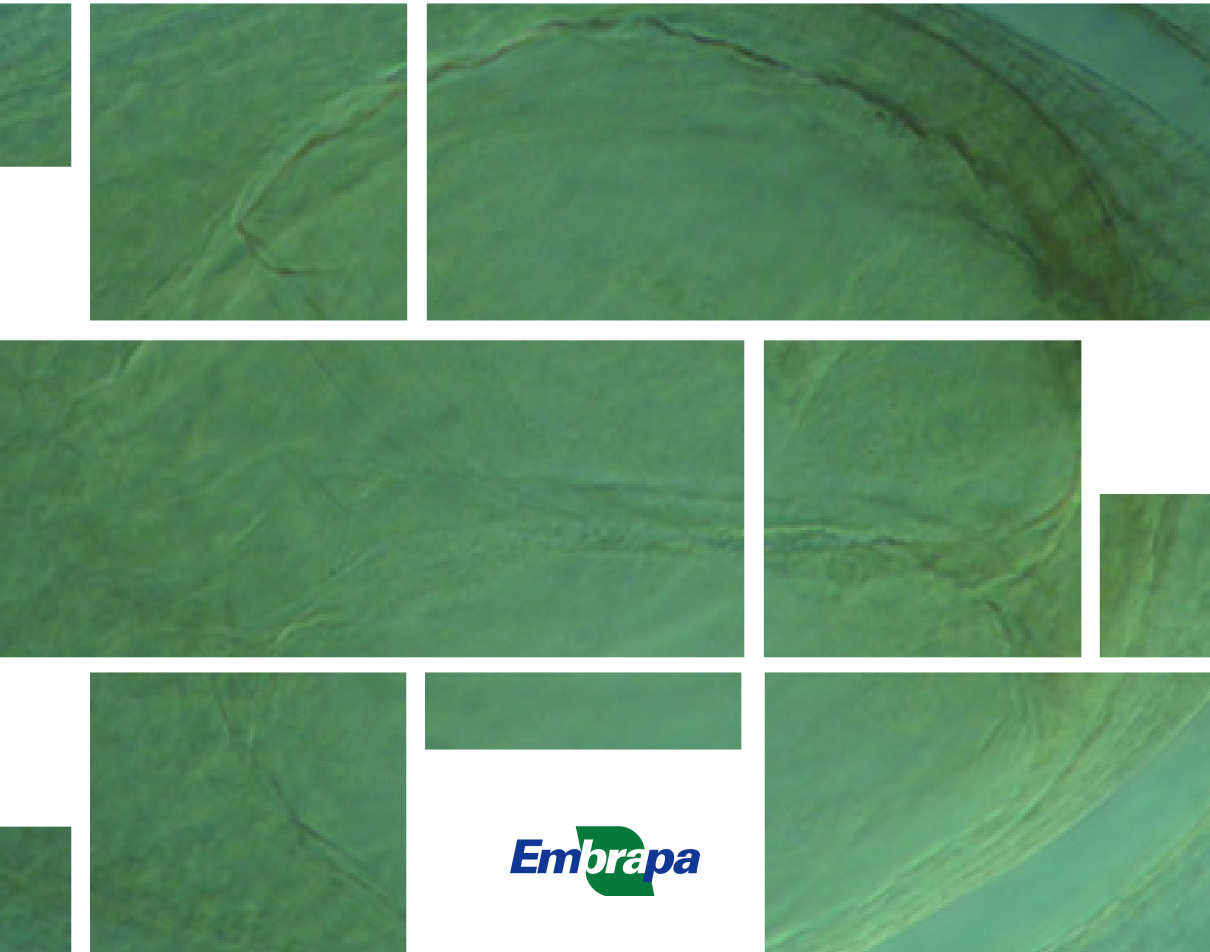


Determinação do modo de reprodução
em *Brachiara* spp. e *Panicum maximum*
usando microscopia por contraste de
interferência em ovários clarificados



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

DOCUMENTOS 267

Determinação do modo de reprodução em *Brachiara* spp. e *Panicum maximum* usando microscopia por contraste de interferência em ovários clarificados

*Andréa Raposo
Cacilda Borges do Valle
Liana Jank
Sandra Ratier
Sanzio Carvalho Lima Barrios
Mateus Figueiredo Santos*

Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2019

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte
Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, MS,
79106-550, Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368 2000
Fax: (67) 3368 2150
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Gado de Corte

Presidente
Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes

Secretário-Executivo
Rodrigo Carvalho Alva

Membros
Alexandre Romeiro de Araújo, Andréa Alves do Egito, Liana Jank, Lucimara Chiari, Marcelo Castro Pereira, Mariane de Mendonça Vilela, Rodiney de Arruda Mauro, Wilson Werner Koller

Supervisão editorial
Rodrigo Carvalho Alva

Revisão de texto
Rodrigo Carvalho Alva

Tratamento das ilustrações
Rodrigo Carvalho Alva

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Rodrigo Carvalho Alva

Foto da capa
Liana Jank

1ª edição
Publicação digitalizada (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Corte

Determinação do modo de reprodução em *Brachiara* spp. e *Panicum maximum* usando microscopia por contraste de interferência em ovários clarificados / Andrea Raposo ... [et al.]. - Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2019.
PDF (34 p.). - (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X ; 267).

1. Apomixia. 2. Gramínea forrageira. 3. Microscopia. 4. Ovário. 5. Progenie. I. Raposo, Andréa. II. Valle, Cacilda Borges do. III. Jank, Liana. IV. Ratier, Sandra. V. Barrios, Sanzio Carvalho Lima. VI. Santos, Mateus Figueiredo. VII. Série.

CDD 633.2 (23. ed.)

Autores

Andréa Raposo

Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de plantas, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

Cacilda Borges do Valle

Engenheira-Agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

Liana Jank

Engenheira-Agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

Sandra Ratier

Assistente de laboratório da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

Sanzio Carvalho Lima Barrios

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

Mateus Figueiredo Santos

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

Sumário

Autores	3
Abstract	8
Introdução.....	9
Metodologia	14
Coleta das espiguetas	14
Procedimentos no laboratório	16
Guia Ilustrado	24
Referências	32

Resumo

A maioria das plantas superiores se reproduz sexualmente, ou seja, para formação do embrião ocorre a fecundação do óvulo por um gameta masculino. Entretanto, em muitas espécies de gramíneas forrageiras, o embrião se origina por meio de um processo de reprodução assexual via sementes denominado apomixia. Este modo de reprodução possui grande potencial para ser explorado na agricultura, particularmente na produção de sementes híbridas visando à manutenção do vigor híbrido ao longo das gerações. No melhoramento de espécies apomíticas, o cruzamento entre genitores sexuais e apomíticos origina progênes segregando para o modo de reprodução sexual e apomítico. A determinação do modo de reprodução das progênes pode ser realizada por diversas estratégias, uma delas com destaque para as análises citoembriológicas, as quais possibilitam o estudo da morfologia dos ovários das plantas, permitindo separá-las entre sexuais e apomíticas. Apesar de estas análises já serem realizadas em várias espécies, ainda não existe uma publicação que descreva detalhadamente cada etapa e que tenha um acervo fotográfico ilustrando o passo a passo. Assim, neste documento são apresentadas, com detalhes, as análises citoembriológicas por meio de microscopia por contraste por interferência. São relatados todos os procedimentos necessários para a coleta das espiguetas no campo, a fixação destas em fenol ácido acético - FAA, a extração dos ovários e sua clarificação. Posteriormente, é detalhada a montagem das lâminas e a análise dos ovários clarificados, utilizando-se o microscópio com contraste diferencial de interferência (DIC – *differential interference contrast*). Por fim, é apresentado como se analisam os resultados do método para se concluir sobre o modo de reprodução de cada planta. Dentro deste contexto, este documento apresenta grande importância para estudantes, professores e pesquisadores que trabalham com sistema reprodutivo de forrageiras.

Abstract

Most of the higher plants reproduce sexually, ie, for embryo formation, ovule fertilization occurs by a male gamete. However, in many forage grass species, the embryo originates through a process of asexual reproduction by seeds called apomixis. This mode of reproduction has great potential to be explored in agriculture, particularly in the production of hybrid seeds aiming at maintaining hybrid vigor over generations. In the breeding of apomitic species, the cross between sexual and apomitic parents gives rise to progenies segregating into the apomitic and sexual reproductive mode. The progeny reproductive mode can be determined by several strategies, one of them being the cytoembriological analysis. The cytoembriological analysis allow the study of the morphology of the plant's ovaries, allowing to separate them between sexual and apomitic ones. Despite these analyses are already being done in various species, there is not yet a publication that describes each step in detail and has a photographic collection illustrating the step by step. Thus, in this document the cytoembriological analysis by interference contrast microscopy is presented in detail. All procedures necessary for field spikelet collection, FAA fixation, ovary extraction and clarification are reported. Subsequently, it is detailed how the slides are assembled and the clarified ovaries are analyzed using the differential interference contrast (DIC) microscope. Finally, it is presented how the results of the method are analyzed to conclude about the reproductive mode of each plant. Within this context, this document is of great importance to students, teachers and researchers who work with the forage reproductive system.

Introdução

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, com cerca de 214,69 milhões de cabeças, sendo o segundo maior produtor de carne bovina, representando 15,3% de toda carne produzida no mundo em 2018 (ABIEC, 2019). O setor pecuário representa 8,7% do PIB brasileiro e gera 7,74% das exportações do agronegócio nacional (ABIEC, 2019). A principal vantagem da bovinocultura nacional é a expansão vertical, ou seja, sem o desmatamento ou abertura de novas áreas, mas sim pelo incremento da produtividade e conseqüentemente da produção (CPCA, 2017).

