



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CITOGENÉTICA DE
ACESSOS DE CAPIM BUFFEL (*Cenchrus ciliaris* L.)**

LÍVIA PINTO BRANDÃO

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JULHO – 2015

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CITOGENÉTICA DE ACESSOS
DE CAPIM BUFFEL (*Cenchrus ciliaris* L.)

LÍVIA PINTO BRANDÃO

Bióloga
Universidade Regional do Cariri, 2008

Tese submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Dr. Sebastião de Oliveira e Silva

Coorientador: Dr. Nataniel Franklin de Melo

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CURSO DE DOUTORADO
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

631.523 Brandão, [Lívia Pinto](#).

B 817c

Caracterização molecular e citogenética de acessos de capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.). / [Lívia Pinto Brandão](#). Cruz das Almas, 2015.

67 p., il

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Coorientador: Nataniel Franklin de Melo

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia -,
Curso de Ciências Agrárias.

1. Melhoramento genético. 2. Marcador molecular. 3. Capim Buffel –
Acesso. I. Silva, Sebastião de Oliveira (Orientador). II Universidade
Federal do Recôncavo da Bahia. III. Título

CDD21

AGRADECIMENTOS



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
LÍVIA PINTO BRANDÃO**

Membro Presidente: Prof. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva
Instituição: UFRB

Membro Interno ao Programa: Profa. Dra. Daniela Garcia Silveira
Instituição: IFBAIANO

Membro Externo à Instituição: Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Instituição: UFRB

Membro Externo ao Programa: Dra. Lucymeire Souza Morais Lino
Instituição: Embrapa

Membro Externo ao Programa: Dra. Cristina Ferreira Nepomuceno
Instituição: UFRB-PNPD

Homologada em / /

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa o fim de um ciclo de perseverança, estudo, muita dedicação e garra. Porém, é o começo de outra fase, de muita responsabilidade e infinitos estudos. Inúmeras vezes achei que não conseguiria. Mas tenho certeza que não teria conseguido sozinha. Assim, gostaria de fazer alguns agradecimentos.

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus, por ser a minha fortaleza, por dispor de saúde, paz, proporcionando-me mais uma conquista.

À minha família, que sempre me deu apoio e força, para o meu crescimento, em especial a minha mãe. E ao meu marido Igor, por tornar os meus dias mais descontraídos, pelo apoio, compreensão e incentivo.

Ao meu orientador, pesquisador Dr. Sebastião de Oliveira e Silva, pela oportunidade da orientação, compreensão e presteza para solucionar todos os contratemplos, que não foram poucos.

Ao meu coorientador, pesquisador Dr. Nataniel Franklin de Melo pelos ensinamentos, paciência e por aceitar que esse trabalho fosse realizado sobre sua supervisão, mesmo diante das circunstâncias da limitação do tempo.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de realização do curso, e a amiga Marciene pela amizade sincera e por toda ajuda.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de um crescimento intelectual e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias.

À (Capes) pela concessão da bolsa de estudo. .

À Embrapa Mandioca e Fruticultura e a Embrapa semiárido, pelo apoio institucional e por permitir a realização do trabalho.

Aos colegas que quando podiam nos auxiliavam no laboratório, Thamires, Katherine, Maiany, Airla, Hugo, Roberta, Jessica, Angélica, Larisse e em especial a Ângela (pelos ensinamentos técnicos), a Micaele, por a enorme ajuda e dedicação no momento que mais precisei, peça importante para que diante de toda correria eu obtivesse algum resultado. A Francisco e aos demais colegas de trabalho do laboratório de biotecnologia.

Aos colegas do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa mandioca e fruticultura, que muitas vezes, se compadeceram de minha situação, sem obter

Nenhum resultado, se dispondo caso precisasse de ajuda. Apesar de não ter finalizado minha tese com os trabalhos iniciados nesse laboratório sou grata a todos vocês. A Dra Janay e Edson Perito pela oportunidade de coorientação, durante o desenvolvimento do primeiro projeto. Apesar da necessidade de mudança de projeto devido à falta de resultados, sou muito agradecida a vocês.

Ao pesquisador Dr. Onildo Nunes de Jesus pela colaboração nas análises estatísticas. Obrigada pela presteza. A pesquisa precisa de profissionais do seu perfil.

Aos queridos amigos, Cleilton, Ronilze, Vanessa, Rafaella e Marciene pela convivência agradável, amizade sincera e momentos de estudos durante o curso.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desta tese.

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO..... 1

Capítulo 1

Uso de marcadores ISSR para estimar a diversidade genética entre acessos de capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.)..... 11

Capítulo 2

Variabilidade citogenética em acessos de capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.)..... 26

Capítulo 3

Avaliação preliminar de apomixia em acessos de capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) por meio de marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*)..... 40

CONSIDERAÇÕES FINAIS 55

Anexo..... 57

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CITOGENÉTICA DE ACESSOS DE CAPIM BUFFEL (*Cenchrus ciliaris* L.)

Autora: Lívia Pinto Brandão

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Coorientador: Nataniel Franklin de Melo

Resumo: O capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L) é uma planta forrageira de grande importância na região semiárida do nordeste brasileiro. Possui ampla variabilidade citogenética quanto ao número cromossômico. Objetivou-se estudar a diversidade genética utilizando marcadores moleculares ISSR, assim como, realizar a caracterização citogenética de 11 acessos de capim buffel e identificar acessos apomíticos com o uso de marcador molecular SCAR em acessos de capim buffel do BAG da Embrapa Semiárido. Os 10 primers ISSR utilizados em 30 acessos, produziram um total de 75 bandas, sendo 72 polimórficas e 3 monomórficas. Os valores de dissimilaridade genética variaram de 0,19 a 0,78. O método UPGMA agrupou os acessos em sete grupos. Os acessos 617 e Buchuma conosite foram mais dissimilares e 138 e 141 os menos dissimilares. Para o experimento de citogenética todos os 11 acessos de *C. ciliaris* apresentaram $2n=36$. Entretanto, em uma mesma raiz analisada foi possível observar algumas células com $2n=30$ no acesso 433, $2n=32$ no acesso 6, $2n=34$ nos acessos 7754, Áridus, Gayndah, Grei e Biloela, e $2n=42$ no acesso 617, indicando a ocorrência de polissomatia. Os padrões eletroforéticos dos marcadores SCARs revelaram, fragmento com tamanho de 100 (20G), 300 (19G) e 600 (OPF08-600) pb. O primer OPF08-600 revelou 83%, o primer 19G revelou 77% e o primer 20G, revelou que 90% de bandas indicativas de apomixia. Os marcadores ISSR foram eficientes na detecção da variabilidade genética. E a variabilidade cromossômica (polissomatia) pode está correlacionada a alta frequência de apomixia nessa espécie. Os marcadores SCARs permitiram a identificação preliminar de acessos apomíticos para uso no programa de melhoramento, embora seja mais indicado a utilização de outra técnica associada ao marcador SCAR para a identificação mais precisa de apomixia.

Palavras chave: Forrageira, ISSR, Variabilidade, Cromossomos, SCAR, Apomixia.

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND CYTOGENETIC BUFFEL GRASS OF ACCESS (*CENCHRUS CILIARIS* L.)

Author: Livia Pinto Brandão

Adviser: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-adviser: Nataniel Franklin Melo

Summary: The Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) is a forage plant of great importance in the semiarid region of northeastern Brazil. It has extensive cytogenetic variability on the chromosome number. The objective was to study the genetic diversity using molecular markers ISSR, as well as perform cytogenetic characterization of 11 Buffel grass accesses and identifying apomictic accesses using molecular marker SCAR in Buffel grass accessions of BAG Embrapa Semiarid. 10 ISSR primers on 30 accessions, produced a total of 75 bands, 72 polymorphic and monomorphic 3. The genetic dissimilarity values ranged from 0.19 to 0.78. The UPGMA method grouped the accessions into seven groups. The accesses 617 and Buchuma conosite were more dissimilar and 138 and 141 the least dissimilar. For cytogenetic experiment all 11 *C. ciliaris* accessions showed $2n = 36$. However, in the same root analyzed we observed some cells with $2n = 30$ in the access 433, $2n = 32$ in access 6, $2n = 34$ in hits 7754, aridus, Gayndah, Grey and Biloela, and $2n = 42$ in the access 617, indicating the occurrence of polissomaty. The electrophoretic patterns of the SCAR markers revealed, fragment size of 100 (20G), 300 (19G) and 600 (OPF08-600) bp. The primer OPF08-600 revealed 83%, 77% showed primer 19G and 20G primer, revealed that 90% of bands indicative of apomixis. The ISSR markers were efficient in detecting genetic variability. And the chromosomal variability (polissomaty) can correlates the high frequency of apomixis in this species. The SCAR markers allowed the preliminary identification of apomictic access for use in the breeding program, although it is the most appropriate use of another technique associated with the SCAR marker for more precise identification of apomixis.

Key words: Forage, ISSR, variability, chromosomes, SCAR, Apomixis.

INTRODUÇÃO

O capim buffel é uma Poaceae, subfamília Panicoideae, gênero *Cenchrus*, espécie *Cenchrus ciliaris* L. ou *Penissetum. cencroides* Rich (AYERSA, 1981).

É uma espécie perene, seu porte varia de 0,6 a 1,5 m de altura, dependendo da variedade ou cultivar. Possui sistema radicular fasciculado e pivotante, podendo atingir até 1,5 metros de profundidade, dependendo da variedade, rizomas medianamente desenvolvidos, permitindo maior hidratação por sua capacidade em explorar água profundas do solo (RODRIGUES et al.,1993).

As inflorescências têm a forma característica de rabo de raposa. As sementes estão fechadas em finas cerdas que ocorrem em grupo que pode conter mais de uma semente. A planta apresenta crescimento vertical, em forma cespitosa (touceira) e produzem forragem com boa palatabilidade e digestibilidade, além de possuir bom valor nutritivo e ser bem aceito pelos animais em qualquer estágio de crescimento. (OLIVEIRA, 1981 e 2005).

As cultivares de capim buffel apresentam características estruturais diferentes que possibilitam separá-las em três grupos: de porte alto, médio e pequeno. O grupo de porte alto é representado pelas cultivares Biloela, Molopo, Numbank, Boorara, Lawes, Pusa Giant e Buchuma conosite, sendo mais produtivas, apresentam altura variando de 1,0m a 1,5m. O grupo de porte médio, as plantas podem medir de 0,75m a 1,0m de altura, sendo representado pelas cultivares Gayndah, Americano, 7754 e Áridus. Já, o grupo de porte baixo apresenta altura inferior a 0,75m e tem como representante a cultivar West Australian (OLIVEIRA, 1993).

Cenchrus ciliaris, tem origem na África. No período entre 1870 e 1880 foi introduzida na Austrália, e posteriormente difundida para outros países como Estados Unidos da América, México e Argentina (AYERSA, 1981).

Para Oliveira (1993), a introdução no Brasil ocorreu em 1952 no estado de São Paulo e depois trazida para o nordeste. Sendo cultivado em todo Semiárido, que abrange parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Norte de Minas Gerais, totalizando uma área de 982.563 km² (LINS et al., 2007). No Brasil, especialmente no semiárido nordestino é considerada uma das melhores forrageiras, devido sua adaptação às

condições edafoclimáticas, seu potencial forrageiro e, principalmente, por suas características de resistência a longos períodos secos (MELO, 2010).

