

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Varredura do banco ativo de germoplasma de capim-elefante para identificação de regiões genômicas associadas a apomixia¹

Otto Samuel Gonçalves Seiberlick^{2,3}, Bianca de Oliveira Carvalho^{2,3}, Jéssica Capelli do Nascimento^{2,4}, Ana Luísa Sousa Azevedo⁵, Daniele Ribeiro de Lima Reis⁵, Francisco José da Silva Léo⁵, Marco Antonio Machado^{5,6,7}

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

²Bolsista de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite. Bolsista do CNPq. e-mail: ottoseiberlick@gmail.com

³Graduando em Ciências Biológicas – Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF

⁴Graduando em Farmácia – Faculdade de Ciências Médias e da Saúde/JF

⁵Pesquisador/Analista, Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora – MG. e-mail: ana.azevedo@embrapa.br; francisco.ledo@embrapa.br; daniele.reis@embrapa.br; marco.machado@embrapa.br

⁶Bolsista de Produtividade CNPq

⁷Orientador

Resumo: A apomixia pode ser definida como um modo de reprodução assexuada por sementes, que tem grande interesse por seu potencial de aplicação comercial e biotecnológica. A progênie de uma planta apomítica é idêntica à planta-mãe, uma vez que a meiose, que na sexualidade leva à formação de um gameta feminino (oosfera) reduzido, não existe ou não é funcional, logo o embrião se desenvolve de modo autônomo, sem a fecundação da oosfera. Deste modo, o embrião contém exclusivamente os cromossomos somáticos maternos. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar todo o Banco Ativo de Germoplasma de capim-elefante usando dois marcadores moleculares associados à apomixia que já foram descritos na literatura para outras espécies. O trabalho apresenta resultados parciais obtidos com a experimentação inicial no qual foi identificada uma amostra de capim-elefante com o marcador para apomixia. A partir destas informações, análises foram realizadas a fim de comprovar essa marca molecular específica de apomixia associada à *Cenchrus purpureus*, fato esse não descrito anteriormente na literatura.

Palavras-chave: *Cenchrus purpureus*; melhoramento; *Pennisetum purpureum*

Scanning of elephantgrass germplasm active bank for identification of genome regions associated with apomixes

Abstract: Apomixis can be defined as a mode of asexual reproduction by seeds, which has great interest for its commercial and biotechnological application potential. The progeny of an apomictic plant is identical to the mother, since meiosis, which in sexuality leads to the formation of a female gamete (oosphere), does not exist or is not functional, so the embryo develops autonomously without fertilization of the oosphere. Thus, the embryo contains exclusively maternal somatic chromosomes. This work aimed to evaluate Embrapa's elephant-grass germplasm active bank with two molecular markers associated with apomixis previously described in other species. This work generated partial results obtained with the initial experiment in which a sample of elephant grass with the marker for apomixis was identified. From this information, analyzes were carried out to verify this specific apomixis molecular marker associated with *Cenchrus purpureus*, a fact not previously described in the literature.

Key-words: *Cenchrus purpureus*; improvement; *Pennisetum purpureum*

Introdução

O melhoramento genético de forrageiras, visando atender a demanda permanente de sementes forrageiras e de novas cultivares mais produtivas e adaptadas a diversos fins, é componente essencial da sustentabilidade do agronegócio da pecuária brasileira. A decisão dos melhoristas sobre o melhor método de melhoramento para uma dada espécie está condicionada aos seguintes fatores: modo de reprodução; disponibilidade de germoplasma; potenciais locais de cultivo da futura nova cultivar; atendimento aos requisitos de avaliação de campo da espécie de interesse; e tipo de cultivar a ser desenvolvida, se sintético, genótipo propagado vegetativamente ou híbrido (Resende et al., 2013).

O gênero *Cenchrus* é um dos mais importantes da família Poaceae (Martel, Ricroch & Sarr, 1996). Uma das espécies que mais se destaca como importante forrageira é o *Cenchrus purpureus* (capim-

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

elefante). Suas características forrageiras somadas ao seu potencial de reprodução têm estimulado não só o cultivo, mas estudos de melhoramento da espécie (Campos, 2007). O capim-elefante é uma espécie alotetraploide ($2n=4x=28$ cromossomos), propagado principalmente de forma vegetativa, mas que atualmente tem recebido maior atenção para o desenvolvimento de cultivares propagadas por semente.

