

Estimativa do Tamanho do Genoma
em Cultivares de Capim-Andropogon
(*Andropogon gayanus* Kunth)



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
372**

**Estimativa do Tamanho do Genoma
em Cultivares de Capim-Andropogon
(*Andropogon gayanus* Kunth)**

Marco Pessoa-Filho
Ana Luisa Sousa Azevedo
Allan Kardec Braga Ramos
Marcelo Ayres Carvalho
Carlos Eduardo Lazarini da Fonseca

Exemplar desta publicação disponível gratuitamente
no link: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/?initQuery=t>
(Digite o título e clique em "Pesquisar")

Embrapa Cerrados
BR 020, Km 18, Rod. Brasília / Fortaleza
Caixa Postal 08223
CEP 73310-970, Planaltina, DF
Fone: (61) 3388-9898
Fax: (61) 3388-9879
embrapa.br/cerrados
embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade

Presidente
Lineu Neiva Rodrigues

Secretária-executiva
Alessandra Duarte de Oliveira

Secretária
Alessandra S. G. Faleiro

Membros
Alessandra Silva Gelape Faleiro; Alexandre Specht; Edson Eyji Santo; Fábio Gelape Faleiro; Gustavo José Braga; Jussara Flores de Oliveira Arbues; Kleberson Worsley Souza; Maria Madalena Rinaldi; Shirley da Luz Soares Araújo

Supervisão editorial
Jussara Flores de Oliveira Arbues

Revisão de texto
Jussara Flores de Oliveira Arbues

Revisão de abstract
Margit Bergener L. Guimarães

Normalização bibliográfica
Shirley da Luz Soares Araújo

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Leila Sandra Gomes Alencar

Fotos da capa
Allan Kardec Braga Ramos

1ª edição
1ª impressão (2021): tiragem 30 exemplares

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 Cerrados

E81 Estimativa do tamanho do genoma em cultivares de capim-andropogon
(*Andropogon gayanus* Kunth / Marco Pessoa-Filho... [et al.]. – Planaltina, DF
: Embrapa Cerrados, 2021.

13 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN
1676-918X, ISSN online 2176-509X, 372).

1. Forrageira. 2. Pastagem. 3. Citometria de fluxo. I. Pessoa-Filho, Marco.
II. Embrapa Cerrados. III. Série.

CDD (21 ed.) 633.2

Sumário

Resumo5

Abstract6

Introdução.....7

Material e Métodos8

Resultados e Discussão9

Conclusões.....11

Agradecimentos.....11

Referências12

Estimativa do Tamanho do Genoma em Cultivares de Capim-Andropogon (*Andropogon gayanus* Kunth)

Marco Pessoa-Filho¹

Ana Luisa Sousa Azevedo²

Allan Kardec Braga Ramos³

Marcelo Ayres Carvalho⁴

Carlos Eduardo Lazarini da Fonseca⁵

Resumo – Experimentos de montagem de genomas dependem de estimativas iniciais do conteúdo de DNA nuclear de uma espécie alvo. A citometria de fluxo é uma ferramenta de baixo custo, utilizada em rotina, para estimar o tamanho do genoma a partir do conteúdo de DNA nuclear de plantas. O capim-andropogon (*Andropogon gayanus* Kunth) é uma gramínea perene, tetraploide ($2n = 4x = 40$), resistente a solos de baixa fertilidade e com baixa disponibilidade hídrica. Há potencial de dinamização do processo de desenvolvimento de cultivares pelo uso de ferramentas genômicas. O tamanho do genoma de três cultivares de capim-andropogon foi estimado por citometria de fluxo. O tamanho médio estimado para o genoma haploide de capim-andropogon foi de 1,5 Gpb C⁻¹ e 770 Mpb Cx⁻¹. Os resultados obtidos neste trabalho são inéditos para cultivares dessa espécie e guiarão os esforços de sequenciamento para montagem do seu genoma.

Termos para indexação: citometria de fluxo, DNA nuclear, forrageira, pastagem.

¹ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

² Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento, pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

⁴ Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Agronomia, pesquisador da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

⁵ Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Melhoramento de Plantas e Biometria, pesquisador da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

Title: Genome Size Estimation in Gamba Grass Cultivars (*Andropogon gayanus* K.)