Na década de 70, foi criado o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de espécies forrageiras na Embrapa Semiárido (Campo Experimental Caatinga), incluindo diversos acessos de capim buffel. As introduções de capim buffel foram proveniente de diferentes locais, tais como: CSIRO - Austrália, USA - Texas A & MU, IARI - Índia, Agroceres - PE, IRI - Matão - SP, CNPGC - Embrapa Gado de Corte, Quissamã - SE e Tanzânia. Atualmente o BAG de capim buffel possui 117 acessos, preservados na unidade da Embrapa Semiárido.

Esses acessos carecem de informações básicas para dar suporte ao programa de melhoramento genético. Trabalhos para conhecer o nível de ploidia e caracterizar a diversidade genética entre os acessos estão sendo inicialmente relatados no presente estudo. Essas informações são primordiais para que se iniciem atividades com a finalidade de desenvolver cultivares com características que sejam voltadas para às necessidades locais.

A caracterização de recursos genéticos é fundamental para subsidiar estudos filogenéticos, evolutivos e taxonômicos, possibilitando o planejamento e a seleção de acessos adequados para os programas de melhoramento genético. Neste sentido, a conservação *ex situ* é fonte de reserva de genes, mas a indicação do uso desse recurso genético conservado depende da caracterização deste germoplasma. Uma forma de caracterizar germoplasma é por meio de aplicação de marcadores moleculares. O polimorfismo genético obtido via desses marcadores podem ser usados no estudo genômico comparativo e na caracterização de germoplasma (XI et al., 2008).

Com os progressos da biotecnologia, principalmente o desenvolvimento dos marcadores de DNA, têm permitido estudar e caracterizar a variabilidade genética em diferentes níveis (OLIVEIRA, 2006). Como ferramenta auxiliar indispensável, os marcadores moleculares têm sido utilizados nas distintas etapas do melhoramento genético, desde a caracterização do germoplasma até as etapas finais de desenvolvimento e seleção de plantas melhoradas (FERREIRA et al., 1998).

O marcador molecular ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), baseado em reação de PCR (*Reaction Chain Polymerase*), dentre as classes de marcadores moleculares, constitui em uma técnica simples, rápida e eficiente, desenvolvido a

partir da necessidade de explorar repetições de microssatélites abundantes no genoma eucarioto sem a utilização de sequenciamento do DNA (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

O ISSR utiliza primer de sequência simples repetitiva para amplificar regiões entre sequências alvo. Essa técnica pode ser aplicada para analisar praticamente qualquer organismo, mesmo aqueles que dispõem de pouca ou nenhuma informação genética prévia. O uso desses marcadores em plantas superiores é bem aceito por serem altamente reprodutíveis, polimórficos, e informativos, rápidos de usar e pouco onerosos (ZIETKIEWICZ et al., 1994; ARCADE et al., 2000; BORNET et al., 2002a, 2002b).

Esses marcadores podem auxiliar nas análises genéticas em *C. ciliaris*, devido à ampla variabilidade da espécie, tornando-se uma ferramenta valiosa para ações de melhoramento em busca de genótipos mais adequados ao cultivo de pastagem. Para isso, é necessário o desenvolvimento de trabalhos relativos à caracterização e avaliação para posterior seleção dos genótipos com caracteres de interesse (SANTOS et al., 2011).

A técnica molecular com os referidos marcadores possibilita o estudo de análise genética por meio do polimorfismo molecular, identificação de híbridos e caracterização de bancos de germoplasma. Em coleções onde não foi realizado nenhum estudo com marcadores moleculares, como é o caso da coleção de capim buffel da Embrapa Semiárido, esse marcador poder ser uma alternativa eficaz e de baixo custo para conhecer a diversidade genética entre os acessos.

Os produtos amplificáveis codificam pequenas regiões entre dois microssatélites similares, com aproximadamente de 100-3000 pb (pares bases). A limitação dessa classe de marcadores está relacionada ao fato de serem dominantes que impossibilita estabelecer relações alélicas entre os indivíduos (ZIETKIEWICZ et al., 1994; GODWIN et al., 1997)

O estudo da diversidade é o processo pelo qual a variação entre populações, entre grupos ou entre indivíduos de um mesmo grupo é avaliada por meio de um método específico ou pela combinação de métodos (PEREIRA et al., 2009).

Quando tomada como resultado da dissimilaridade entre indivíduos, a diversidade genética é de forma grandiosa responsável pelo sucesso de um programa de melhoramento genético. Além de obter informações sobre a

diversidade genética, é necessária para o manejo de uma espécie (SAVOLAINEN et al., 1991; MILLAR et al., 1992).

Para os programas de melhoramento de plantas, a existência de variação genética é uma condição fundamental, seja representada em acesso, em cultivar melhorada ou selvagem, pois é através do manejo dessa variabilidade que se obtém novas cultivares agronômicas superiores (BORÉM et al., 2009).

Pesquisas têm sido realizadas utilizando marcadores moleculares para estimar com eficiência a diversidade genética existente nas coleções de *C. ciliaris*. Al-Soqeer (2011), utilizou marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) e ISSR para investigar a distância genética em populações de capim buffel para na região de Al-Quassim, sendo o ISSR mais eficiente que o RAPD. Gutierrez-Ozuna et al. (2009) estudaram a diversidade genética em populações de capim buffel através de marcadores ISSR a fim de investigar a existência de variabilidade dentro e entre dezesseis populações dessa espécie no México, concluindo que, a diversidade genética era baixa entre as populações,

Outra maneira de caracterizar germoplasma é por meio das técnicas citogenéticas. Mesmo com advento da biologia molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar todo o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, passíveis de serem mensurados, diferenciados em subunidades e manipulados de diversas maneiras (GUERRA et al., 2002).

O uso da citogenética, por ser uma atividade básica, deveria ser encarado como um pré-requisito na caracterização das coleções de germoplasma. Estudo dessa natureza envolve, entre outros aspectos, a contagem do número cromossômico, determinação do nível de ploidia, avaliação do comportamento meiótico e da fertilidade de pólen entre outros (PAGLIARINI et al., 2004).

O gênero *Cenchrus* apresenta ampla diversidade cromossômica e, conseqüentemente, existem muitas dúvidas taxonômicas. Em termos numéricos, tanto a aneuploidia como a poliploidia são comuns no gênero, que apresenta o número básico sugerido de $x = (9, 10, 17, 18)$. (GIUSSANI et al., 2001; MARTEL et al., 2004; DONADIÓ et al., 2009).

Para a espécie *C. ciliaris* L. (capim buffel) tem sido relatado $x = 9$ como sendo o número cromossômico básico. O capim buffel possui três níveis de ploidia mais frequente: tetraploide ($2n = 4x = 36$), pentaploide ($2n = 45 = 5x$) e

hexaploide ($2n = 6x = 54$). Embora em menor frequência haja ocorrência de diploide ($2n = 2x = 18$). No entanto a maioria das populações naturais dessa espécie são tetraplóide. Diversos pesquisadores relatam uma grande variabilidade cromossômica a espécie, a qual é descrita como $2n = (18, 32, 34, 36, 40, 45, 52, 54, 63, 78 \text{ e } 90)$ (FISHER et al. 1954; GOULD, 1965; GOULD et al., 1970; MEHRA, 1982; JENSEN et al., 1989; KHAN et al., 1997; GIUSSANI et al., 2001; BURSON et al., 2012).

Aneuploidia é uma variação numérica muito frequente em capim buffel, que pode ocorrer em diploides, triploides, pentaploides, hexaploides e nanoploides (FISHER et al, 1954;. SNYDER et al, 1955;. MEHRA et al, 1968.; KHAN et al., 1997; RAMASWAMY et al., 1969; HIGNIGHT et al., 1991; VISSER et al., 1998a, 1998b, 1998c; KHARRAT-SOUISSI et al. 2013; BURSON et al., 2012 e 2015).

Atualmente, a utilização de marcadores moleculares ligados ao modo reprodutivo têm sido relatada em estudos de gramíneas, incluindo *C. ciliaris*. Tais marcadores baseados em DNA são eficazes em análises genéticas, citogenéticas e moleculares para identificar plantas apomíticas e sexuais. Dwivedi et al., (2007) utilizaram marcador SCAR para identificar genes ligado a apomixia, enquanto Yadav et al. (2012) realizaram estudo de associação de regiões cromossômicas com o modo reprodutivo de capim buffel (sexual e apomítico), utilizando marcadores SCAR, derivados de AFLP.

Apomixia é um modo de reprodução assexual onde o embrião se desenvolve no ovário a partir de uma célula somática do óvulo, ocorrendo formação de sementes férteis, sem haver fecundação, como ocorre na reprodução sexual (KOLTUNOW, 1993). O que resulta em uma planta com a mesma constituição genética da planta mãe.

A apomixia em plantas, já foi considerada uma barreira ao melhoramento. No entanto, este modo de reprodução tem recebido uma grande atenção devido a descobertas de plantas parcialmente apomíticas (apomíticas facultativas) em espécies cultivadas, a descoberta de plantas sexuais em espécie apomíticas e a obtenção de novas formações sobre o controle genético da apomixia (CAVALLI, 1995). Tais descobertas são de grande importância para a utilização da apomixia em programas de melhoramento.

Para Hanna (1995), a apomixia pode ter um grande impacto na produção de alimentos, forrageiras e fibras, que são propagadas por semente, em todo o

mundo. A principal vantagem da apomixia no melhoramento vegetal refere-se ao fato dos embriões apomíticos serem, via de regra, geneticamente idênticos à planta mãe. Esta situação traz grande benefício à agricultura, pois se puder introduzir a apomixia em grupos de plantas economicamente importantes, ela possibilitará imediata fixação de qualquer genótipo superior selecionado no processo de melhoramento, permitindo que o mesmo origine plantas idênticas, independente do seu grau de heterozigose ao longo das gerações via semente (HANNA & BASHAW, 1987).

Marcadores moleculares associados ao gene de apomixia facilitam não apenas a transferência do gene ligado a essa característica, como também o acompanhamento da segregação da apomixia nas gerações seguintes, quando hibridizado com uma planta sexual.

O capim buffel é uma interessante alternativa de forrageira, por ser naturalmente tolerante às condições ambientais da região por longos períodos de seca. Portanto, quando melhorada poderá acentuar essa característica, o que a transformaria em opção adequada de implantação de pastagem. Vale ressaltar que uma variedade melhorada pode induzir a aumento de produtividade e menor custo de produção, e em forrageiras, maiores índices de nutrientes que irá proporcionar melhoria na qualidade da alimentação animal na região Semiárida. Face às considerações citadas, o objetivo desse trabalho foi estudar a variabilidade genética de capim buffel com a aplicação de marcador molecular (ISSR), bem como avaliar a variabilidade citogenética dessa espécie mediante contagem e coloração diferencial com fluorocromos e por fim, identificar acessos apomíticos com o uso de marcador molecular SCAR.