As plantas exibem uma diversidade de modos de reprodução variando desde cruzamentos a autofecundação. Até o momento não foi relatada presença de apomixia em capim-elefante. O sistema de polinização determina a quantidade e a natureza da variabilidade genética e conseqüentemente, a estrutura genética das populações (Jain, 1975). A fecundação cruzada promove a heterozigosidade, enquanto que a autofecundação reduz a heterozigosidade e limita o fluxo gênico entre as plantas (Clay & Levin, 1989). Muitas plantas apresentam um sistema misto de cruzamentos apresentando tanto acasalamentos ao acaso como autofecundação. O conhecimento a respeito dessas formas de cruzamento é fundamental para direcionar as estratégias dentro de um programa de melhoramento. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar todo o banco de germoplasma de capim-elefante usando dois marcadores moleculares associados à apomixia já descritos em outras espécies (Worthington et al., 2016).

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 (GE Healthcare). Todas as amostras pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de capim-elefante foram extraídas.

A partir do DNA extraído e quantificado, dá-se início ao processo de genotipagem. Utilizando-se da metodologia para os testes: PCR, que consiste em amplificar o gene de interesse. A visualização dos fragmentos foi realizada em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio. Para a determinação dos alelos do gene responsável pela expressão da apomixia, o DNA foi amplificado utilizando os *primers forward* Apo2 e Apo3, e *reverse* Apo2 e Apo3.

Resultados e Discussão

Foram genotipadas cultivares de *Brachiaria* já identificadas como apomíticas e com a presença da banda de aproximadamente 950 pares de bases para o marcador Apo2 e 900pb para o marcador Apo3.

Entre as 96 amostras de capim-elefante analisadas, uma amostra BAG35 (Figura 1) apresentou uma amplificação em ambos os marcadores utilizados. O tamanho do fragmento amplificado foi um pouco menor se comparado à amostra controle, mas se mostrou consistente pois foi identificado nos dois marcadores avaliados no presente trabalho.

Ainda não foi relatada a ocorrência de apomixia em capim-elefante, porém essa condição já foi identificada dentro do gênero *Cenchrus* e o marcador Apo2 foi inicialmente descoberto em *Cenchrus squamulatus*. A identificação de um acesso apomítico poderá auxiliar muito na condução do programa de melhoramento, permitindo a utilização de novas abordagens para o desenvolvimento de cultivares melhoradas.