Dentro deste contexto, as plantas forrageiras são de grande importância, uma vez que o diferencial da carne brasileira é a produção de carne a pasto, devido à natural aptidão do Brasil para isso (VALLE et al, 2009). O “boi de capim”, ou seja, aquele animal que se alimenta por meio de plantas forrageiras, principalmente de gramíneas no pasto, é um produto de menor custo de produção, mais natural, saudável, e com qualidade nutricional elevada. Além disso, existe um apelo mercadológico devido às vantagens competitivas para exportação de carne livre dos riscos associados à doença da vaca louca (encefalopatia espongiforme bovina). De acordo com ABIEC (2019), 87,4% dos animais são criados, recriados e terminados a pasto, e os outros 13% são criados e recriados a pasto e terminados em confinamento, o que ressalta a notoriedade destas plantas para o sistema de produção brasileiro.

As forrageiras, além de serem usadas na formação de pastagens, podem ainda ser utilizadas como feno, silagem, ou adubação verde (LIMA; CUNHA, 2008; DOMINGUES, 2009), bem como para biomassa e biocombustíveis (; DIEN et al., 2006; ANDERSON et al., 2008; GONZALEZ-HERANDEZ et al., 2009; ROCHA et al., 2017).

Apesar do grande número de gêneros e espécies de plantas forrageiras, poucas são as cultivares efetivamente utilizadas nas pastagens tropicais, o que caracteriza a formação de extensos monocultivos. Ainda mais séria é a situação das pastagens formadas por cultivares tropicais apomíticas, isto é, oriundas de sementes clonais, portanto de variação genética extremamente limitada. Essa situação impõe sério risco à produção animal em pastagens tropicais, daí a urgência em melhorar e desenvolver novas cultivares para o mercado visando à diversificação das pastagens.

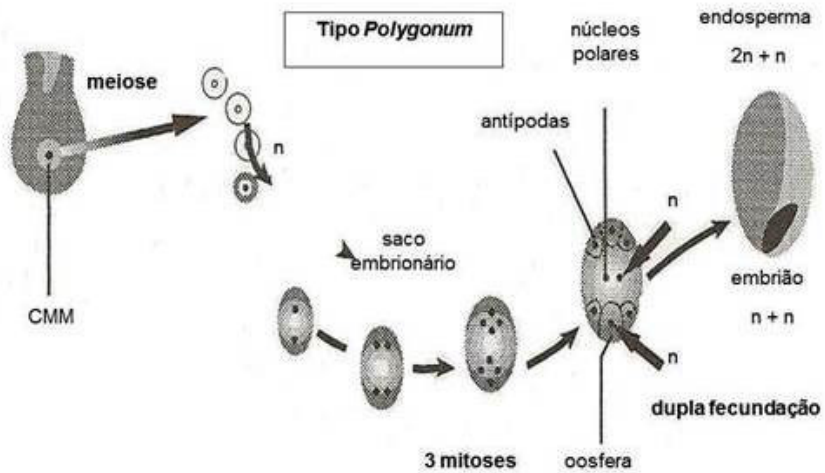
A maioria das plantas superiores se reproduz sexualmente, ou seja, o embrião é formado por meio da fertilização da célula-ovo pelo grão de pólen. Os gametas são produzidos por meiose, portanto há redução do número de cromossomos. Com a fertilização ocorre o pareamento dos cromossomos homólogos e como consequência, a recombinação gênica, que gera a variabilidade genética deste processo e recompõe o número somático de cromossomos do organismo.

Nas angiospermas ocorre a chamada dupla fecundação que se caracteriza pela fecundação da oosfera e dos núcleos polares por dois gametas masculinos (Figura 1a). Com a polinização, o grão de pólen absorve água do estigma e germina, formando o tubo polínico que segue pelo estigma, estilete até alcançar a micrópila, que é uma pequena abertura na extremidade superior do óvulo pela qual ele penetra e atinge o saco embrionário. Então, um dos gametas masculinos (n) une-se com o núcleo da oosfera (n) e outro, com os núcleos polares ($2n$). Como resultado, tem-se a produção de um embrião $2n$ ($n=n$) e do endosperma $3n$ ($2n=n$).

Em muitas gramíneas tropicais, no entanto, o embrião é formado por um processo assexual chamado apomixia, no qual ocorre a formação do embrião por um processo clonal derivado apenas de tecidos maternos (KARASAWA, 2009), não ocorrendo, portanto, a fusão de gametas (Figura 1b). Neste, a meiose não ocorre ou não é funcional, os gametas femininos são degenerados e uma ou várias células somáticas sofrem mitoses que resultam em um embrião com o mesmo material genético da planta mãe. Normalmente, o endosperma é resultado da fecundação dos núcleos polares, que se fundiram ($2n$), por um gameta masculino, daí a formação normal das sementes nas plantas apomíticas.

A apomixia é um fenômeno comum em 15% das angiospermas, sendo que 75% das espécies apomíticas estão nas famílias *Gramineae* (*Poacea*), *Astereaceae* e *Rosaceae* (DALL'AGNOL, SCHIFINO-WITTMANN, 2005; KUMAR, SAXENA, 2016). Este tipo de reprodução tem sido encontrado em diversos gêneros de gramíneas forrageiras, como *Brachiaria* e *Panicum*, não sendo muito comum dentre outras culturas (KUMAR, 2017). Três fatores compõem o mecanismo apomítico: a apomeiose (formação do saco embrionário sem que ocorra a meiose), a partenogênese (desenvolvimento autônomo do embrião) e a produção de endosperma - de forma autônoma ou derivada da fecundação (HAND; KOLTUNOW, 2014).

a) Sexualidade



b) Apomixia

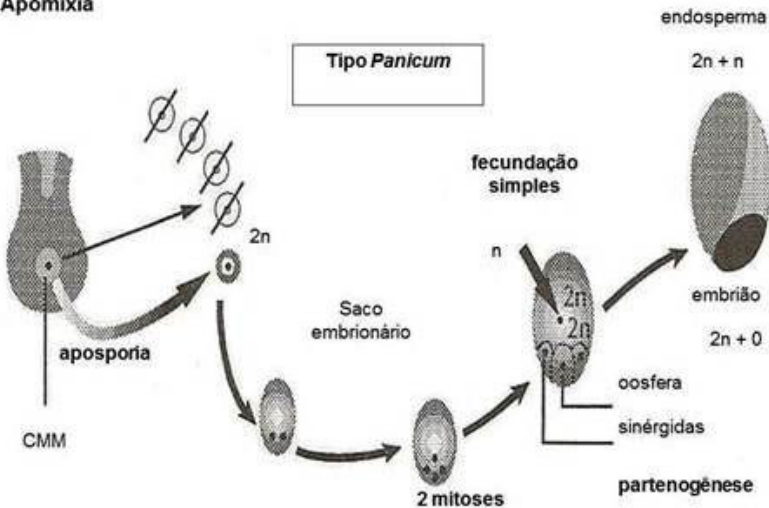


Figura 1. Divisão celular da célula-mãe da megáspora (CMM) dando origem a uma tétrade de megásporas com gametas n seguida de: a) 3 divisões mitóticas dando origem ao saco embriônico meiótico, tipo Polygonum, indicando sexualidade; b) 2 divisões mitóticas dando origem ao saco embriônico apospórico do tipo Panicum, indicando apomixia. Fonte: Savidan; Valle, 1999.

*Para saber mais sobre sacos embriônicos tipo Polygonum e Panicum ler item "Análise dos ovários clarificados", página 21.

Segundo Kumar e Saxena (2016), a apomixia possui grande potencial para ser aplicada na agricultura, particularmente na produção de sementes híbridas visando à manutenção do vigor híbrido ao longo das gerações. Inúmeros esforços têm sido dispendidos em introduzir a apomixia em várias culturas, porém até hoje sem sucesso (SAVIDAN, 2001; MAHESHWARI, et al. 1998; KANDEMIR; SAYGILI, 2015).

No melhoramento de espécies apomíticas, o cruzamento é feito usando-se um genitor sexual como receptor de pólen oriundo de um genitor apomítico, desde que compatível quanto ao nível de ploidia e número básico de cromossomos. Nos programas da Embrapa Gado de Corte usam-se plantas tetraploides sexuais de *Panicum maximum* ($2n=4x=32$), *Brachiaria ruziziensis* e *B. decumbens* (ambas $2n=4x=36$). Todas as plantas sexuais iniciais do programa tiveram ancestrais diploides que foram tetraploidizados artificialmente com o alcaloide colchicina. Com a disponibilização das plantas sexuais tetraploidizadas foi possível obter novas plantas sexuais a partir do cruzamento entre plantas sexuais e apomíticas tetraploides, uma vez que na geração F1 ocorre plantas sexuais e apomíticas na proporção de 1:1 (SAVIDAN, 1983). Já em *B. humidicola* foi identificado um acesso sexual hexaploide ($2n=6x=36$) que pode ser cruzado com plantas apomíticas. Ainda não é possível realizar cruzamento no âmbito nonaploide dessa espécie, típico das duas cultivares comerciais de *B. humidicola*, por falta de genitor sexual com 54 cromossomos ($2n=9x=54$).

Para determinar o modo de reprodução da progênie de cruzamentos entre plantas sexuais e apomíticas pode-se lançar mão de testes de progênie, plantando-se fileiras dos descendentes e observando se estes segregam fenotipicamente, indicando comportamento sexual da mãe; caso contrário, indica comportamento assexual, isto é, apomixia ocorrendo na planta mãe, como ilustrado na Figura 2. O uso deste teste implica em montar um campo de observação com ao menos 20 plantas por genitor e esperar o pleno crescimento e, se necessário, o florescimento da progênie para classificá-la em segregante ou não, já que às vezes é mais fácil verificar segregação observando-se as inflorescências. Além de ser moroso e trabalhoso, este procedimento pode sofrer fortes efeitos ambientais, gerando dúvidas sobre a expressão fenotípica das plantas na parcela (SILVA et al., 2005).