REFERÊNCIAS

- Al-SOQEER, A. Genotypic diversity among wild population of buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L. Link) in –Al-Qassim Region. **Asian Journal of Biotechnology**, p. 262-268, 2011.
- ARCADE, A. F.; ANSELIN, P.; FAIVRE, R. M. C.; LESAGE, L. E.; PRAT, D. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p. 299-307, 2000.
- AYERSA, R. **El buffel grass: utilidad y manejo de uma promisoría gramínea**. Buenos Aires: Hemisfério Sul, 139 p. 1981.
- BORÉM, A.; VIEIRA, G. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Editora UFV, 5 ed., 529p, 2009.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Report**, v. 19, p. 209–215, 2002a.
- BORNET, B.; MULLER, C.; PAULUS, F.; BRANCHARD, M. High informative nature of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) sequences amplified with tri- and tetranucleotide primers from cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis L.) DNA. **Genome**, v. 45: p. 890-896, 2002b.
- BURSON, B. L., ACTKINSON, J. M.; HUSSEY, M. A.; JESSUP, R. W. Ploidy determination of buffel grass accessions in the USDA National Plant Germplasm System collection by flow cytometry. **South African Journal of Botany**, v. 79, p. 91–95, 2012.
- BURSON, B. L.; RENGANAYAKI, K.; DOWLING, C. D.; HINZE, L. L.; JESSUP, R. W. Genetic Diversity among Pentaploid Buffelgrass Accessions. **Crop science**, v 55, p 1637–1645., 2015.
- CAVALLI, S. S. Apomixia: um método de reprodução assexual. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Org.). **Genética & evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003.
- DONADIÓ, S.; GIUSSANI, L. M.; KELLOGG, E. A.; ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. A preliminary molecular phylogeny of Pennisetum and Cenchrus (Poaceae-Paniceae) based on the trnL-F, rpl16 chloroplast markers. **Taxon**, v. 58, p. 392–404, 2009.
- 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**, v. 172, p.788-795, 2007.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA–CENARGEN, 2ª ed., p.

220, 1998.

FISHER, W. D., BASHAW, E. C.; HOLT, E. C. Evidence for apomixis in *Pennisetum ciliare* and *Cenchrus setigerus*. **Agronomy journal**, v.46, p. 401–404, 1954.

GIUSSANI, L. M.; COTA-SANCHEZ, H.; ZULOAGA, F. O.; KELLOGG, E. A. A molecular phylogeny of the grass subfamily Panicoideae (Poaceae) shows multiple origins of C4 photosynthesis. **American Journal of Botany**, v.88, p. 1993–2012, 2001.

GODWIN, I. D.; AITKEN, E. A. B.; SMITH, L. W. Application of inter-simple sequence (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, v.18, p.1524-1528. 1997.

GOULD, F. W. Chromosome numbers in some Mexican grasses. **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, v.29, p. 49–62, 1965.

GOULD, F. W.; SODERSTROM, T. R. Chromosome numbers of some Mexican and Colombian grasses. **Canadian Journal of Botany**, v. 48, p.1633–1639, 1970.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo, editora FUNPEC, 131 p. 2002.

GUTIERREZ-OZUNA, R.; EGUIARTE, L. E.; MOLINA-FREANER, F. Genotypic diversity among pasture and roadside populations of the invasive buffelgrass (*Pennisetum ciliare* L. Link) in north-western Mexico. **Journal of Arid Environments**, p. 26–32, 2009.

HANNA, W. W., BASHAW, E. C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop science**, Madison, v. 27, p. 1136-1139, 1987.

HANNA, W. W. Use of apomixis in cultivar development. **Advances in Agronomy**, v. 54, p.333- 350, 1995.

HIGNIGHT, K. W.; BASHAW, E. C.; HUSSEY, M.A. Cytological and morphological diversity in apomictic buffelgrass. **Botanical Gazette**, v. 152, p.214– 218, 1991.

JENSEN, K. B.; HIGNIGHT, K.; WIPFF, K.J.; IOPB chromosome data 1. International Organization of Plant Biosystematists Newsletter, v. 13, p. 20–21, 1989.

KHAN, M. F.; EVANS, G. M. Analysis of the breeding system and of chromosome pairing at meiosis in a population of *Cenchrus ciliaris* L. from district Rawalakot, Azad Kashmir-Pakistan. **Cytologia**, Japan, v. 62, n. 1, p. 31-38, 1997.

KHARRAT-SOUISSI, A.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S. C.; CHAIEB, M. Cytogeography of *Cenchrus ciliaris* (Poaceae) in Tunisia. **Folia geobotanica**, v. 48, p.95–113, 2013.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell**, v. 5, p.1425–1437, 1993.

LINS, C. C.; CARVALHO, O. de. Nova Delimitação do Semi-Árido Brasileiro. Secretaria de Políticas de Desenvolvimento Regional, **(Cartilha)**. 32p,2007.

MARTEL, E.; PONCET, V.; LAMY, F.; SILJAK-YAKOLEV, S.; LEJUNE, B.; SARR, A. Chromosome evolution of Pennisetum species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v.249, p. 139–149, 2004.

MEHRA, P. N. Cytology of East Indian grasses. India: PN Mehra **Chandigarh**, 1982.

MEHRA, P. N.; KHOSLA, P. K.; KOHLI, B. L.; KOONER, J. S. Cytological studies in the North-Indian grasses (Part I). **Panjab University Research Journal**, v.19, p.257–230, 1968.

MELO, P. M. C. **Características estruturais de gramíneas forrageiras exóticas na fase de estabelecimento**. Caruaru-PE. X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSAO – JEPEX UFRPE: Recife, 2010.

MILLAR, C. I.; WESTFAAL, R. D. Allozyme markes in forest genetic conservation. **New Forests**. v.6, p. 347-371, 1992.

NISAR, M. F.; IRAM, S.; AKTAR, Y.; MAJEED, A.; ISMAIL, S.; LIN, F. AFLP Based Analysis of Genetic Diversity in Buffle Grass. **Word Applied Sciences Journal**, p. 560-567, 2010.

OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.*)**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.

OLIVEIRA, M. C. Capim buffel: Produção e Manejo nas regiões secas do Nordeste. Petrolina: EMBRAPA/CPATSA **(Circular Técnica)**. 18p,1993.

OLIVEIRA, M. C. Capim buffel nas regiões secas do Nordeste. Petrolina: EMBRAPA/CPATSA **(Circular Técnica 27)**. 19p,1981.

OLIVEIRA, M. C. de. Capim-búfel. In: KIILL, L.H.P.; MENEZES, E.A. (Eds). **Espécies vegetais exótica com potencialidades para o semi-arido brasileiro**. Brasilia-DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 340p. 2005.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. Meiose vegetal: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. Brasília. **Anais**, Brasília: EMBRAPA recursos genéticos e biotecnologia, p. 24-41, 2004.

PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; COSTA, F. R. Marcadores moleculares no pré-melhoramento. In: BORÉM, A.; Caixeta, E. T. (Eds.) **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG, p. 103-128, 2009.

RAMASWAMY, K. R.; RAMAN, V. S.; MENON, P. M. An analysis of morphological variation in relation to chromosomal forms in *Cenchrus* complex. **Journal of the Indian Botanical Society**, v. 48, p.102–111, 1969.

RODRIGUES, T. J. D.; RODRIGUES, L. R. A.; REIS, R. A. Adaptação de plantas forrageiras às condições adversa. In: FAVORETTO, V.; RODRIGUES, L. R. A.; REIS, R.A. (Eds) **Simposio sobre ecossistemas de pastagens**. Jaboticabal: editora FUNEP, p.17-61, 1993.

SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; SILVA, A. S.; CARVALHO, F. M.; COSTA, J. L.; PÁDUA, J. G. ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**, v.49, p. 540–554, 2011.

SAVOLAINEN, O.; YAZDANI, R. Genetic comparison of natural and artificial populations of *Pinus sylvestris*. In: MILLER-STARCK, G.; ZIEHE, M. (Eds.) **Genetic variation in European populations of forest trees**, Sauerlander's Verlag, Frankfurt am Main, p. 228-234, 1991.

SNYDER, L. A.; HERNANDEZ, A. R.; WARMKE, H.E. The mechanism of apomixis in *Pennisetum ciliare*. **Botanical Gazette**, v.116, p. 209–221, 1955.

VISSER, N. C.; SPIES, J. J.; VENTER, H. J. T. Aneuploidy in *Cenchrus ciliaris* (Poaceae, Panicoideae, Paniceae): Truth or fiction? **South African Journal of Botany**, v 64, p.337–345,1998c.

VISSER, N. C.; SPIES, J. J.; Venter, H. J. T. Uneven segregation of chromosomes: A possible source of aneuploidy in *Cenchrus ciliaris* (Poaceae: Paniceae). **South African Journal of Botany**, v. 64, p.130–136, 1998b.

VISSER, N.; SPIES, J. J.; VENTER, H. J .T. Meiotic chromosome behavior in *Cenchrus ciliaris* (Poaceae: Paniceae). **Bothalia**, v. 28, p.83–90,1998a.

XI, Z. Y.; HE, F. H.; ZENG, R. Z.; ZHANG, Z. M.; DING X. H.; LI, W. T.; Zang, G. Q. Characterization of donor genome contents of backcross progenies detected by SSR markers in rice. **Euphytica**. v.160, p.369-377, 2008.

YADAV, C. B.; ANUJ; 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**, v.30, p. 239-250, 2012.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p.176-183, 1994.

CAPÍTULO I

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE CAPIM BUFFEL ESTIMADA POR MARCADORES ISSR.

¹ Artigo será submetido ao comitê editorial da Revista Crop Breeding And Applied Biotechnology

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE EM ACESSOS DE CAPIM BUFFEL ESTIMADA POR MARCADORES ISSR.

Autora: Lívia Pinto Brandão

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Coorientador: Nataniel Franklin de Melo

Resumo: O capim buffel é uma planta forrageira de grande importância na região semiárida do nordeste brasileiro. Objetivou-se com este estudo avaliar a diversidade genética de acessos de capim buffel (*C. ciliaris*) com a utilização de marcadores moleculares ISSR. Foram analisados 30 acessos do BAG da Embrapa semiárido com 10 primers ISSR. A extração de DNA genômico foi realizada por o procedimento de Doyle & Doyle (1990) com modificações. O volume final da reação de amplificação foi de 30 µL, seguidas de amplificação em termociclador e separação em gel de agarose. Os marcadores ISSR utilizados nesse estudo revelaram variabilidade genética entre os acessos, os quais produziram um total de 75 bandas, sendo 72 polimórficas e 3 monomórficas. Os valores de dissimilaridade genética, calculados de acordo com o complemento do índice de Jaccard, variaram de 0,19 a 0,78. O método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) agrupou os acessos em sete grupos. Os acessos 617 e Buchuma conosite foram mais dissimilares e 138 e 141 os menos dissimilares. Os marcadores ISSR utilizados neste estudo demonstraram eficiência na detecção de polimorfismos moleculares, revelando variabilidade genética entre os 30 acessos. É possível inferir que existe considerável variabilidade genética entre os acessos de buffel, demonstrando a importância desses marcadores na caracterização e análise de variabilidade de germoplasma da espécie.

Palavras chave: *Cenchrus ciliaries* L., ISSR, variabilidade genética

GENETIC DIVERSITY IN GRASS OF ACCESS BETWEEN BUFFEL BY ISSR MARKERS.