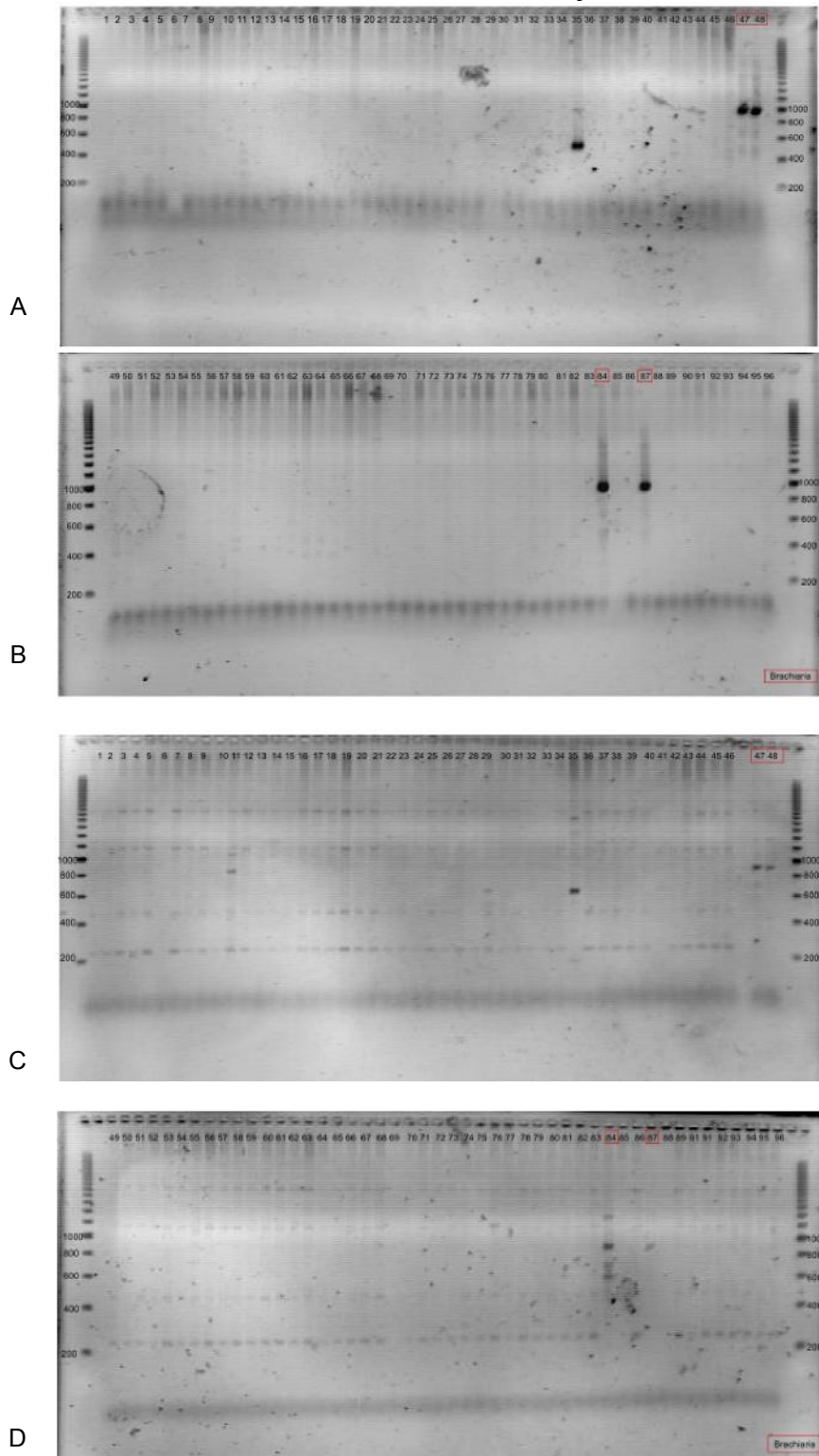
XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Figura 1. Gel de agarose contendo todas as amostras de capim elefante que foram genotipadas com o marcador Apo2 (A e B) e Apo3 (C e D). Os retângulos vermelhos indicam as amostras controles de *Brachiaria*. Padrão de peso molecular de 200pb.

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Conclusões

Foi identificado um acesso no banco ativo de germoplasma de capim-elefante que apresenta uma marca molecular específica associada à apomixia. Essa identificação deverá ser confirmada em novas amostras do mesmo acesso e as sementes produzidas por esse acesso também serão avaliadas para verificar se a progênie realmente é idêntica à planta-mãe.

Referências

CAMPOS JMS (2007) Obtaining hexaploids hybrids and genomic analysis of Pennisetum sp. by flow cytometry. PhD Thesis, Doctor in Genetics and Plant Breeding, Federal University of Lavras, Lavras, MG, 115 pp.

CLAY, K.; LEVIN, D.A. Quantitative variation in phlox: comparison of selfing and outcrossing species. **American Journal of Botany**, v.76, p.577–588, 1989. DOI: 10.2307/2444353.

JAIN, S. K. Population structure and the effects of breeding system. In: O. H. Frankel, and J. G. Hawkes (eds), *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*, 15-36. Cambridge University Press, Cambridge, 1975.

MARTEL E, RICHROCH A, SARR A. Assessment of genome organization among diploid species ($2n = 2x = 14$) belonging to primary and tertiary gene pools of pearl millet using fluorescent in situ hybridization with rDNA probes. **Genome** 39(4):680–687, 1996.

RESENDE, R.M.S., M.D. CASLER, AND M.D.V. RESENDE. Selection methods in forage breeding: A quantitative appraisal. **Crop Science** 53:1925–1936, 2013 doi:10.2135/cropsci2013.03.0143

WORTHINGTON, M.; HEFFELFINGER, C.; BERNAL, D.; QUINTERO, C.; ZAPATA, Y.P.; PEREZ, J.G.; VEGA, J. DE; MILES, J.; DELLAPORTA, S.; TOHME, J. A **parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic Brachiaria decumbens**. [s.l.: s.n.]. v.203 1117–1132p.DOI: 10.1534/genetics.116.190314.