

# Identificação de Genótipos Apomíticos ou Sexuais por Meio de Marcadores Moleculares em Acessos de Capim-buffel

## Identification of Apomictic or Sexual Genotype by Means of Molecular Markers in Buffel Grass Accessions

*Lucas Sampaio Araujo<sup>1</sup>; Rafaela Priscila Antonio<sup>2</sup>; Marilza Neves do Nascimento<sup>3</sup>; Paulo Ivan Fernandes Júnior<sup>4</sup>*

### Abstract

The buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) is a forage highly tolerant to drought used in arid and semi-arid regions. Its predominant reproductive way is by means of apomixis, in spite of some genotypes with sexual reproduction character. The obtaining of sexual genotypes able of been crossed is important to inclusion in species breeding programs. The aim of this study was to identify the mechanism reproduction of 115 buffel grass genotypes of the Embrapa Semiárido active germplasm bank (BAG) by means of molecular markers. The plants were subjected to PCRs for amplification of apomixy related fragments using the molecular markers Q8H, UGT197, PCAB10. For the sexuality, the plants were evaluated using the marker 4HS\*. All 115 plants amplified the apomictic amplicon while only the accessions CPATSA 102 and

<sup>1</sup>Mestrando em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana (Uefs), bolsista Capes, Feira de Santana, BA.

<sup>2</sup>Engenheira-agrônoma, D.Sc em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>3</sup> Engenheira-agrônoma, D.Sc em Fisiologia Vegetal, professora da Uefs – Departamento de Biologia, Feira de Santana, BA.

<sup>4</sup> Biólogo, D.Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

CPATSA 134 were positive for the amplification with the sexual marker. These results confirm the predominance of the apomictic phenotype in this buffel grass collection and indicate the sexual genotypes could be applied to buffel grass breeding programs.

**Palavras-chave:** *Cenchrus ciliaris*, apomixia, reprodução sexual, forrageira.

**Keywords:** *Cenchrus ciliaris*, apomixis, sexual reproduction, forage.

## Introdução

O capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*) se destaca entre as forrageiras utilizadas na região semiárida por causa de sua capacidade de resistir a longos períodos de seca, dentre outras características (MOREIRA et al., 2007). Esta gramínea é uma forrageira perene, originária do continente africano e largamente distribuído em regiões áridas e semiáridas no mundo. A espécie chegou ao Brasil em 1952, no Estado de São Paulo, e posteriormente foi levada para a região Nordeste (OLIVEIRA et al., 1999).

Como o capim-buffel apresentou potencial de uso como forrageira para o Semiárido, em 1977 foi criado o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido, localizado em Petrolina, PE. Ao longo dos anos, estudos foram desenvolvidos com intuito de agregar informações sobre o acervo do BAG, porém, com relação aos mecanismos reprodutivos destas plantas, poucas informações foram levantadas.

A reprodução assexuada ocorre regularmente em algumas espécies do gênero *Cenchrus* (AYERSA, 1981). O termo mais usado para este tipo de reprodução é apomixia, que pode ser de forma obrigatória ou facultativa. Na espécie *C. ciliaris*, a apomixia tem dominância sobre a reprodução sexuada e a ocorrência de plantas sexuais obrigatórias na natureza é rara (KUMAR et al., 2015; YADAV et al., 2012), contudo, a obtenção de genótipos sexuais obrigatórios ou apomíticos facultativos, com altos níveis de sexualidade, é necessária para a realização de cruzamentos nos programas de melhoramento genético da espécie (QUIROGA et al., 2013).

Indivíduos de *C. ciliaris* com capacidade de serem cruzados foram detectados e a manipulação dessas plantas deu origem a alguns híbridos com características de interesse econômico (BASHAW; HUSSEY, 1992). Até o momento, o uso desses híbridos é a única

alternativa para efetuar cruzamentos convencionais em programas de melhoramento da espécie (QUIROGA et al., 2013). Os marcadores moleculares complementam as técnicas já existentes, possibilitando discriminar os acessos de forma genotípica diretamente no DNA, evitando o efeito ambiental e, conseqüentemente, erros de identificação (BORBA et al., 2005; SOUZA, 2015).

Este trabalho teve como objetivo identificar o mecanismo de reprodução de 115 genótipos de capim-buffel do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido por meio de marcadores moleculares.