Progênie heterogênea: planta mãe é sexual

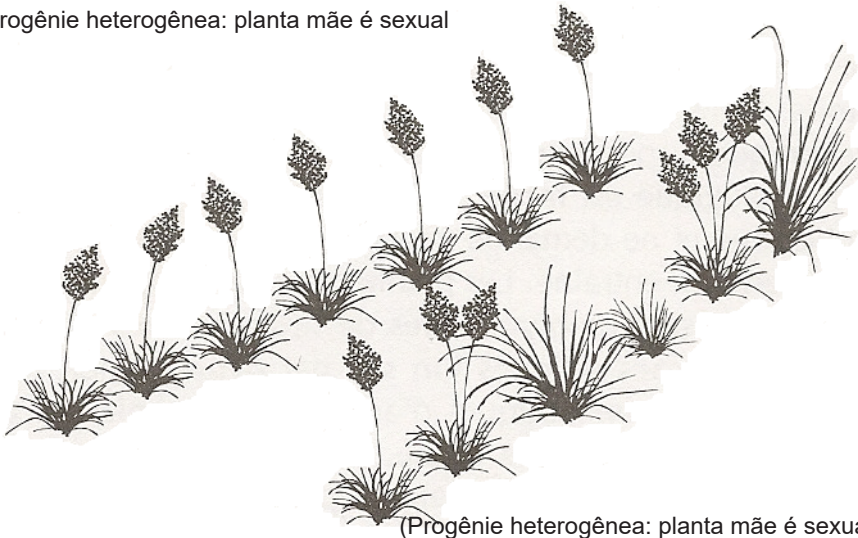


Figura 2. Teste de progênies para determinação do modo de reprodução das plantas-mãe: cada linha representa uma progênie. Fonte: Savidan; Valle, 1999.

O estudo do modo de reprodução usando a extração e clarificação de ovários com posterior análise por microscopia de contraste por interferência (YOUNG et al., 1979; BITENCOURT et al., 2012) é outra forma de determinar o sistema reprodutivo de forma segura. Esse método é também moroso e exige treinamento prévio para o reconhecimento das estruturas internas do ovário. É mais seguro do que o teste de progênies, pois a detecção de sacos apospóricos indica a presença do alelo da apomixia que é dominante sobre a sexualidade. A ausência de sacos apospóricos em pelo menos 30 ovários indica sexualidade. Esse procedimento será detalhado mais adiante.

É importante esclarecer que a apomixia é geralmente facultativa, isto é, algumas flores na mesma planta exibem ocasionalmente sacos meióticos passíveis de serem fecundados e de originarem híbridos chamados de “off-types”. No exame microscópico é comum encontrarem-se sacos meióticos entre os 30-40 ovários examinados, porém, em geral, no campo esses “off-types” dificilmente ocorrem por serem menos competitivos do que os apomíticos. Tal fato poderia ser explicado pela vantagem adaptativa da apomixia sobre a sexualidade por independência da meiose e da fecundação da célula-ovo. Sacos

apospóricos dependem de apenas duas mitoses enquanto os meióticos precisam de três mitoses após a meiose, que por sua vez é bastante sensível a estresses de temperatura e chuva (OHKURA, 2015; FUCHS et al., 2018).

O método mais rápido de determinar o modo reprodutivo seria com o uso de marcadores moleculares, que permite a avaliação de plântulas antes de serem levadas ao campo (seleção precoce) e promove economia tanto de tempo quanto de recursos em um programa de melhoramento. O problema é que os marcadores disponíveis são ainda inconclusivos para a definição exata das plantas apomíticas (BITENCOURT, et al. 2012;; BLUMA-MARQUES et al., 2014; WORTHINGTON, et al. 2016), e, portanto, ainda é necessário usar a citogenética e/ou testes de progênies para certificar o modo de reprodução.

Plantas apomíticas superiores são candidatas a futuras cultivares, enquanto que plantas sexuais superiores voltam ao programa de melhoramento como novos genitores sexuais para futuros cruzamentos. Daí a grande importância na identificação correta do modo de reprodução dos híbridos gerados.

Metodologia

Coleta das espiguetas

As espiguetas encontram-se agrupadas nos racemos ou panículas das gramíneas forrageiras. Estas são formadas pelo pedúnculo, glumas e flores (Figura 3). As flores, geralmente hermafroditas, encontram-se dentro das espiguetas e são formadas pela ráquis, lema, pálea e, no seu interior, pela lodícula e órgãos reprodutores feminino (estigma e ovário) e masculino (antera e filamento). As anteras são responsáveis pela produção de grãos de pólen, enquanto os estigmas recebem os grãos de pólen que germinam até alcançar o ovário, onde ocorre a fecundação.

Para os estudos do modo de reprodução e de taxa de sexualidade, as espiguetas devem ser coletadas no início da manhã, sendo que apenas aquelas que apresentarem flores em antese devem ser selecionadas. As principais características das flores em antese são a turgidez e a aparência visível dos estigmas (Figura 4). Estas características indicam que a fecundação ainda não ocorreu, o que é fundamental para o estudo da morfologia dos ovários.

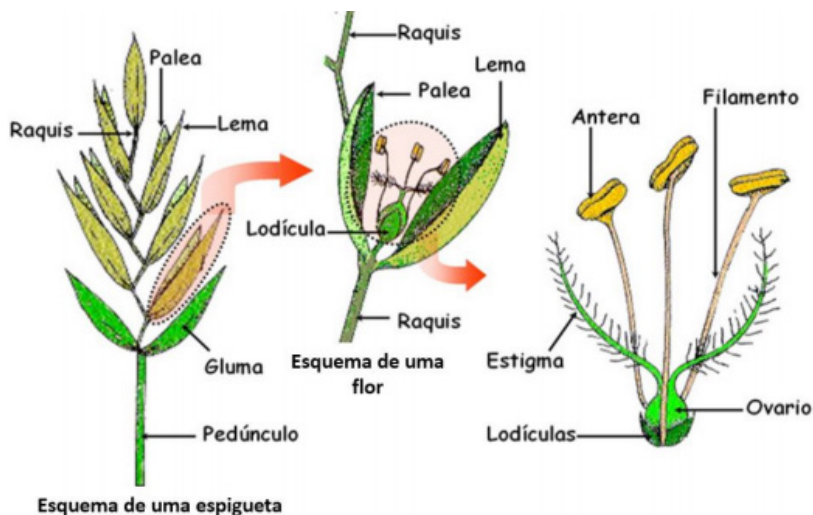


Figura 3. Esquema de uma espiguetas. Fonte: <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas%20Angiospermas/Comenilidas/Gramineas.htm>.

Para a coleta, deve-se utilizar uma pinça de ponta fina e a flor deve ser retirada pela sua base (pedúnculo), de forma a não causar injúrias ao ovário. Após a coleta, o material deve ser imediatamente colocado em um frasco de vidro devidamente identificado contendo água, para manter a turgescência das flores e tampado. Pode-se colher espiguetas de várias plantas na mesma jornada, desde que se evite deixar as amostras coletadas ao sol. Ao final da coleta, as amostras devem ser levadas para o laboratório, onde é realizada a fixação da fase de desenvolvimento das espiguetas (vide item 2.2.1). Neste processo ocorre a morte imediata das células e a preservação da morfologia das mesmas, com a desestabilização das enzimas proteolíticas não ocorre a autólise celular. Ele ainda impede a proliferação de microrganismos, leva ao endurecimento dos tecidos e melhora a diferenciação ótica dos mesmos (CUTLER, et al. 2011).

Para o estudo do modo de reprodução, deve-se coletar no mínimo 60 espiguetas por planta a ser estudada; já para o estudo da taxa de sexualidade, ou seja, da porcentagem de ovários sexuais em relação ao total avaliado, deve-se coletar no mínimo 200 espiguetas.

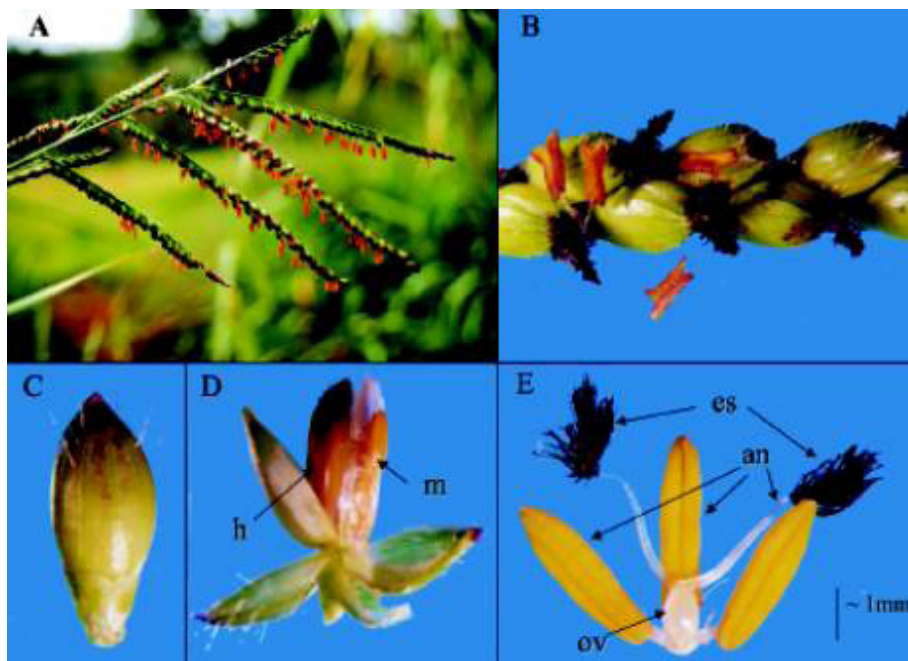


Figura 4. A, Inflorescência de braquiária em antese com anteras amarelas e estigmas escuros; B, Detalhe do racemo durante a antese, mostrando as espiguetas em duas fileiras; C, Espigueta; D, Espigueta aberta, mostrando a flor hermafrodita (h) e a flor masculina (m); E, Flor hermafrodita dissecada, mostrando três anteras (an), o pistilo com o ovário (ov) e o estigma (es). Fonte: Carneiro; Dusi, 2002.