Author: Livia Pinto Brandão

Adviser: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-adviser: Nataniel Franklin de Melo

Abstract: The Buffel grass is a forage plant of great importance in the semiarid region of northeastern Brazil. The objective of this study to assess the genetic diversity of Buffel grass accesses (*C. ciliaris*) with the use of molecular markers ISSR. They analyzed 30 BAG accesses Embrapa semiarid with 10 ISSR primers. The extraction of genomic DNA was performed by the procedure of Doyle and Doyle (1990) with modifications. The final volume of amplification reaction was 30 µl followed by amplification in a thermocycler and separation in agarose gel., the ISSR markers used in this study revealed genetic variation among accessions, which produced a total of 75 bands, 72 polymorphic and 3 monomorphic. The values of genetic dissimilarity, calculated according to the complement of Jaccard index, ranged from 0.19 to 0.78. The UPGMA method (Unweighted Pair Group Method Average) grouped the accessions into seven groups. The accesses 617 and Buchuma conosite were more dissimilar and 138 and 141 the least dissimilar. The ISSR markers used in this study were efficient in detecting molecular polymorphisms, revealing genetic variability among 30 hits. Large is possible to infer that there is genetic variability among Buffel hits, demonstrating the importance of these markers in germplasm characterization and analysis of variability of the species

Key words: *Cenchrus ciliares* L., ISSR, genetic variability

INTRODUÇÃO

No semiárido brasileiro os índices pluviométricos são baixos e mal distribuídos. Isso faz com que ocorra uma baixa disponibilidade de forragem de qualidade no período de estiagem por causa do déficit hídrico e evapotranspiração elevada, sendo necessária a suplementação alimentar para obtenção de níveis aceitáveis de desempenho animal (ANDRADE et al., 2010). Existem diversas estratégias para elevar a oferta de forragem no período seco, entre as quais se destaca a utilização de espécies resistentes à seca e bem ajustadas as variações climáticas do ambiente.

O capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) é uma das principais gramíneas forrageiras, sendo base para a exploração pecuária em diversas localidades da região semiárida. Essa planta forrageira vem despertando interesse em pesquisadores e produtores por apresentar maior resistência à deficiência hídrica entre as gramíneas cultivadas, em função de sua elevada eficiência de uso da água (MEDEIROS & DUBEUX JR., 2008)

Segundo Moreira et al. (2007), o capim buffel apresenta sistema radicular profundo que lhe possibilita ter acesso à água de forma rápida e por tempo mais prolongado, além de acumular reservas nutritivas na base das suas hastes para uma possível liberação lenta quando necessário. De acordo com Rangel et al. (2009), a incorporação desta gramínea aos sistemas produtivos, não têm sido proporcional a geração de tecnologias referente à mesma, sendo ainda a tecnologia pouco difundida.

A EMBRAPA Semiárido mantém uma coleção de germoplasma em campo com 117 acessos de capim buffel, para tanto os acessos da coleção desse banco de germoplasma ainda não foi caracterizado. Entretanto, atividades de caracterização e conhecimento da variabilidade genética dos acessos são necessárias a fim detectar características desejáveis que forneçam subsídios para outras pesquisas visando o uso eficiente desta forrageira em programas de melhoramento genético.

No melhoramento genético é essencial o conhecimento da diversidade genética, uma vez que está orientada a formação de uma coleção de trabalho a partir da identificação de grupos heteróticos e a seleção de genitores mais divergentes para cruzamento, além de permitir um manejo e uso mais adequado das coleções (BONATO et al., 2006). Os marcadores moleculares

são amplamente utilizados em estudos da diversidade genética por mostrarem diferenças no DNA (polimorfismo genético) e não sofrerem influência do ambiente.

Entre os marcadores baseados em PCR (*Polimerase Chain Reaction*), o marcador dominante ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) é uma técnica simples, rápida, eficiente e reprodutível, que amplifica segmentos de DNA presentes entre duas regiões microssatélites idênticas orientadas em direções opostas (REDDY, 2002). Este marcador tem sido utilizado com sucesso em pesquisas relacionadas às análises de diversidade genética em várias culturas forrageiras como alfafa (RASHIDI et al., 1997), capim elefante (LIMA et al., 2011), braquiária (AZEVEDO et al., 2011), entre outras. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética em 30 acessos de capim buffel do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido por meio do uso de marcadores ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram avaliados 30 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de capim buffel da Embrapa Semiárido, localizado em Petrolina, Pernambuco, introduzidos a partir da década de 1970, sendo provenientes de coleções localizadas na Austrália, Índia, Irã, Estados Unidos, Kênia, Tanzânia, além de acessos introduzidos anteriormente nos estados da Bahia, Pernambuco, Sergipe e São Paulo (Tabela 1).

Tabela 1. Informações dos acessos de capim buffel analisados do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, Brasil, 2015.

Identificação do acesso	Data de introdução	Número no CPATSA	Origem
3	06/03/2014	POA-03	Petrolina-PE
5	06/03/2014	POA-04	Petrolina-PE
6	06/03/2014	POA-06	Petrolina-PE
40	06/03/2014	POA-40	Petrolina-PE
52	14/03/1977	7752	Matão-SP (IRI)
Pusa Giant Antan	06/03/1979	79119	Índia (IARI)
West Austrália	07/04/1979	79123	Austrália (CSIRO)
138	26/06/1979	79138	Quissamã-SE
141	26/06/1979	79141	Quissamã-SE
158	26/06/1979	79158	Quissamã-SE
195	11/05/1980	80195	Tanzânia (Cenargen)
198	11/05/1980	80198	Tanzânia (Cenargen)
237	06/03/2014	POA-237	Petrolina-PE
302	11/01/1982	82302	Irã
433	28/06/1983	83433	Austrália (CSIRO)
434	28/06/1983	83434	Austrália (CSIRO)
Buchuma conosite	12/06/1987	87541	Kênia (NARS)
571	10/09/1990	90571	USA (Texas A&M)
572	10/09/1990	90572	USA (Texas A&M)
579	10/09/1990	90579	USA (Texas A&M)
585	10/09/1990	90585	USA (Texas A&M)
590	10/09/1990	90590	USA (Texas A&M)
598	10/09/1990	90598	USA (Texas A&M)
603	10/09/1990	90603	USA (Texas A&M)
617	10/09/1990	90617	USA (Texas A&M)
7754	14/03/1977	7754	Matão-SP (IRI)
Áridus	11/05/1980	80196	Tanzânia (Cenargen)
Biloela	26/02/1976	7602	Pernambuco (Agroceres)
Gayndah	26/02/1976	7603	Pernambuco (Agroceres)
Grei ou Grass	19/11/1979	79176	Bahia

Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o procedimento de Doyle & Doyle (1990) com pequenas modificações, conforme anexo 1.

A quantificação do DNA extraído foi realizada por meio da comparação visual com bandas obtidas do DNA de fago λ (10 e 20 ng), em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídio. A visualização foi realizada por meio de luz ultravioleta e registrada em aparelho fotodocumentador modelo LPix Image (Loccus Biotecnologia). Com base nas concentrações estimadas, as amostras foram diluídas para $10 \text{ ng}/\mu\text{L}^{-1}$ e armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Amplificação de PCR e eletroforese

Inicialmente foi realizado uma pré-seleção de 50 iniciadores para ISSR em três genótipos. Destes, apenas 10 revelaram polimorfismo, os quais foram aplicados nos genótipos. As reações de amplificação foram realizadas contendo um volume final de 30 μ L, utilizando os seguintes reagentes: 3,0 mM $MgCl_2$, 0,2 μ M de cada um dos dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,5 μ M de cada *primer*, 1x tampão PCR, 0,7 unidade de Taq polimerase e 45 ng de DNA genômico, sendo o volume final ajustado com água miliQ.

As amplificações foram conduzidas em termociclador Gene Amp 9600 (Applied Biosystems). Utilizou-se os seguintes ciclos: 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 45s, 72°C por 75s. Para finalizar, foi realizada uma extensão a 72°C por 5 minutos, deixando os produtos das reações a 4°C ∞ .

Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 2% (p/v) submetidos à voltagem constante de 80 V por 3h, e corados com brometo de etídio. A visualização dos padrões foi realizada sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular 100pb (Ludwing).

Análise dos dados

Os marcadores ISSR foram convertidos em dados binários, onde se atribui valor um para presença e valor zero para ausência de bandas. Os marcadores que se mostraram polimórficos foram submetidos à análise de diversidade genética, utilizando como método de agrupamento o UPGMA e coeficiente de Jaccard. O ajuste entre a matriz de distâncias e dendrograma foi verificado por meio de correlação cofenética (cc) utilizando o software Genes (CRUZ, 2006). O conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) foi obtido com o auxílio do programa PowerMarker (LIU & MUSE, 2005). Para obtenção do dendrograma de dissimilaridade foi utilizado o software Mega 6.0 (TAMURA et al., 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 10 iniciadores de ISSR geraram um total de 75 bandas contáveis, com média de 7,2 bandas polimórficas por iniciador (Tabela 2). Deste total, 72 apresentaram-se polimórficas (96%), com maior número de bandas observado para o iniciador TriCAC3'RC (10 bandas) e o menor para TriCAC5'CY (4 bandas).

Tabela 2. Produtos de amplificação de 10 iniciadores ISSR em 30 acessos de capim buffel (*Cenchrus ciliaris*) do BAG de capim buffel da Embrapa semiárido..

Iniciador	Sequência (5'-3)'	Bandas					
		T	Po.	Mo.	% Po.	D.G	PIC
DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	9	8	1	88,9%	0,28	0,28
DiGT5'CY	CYGTGTGTGTGTGTGTGT	6	6	0	100 %	0,28	0,29
TriCAC5'CY	CYCACCACCACCACCAC	5	4	1	80%	0,27	0,25
TriCAG	CAGCAGCAGCAGCAG	5	5	0	100 %	0,33	0,42
DiGA3'T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	8	8	0	100 %	0,24	0,21
TriTGT3'RC	TGTTGTTGTTGTTGTRC	6	6	0	100 %	0,30	0,41
TriTGT3'YC	TGTTGTTGTTGTTGTYC	9	8	1	89 %	0,21	0,31
TriAGG3'RC	AGGAGGAGGAGGAGGRC	8	8	0	100 %	0,31	0,32
TriACT3'RC	ACTACTACTACTACTRC	9	9	0	100 %	0,39	0,45
TriCAC3'RC	CACCACCACCACCACRC	10	10	0	100%	0,40	0,38
Média		7,5	7,20		96%	0,32	0,33
Total		75	72	3		0,32	

T = Total de bandas; Po. = Bandas polimórfica; Mo = Bandas monomórfica; % Po = % polimorfismo; D.G = Diversidade genética; PIC = (conteúdo de informação de polimorfismo). *R = A, G; Y = C, T;

A elevada porcentagem de bandas polimórficas encontrada (acima de 80%) ressalta que há variabilidade genética entre os acessos de capim buffel. Resultado semelhante foi relatado por Cidade et al. (2008) caracterizando 95 acessos de forrageira bahia grass (*Paspalum notatum* Flugge.) por meio de 4 iniciadores ISSR, em que o percentual de polimorfismo foi de 97,5% (89 dos 91 fragmentos apresentaram-se polimórficos) com média de 18 bandas por

iniciador, mostrando a eficiência desse iniciador para a detecção de polimorfismo.