Abstract – Genome assembly projects depend on reliable estimates of nuclear DNA content for a target species. Flow cytometry is routinely used as a low-cost method for analyses of nuclear DNA content in plants. Gamba grass (*Andropogon gayanus* Kunth) is a tetraploid ($2n = 4x = 40$) perennial grass resistant to low fertility soils with limited water supply. The gamba grass breeding program at Embrapa Cerrados has selected genotypes during the last decade with a focus on plant architecture, leaf/culm ratio, tillering, dry matter yield and nutritional quality. Cultivar releases of the breeding program could potentially take place quicker with the use of genomic tools. The genome sizes for three gamba grass cultivars were estimated by flow cytometry. The mean haploid genome size for gamba grass was 1.5 Gbp C^{-1} and 770 Mbp Cx^{-1} . Results of this study will lead genome assembly efforts for gamba grass.

Index terms: flow cytometry, nuclear DNA, forage, pasture.

Introdução

O planejamento de experimentos para montagem de genomas pode se beneficiar de estimativas iniciais do conteúdo de DNA nuclear. Boas estimativas do seu tamanho permitem planejamentos prévios adequados, relacionados aos esforços necessários para o sequenciamento, quanto à cobertura recomendada e à previsão de custos financeiros e computacionais para determinada espécie alvo. A complexidade de um genoma não se restringe ao seu tamanho em pares de base (pb). As proporções de conteúdo repetitivo, a ploidia, e os níveis de heterozigosidade de um genoma são complicadores adicionais que podem tornar a execução de projetos genoma mais ou menos complexa. Estimativas do tamanho de genomas também podem fornecer informações valiosas para estudos filogenéticos e como critério de seleção de materiais para cruzamentos em programas de melhoramento (Ishigaki et al., 2010).

A citometria de fluxo é uma ferramenta utilizada para medir características químicas e físicas de uma amostra de células ou partículas celulares (Picot et al., 2012). Entre suas diversas aplicações, a quantificação do conteúdo de DNA tem sido usada em rotina como metodologia de baixo custo para análise do conteúdo de DNA nuclear em plantas (Dolezel, 2003; Dolezel et al., 2007). A preparação de amostras é rápida e os reagentes utilizados são de baixo custo (Dolezel et al., 2007).

O capim-andropogon (*Andropogon gayanus* Kunth) é uma gramínea perene, resistente a solos de baixa fertilidade e a ambientes com baixa disponibilidade hídrica. É uma forrageira alógama, rústica, resistente à cigarrinha das pastagens e com boa rebrota ao final do período seco (Fonseca et al., 2020). O programa de melhoramento de capim-andropogon na Embrapa Cerrados tem avançado a seleção de materiais, nos últimos 10 anos, com foco em arquitetura da planta, relação folha/haste, capacidade de perfilhamento, produtividade e qualidade nutricional da forragem. Há potencial de dinamização do processo de desenvolvimento de cultivares pelo uso de ferramentas genômicas (Pereira et al., 2018). Entretanto, não há nenhuma informação disponível quanto ao genoma da espécie, com exceção de caracterizações citogenéticas realizadas nos anos de 1980 (Okoli; Olorode, 1983). Iniciativas para o desenvolvimento e uso de recursos genômicos serão beneficiadas por uma base mínima de conhecimento sobre a complexidade do genoma da espécie.

Com o intuito de ampliar o conhecimento básico acerca do genoma do capim-andropogon, este trabalho estabeleceu as primeiras estimativas de tamanho do genoma de cultivares de *Andropogon gayanus*, avaliados por citometria de fluxo.

Material e Métodos

Material vegetal

As amostras provieram de três cultivares de *Andropogon gayanus* desenvolvidas pela Embrapa: Planaltina, Baetí e BRS Sarandi (cultivar criada pela Embrapa Cerrados). Para cada cultivar, cinco folhas foram coletadas de três plantas mantidas nos Campos Experimentais da Embrapa Cerrados (Planaltina, DF, Brasil, 15° Sul; 47° Oeste), cultivadas em parcelas constituídas por oito plantas. As folhas foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas em gelo durante o transporte.