Procedimentos no laboratório

Preparo de Soluções

Tabela 1. Preparo da Solução de álcool etílico 70%.

Reagentes	Quantidade
Álcool etílico absoluto PA	700 mL
Água destilada	300 mL
Volume final da solução	1.000 mL

Tabela 2. Preparo da Solução de álcool etílico 85%.

Reagentes	Quantidade
Álcool etílico absoluto PA	850 mL
Água destilada	15 mL
Volume final da solução	1.000 mL

Preparo da Solução de Formalina a 40%

Utilizar partes iguais da solução A e da solução B

Preparo da Solução A -

Tabela 3. Preparo da Solução A -.

Reagentes	Quantidade
Anidrido crômico	1 grama
Ácido acético glacial	4 mL
Água destilada	96 mL
Volume final da solução	100 mL

Tabela 4. Preparo da Solução B -.

Reagentes	Quantidade
Formaldeído	30 mL
Água destilada	70 mL
Volume final da solução	100 mL

Tabela 5. Preparo da Solução de FAA na proporção 40:14:3:3 (Formalina 40%:Água destilada:Álcool etílico 95%:Ácido acético glacial).

Reagentes	Quantidade		
Álcool etílico 95%	360 mL	40 mL	13,30 mL
Água destilada	126 mL	14 mL	4,7 mL
Formalina 40 % *	27 mL	3 mL	1 mL
Ácido acético glacial	27 mL	3 mL	1 mL
Volume final da solução	540 mL	60 mL	20 mL

* solução preparada a partir da utilização de volumes iguais da solução A e da solução B

Fixação das espiguetas

- 1) Com auxílio de uma pipeta de Pasteur retirar toda a água do frasco cuidadosamente.
- 2) Preparar e acrescentar a solução fixadora de FAA no frasco (preparo no item 3) e garantir que a solução cubra todo material. O fixador deverá ser preparado no mesmo dia da sua utilização.
- 3) As espiguetas devem ficar na solução fixadora por 24 horas em temperatura ambiente (Figura 5).
- 4) Após este tempo, utilizando uma pipeta de Pasteur retirar todo o fixador cuidadosamente do frasco e descartar de forma apropriada.
- 5) Acrescentar álcool etílico a 70% no frasco.
- 6) O material deve ser armazenado sob refrigeração ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) até o momento da extração dos ovários.



Figura 5. Frascos com espiguetas fixadas e depois armazenadas em álcool 70% e frascos menores com ovários já extraídos também em álcool 70%.

Extração dos ovários

- 1) Colocar uma placa de Petri sob um estereomicroscópio e acrescentar um pouco de álcool etílico 70%.
- 2) Colocar as espiguetas nesta placa e com o auxílio de uma pinça e do bisturi (ou duas pinças) remover as glumas e abrir cuidadosamente o flósculo hermafrodita (este é formado pelas flores masculina e feminina, lema e pálea, Figuras 3 e 4) para retirar o ovário (Figura 6), sempre que possível com os estigmas intactos. Manter as espiguetas embebidas no álcool todo o tempo.
- 3) Após a extração colocá-los em um frasco do tipo penicilina ou de vacina com capacidade de 10 mL devidamente identificado e contendo álcool etílico 70% encobrendo o material (Figura 5).
- 4) Estes devem ser armazenados sob refrigeração (4° graus) até o momento da clarificação.



Figura 6. Extração de ovários a partir de espiguetas de *Panicum maximum* fixadas e depois armazenadas em álcool 70%.

Clarificação dos ovários

1) Os ovários dissecados (Figura 5) devem ser desidratados em uma série de etapas envolvendo álcool etílico, álcool etílico e salicilato de metila em diferentes proporções e, finalmente, salicilato de metila, conforme indicado abaixo:

Etapa	Tempo	Solução
1 ^a	30 minutos	álcool etílico 85%
2 ^a	30 minutos	álcool etílico 100%
3 ^a	30 minutos	álcool etílico 100%
4 ^a	30 minutos	álcool etílico 100%
5 ^a	30 minutos	1:1 álcool etílico 100% : salicilato de metila
6 ^a	30 minutos	1:3 álcool etílico 100% : salicilato de metila
7 ^a		salicilato de metila

2) Após a clarificação, o material deverá ficar armazenado sob refrigeração de aproximadamente 4°C em salicilato de metila.

Montagem da lâmina

Utilizando-se um estereomicroscópio, as lâminas devem ser montadas da seguinte forma (Figura 7):

1) Etiquetar uma lâmina e fixar duas lamínulas pequenas nas pontas da lâmina utilizando-se uma gota de salicilato de metila (Figura 7A e 7B).

2) Em seguida, alinhar os ovários clarificados em três fileiras com 10 ovários cada (Figura 7C). Todas as micrópilas (Figura 8) devem estar para o mesmo lado, e procurar não sobrepor os estigmas no ovário subsequente. Estas ações irão facilitar tanto a montagem como a leitura das lâminas.

3) Após formar as três fileiras cobri-las com uma lamínula grande (Figuras 7D e 8) com todo o cuidado para não desalinhar os ovários. Com uma pipeta de Pasteur em contato com a região de encontro entre a lâmina e a lamínula completar os espaços lentamente com salicilato de metila, para que não ocorra ressecamento dos ovários e para que não se formem bolhas entre elas. Assim, todos os ovários ficarão no mesmo nível para observação.

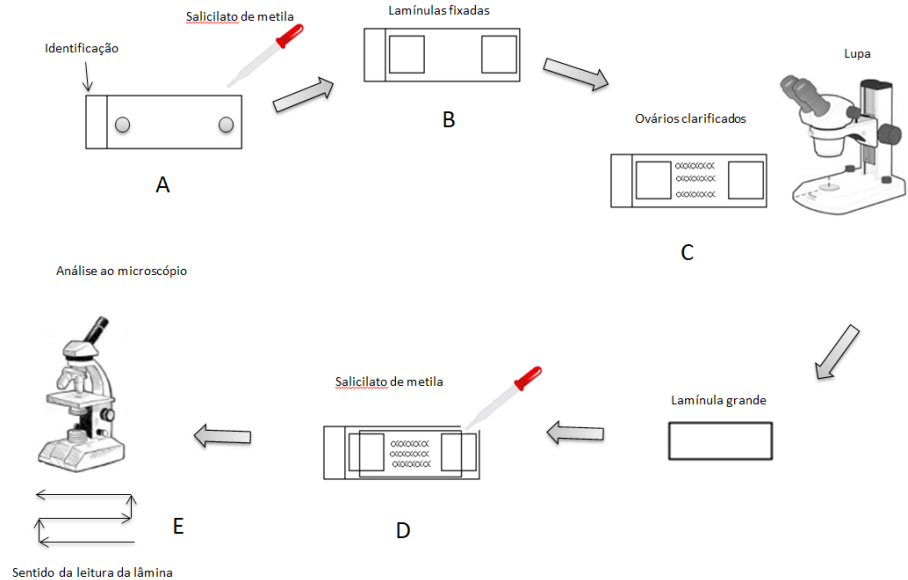


Figura 7. Desenho esquemático mostrando como é realizada a montagem de uma lâmina para análises dos ovários clarificados.

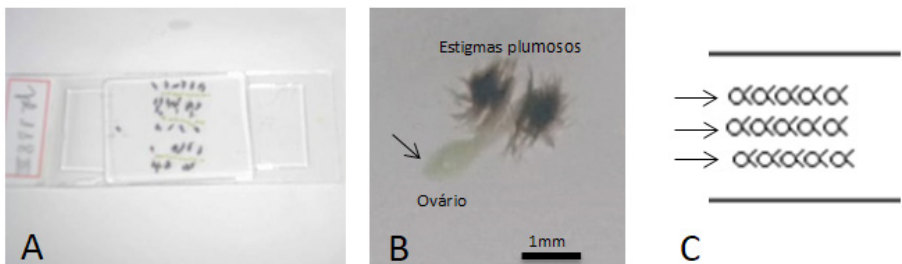


Figura 8. A) Lâmina contendo ovários clarificados para estudo do modo de reprodução em forrageiras: observe que são feitas três fileiras contendo 10 ovários cada. B) Ovário e estigmas plumosos após serem retirados do antécio floral de *Brachiaria*; C) Representação esquemática de ovários enfileirados em uma lamínula. Observe que as setas indicam a região da micrópila.

Análise dos ovários clarificados

Utilizando-se um microscópio com contraste diferencial de interferência (DIC – *differential interference contrast*), as lâminas contendo os ovários (Figura 8) devem ser analisadas e os sacos embrionários classificados. A visualização da imagem tem aparência 3D. A leitura da lâmina deve ser realizada confor-

me esquema da Figura 7E. Na Figura 9, observa-se desenho esquemático dos sacos embrionários. A análise dos ovários deve ser realizada iniciando-se pela objetiva de 10x quando os ovários são grandes, como é o caso dos ovários de *Brachiaria*. Posteriormente, aumenta-se para 20x, visando-se obter mais detalhes; para ovários pequenos, como é o caso daqueles de *Panicum*, pode-se iniciar pela objetiva de 20x, aumentando-se, posteriormente, para 40x.

Ovários contendo sacos embrionários múltiplos (Sm) ou apospórico único (A) apresentam oosfera, as sinérgides, um único núcleo polar (ou às vezes dois núcleos polares) e ausência de células antípodas, caracterizando como sacos embrionários tipo *Panicum* (Figuras 9A e 10A). Ovários Sm ou A são classificados como apospóricos.