O alto polimorfismo e a baixa porcentagem de marcadores monomórficos também foi observado no trabalho desenvolvido por Azevedo et al. (2011) em braquiária (Poaceae; *Brachiaria ruzizienis* Germain et Evrard) utilizando 12 iniciadores de ISSR com 100% de polimorfismo e média de 7,41 bandas por primer. Lima et al. (2011), observaram variabilidade genética semelhante em 46 acessos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com aplicação de 25 iniciadores ISSR revelando polimorfismo de 76%.

De acordo com Gutierrez-Ozuna et al. (2009), avaliando a diversidade genética em populações de capim buffel via marcadores ISSR, obtiveram um total de 27 bandas, sendo 16 polimórficas (59,26%). Segundo estes autores, a elevada porcentagem de polimorfismo dos marcadores pode ser associada com a alta variabilidade genética intraespecífica de *C. ciliaris*

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,21 para o iniciador DiGA3'T a 0,45 para o iniciador TriACT3'RC, com valor médio de 0,33 (Tabela 2). Os primers, TriACT3'RC, TriCAG e TriTGT3''RC proporcionaram os maiores valores de PIC com 0,45, 0,42 e 0,41 respectivamente. De maneira geral, marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos; com valores entre 0,25 e 0,50 medianamente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos (BOTSTEIN et al., 1980). Segundo essa classificação, não foi obtido resultados de PIC superiores a 0,5, sendo o maior valor 0,45, obtido pelo primer TriACT3'RC, considerado, nesse caso, medianamente polimórfico. Por outro lado, como ISSR são marcadores bialélicos, o valor máximo de PIC é de 0,50 (TATIKONDA et. al., 2009). Isso justifica os baixos valores calculados quando comparados com outros marcadores multialélicos, como, os microsatélites.

Os valores de dissimilaridade genética (dg) entre os acessos variaram de 0,19 (acessos 138 e 141) a 0,77 (acessos 617 e Buchuma conosite), com valor médio de 0,51. Por meio da análise de agrupamento foi possível observar a formação de sete grupos distintos (Figura 1).

Contudo, pode-se observar que houve uma grande tendência dos indivíduos em agruparem em função da origem. O primeiro grupo (G1) foi formado por 10 acessos (Figura 1). Pode-se observar que todos os genótipos provenientes de Quissamã-SE (138; 141 e 158) agruparam-se no G1, incluindo

ainda outros dois acessos (302 e Buchuma conosite) que apresentam origem exclusiva como, Irã e Índia, respectivamente. Nesse mesmo grupo estão incluídos ainda dois genótipos coletados em Petrolina (40 e 237) revelando maior similaridade entre esses genótipos, indicando que esses dois acessos provavelmente sejam de mesma origem geográfica. Com exceção à tendência geral, três genótipos do G1 [434 (Austrália); 195 (Tanzânia) e 52 (Matão - SP)], não agruparam com os outros acessos de mesma origem (Figura 1). Essa informação contribui com o estudo, pois revela que, mesmo prevalecendo a similaridade entre os acessos da mesma origem, pode ocorrer a existência de variabilidade genética entre acessos de mesma procedência.

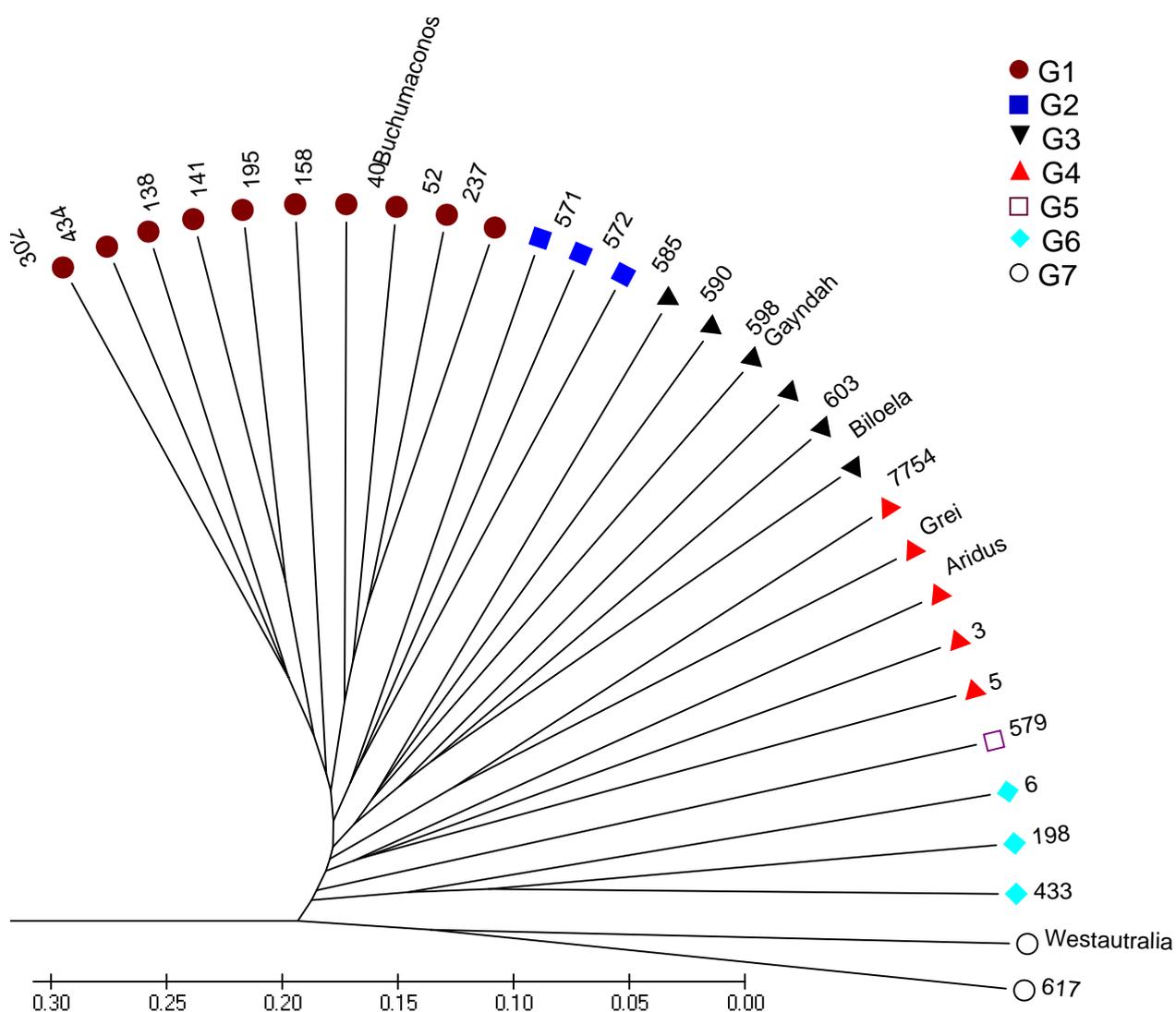


Figura 1 – Dendrograma de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard de 30 acessos de capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) do

Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido, analisados para 75 bandas de 10 loci de ISSR. Correlação cofenética ($r \geq 0,75$).

Fato semelhante pode ser observado com o grupo 2 (G2), constituído por três acessos [Buchuma conosite Quênia (NARS Kenya); 571 e 572 (USA Texas A&M)], bem como no grupo 3 (G3) [585, 590, 598, 603 (USA Texas A&UM); 'Biloela' e 'Gayndah' (Pernambuco, Agroceres)].

O cluster do grupo 4 (G4) foi formado por cinco acessos, dos quais 'Grei'/'Grass' (Bahia), POA-3 e POA-5 (Pernambuco) com valor $d=0,44$ revelando variabilidade genética mediana entre eles. Os demais acessos do grupo G4 (7754 e 'Áridus', oriundos de Matão-SP e Tanzânia, respectivamente), são de diferentes origem geográfica, com maior valor de dissimilaridade (0,66 ou 66%). Nota-se que apesar desses acessos formarem o mesmo grupo, apresentam um percentual de dissimilaridade significativa, possibilitando ao melhoristas planejar melhores combinações de cruzamentos entre os acessos.

Por outro lado, apesar do acesso 579 oriundo do Texas ter formado um grupo isolado (grupo 5), quando comparado com os demais acessos de mesma procedência, nota-se valores de dissimilaridade entre esses acessos variando de 0,38 (579-585) a 0,58 (579-590) com média de 0,48. Não se sabe exatamente a causa do isolamento desse acesso no G5, contudo, é válido enfatizar que o acesso 579 é similar ao demais acessos provenientes do Texas.

Tendência semelhante foi observada para os acessos 6, 198 e 433 que formam o grupo 6 (G6), assim como os acessos West Austrália e 617 que deu origem ao grupo 7 (G7). 433 e West Austrália (Austrália) apresentaram maior valor de dissimilaridade (0,50) entre todos esses acessos. Os menores valores de dessemelhança são entre os pares de genótipos do G6: 6 e 198 (0,32); 198 e 433 (0,33) e 6 e 433 (0,43). Enquanto que entre West Austrália e 617 a dissimilaridade foi de 0,43, reforçando a adesão dos acessos nos referidos grupos.

O valor de correlação cofenética obtido foi elevado ($r = 0,75$) e adequado, já que valores de $r \geq 0,56$ são considerados ideais, o que reflete boa concordância com os valores de similaridade genética (VAZ PATTO et al., 2004).

A análise da distribuição da frequência de dissimilaridade (Figura 2) entre os trinta pares de acessos de capim buffel revelou-se uniforme, oscilando entre 0,31 a 0,74 com média de 0,56. Os pares de genótipos com dissimilaridade entre 0,51 e 0,60 apresentaram-se em maior frequência (56,3%), seguidos das classes de distribuição de 0,61-0,70; 0,41-0,50; 0,31-0,40 e 0,71-0,74 com magnitude de 22,8%; 20,5%; 2,1% e 1,1% respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Lima et al. (2011) ao avaliar a diversidade genética de capim elefante com marcadores ISSR com frequência de dissimilaridade de 0,05 a 0,50 (média de 0,34), com maiores percentuais de 35,84% (0,30-0,35) e 26,96% (0,35-0,40).

Vale salientar que quanto maior for o valor de dissimilaridade entre os genótipos de capim buffel, maior será a diferença entre eles. Portanto, é possível inferir que os marcadores ISSR foram eficientes para detectar a variabilidade genética entre os acessos avaliados no presente estudo.

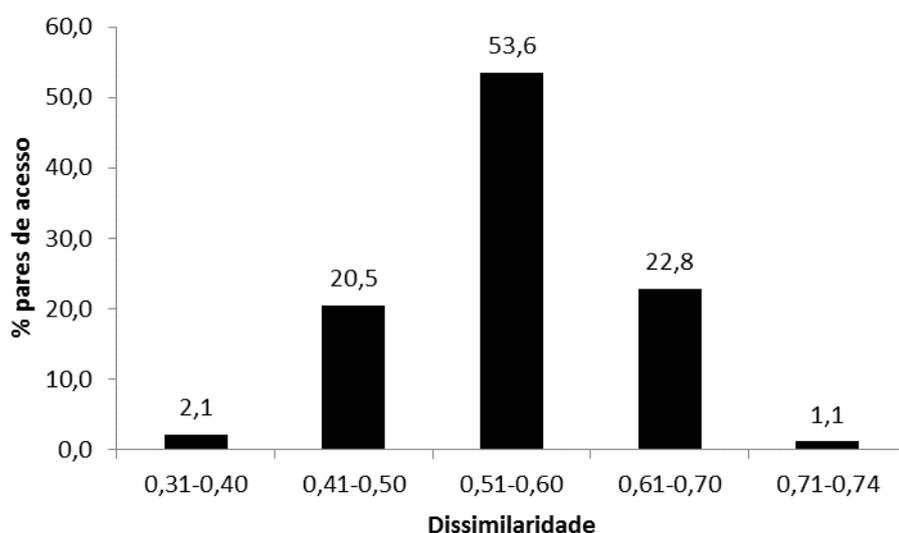


Figura 2 – Histogramas de distribuição da dissimilaridade entre os pares de 30 acessos de capim buffel obtido com marcadores ISSR pelo índice de Jaccard.