Citometria de fluxo

Tecido foliar das plantas de cada cultivar e de um padrão interno (*Raphanus sativus* cv. Saxa, 2C= 1.11 pg, (Dolezel et al., 1998)) foram cortados com uma lâmina de bisturi estéril e armazenados em uma placa de Petri mantida no gelo. Aproximadamente 1 cm² de tecido foliar jovem foi utilizado para o preparo de suspensões nucleares, de acordo com Dolezel et al. (2007). As amostras de tecido foram embebidas em 1 mL de tampão de extração LB01 pH 7,5 (Tris 15 mM, Na₂EDTA 2 mM, espermina 0,5 mM, KCl 80 mM, mercaptoetanol 15 mM, e Triton X-100 0,1% (v/v)) (Dolezel et al., 1989) e picadas com uma lâmina de bisturi. Amostras em suspensão foram filtradas em uma malha de náilon de 40 µm (CellTrics, PARTEC) e acrescidas de 25 µL de iodeto de propídio (1 mg/mL) e 25 µL de RNase (1 mg/mL). As medidas de intensidade de fluorescência foram tomadas em um citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences, EUA). Para cada amostra, 10 mil eventos foram avaliados e três análises em réplica foram realizadas para cada cultivar. Os histogramas obtidos foram analisados utilizando-se o software livre Flowing, disponibilizado no endereço <http://www.flowingsoftware.com> (Flowing Software, 2020). O valor 2C em picogramas (pg), que corresponde ao conteúdo de DNA do con-

junto cromossômico completo de uma célula em fase G1 do ciclo celular, foi calculado a partir da relação linear entre sinais de fluorescência de núcleos corados de amostras desconhecidas e aqueles do padrão de referência.

A conversão dos valores de 2C em pares de bases (pb), correspondentes ao conteúdo do genoma nuclear haploide (C^{-1}), foi realizada de acordo com a fórmula [Tamanho de genoma (Mpb) = Valor 2C (pg) x 980 Mpb]/2, ou seja, assumindo 1 pg = 980 Mpb (Dolezel, 2003). O conteúdo do genoma nuclear monoploide (Cx) corresponde à metade do holoploide ($2n=4x$).

Resultados e Discussão

A citometria de fluxo é uma ferramenta acurada, eficiente e de fácil uso para estimativa de conteúdo de DNA nuclear (Ishigaki et al., 2010). Segundo Ochatt (2008), ela é essencial para a compreensão dos mecanismos e processos fundamentais subjacentes ao crescimento, desenvolvimento e função das plantas. Na Figura 1, mostra-se um dos histogramas resultantes da análise por citometria de fluxo, com três picos distintos. Os dois primeiros picos, G1 e G2, representam os picos dos núcleos do padrão de referência utilizado, que foi o rabanete (*Raphanus sativus* cv. Saxa). O terceiro pico, G1 *Andropogon*, refere-se aos núcleos das amostras de *Andropogon gayanus*.

Na Tabela 1, mostram-se as estimativas de conteúdo de DNA nuclear e tamanho de genoma para os três genótipos avaliados. Os tamanhos de genoma são expressos em função do número de cromossomos n (C, ou tamanho de genoma holoploide) e pelo conjunto haploide x (Cx ou tamanho de genoma monoploide). Os três genótipos apresentaram uma estimativa média de tamanho de genoma de 1,5 Gpb, sem diferenças significativas entre eles. Quando expresso em Cx (monoploide), o valor médio aproximado foi de 770 Mpb. O número de cromossomos relatado para *A. gayanus* var. *bisquamulatus* é $2n = 4x = 40$ (Okoli; Olorode, 1983), com sugestões de que os indivíduos poliploides da espécie são alotetraploides, originados a partir da hibridização entre *A. gayanus* e *A. tectorum* diploides ($2n = 20$) (Foster, 1962). A confirmação da estabilidade na quantidade de DNA entre as cultivares de capim-andropogon reforça o conhecimento prévio acerca de suas origens (cvs. Baetí e BRS Sarandi derivadas da cv. Planaltina), da poliploidia na espécie e fornece embasamento teórico para o direcionamento de cruzamentos entre cultivares que favoreçam o desenvolvimento do programa de melhoramento.