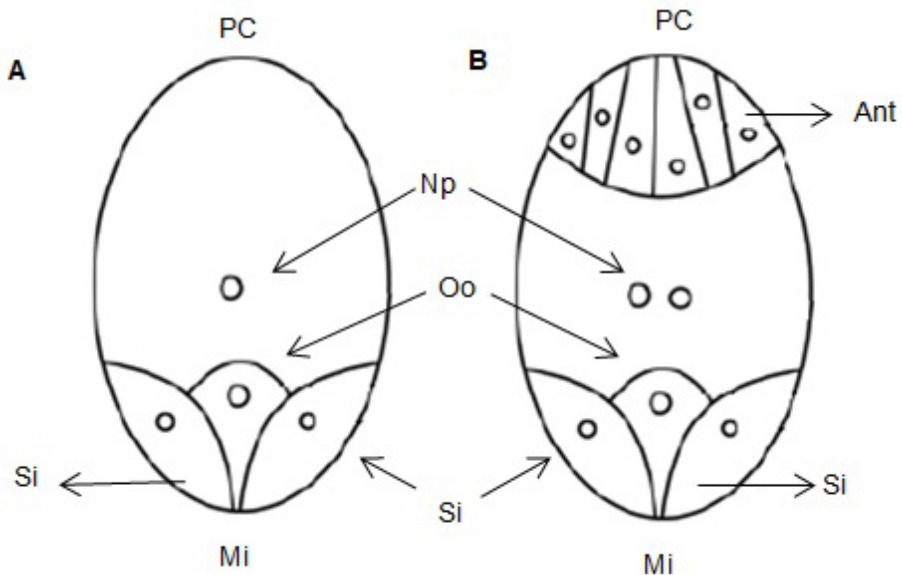


Figura 9. Esquema representativo de sacos embrionários de *B. brizantha*. A) saco embrionário tipo *Panicum*, contendo na micrópila uma oosfera associada a duas sinérgides e um núcleo polar centralizado. B) saco embrionário tipo *Polygonum*, contendo na micrópila uma oosfera associada a duas sinérgides dois núcleos polares centralizados e no polo chalazal 3 ou mais antípodas. Si – sinérgides Oo – oosfera, Np – núcleo polar; Ant – antípoda, Mi – micrópila, PC – polo chalazal. (adaptado de Araujo et al., 2004).

Já ovários contendo um único saco meiótico (S) com a oosfera, as sinérgides, dois núcleos polares e uma massa de células antípodas no polo chalazal são caracterizados como sacos embrionários tipo *Polygonum* (Figuras 9B e 10B). Ovários do tipo S são classificados como sexuais. Ressalta-se que as sinérgides são muito efêmeras e não são visualizadas por essa técnica em qualquer dos tipos de sacos embrionários.

Muitas vezes nas plantas sexuais são observados sacos estéreis (E), ou seja, a meiose falhou e nada se formou no ovário. Outras vezes o desenvolvimento foi estacionado e classifica-se o ovário como atrofiado (At). Podem ainda ocorrer sacos anormais (An), quando as estruturas internas estão distorcidas ou em formato tumoroso, às vezes até ultrapassando a parede do ovário. Sacos embrionários sem a presença de núcleos ou antípodas, ou estruturas que permitam sua classificação são denominados como indefinidos ou duvidosos (?). Pode ainda acontecer de ter um saco meiótico bem localizado na micrópila, mas rodeado de outros sacos apospóricos e para esses anota-se: S+Sm, ou S+A se for um único saco apospórico associado ao meiótico. Se o Sm ou A estiverem na micrópila e o meiótico mais para a região da chalaza, a anotação deverá ser: Sm+S ou A+S.

Um exemplo de análise no caderno de anotações está demonstrado abaixo:

Híbrido	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	S	A	Sm	An	E	?	At	Total	Class
R 12	SM	S+A	SM	AT	S	S	S	SM	SM	SM	9,5	5,5	13	0	0	1	1	30	APO
	SM	A	A	A+S	S+A	SM	S+A	SM	SM	S+A	32	18	43	0	0	3	3	100%	APO
	S+A	S	S	2S	A+S	SM	SM	?	SM	SM									

Neste lado da tabela, verifica-se a leitura da lâmina. Observe que são três fileiras de 10 leituras totalizando 30 sacos embrionários analisados. Note que a anotação no caderno é do jeito que se escreve (da linha mais acima e da esquerda para a direita), porém os sacos são observados seguindo-se a indicação na Figura 7E (iniciando-se no ovário inferior direito para a esquerda e subindo em zigue-zague).

Neste outro, a primeira fileira traz a quantidade de cada tipo de saco embrionário analisado (S, A, Sm, Na, E, ?, At). Já na segunda fileira observa-se a porcentagem destes no material analisado, e por fim a classificação do modo de reprodução do indivíduo.

As lâminas podem permanecer montadas por 24 horas para re-exame ou fotografia. Deve-se ter o cuidado para que as mesmas não se desidratem e uma gota de salicilato de metila pode ser colocada ao primeiro sinal de desidratação. Depois de analisados, os ovários devem ser recolocados novamente no frasco original contendo salicilato de metila e armazenados sob refrigeração.

Guia Ilustrado

A seguir segue um guia ilustrado com fotomicrografias de material de *Panicum maximum* e *Brachiaria* spp., pertencentes ao laboratório de Citogenética Vegetal da Embrapa Gado de Corte e também de artigos científicos.

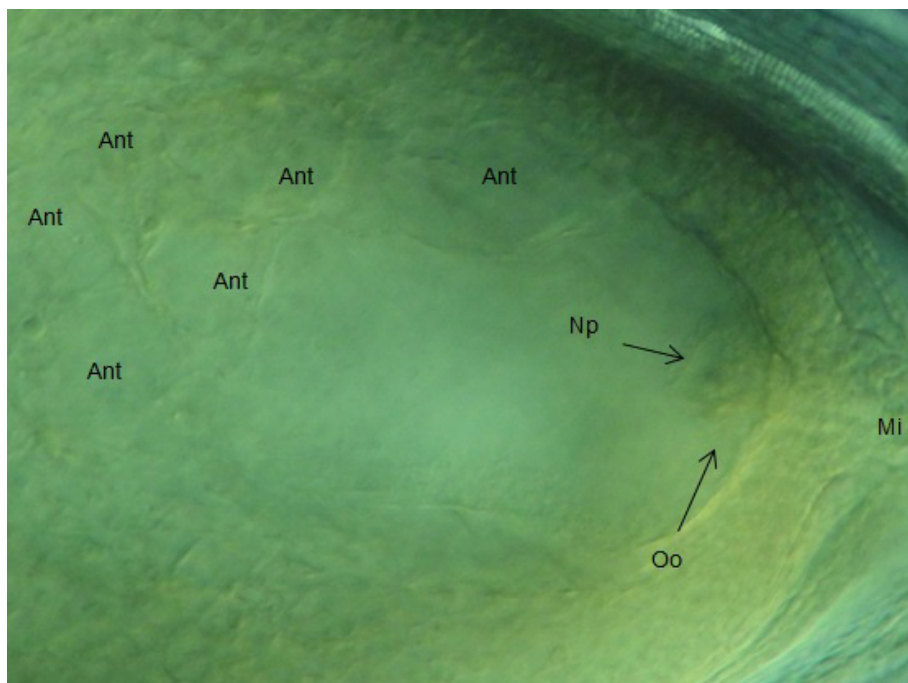


Figura 10. Morfologia de saco embrionário meiótico típico de *Brachiaria* (organismo geneticamente modificado - GMO3) clarificado e observado em microscópio de contraste diferencial. Aumento 670X. Ant – antípodas; Np – núcleo polar; Oo – oosfera; Mi – micrópila.

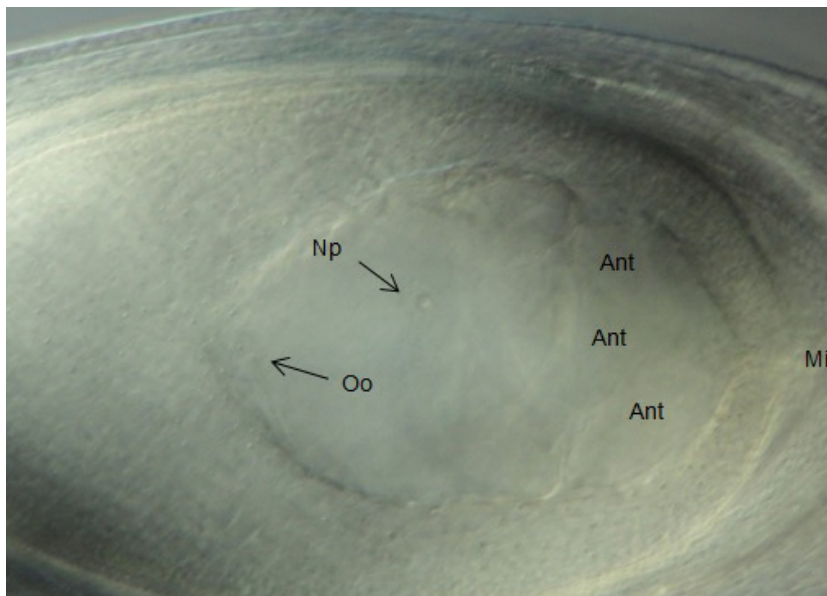


Figura 11. Morfologia de saco embrionário meiótico invertido de *Brachiaria* (GMO3) clarificado e observado em microscópio de contraste diferencial. Aumento 670X. Ant – antípodas; Np – núcleo polar; Oo – oosfera; Mi – micrópila.