CONCLUSÃO

A caracterização molecular com ISSR foi eficiente para estimar a diversidade genética entre acessos de capim buffel, podendo ser usados com sucesso na caracterização molecular do germoplasma dessa forrageira.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. P.; COSTA, R. G.; SANTOS, E. M.; SILVA, D. S. Produção animal no semiárido: O desafio de disponibilizar forragem em quantidade e com qualidade, na estação seca. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, Joao Pessoa, v.4, n.4, p.01-14, 2010.
- AZEVEDO, A. L. S.; COSTA, P. P.; MACHADO, M. A.; PAULA, C. M. P. DE.; SOBRINHO, F. S. High degree of genetic diversity among genotypes of the forage grass *Brachiaria ruziziensis* (Poaceae) detected with ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, p. 3530-3538, 2011.
- BONATO, A. L. V.; CALVO, E. S.; GERALDI, I. O.; ARIAS, C. A. A. Genetic similarity among soybean (*Glycine max* (L) Merrill) cultivars released in Brazil using AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.4, p.692-704, 2006.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am J Hum Genet**, p.:314–331, 1980.
- CHANDRA, A.; DUBEY, A. Identification of species-specific RAPD markers in genus *Cenchrus*. **Journal of Environmental Biology**, p. 403-407, 2010.
- CIDADE, F. W.; DALL'AGNOL, M.; BERED, F.; CHIES, T. T. de S. Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flugge (Paniceae: Panicoideae). **Genet Resour Crop Evol**, p.55:235–246, 2008.
- CLAYTON, W. D., VORONTSOVA, M. S., HARMAN, K. T.; WILLIAMSON, H. GrassBase - The Online World Grass Flora. <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>. [accessed 08 November 2014]
- COSTA, J. L.; JESUS, O. N. DE; FACHARDO, G. A.O.; OLIVEIRA, E. J. de. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, p. 253-260, 2012.
- CRUZ, C.D. **Programas GENES-versão** Windows 2009.7. Editora UFV, Viçosa, p. 642, 2006.
- DOYLE, J.J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, p. 13–15, 1990.
- GRIFFA, S.; DI'AZ†, D.; RIBOTTA, A. S. LANZA CASTELLI, S.; MUNÓZ, N.; COLOMBA, E. LÓPEZ.; LUNA, C.; GRUNBERG, K.; BIDERBOST, E. Molecular genetic discrimination of Buffel grass genotypes and F1 hybrids for breeding purposes using amplified fragment length polymorphism analyses. **Journal Compilation**, p.454-458, 2006.
- GUTIERREZ-OZUNA, R.; EGUIARTE, L.E.; MOLINA-FREANER, F. Genotypic diversity among pasture and roadside populations of the invasive buffelgrass (*Pennisetum ciliare* L. Link) in north-western Mexico. **Journal of Arid Environments**, p. 26–32, 2009.

LIMA, R. S. N DE.; DAHER , R. F.; GONÇALVES, L. S. A.;ROSSI, D.A.; AMARAL JÚNIOR.; A.T. DO.; PEREIRA, M.G.; LÉDO, F.J.S. RAPD and ISSR markers in the evaluation of genetic divergence among accessions of elephant grass. **Genetics and Molecular Research**, p. 1304-1313, 2011.

LIU, K.; MUSE, S. V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics Applications Note**, v.21, p.2128–2129, 2005.

MEDEIROS, H. R.; DUBEUX Jr. Efeitos da fertilização com nitrogênio sobre a produção e eficiência do uso da água em capim buffel. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 3, p. 13-15, 2008.

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, E. J.; PADUA, J;G.; ZUCCHI, M. I.; CAMARGO, L. E. A, FUNGARO M. H. P, VIEIRA M. L. C Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Mol Ecol Notes** p. 331–333, 2005a.

OLIVEIRA, M. C. de. Capim-búfel. In: KIILL, L. H. P.; MENEZES, E. A. (Eds). Espécies vegetais exóticas com potencialidades para o semi-arido brasileiro. Brasília-DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 129-156 , 2005b.

RANGEL, A. H. N.; LIMA JÚNIOR, D. M.; BRAGA, A. P.; SIMPLÍCIO, A. A.; AGUIAR, E. M. Suprimento e demanda de nutrientes em sistemas em não equilíbrio. **Revista Verde**, Mossoró, v. 4, n. 1, p. 14-30, 2009.

RASHIDI, M.; FARSHADFAR, M.; SAFARI, H.; SHIRVANI, H. Utility of ISSR molecule marker in examine of genetic diversity 17 genotypes of perennial alfalfa (*Medicago sativa*). **Journal of Novel Applied Sciences**, p. 969-973, 2013.

REEDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.128, p.9-17. 2002.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p. 2725-2729. 2013.

TATIKONDA, L.; WANI, S. P.; KANNAN, S.; BEERELLI, N.; SRUDEVI, T. K.; HOISINGTON, D. A.; DEVI, P.; VARSHNEY, R. K. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L. biofuel plant. **Plant Science**, v.176, p. 505-513, 2009.

VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v.137, p.63-72, 2004.

VOLTOLINI, T. V.; ARAUJO, G. G. L. de; SOUZA, R. A. Silagem de capim buffel : alternativa para a alimentação de ruminantes na região Semiárida. **Série Documentos 259**, 2014.

CAPÍTULO II

ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ACESSOS DE CAPIM BUFFEL (*Cenchrus ciliaris* L.)

¹ Artigo submetido ao comitê editorial da Revista Cytologia.

ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ACESSOS DE CAPIM BUFFEL (*Cenchrus ciliaris* L.)

Autora: Lívia Pinto Brandão

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Coorientador: Nataniel Franklin de Melo

Resumo: O capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) pertence a família Poaceae e possui aproximadamente 20 a 25 espécies. É uma planta perene, comum em regiões quentes e de ampla distribuição geográfica. Apresenta predominantemente $2n=4x=36$ cromossomos, embora existam relatos de ocorrência de variações numéricas com $2n=32$, 36, 40 e 54. No presente trabalho, objetivou-se caracterizar citogeneticamente 11 acessos de capim buffel do BAG de capim buffel da Embrapa Semiárido mediante avaliações convencionais e por meio de coloração cromossômica com fluorocromos CMA/DAPI para localização de regiões heterocromáticas. Todos os acessos analisados apresentaram $2n=36$. Entretanto, em uma mesma raiz analisada foi possível observar a ocorrência de polissomatia, com células apresentando $2n=30$ no acesso 433, $2n=32$ no acesso 6, $2n=34$ nos acessos 7754, Áridus, Gayndah, Grei e Biloela, e $2n=42$ no acesso 617. A coloração com fluorocromos CMA/DAPI mostrou padrão de distribuição uniforme, com visualização de seis a oito cromossomos com região subterminal distendida, possivelmente relacionada à região do satélite. Nos núcleos interfásicos foram observados ainda pequenos blocos CMA mais brilhantes, evidenciando a presença de cromatina rica em pares de base GC. A variabilidade cromossômica numérica pode estar correlacionada a alta frequência de apomixia nessa espécie.

Palavras chave: Fluorocromo, variabilidade cromossômica

CYTOGENETIC VARIABILITY IN ACCESSIONS OF BUFFEL GRASS (*Cenchrus ciliaris* L.)

Author: Livia Pinto Brandão

Adviser: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-adviser: Nataniel Franklin Melo

Abstract: The Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) belongs to Poaceae family and has about 20 to 25 species. It is a perennial plant common in warm regions and widely distributed. Presents predominantly $2n = 4x = 36$ chromosomes, although there are reports of occurrence of numerical variations with $2n = 32$, 36, 40 and 54. The objective of this work was characterize cytogenetically 11 Buffel grass accesses BAG Embrapa Semiarid, by conventional reviews and by chromosomal staining with fluorochromes CMA / DAPI to location heterochromatic regions., Brazil. All 11 *C. ciliaris* accessions showed $2n = 36$. However, in the same root analyzed we observed some cells with $2n = 30$ in the access 433, $2n = 32$ in access 6, $2n = 34$ hits in 7754, áridus, Gayndah, Grey and Biloela, and $2n = 42$ in the accessions 617, indicating the occurrence of polissomaty. The fluorochrome staining CMA / DAPI showed uniform distribution pattern with six to eight display chromosomes extended subterminal region, possibly related to satellite region. In interphase nuclei were observed still smaller CMA brightest blocks, indicating the presence of chromatin rich in GC base pairs. The large numerical chromosomal variability may correlates the high frequency of apomixis in this species.

Key words: Fluorochrome, chromosomal variability

INTRODUÇÃO

A distribuição das espécies de *Cenchrus* ocorre principalmente na África, Ásia e Austrália (DELISLE, 1963; CRINS, 1991), e durante o século 20, houve introdução de vários genótipos nas regiões mais secas do sul dos Estados Unidos (HOLT, 1985), norte do México (IBARRA-FLORES et al., 1995), Argentina (GRIFFA et al., 2006), e outros países da América do Sul (SIMPSON et al., 1972). A introdução dessa gramínea no Brasil ocorreu em 1952, a princípio no estado de São Paulo e, posteriormente, na região Nordeste (OLIVEIRA, 1993). Entretanto, faltam estudos sobre a diversidade genética desses materiais introduzidos.

Por outro lado, os estudos citogenéticos possuem papel importante na caracterização de germoplasma e no melhoramento genético, pois contribui na determinação do número cromossômico, nível de ploidia e comportamento cromossômico meiótico, auxiliando na identificação de materiais que possam ser utilizados em cruzamentos dirigidos (SYBENGA, 1993; 1998). Os estudos citogenéticos possibilitam a obtenção de informações básicas para a caracterização citológica e permitem que diferenças possam ser encontradas entre genótipos (POZZOBON, 2006).

Diferentes números cromossômicos básicos têm sido relatados para *Cenchrus* ($x=9, 10, 17$), sendo $x=9$ o mais comum para *C. ciliaris* (GIUSSANI et al., 2001; MARTEL et al., 2004; DONADIO et al., 2009; KHAN et al., 1997; BURSON et al., 2012). Estudos mostraram a ocorrência de diferentes níveis de ploidia para o capim buffel, observando-se tetraploides ($2n=4x=36$), pentaploides ($2n=5x=45$) e hexaploides ($2n=6x=54$). Entretanto, a maioria das populações naturais dessa espécie é considerada tetraploide (FISHER et al. 1954; BURSON et al., 2012). Recentemente, Kharrat-Souissi et al. (2013) relataram a distribuição de sítios de DNAr em populações tetraploides, pentaploides e hexaploides de capim buffel na Tunísia. Burson et al. (2012) encontraram ainda indivíduos septaploides ($2n=7x=63$) além de tetraploides ($2n=4x=36$) e outros aneuploides em acessos de capim buffel na África do Sul.