## Material e Métodos

Foram coletadas folhas jovens e expandidas de 115 acessos de *C. ciliaris* do BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido, localizado no Campo Experimental da Caatinga, pertencente à Embrapa Semiárido, em Petrolina, PE.

Para a extração do DNA, cerca de 40 mg do tecido vegetal macerado foi transferido para tubos tipo eppendorf (1,5 mL) e realizada a extração de DNA utilizando-se o kit comercial. O DNA extraído foi diluído para 50ng/ $\mu$ l e armazenado em freezer a aproximadamente -4°C.

Para a identificação de genótipos apomíticos foram utilizados os marcadores específicos – Q8H, UGT197 e PCAB10 – associados à sequência de apomixia da região genômica (ASGR – Apomixis Sequence Genomic Region) (JESSUP, 2005; OZIAS-AKINS et al. 1998). Para a identificação de genótipos sexuais foi utilizado o marcador SCAR 4HS\*, que amplifica a região genômica específica associada à reprodução sexual em *Cenchrus ciliaris* (YADAV et al., 2012).

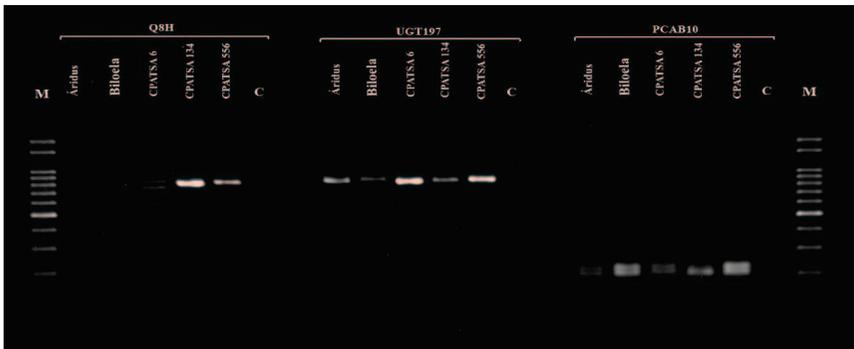
As reações de PCR foram realizadas de acordo com os protocolos estabelecidos por Ozias-Akins et al. (1998) para os marcadores relacionados à apomixia e segundo Yadav et al. (2012) para o marcador relacionado à reprodução sexual. Os produtos das PCRs foram corados com GelRed e submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% (p/v) a 80 volts durante 3 horas. As imagens foram visualizadas e capturadas sob luz UV em fotodocumentador.

Para análise do mecanismo reprodutivo, as imagens foram interpretadas qualitativamente quanto à presença ou ausência de banda no tamanho determinado pelas referências de descrição dos iniciadores.

## Resultados e Discussão

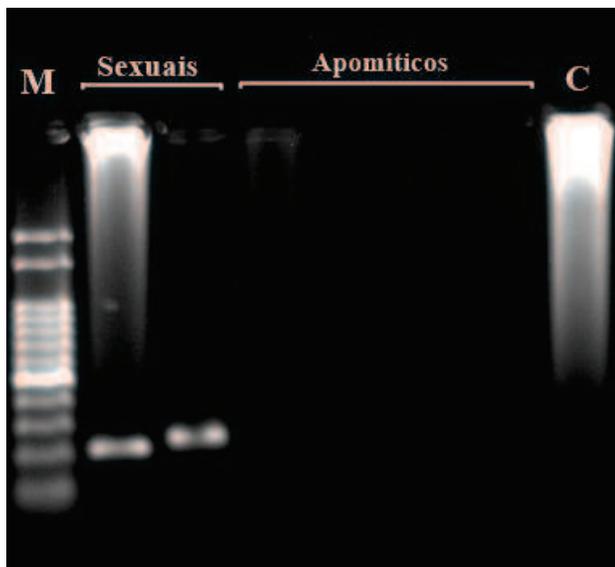
Os três marcadores utilizados – UGT197, Q8H e PCAB10 – amplificaram o respectivo fragmento associado à sequência de apomixia da região genômica ASGR nos 115 acessos de *C. ciliaris* do BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido.

Na Figura 1 é apresentado este padrão de amplificação para cinco genótipos selecionados. A eficiência dos marcadores utilizados para a identificação de genótipos apomíticos foi constatada também por Quiroga et al. (2013), quando os mesmos foram testados em indivíduos sexuais, não se observando amplificação.