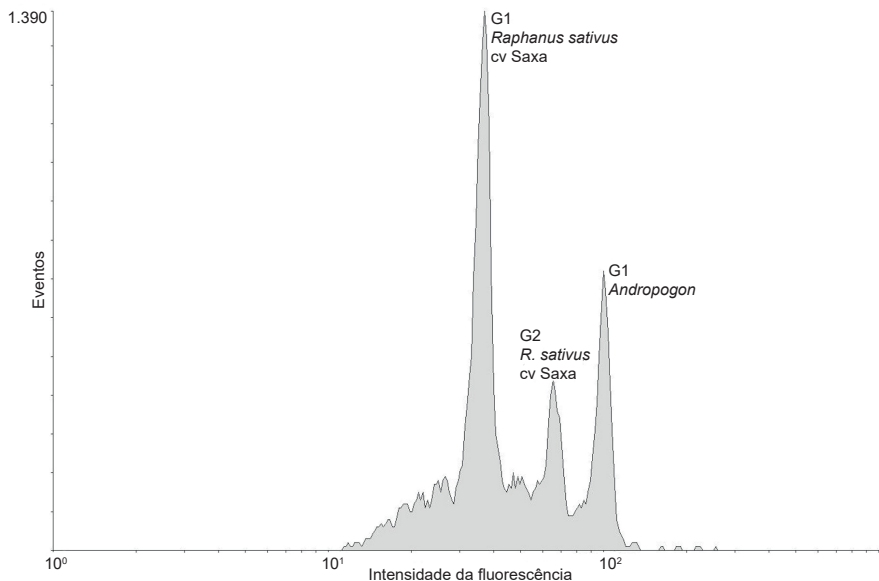


Figura 1. Medidas de intensidade de fluorescência de capim-andropogon (*Andropogon gayanus*) e rabanete (*Raphanus sativus*), obtidas em citômetro de fluxo. O pico G1 *Andropogon* corresponde ao conteúdo de DNA nuclear de capim-andropogon. Os picos G1 e G2 *Raphanus sativus* cv. Saxa correspondem ao padrão de referência utilizado.

Tabela 1. Conteúdos de DNA nuclear e tamanhos do genoma de cultivares de capim-andropogon (*Andropogon gayanus*) expressos em função do conteúdo holoploide (C^{-1}) e monoploide (Cx^{-1}).

Cultivar	Média pg ⁽¹⁾ (2C)	Mpb ⁽²⁾ C^{-1}	Mpb ⁽²⁾ Cx^{-1}
Planaltina	3,13 ± 0,04	1.534 ± 19,6	767 ± 9,8
Baetí	3,16 ± 0,03	1.548 ± 14,7	774 ± 7,4
BRS Sarandi	3,20 ± 0,13	1.568 ± 63,7	784 ± 31,9

⁽¹⁾ pg = picograma = 10^{-12} g

⁽²⁾ Mpb = 10^6 pares de bases

Outras espécies cultivadas da tribo Andropogoneae apresentam tamanhos de genoma que variam de 772 Mpb em sorgo (*Sorghum bicolor*) (Arumuganathan e Earle, 1991); 2,5 Gpb em milho (Schnable et al., 2009); 5,3 Gpb em *Miscanthus sinensis* (Rayburn et al., 2009); até 10 Gpb em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (Garsmeur et al., 2018). Para fins comparativos, espécies de braquiária, pertencentes ao principal gênero de gramíneas forra-

geiras cultivadas no Brasil (*Urochloa*, tribo Paniceae), tiveram estimativas de tamanho de genoma com base em citometria de fluxo, relatadas por Ishigaki et al. (2010), com valores variando de 615 Mpb para *U. ruziziensis* (diploide); 1,4 Gpb para *U. brizantha* Marandu; 1,6 Gpb para *U. decumbens* Basilisk (tetraploides); e 1,9 Gpb para *U. humidicola* (hexaploide). No próprio gênero *Andropogon*, estimativas para *Andropogon gerardii* hexaploide ($2n = 60$) tiveram um valor médio $2C$ de 7,46 pg, o que corresponde a um tamanho de genoma de 3,6 Gpb (Keeler, 1992; Keeler et al., 1987).

Por ter modo de reprodução sexuada e ser alógama, com relatos na literatura de forte depressão por endogamia (Foster, 1962), é possível que *A. gayanus* tenha um genoma complexo, com alto nível de heterozigiosidade. Aliada à poliploidia, a possível alta heterozigiosidade implicará que esforços de montagem de genoma não serão triviais e demandarão a aplicação de uma combinação de tecnologias para a obtenção de uma montagem de boa qualidade. Como exemplo, o uso de sequenciamento de terceira geração baseado em longos fragmentos de DNA, aliado a mapas de captura de conformação de cromossomos (Hi-C), são alternativas hoje acessíveis aos grupos de pesquisa (Pessoa-Filho, 2019). A expectativa, no médio prazo, é de disponibilidade de painéis de genotipagem baseados em variantes simples (SNPs), customizados para aplicações como confirmação de cruzamentos, detecção de contaminações em famílias de meios-irmãos, estudos de associação para descoberta de regiões genômicas associadas a características de interesse para o programa de melhoramento e seleção genômica para diminuição no tempo dos ciclos de seleção, com consequente aumento nas taxas de ganho genético. Uma base bem estabelecida por um genoma de referência de qualidade possibilitará a composição de bancos de dados amplos de variantes, permitindo, com a seleção criteriosa de SNPs de qualidade, a composição de arranjos de genotipagem para uso no programa de melhoramento genético do capim-andropogon.