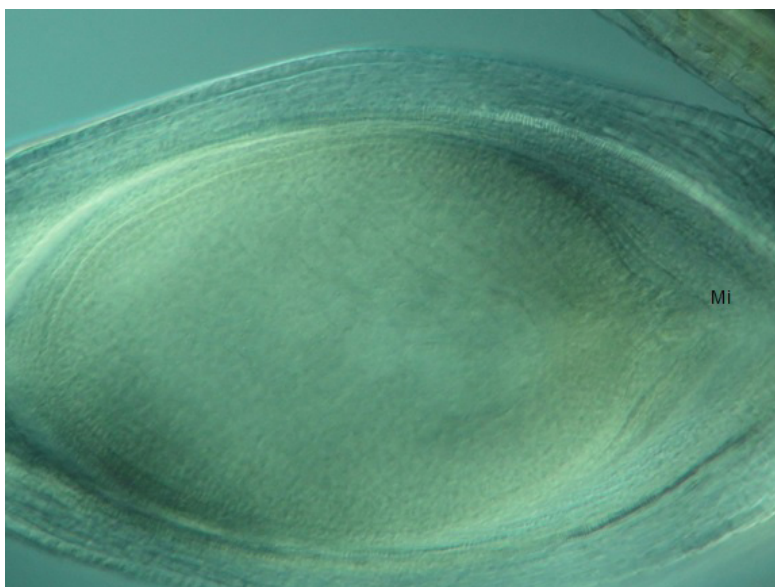


Figura 12. Morfologia de saco embrionário estéril de *Brachiaria* (GMO3) clarificado e observado em microscópio de contraste diferencial. Aumento 400X. Mi – micrópila.

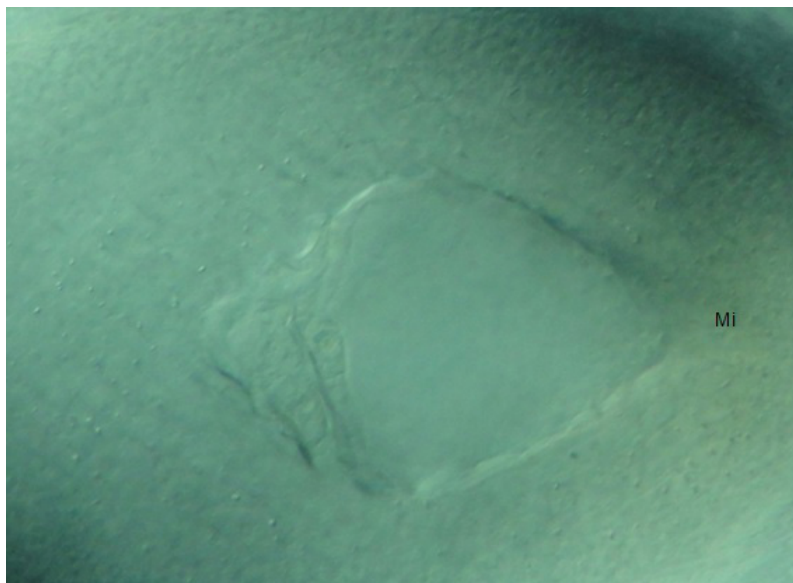


Figura 13. Morfologia de saco embrionário atrofiado de *Brachiaria* (GMO3) clarificado e observado em microscópio de contraste diferencial. Aumento 670X. Mi – micrópila.

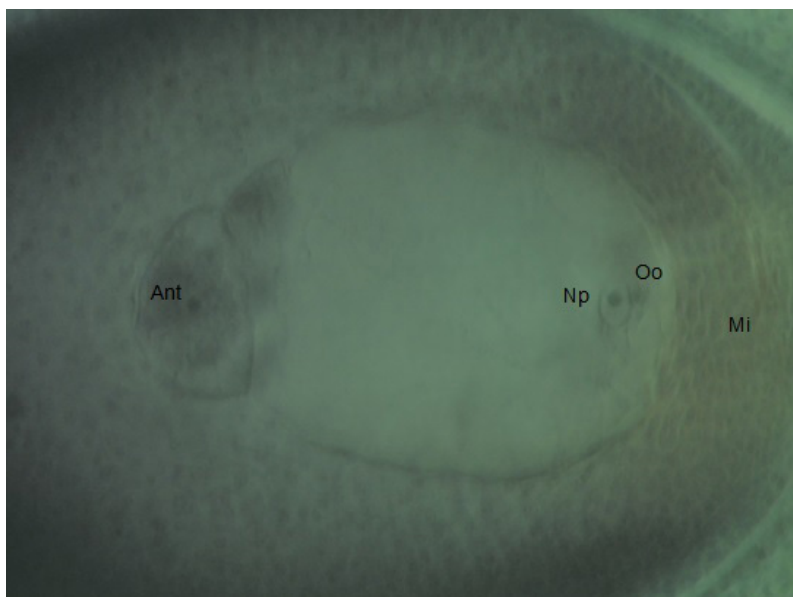


Figura 14. Morfologia de saco embrionário meiótico na cultivar apomítica de *Brachiaria* BRS Ipyporã clarificado e observado em microscópio de contraste diferencial. Aumento 1. Ant – antípodas; Np – núcleo polar; Oo – oosfera; Mi – micrópila.

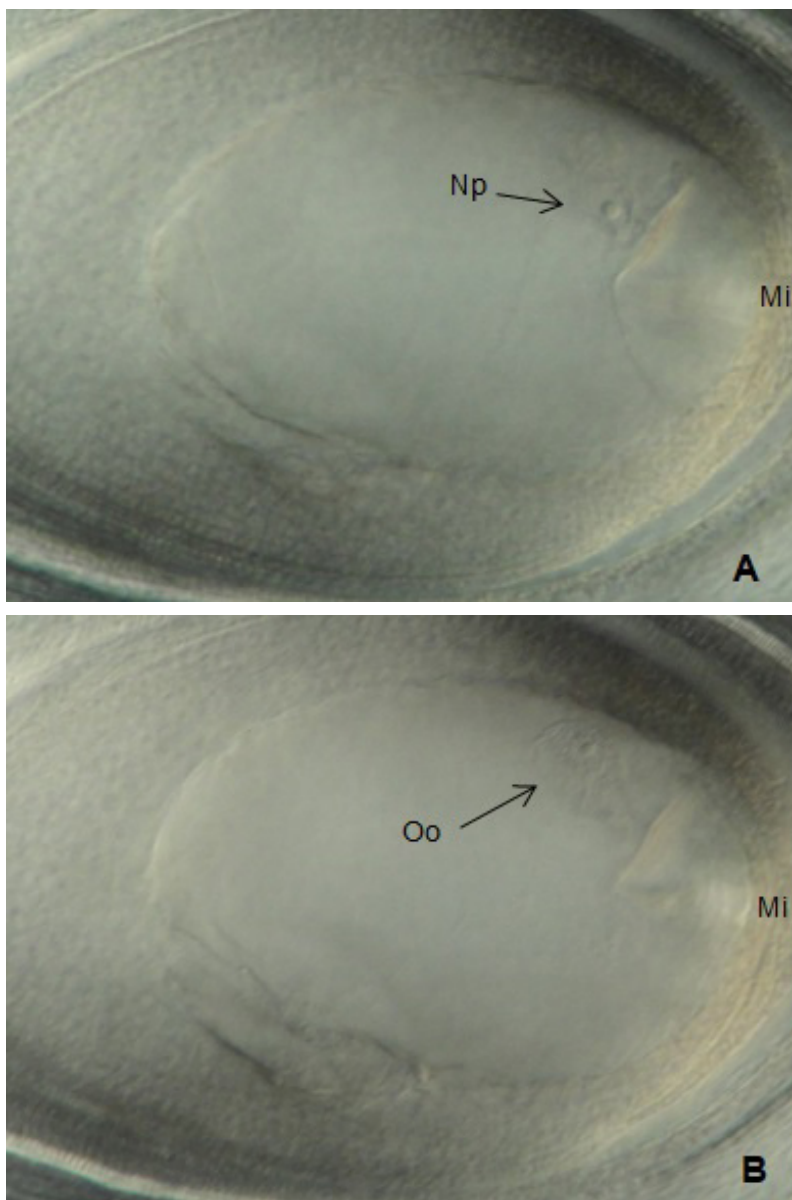


Figura 15. Morfologia de saco embrionário apospórico (A) da cultivar BRS Ipyorã clarificado e observado em microscópio de contraste diferencial. Observe que o mesmo ovário foi fotomicrografado em dois focos diferentes. A) observação de núcleos polares; B) observação da oosfera. Aumento 1.340X. Np – núcleo polar; Oo – oosfera; Mi – micrópila.

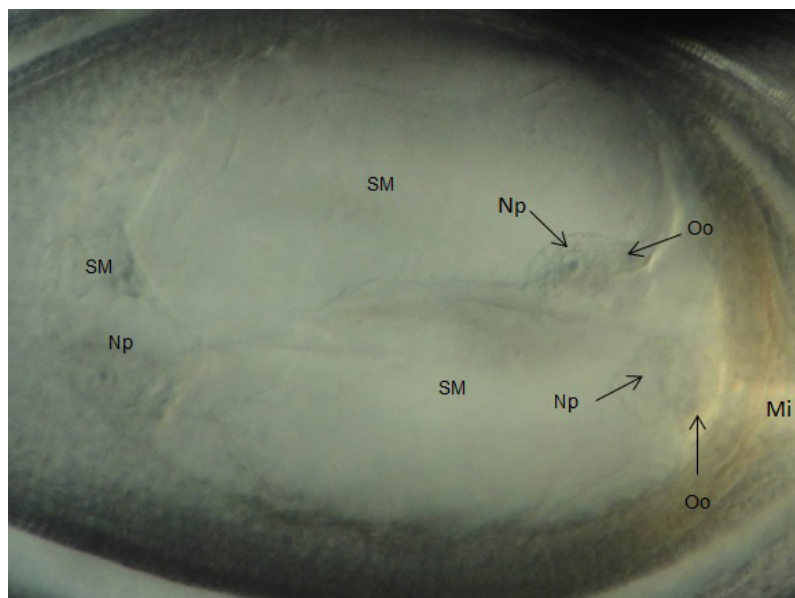


Figura 16. Morfologia de saco embrionário múltiplo da BRS Ipyorã clarificado e observado em microscópio de contraste diferencial. Aumento 1.340X. Np – núcleo polar; Oo – oosfera; Mi – micrópila; SM – saco múltiplo.

