e 393 com o marcador Cy15. PPM de 50 e 25 pares de bases.

Após a genotipagem de todas as famílias, foi possível verificar que 53% das progênes possuem alelos que não estão presentes nos parentais, ou seja, com certeza são fruto de cruzamento. Os demais 47% podem ser progênes autofecundadas, porém devido ao reduzido número de marcadores moleculares utilizados, esse valor pode estar superestimado. Foi realizada análise individual dentro de cada uma das 18 famílias para avaliar possíveis mecanismos de autoincompatibilidade associado aos parentais (Tabela 1). Foi possível identificar uma grande variação da taxa de cruzamento entre as famílias, que variou de 22% a 94%. Os valores mais baixos podem estar associados às falhas de alguns marcadores dentro das famílias ou a mecanismos inerentes aos parentais que favoreçam a autofecundação, como por exemplo, florescimento em épocas distintas e conseqüentemente menor disponibilidade de pólen externo. Novos marcadores serão avaliados dentro dessas famílias para confirmar a real taxa de cruzamento, porém os resultados obtidos já apontam que a maioria das sementes produzidas em *Cynodon* são originadas a partir de cruzamentos entre genótipos diferentes.

Para melhorar a produção e a viabilidade das sementes, além de trabalhar diretamente essas características nos programas de melhoramento, é preciso entender a fundo todos os mecanismos fisiológicos envolvidos e identificar possíveis mecanismos de autoincompatibilidade existentes. Os resultados aqui obtidos indicam que a formação de sementes se dá principalmente através de cruzamento entre diferentes indivíduos. Esse conhecimento será utilizado para abrir novas linhas de investigação sobre a fisiologia da reprodução em *Cynodon* e também será aplicado no melhoramento, para formação de híbridos de forma mais rápida e em maior quantidade.

Tabela 1. Informações sobre as famílias, taxa de cruzamento e número de marcadores avaliados.

Família	Tx cruzamento	Numero de marcadores avaliados
14	83%	3
27	50%	3
236	89%	3
335	94%	3
356	89%	3
367	61%	2
377	50%	2
383	22%	2
384	44%	3
385	22%	2
391	67%	3
392	22%	2
393	28%	3
394	56%	3
396	67%	2
397	83%	2
407	94%	3
450	72%	2

Conclusões

Cynodon se reproduz preferencialmente através de cruzamento com uma estimativa de 53% de taxa de cruzamento. Não foi identificado indícios de autoincompatibilidade entre as famílias avaliadas.

Agradecimentos

A Fapemig e Embrapa pelo apoio financeiro ao projeto.

Referências

- ADUGNA, A.; SNOW, A. A.; SWEENEY, P. M.; BEKELE E.; MUTEGI E. Population genetic structure of *in situ* wild *Sorghum bicolor* in its Ethiopian center of origin based on SSR markers **Genetic Resour Crop Evol** v.60, p.1313–1328, 2013.
- ALLARD, R. W. **Princípios de melhoramento genético de plantas**. São Paulo: E. Blücher, 1971.
- BAWA, K. S. Breeding systems of tree species for a lowland tropical community. *Evolution*, v. 28, p. 85-92, 1974. CLEGG, M.T. Measuring plant mating systems. **BioScience**, v.30, p.814-818, 1980.
- BRESSAN, E. A.; SEBBENN, A. M.; FERREIRA, R. R.; LEE, T. S. G. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) exhibits a mixed mating system, high correlated mating and apomixes. **Tree Genetics & Genomes**, v 9, p.1089-1097, 2013.
- BURTON, G. W. Breeding bermudagrass for the southeastern United States. **Agronomy Journal**, v.39, p.551-569, 1947.
- CHAIX, G.; GERBER, S.; RAZAFIMAHARO, V.; VIGNERON, P.; VEERHAEGEN, D.; HAMON, S. Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. **Theor Appl Genet**, v. 107, p. 705–712, 2003.
- DONG, K. H.; SHEN, Y. X. Forage Production Science. **China Agricultural Press**, Beijing, 2003.
- FERREIRA, T. G. T.; PENHA, H. A.; ZUCCHI, M. I.; SANTOS, A. A.; HANAI, L. R.; JUNQUEIRA, N.; BRAGA, M. F.; VENCOSKY R.; VIEIRA M. L. C. 2010. Outcrossing rate in sweet passion fruit based on molecular markers. **Plant Breeding**, 2010.
- GAIOTTO, F. A.; BRAMUCI, M. E GRATTAPLAGIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 842-849, 1997.

HAMRICK, J. L. **Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations**. In: SOLTIS, D.E. Isozymes in plant biology. Netherlands: Springer, 1989. p. 87-105.

LING Y, HUANG L. K., ZHANG X. Q., MA X, LIU W., CHEN SY. Assessment of genetic diversity of bermudagrass germplasm from southwest China and Africa by using AFLP markers. **Genetic and Molecular Research**, v. 14, p. 1748–1756, 2015.

LOPES, R.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, M. T . G. Estimação da taxa de cruzamento da aceroleira com base em dados isoenzimáticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 321-327, 2002.

MEROTTO JÚNIOR, A.; JASIENIUK, M.; FISCHER, A. J. Estimating the outcrossing rate of *Cyperus difformis* using resistance to ALS-inhibiting herbicides and molecular markers. **Weed Research**, v. 49, p. 29–36, 2009.

MUCHUGI, A.; MULUVI, G. M.; SIMONS, A. J.; WACHIRA F. N.; JAMNADASS R. H. Estimation of outcrossing rate in a natural breeding population of *Warburgia ugandensis* using AFLP marker. **Afr J Biotechnol**, v. 7, p. 139-146, 2008.

RITLAND, K. E JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity**, v. 47, n. 1, p. 35-52, 1981.

RITLAND, K. **Multilocus Mating System program MLTR**. Version 3.1. British Colombia, Vancouver, 2004. Sambrook e Russel, (2001).

VENCOVSKY, R.; PEREIRA, M. B.; CRISÓSTOMO, J. R.; FERREIRA, M. A. J. **Genética e melhoramento de populações mistas**. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. Recursos genéticos e melhoramento: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.231-281.