Embora também seja relatado que muitas espécies são diploides (MEHRA, 1968), estudos embriológicos e citogenéticos de *C. ciliaris* têm revelado que o modo predominante de reprodução é por apomixia aposporia,

seguido por pseudogamia (OZIAS-AKINS et al. 2003), podendo ser correlacionada a extensa variabilidade cromossômica numérica.

As avaliações citológicas podem trazer contribuições no sentido de aumentar a eficiência das estratégias de conservação e mesmo de trabalhos de melhoramento com essa espécie (SINGH, 1993; AULER et al., 2006).

Nos genótipos de capim buffel introduzidos no Brasil não há relatos sobre estudos citogenéticos. Dessa forma, esse trabalho visou caracterizar citogeneticamente acessos de capim buffel do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido, mediante avaliações convencionais e por meio de coloração cromossômica com fluorocromos CMA/DAPI para localização de regiões heterocromáticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais foram provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de capim buffel da Embrapa Semiárido, localizado em Petrolina-PE. Avaliou-se 11 acessos de *C. ciliaris* L. (Tabela 1) selecionados a partir de representantes pertencentes a cada um de sete grupos formados previamente pela análise da diversidade genética com marcadores ISSR (BRANDÃO et al., 2015, em preparação).

Tabela 1: Acessos de *Cenchrus ciliaris* L. analisados, procedentes do Banco ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, Brasil, 2015.

Identificação do acesso	Nome científico/genótipo	Origem
6	<i>C. ciliaris</i>	Petrolina-PE
138	<i>C. ciliaris</i> cv. 04	Quissamã-SE
198	<i>C. ciliaris</i> KN 61167	Tanzânia
302	<i>C. ciliaris</i> PE 339893	Irã
433	<i>C. ciliaris</i> CPI 71913	Austrália
7754	<i>C. ciliaris</i> cv. IRI 503	Matão-SP
617	<i>C. ciliaris</i> PI 414451	EUA (Texas A&M)
Áridus	<i>C. ciliaris</i> KN 537- Áridus	Tanzânia
Biloela	<i>C. ciliaris</i> cv. Biloela	Pernambuco
Gayndah	<i>C. ciliaris</i> cv. Gayndah	Pernambuco
Grei ou Grass	<i>C. ciliares</i> cv. Grei	Bahia

Para análise citogenética foram utilizadas pontas de raízes obtidas de sementes de cada acesso, as quais foram colocadas para germinar em bandejas contendo substrato, sob condições de casa de vegetação. Pontas de raízes jovens foram pré tratadas com 8- hidroxiquinoleína 0,002 M, durante 24 h a 6°C, fixados em Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1 v/v) e estocadas em freezer a -20°C até a posterior utilização. O protocolo utilizado foi descrito por Guerra et al., (2002) com pequenas modificações no tempo de digestão da parede celular. Em resumo, as raízes foram lavadas três vezes por 5 minutos em água destilada e digeridas em solução enzimática (2% celulase - 20% pectinase) ficando em câmara úmida *overnight* a temperatura ambiente, sendo posteriormente preparadas pela técnica de esmagamento em uma gota de ácido acético 45%. A coloração por fluorocromos foi realizada com 8µL de CMA₃ (cromomicina A - 0,5 mg/ml) por 60 min, seguida de coloração com 8µL de DAPI (2µg/ml) por 30 minutos, e montadas com 10µL de meio de montagem.

As imagens das melhores células em divisão mitótica foram capturadas em microscópio de epifluorescência Leica DM2000 equipado com câmera digital FX350. As medições cromossômicas foram realizadas no software Leica QFish e processadas quanto ao brilho e contraste com auxílio do Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta a lista dos acessos estudados, bem como os números cromossômicos observados. Todos os 11 acessos de *C. ciliaris* apresentaram 2n=36. Entretanto, em uma mesma raiz analisada foi possível observar algumas células com 2n= 30 no acesso 433, 2n= 32 no acesso 6, 2n=34 nos acessos 7754, Áridus, Gayndah, Grei e Biloela, e 2n=42 no acesso 617.

Dentre as principais causas dessas variações podemos citar a endopoliploidia e anormalidades no fuso, que podem ter como resultados a eliminação cromossômica, formação de fusos múltiplos, fracionamento do complemento cromossômico, entre outros, gerando aneussomatia e polissomatia, como descrito para *Pennisetum* (DAVIDE et al., 2007).

Tabela 2 – Lista dos acessos capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) analisados com respectivos números cromossômicos e variantes polissômicos.

Acesso	Número cromossômico (2n)	Número polissômico (2n±x)
06	36	32
138	36	-
198	36	-
302	36	40
433	36	30
7754	36	34
617	36	42
Áridus	36	34
Gayndah	36	34
Grei	36	34
Biloela	36	34

Os valores de número cromossômico do presente trabalho estão sendo relatados pela primeira vez para todos os onze genótipos analisados (Tabela 2). Entretanto, os números cromossômicos $2n=36$ confirmam vários relatos descritos anteriormente em outras populações de capim buffel, como, por exemplo, na Tunísia (KHARRAT-SOUISSI et. al., 2012 e 2013), nos Estados Unidos (BURSON et al., 2012), no Kênia (ALDERSON et. al., 1994), e na África (HUSSEY et al., 2005), mas nenhuma delas correspondente aos genótipos da coleção da Embrapa Semiárido.

Observou-se que o capim buffel apresenta cromossomos pequenos (1-2 μm), não sendo possível analisar detalhes da morfologia cariotípica nos acessos. Apesar disso, foi possível observar alguns cromossomos com morfologia de metacêntricos a submetacêntricos e núcleos interfásicos do tipo semirreticulado (Figuras 1a-b e 1c-d).

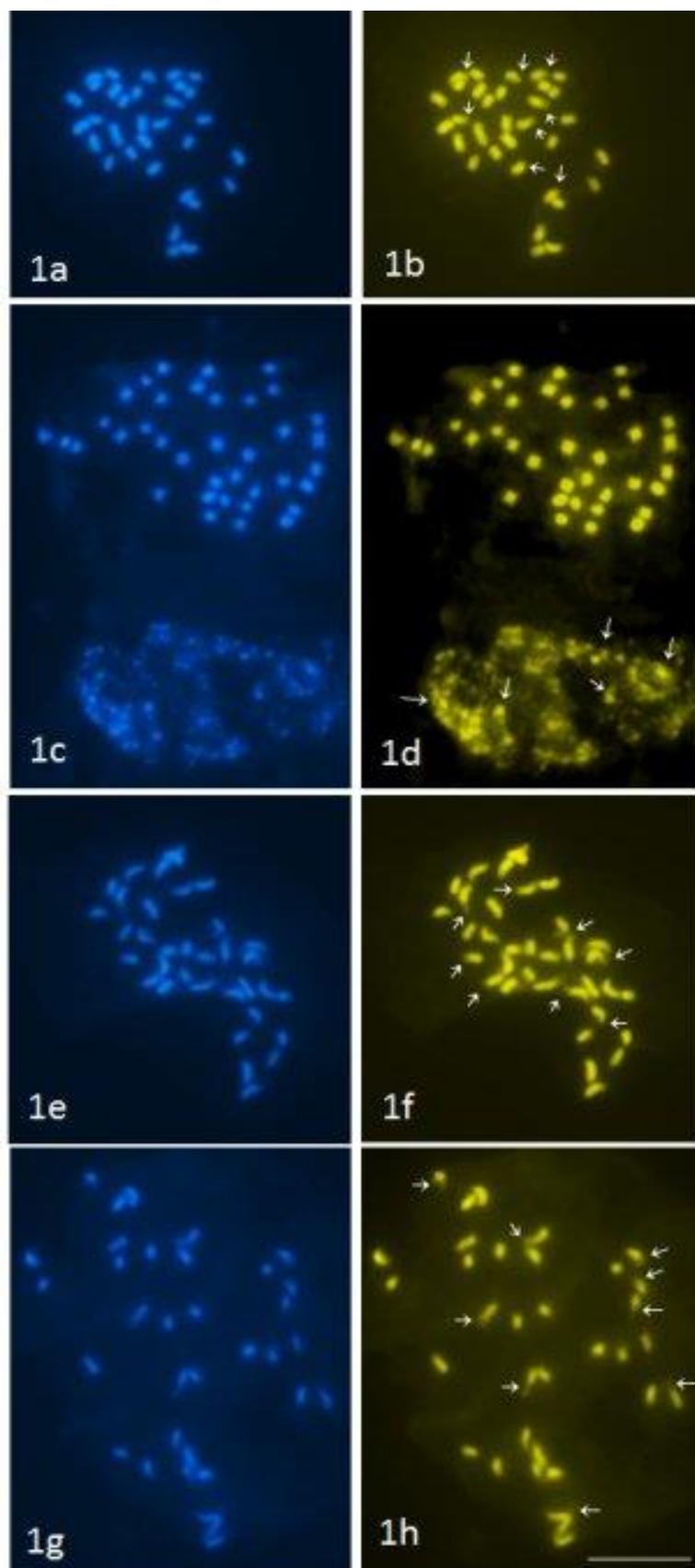


FIGURA 1. Metáfases mitóticas em capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.). a e b) Acesso 6 com $2n=34$; c e d) Acesso 302 com $2n=36$; e e f) Acesso 7754 com $2n=34$; g e h) Acesso 7754 com $2n=36$. Setas indicam nos cromossomos região distendida referente ao satélite. Setas indicam nos núcleos regiões de cromatina mais brilhantes com coloração CMA. Barra representa $10\mu\text{m}$

Variação no nível de ploidia tem sido relatada com frequência para o capim buffel. Burson et.al., (2012), por exemplo, ao estudarem 568 acessos de capim buffel do USDA (EUA) determinaram por citometria de fluxo que 308 acessos foram descritos como tetraploides, com $2n=4x=36$ cromossomos, 139 como pentaploides, com $3n=5x=45$ cromossomos, 20 como hexaploides, com $2n=6x=54$ cromossomos, dois septaploides, com $2n=7x=63$ cromossomos, e 99 como aneuploides. No nosso trabalho, foi possível observar em alguns acessos a presença de células com $2n=40$ (acesso 302) e $2n=42$ (acesso 617) cromossomos, característica que lhe confere uma origem híbrida ou de maior variabilidade cariotípica, aproximando-os dos genótipos pentaploides.

A maioria dos acessos avaliados apresentou polissomatia, com variação cromossômica numérica de $2n=30$ até $2n=42$, mas com predominância de $2n=34$, número cromossômico observado em acessos previamente selecionados como cultivares (Áridus, Gayndah, Grei e Biloela), o que pode sugerir uma maior semelhança entre eles. Aneuploides com $n=2x-1=17$ ($2n=34$) foi relatado por Visser et al., (1998), estudando o comportamento de cromossomos meióticos dentro e entre populações de capim buffel (*C. ciliaries*) no Sul África. Os mesmos autores reforçam que a aneuploidia não se restringe apenas aos indivíduos tetraploides, ocorrendo nos demais níveis de poliploidia como diploides, triploides, pentaploides, hexaploides e nanoploides. Burson et al. (2012 e 2015) também relataram a ocorrência comum de variantes aneuploides no gênero *Cenchrus*. A ocorrência dessa variação numérica nos tetraploides também foi verificada nos acessos 6 ($2n=4x=32$) e 433 ($2n=2x=30$).