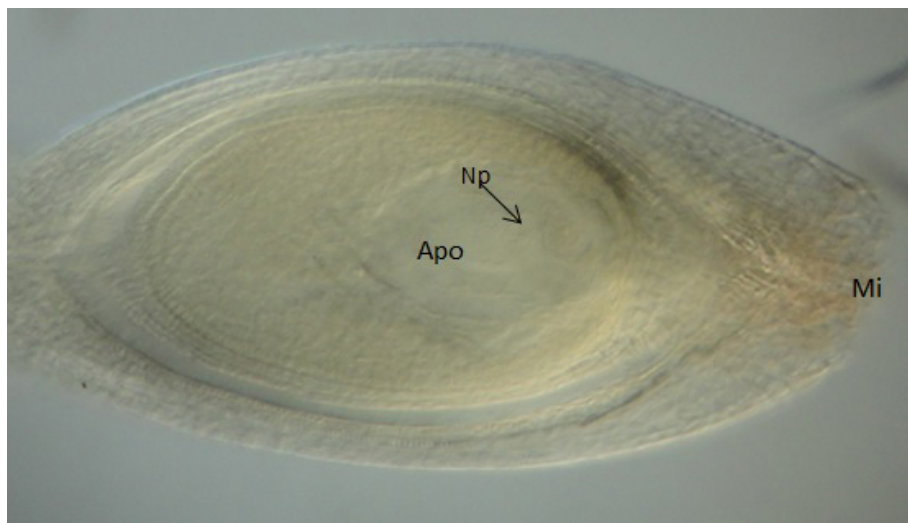


Figura 17. Morfologia de saco embrionário apospórico de *Panicum maximum* clarificado e observado em microscópio de contraste diferencial. Aumento 400X. Np – núcleo polar; oosfera; Mi – micrópila; Apo – saco embrionário apospórico.

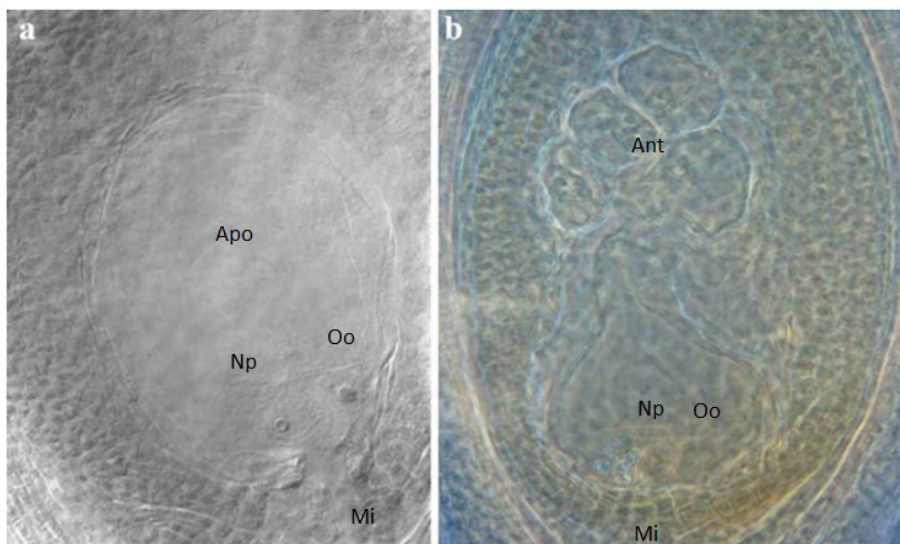


Figura 18. Ovários clarificados de *Panicum maximum*. a) saco embrionário apospórico, b) saco embrionário meiótico. Np – núcleo polar; Oo - oosfera; Mi – micrópila; Apo – saco embrionário apospórico; Ant – antípodas (KAUSHAL et al., 2008).

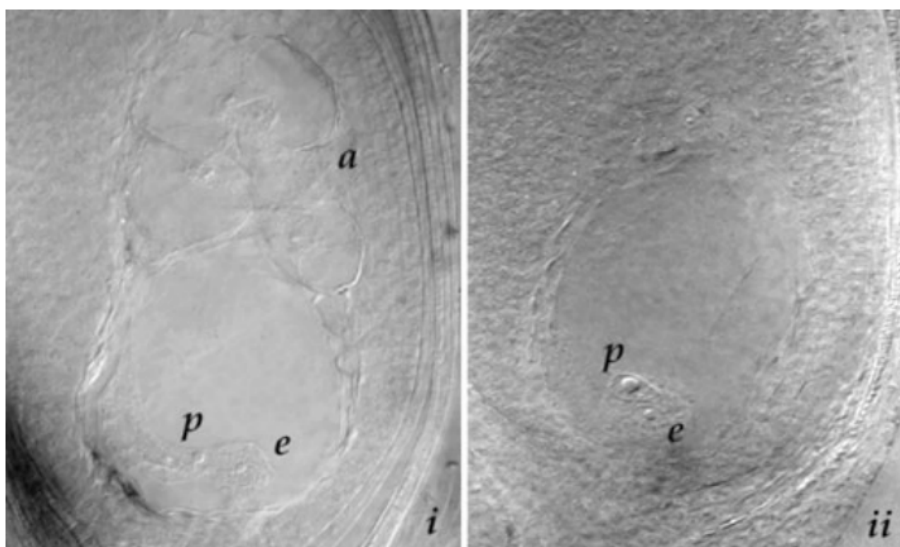


Figura 19. Sacos embrionários clarificados de *Panicum maximum*. a) saco embrionário meiótico típico, b) saco embrionário apospórico p – núcleo polar; e - oosfera; a – antípodas (KAUSHAL et al., 2009).

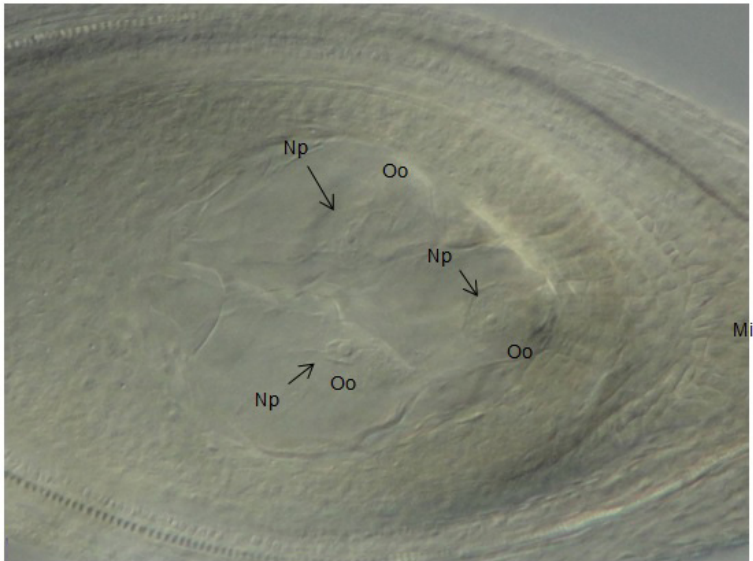


Figura 20. Ovário clarificado de *Panicum maximum* mostrando sacos múltiplos. Np – núcleo polar; Oo - oosfera; Mi – micrópila.

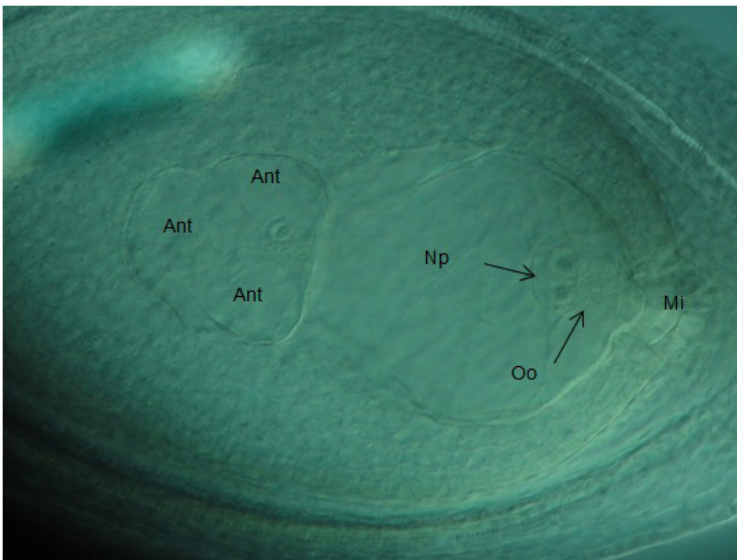


Figura 21. Morfologia de saco embrionário sexual de *Panicum maximum* clarificado e observado em microscópio de contraste diferencial. Ant – antípodas; Nps – núcleos polares; Oo – oosfera; Mi – micrópila.