Conclusão

Não há diferenças significativas no tamanho do genoma dos três cultivares de capim andropogon estimados com o uso de citometria de fluxo. Os resultados relativos às estimativas de conteúdo de DNA nuclear e de tamanho de genoma guiarão futuros esforços de sequenciamento para mon-

tagem do genoma de *A. gayanus*, como base para o desenvolvimento e o uso de recursos genômicos para apoio ao desenvolvimento de cultivares de capim-andropogon.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado parcialmente com recursos da Embrapa, projeto SEG 32.14.01.029.00.00.

Referências

- ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. **Plant molecular biology reporter**, v. 9, n. 3, p. 229-241, 1991.
- DOLEZEL, J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry Part A**, v. 51, n. 2, p. 127-128, 2003.
- DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2233-2244, 2007.
- DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSÁK, M. A.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, v. 82, n. Supplement A, p. 17-26, 1998.
- DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, v. 31, n. 2, p. 113-120, 1989.
- FLOWING SOFTWARE. **Flowing**. 2020. Disponível em: <http://www.flowingsoftware.com>. Acesso em: 1 dez. 2020.
- FONSECA, C. E. L. da; PESSOA FILHO, M. A. C. de P.; BRAGA, G. J.; RAMOS, A. K. B.; CARVALHO, M. A.; FERNANDES, F. D.; KARIA, C. T.; MACIEL, G. A.; ATHAYDE, N. B.; DESSAUNE, S. N. Near-infrared reflectance spectroscopy as a tool for breeding *Andropogon gayanus* Kunth for forage quality. **IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 13, n. 6, p. 57-66, 2020.
- FOSTER, W. H. Investigations preliminary to the production of cultivars of *Andropogon gayanus*. **Euphytica**, v. 11, n. p. 47-52, 1962.
- GARSMEUR, O.; DROC, G. A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2018.
- ISHIGAKI, G.; GONDO, T. EBINA, M.; SUENAGA, K.; AKASHI, R. Estimation of genome size in Brachiaria species. **Grassland Science**, v. 56, n. 4, p. 240-242, 2010.
- KEELER, K. H. Local polyploid variation in the native prairie grass *Andropogon gerardii*. **American Journal of Botany**, v. 79, n. 11, p. 1229-1232, 1992.
- KEELER, K. H.; KWANKIN, B.; BARNES, P. W.; GALBRAITH, D. W. Polyploid polymorphism in *Andropogon gerardii*. **Genome**, v. 29, n. p. 374-379, 1987.

OCHATT, S. J. Flow cytometry in plant breeding. **Cytometry Part A: The journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 73, n. 7, p. 581-598, 2008.

OKOLI, B. E.; OLORODE, O. Cytogenetic studies in the *Andropogon gayanus-a. Tectorum* complex (Gramineae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 87, n. p. 263-271, 1983.

PEREIRA, J. F.; AZEVEDO, A. L. S.; PESSOA FILHO, M. A. C. de P.; ROMANEL, E. A. da C.; PEREIRA, A. V.; VIGNA, B. B. Z.; SOUZA SOBRINHO, F. de; BENITES, F. R. G.; LEDO, F. J. da S.; BRITO, G. G. de; MEIRELES, K. G. X.; CAVALLARI, M. M.; RESENDE, R. M. S.; MACHADO, J. C. Research priorities for next-generation breeding of tropical forages in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 314-319, 2018.

PESSOA-FILHO, M. A. C. D. P. Aplicação de sequenciamento de ácidos nucleicos em espécies forrageiras. In: AZEVEDO, A. L. S.; PEREIRA, J. F.; MACHADO, J. C. (Ed.). **Melhoramento de forrageiras na era genômica**. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

PICOT, J.; GUERIN, C. L.; le van KIM, C.; BOULANGER, C. M. Flow cytometry: Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. **Cytotechnology**, v. 64, n. 2, p. 109-130, 2012.

RAYBURN, A. L.; CRAWFORD, J.; RAYBURN, C. M.; JUVIK, J. A. Genome size of three *Miscanthus* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 27, n. 2, p. 184, 2009.

SCHNABLE, P. S.; WARE, D. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. **Science**, v. 326, n. 5956, p. 1112-1115, 2009.

Embrapa

Cerrados

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



**PÁTRIA AMADA
BRASIL**
GOVERNO FEDERAL

CGPE 016816