**Figura 1.** Padrões de amplificação utilizando-se os marcadores moleculares para apomixia (Q8H, UGT197 e PACB10) em acessos de *Cenchrus ciliaris* do BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido. M: Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder; C: controle negativo.

O marcador 4HS\*, desenvolvido por Yadav et al. (2012), foi eficiente em identificar genótipos sexuais no BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido (Figura 2). Dois acessos apresentaram o fragmento ligado ao sistema de reprodução sexual (CPATSA 102 e CPATSA 134) dentre os 115 pertencentes ao BAG. Como estes dois acessos também apresentaram o fragmento do gene para apomixia, os mesmos podem ser apomíticos facultativos.



**Figura 2.** Padrões de amplificação utilizando-se o marcador molecular para sexualidade (4HS\*) em acessos de *Cenchrus ciliaris* do BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido. M: Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder; C: controle negativo.

A reprodução apomítica é, geralmente, predominante sobre a sexual em espécies que se reproduzem por ambas as formas (DWIVEDI et al., 2007). Em *C. ciliaris*, o mecanismo de reprodução via apomixia é controlado por um ou mais genes (DWIVEDI et al., 2007; JESSUP, 2005). Essa predominância pôde ser observada nos acessos do BAG da Embrapa Semiárido, uma vez que apenas dois dos 115 acessos (1,7%) apresentaram o fragmento alvo na amplificação com o marcador SCAR 4HS\*.

## Conclusão

Os marcadores SCAR foram eficientes na determinação do mecanismo reprodutivo de 115 acessos de capim-buffel do BAG da Embrapa Semiárido. A análise permitiu identificar que os genótipos CPATSA 102 e CPATSA 134 apresentam característica de reprodução sexual, sendo passíveis de incorporação em programas de melhoramento da espécie.

## Agradecimentos

À Embrapa Semiárido, à Capes e à Universidade Estadual de Feira de Santana (Uefs) pelo poio financeiro.

## Referências

AYERSA, R. **El buffel grass: utilidad y manejo de una promisoría gramínea**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1981. 139 p.

BASHAW, E. C.; HUSSEY, M. A.; HIGNIGHT, K. W. Hybridization ( $n+n$  and  $2n+n$ ) of facultative apomictic species in the *Pennisetum* agamic complex. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 153, p. 446-470, 1992.

BORBA, R. de S.; GARCIA, M. S.; KOVALESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, p. 565-569, 2005.

DWIVEDI, K. K.; BHAT, S. R.; BHAT, V.; BHAT, B. V.; GUPTA, M. G. Identification of a SCAR marker linked to apomixis in buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.). **Plant Science**, Limerick v. 172, n. 4, p. 788-795, 2007.

JESSUP, R. W. **Molecular tools for marker-assisted breeding of buffelgrass. partial fulfillment of the requirements**. 2005. 65 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – Texas A&M University, Texas.

KUMAR, S.; SAHU, N.; SINGH, A. In vitro plant regeneration via callus induction in a rare sexual plant of Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 51, p. 28-34, 2015.

MOREIRA, J. N.; LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; ARAÚJO, G. G. L.; SILVA, G. C. Potencial de produção de capim-buffel na época seca no Semiárido pernambucano. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 3, p. 22-29, 2007.

OLIVEIRA, M. C.; SILVA, C. M. M. de S.; SOUZA, F. B. Capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) preservação ex-situ e avaliação aprofundada. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://anfocnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104279/1/Celia.pdf>>. Acesso em: 15 set 2017.

OZIAS-AKINS P.; ROCHE D.; HANNA W. W. Tight clustering and hemizygoty of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, D.C., v. 95, p. 5127-5132, 1998.

QUIROGA, M.; GRUNBERG, K.; RIBOTTA, A.; LÓPEZ, C. E.; CARLONI, E.; TOMMASINO, E.; LUNA, C.; GRIFFA, S. Obtaining sexual genotypes for breeding in buffel Grass. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 88, p. 118-123, 2013.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 17, n. 3, jul./set. 2015. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722015000300495](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000300495) >. Acesso em: 10 ago. 2017.

YADAV, C. B.; KUMAR, S.; GUPTA, M. G.; BHAT, V. Genetic linkage maps of the chromosomal regions associated with apomictic and sexual modes of reproduction in *Cenchrus ciliaris*. **Molecular Breeding**, Cham, v. 30, n. 1, p. 239-250, 2012.