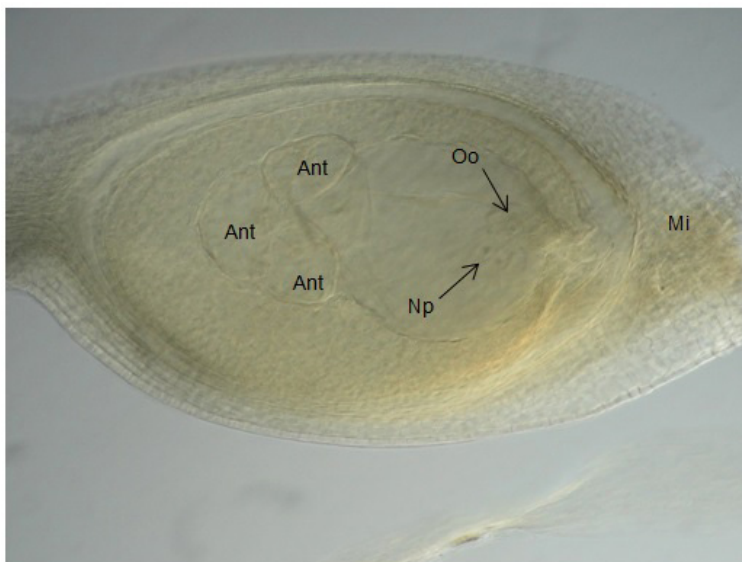


Figura 22. Morfologia de saco embrionário sexual de *Panicum maximum* clarificado e observado em microscópio de contraste diferencial. Ant – antípodas; Np – núcleo polar; Oo – oosfera; Mi – micrópila.

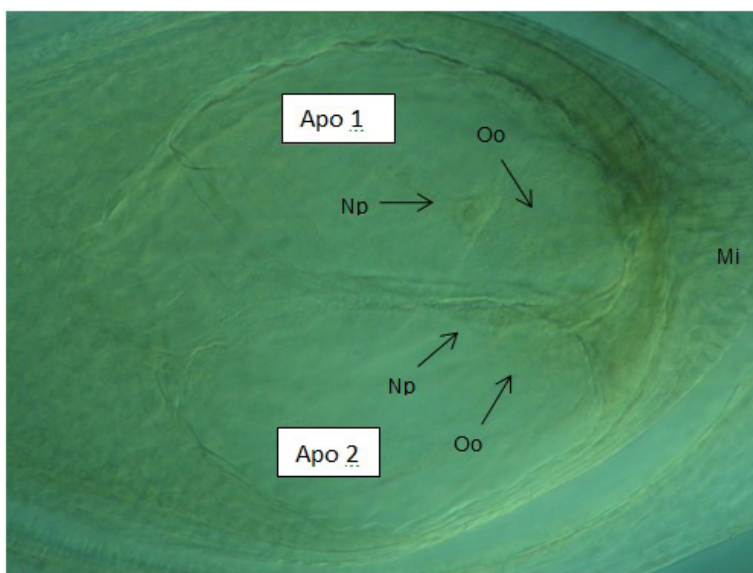


Figura 23. Morfologia de saco embrionário múltiplos de *Panicum maximum* clarificado e observado em microscópio de contraste diferencial. Np – núcleo polar; oosfera; Mi – micrópila; Apo – saco embrionário apospórico.

Referências

- ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne). Perfil da Pecuária no Brasil, relatório anual. 2019 Disponível em: <>. Acesso em: 20/05/2019.
- ANDERSON, W. F.; DIEN, B. S.; BRANDON, S. K.; PETERSON, J. D. Assessment of bermudagrass and bunch grasses as feedstock for conversion to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.145, n. 1, p. 13–21, 2008.
- ARAUJO, A. C. G.; FALCAO, R.; SIMÕES, K. C. R.; CARNEIRO, V. T. C. Identificação de acessos de *Brachiaria* com interesses ao estudo da apomixia facultativa. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2004, 29 p.
- BITENCOURT, G. A.; CHIARI, L.; VALLE, C. B. DO. Avaliação de híbridos por meio de marcadores RAPD e identificação do modo de reprodução pela anatomia de sacos embrionários em *Brachiaria humidicola*. **Ensaios e Ciência**, v. 16, p.59-70, 2012.
- BLUMA-MARQUES, A.C.; CHIARI, L.; AGENS, D.C.; JANK, L.; PAGLIARINI, M.S. Molecular markers linked to apomixis in *Panicum maximum* Jacq. **African Journal of Biotechnology**, v.13, n.22, pp.2198-2202.
- CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. de A. Apomixia: Em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasileira, v. 25, março-abril, p. 36-42, 2002.
- CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A.; ORTIZ, J. P. A. **Apomixis: Occurrence, applications and improvements**. In: Teixeira da Silva JA, Ed. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues. 1ed. Isleworth, UK: Global Science Books, pp. 564–571, 2006.
- Cenários para Pecuária de Corte Amazônica (CPCA), Pecuária Brasileira no mundo. Disponível em: <<http://csr.ufmg.br/pecuaria/portfolio-item/pecuaria-brasileira-no-mundo-2/>>. Acesso em 18 de dezembro de 2017.
- CUTLER, D. F.; BOTHA, T.; STEVENSON, D. W. *Anatomia vegetal - uma abordagem aplicada*. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **R. Bras. Agrociência**, v.11, n. 2, p. 127-133, 2005.
- DIEN, B. S.; JUNG, H. J. G.; VOGEL, K. P.; CASLER, M. D.; LAMB, J. F. S.; ITEN, L.; MITCHELL, R. B.; SARATH, G. Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. **Biomass Bioenergy**, v.30, p. 880–891, 2006.
- DOMINGUES, J.L. Uso de volumosos conservados na alimentação de equinos. **R. Bras. Zootec.**, v.38, p.259-269, 2009.
- FARMNEWS (2017), Online, disponível em <http://www.farmnews.com.br/analises-mercado/produtores-de-carne-bovina/> acesso em dezembro de 2017.

FUCHS, L.K.; JENKINS, G.; PHILLIPS, D.W. Anthropogenic Impacts on Meiosis in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, a1429, 2018

GONZALEZ-HERANDEZ, J. L.; SARATH, G.; STEIN, J. M.; OWENS, V.; GEDYE, K.; BOE, A. A multiple species approach to biomass production from native herbaceous perennial feedstocks. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, n. 45, p. 267–281, 2009.

HAND, M.L.; KOLTUNOW, A.M. The genetic control of apomixis: asexual seed formation. **Genetics**, v. 197, n. 2, p. 441-50, 2014.

KANDEMIR N, SAYGILI I. Apomixis: new horizons in plant breeding. **Turk J Agri Forestry**, v.39, n. 1, p. 549-556, 2015.

KARASAWA, M.M.G. Diversidade Reprodutiva de Plantas. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética – SBG, 2009. 113 p.

KAUSHAL, P., A. AGRAWAL, D. R. MALAVIYA, S. A. SIDDIQUI AND A. K. ROY. Ploidy manipulation in guinea grass (*Panicum maximum* Jacq., *Poaceae*) utilizing a Hybridization-supplemented Apomixis-components Partitioning Approach (HAPA). **Plant Breed**, v. 128: 295-303, 2009.

KAUSHAL, P.; MALAVIYA, D. R.; ROY, A. K.; PATHAK, S.; AGRAWAL, A.; KHARE, A.; SIDDIQUI, S. A. Reproductive pathways of seed development in apomictic guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) reveal uncoupling of apomixis components. **Euphytica**, n.164, p.81–92, 2008.

KUMAR, S. Epigenetic Control of Apomixis: A New Perspective of an Old Enigma. **Adv Plants Agric Res**, v. 7, n. 1, p.243-247, 2017.

KUMAR, S.; SAXENA, S. Sequence characterized amplified regions linked with apomictic mode of reproduction in four different apomictic *Cenchrus* species. **Molecular Plant Breeding**, v.7, p.1-14, 2016.

KUMAR, S.; SAXENA, S.; GUPTA, M. G. Marker-assisted screening of breeding populations of an apomictic grass *Cenchrus ciliaris* L. segregating for the mode of reproduction. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.**, v. 17, n. 1, p. 10-17, 2017.

LIMA, J. A. de; CUNHA, E. A. da Produção de feno de capim-elefante em pequena escala. 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Feno_Elefante/index.htm>. Acesso em: 20/12/2017

MAHESHWARI S.C., MAHESHWARI N., KHURANA J.P., AND SOPORY S.K. Engineering apomixis in crops: A challenge for plant molecular biologists in the next century, **Curr. Sci**, v. 75, n.1, p. 1141–114, 1998.

OHKURA, H. Meiosis: An overview of key differences from mitosis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 7: a015859, 2015.

ROCHA, A. M, SILVA, M. A; FERNANDES, F. M.; PAULILLO, L. C. M. S.; TORRES, L. A. Prospecção tecnológica do capim elefante e sua relevância como matéria-prima para a produção energética. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 1, n. 2, p.475-499, 2017.

SAVIDAN, Y. H. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). In: Proceedings of the 14th International Grassland Congress, Lexington, USA, pp.182-184, 1983.

SAVIDAN, Y. H. Transfer of apomixis through wide crosses. In **The flowering of Apomixis: from Mechanisms to Genetic Engineering**. Savidan, Carman and Dresselhaus Editors. Chapter 11, p. 153-167, 2001.

SAVIDAN, Y. H.; VALLE, C. B. DO. Amélioration génétique des graminées fourragère tropicales. In: Guy Roberge; Bernard Toutain, eds.. (Org.). **Cultures fourragères tropicales**. Montpellier: La Librairie du CIRAD, 1999, v. , p. 53-68.

SILVA, M. P.; AMARAL, Jr. A.T.; PEREIRA, M. G.; RODRIGUES, R.; DAHER, R.F.; POSSE, S.C.P. Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, n. 3, p. 531-539, 2005.

VALLE, C. B. DO; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, p.460-472, 2009.

YOUNG, B. A.; SHERWOOD, R. T.; BASHAW, E. C. Cleared-pistyl and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1668-1672, 1979.

WORTHINGTON, M.; HEFFELFINGER, C.; BERNAL, D. ; QUINTERO, C.; ZAPATA, Y.P.; PEREZ, J.G.; VEGA, J.; MILES, J.; DELLPORTE, S.; TOHME, J. A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. **Genetics**, v. 203, p.1117–1132, 2016.

Embrapa

Gado de Corte



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE 15544