A dupla coloração com CMA/DAPI permitiu visualizar a presença de cromatina distendida na porção terminal de seis a oito cromossomos, possivelmente relacionada a região dos satélites (Figuras 1a-1b, 1e-1f, 1g-1h, 2a-2b). Pequenos blocos mais brilhantes com coloração CMA também foram observados nos núcleos interfásicos, confirmando a existência de uma pequena porção de cromatina com coloração diferencial rica em pares de base GC (Figuras 1c-1d, 2c-2d). Kharrat-Souissi et al. (2012), estudando a localização e distribuição de DNAr 5S e 45S em 13 populações de capim buffel da Tunísia, relataram a presença de 4 a 6 sítios desses genes ribossomais, correlacionado ao nível de ploidia dos citótipos analisados (tetraploides,

pentaploides ou hexaploides). Esses sítios de DNAr podem corresponder às regiões mais distendidas observadas em alguns acessos analisados.

Por fim, observou-se que existe variabilidade cariotípica polissomática entre e dentro dos acessos de capim buffel analisados no presente trabalho, o que pode estar relacionado a apomixia descrita para a espécie.

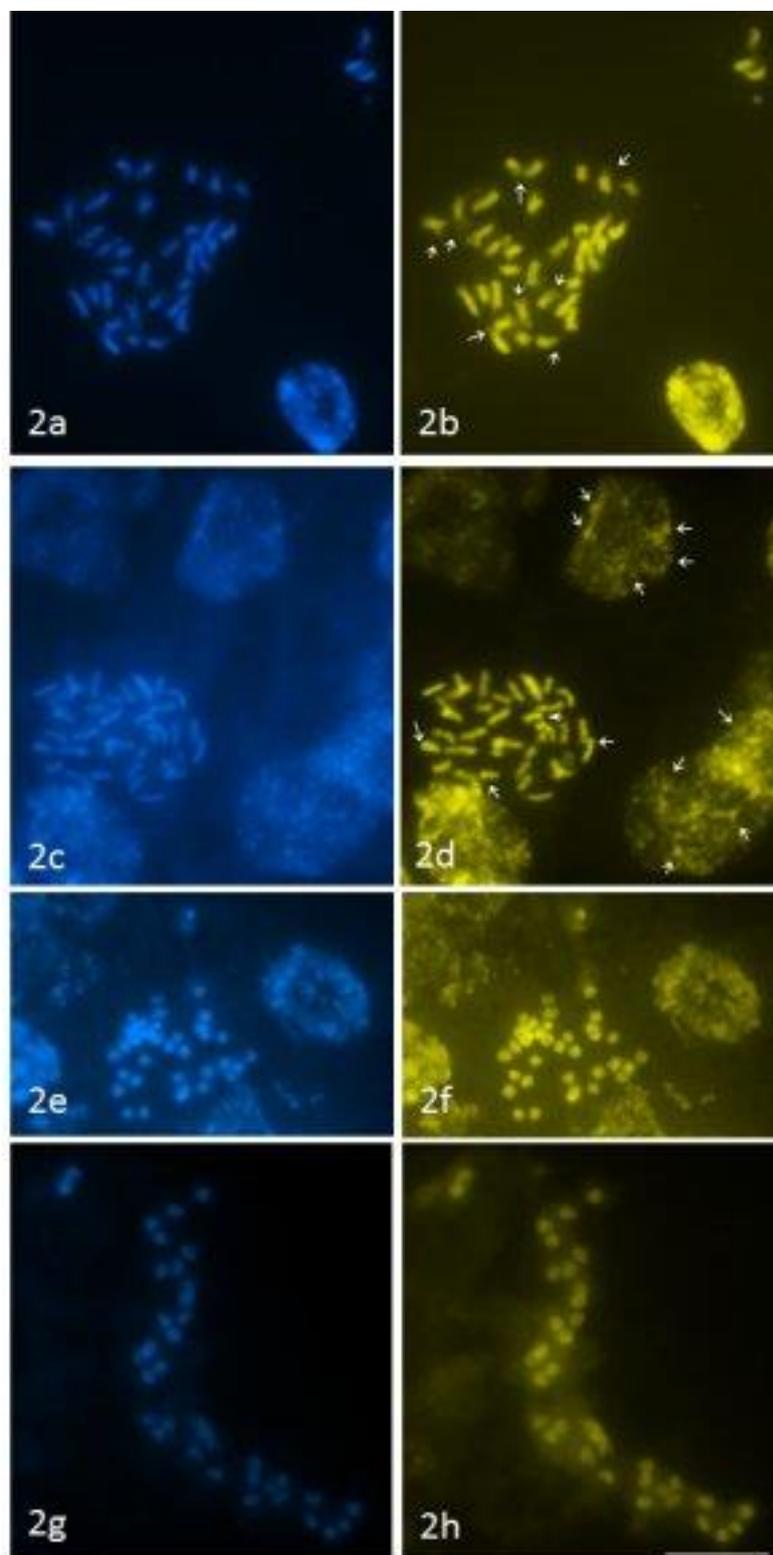


FIGURA 2. Metáfases mitóticas em capim buffel (*Cenchrus ciliares* L.) com $2n=36$. a e b) Cultivar Áridus; c e d) Cultivar Gayndah; e e f) Cultivar Grei; g e h) Cultivar Biloela. Setas indicam nos cromossomos região distendida referente ao satélite. Setas indicam nos núcleos regiões de cromatina mais brilhantes com coloração CMA. Barra representa $10\ \mu\text{m}$.

CONCLUSÕES

Todos os acessos de capim buffel analisados apresentam $2n=36$, observando-se variantes polissômicos na maioria dos genótipos;

A coloração diferencial CMA/DAAPI revela a presença de seis a oito cromossomos com porção subterminal distendida, possivelmente relacionada à região dos satélites.

REFERÊNCIAS

ALDERSON, J., SHARP, W. C. **Grass varieties in the United States**. Agriculture Handbook n.170, USDA, SCS, Washington D.C., p. 79-81, 1994.

AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p.55-63, 2006.

BURSON, B. L., ACTKINSON, J. M.; HUSSEY, M. A.; JESSUP, R. W. Ploidy determination of buffel grass accessions in the USDA National Plant Germplasm System collection by flow cytometry. **South African Journal of Botany**, v. 79, p. 91–95, 2012.

BURSON, B. L.; RENGANAYAKI, K.; DOWLING, C. D.; HINZE, L.L.; JESSUP, R. W. Genetic Diversity among Pentaploid Buffelgrass Accessions. **crop science**, v 55, p 1637–1645., 2015.

CRINS, W. J. The genera of Paniceae (Gramineae: Panicoideae) in the Southeastern United States. **J Arbor Suppl**, v.1, p. 205–220, 1991.

DAVIDE, L. C.; TECHIO, V. H.; NUNES, J. D.; PEREIRA, A. V. Variação cromossômica numérica em *Pennisetum*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 398-405, 2007.

DeLISLE, D. G. Taxonomy and distribution of the genus *Cenchrus*. **Science Iowa State University**, v.37: p. 259–351, 1963

DONADIÓ, S.; GIUSSANI, L. M.; KELLOGG, E. A.; ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. A preliminary molecular phylogeny of *Pennisetum* and *Cenchrus* (Poaceae-Paniceae) based on the trnL-F, rpl16 chloroplast markers. **Taxon**, v. 58, p. 392–404, 2009.

FISHER, W. D., BASHAW, E. C.; HOLT, E. C. Evidence for apomixis in *Pennisetum ciliare* and *Cenchrus setigerus*. **Agronomy journal**, v.46, p. 401–404, 1954.

GIUSSANI, L. M.; COTA-SA´NCHEZ, H.; ZULOAGA, F. O.; KELLOGG, E. A. A molecular phylogeny of the grass subfamily Panicoideae (Poaceae) shows multiple origins of C4 photosynthesis. **American Journal of Botany**, v.88, p. 1993–2012, 2001.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo, editora FUNPEC, 131 p., 2002.

GRIFFA, S.; DI'AZ†, D.; RIBOTTA, A. S. LANZA CASTELLI, S.; MUNÓZ, N.; COLOMBA, E. LÓPEZ.; LUNA, C.; GRUNBERG, K.; BIDERBOST, E. Molecular genetic discrimination of Buffel grass genotypes and F1 hybrids for breeding purposes using amplified fragment length polymorphism analyses. **Journal Compilation**, p.454-458, 2006.

HOLT, E. C. **Buffelgrass– A brief history**. In: RUNGE. E. C. A.; SCHUSTER, J. L. (Eds). *Buffelgrass: Adaptation, management, and forage quality*. Miscellaneous Publication. Tex. Agric, Exp. Stn. College Station, p. 1–5, 1985.

HUSSEY, M. A.; BURSON, B. L. Registration of 'Frio' buffelgrass. **Crop Science**, v.45, p.411–412, 2005.

IBARRA-FLORES, F. A.; COX, J. R.; MARTIN-R., M. A.; CROWL, T. A.; Call, C. A. Predicting buffelgrass survival across a geographical and environmental gradient. **Journal of Range Management**, v.48, p. 53–59, 1995.

KHAN, M. F.; EVANS, G. M. Analysis of the breeding system and of chromosome pairing at meiosis in a population of *Cenchrus ciliaris* L. from district Rawalakot, Azad Kashmir-Pakistan. **Cytologia**, Japan, v. 62, n. 1, p. 31-38, 1997.

KHARRAT-SOUISSI, A., BAUMEL, A., TORRE, F.; JUIN, M.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; ROIG, A.; CHAIEB, M. New insights into the polyploid complex *Cenchrus ciliaris* L. (Poaceae) show its capacity for gene flow and recombination processes despite its apomictic nature. **Australian Journal of Botany**, v. 59, p. 543–553, 2012.

KHARRAT-SOUISSI, A.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S. C.; CHAIEB, M. Cytogeography of *Cenchrus ciliaris* (Poaceae) in Tunisia. **Folia geobotanica**, v. 48, p.95–113, 2013.

MEHRA, P. N.; KHOSLA, P. K.; KOHLI, B. L.; KOONER, J. S. Cytological studies in the North-Indian grasses (Part I). **Panjab University Research Journal**, v.19, p.257–230, 1968.

OLIVEIRA, M. C. Capim buffel: Produção e Manejo nas regiões secas do Nordeste. Petrolina: EMBRAPA/CPATSA (**Circular Técnica**). 18p,1993.

OZIAS-AKINS, P.; AKIYAMA, Y.; HANNA, W. W. Molecular characterization of the genomic region linked with apomixis in Pennisetum/Cenchrus. **Functional and Integrative Genomics**, v. 3, p. 94–104, 2003.

POZZOBON, M. T.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; BIANCHETTI, L. B. Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian Capsicum L. (Solanaceae) species: do $x = 12$ and $x = 13$ represent two evolutionary lines?, **Biological Journal of the Linnean Society**, v, 151, p. 259-269, 2006.

SILVA, C. R.; VENTURIERI, G. A.; FIGUEIRA, A. Description of Amazonian Theobroma L. Collections species identification and characterization of

interspecific hybrids. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.18, n.2, p.333-341, 2006.

SIMPSON, J. R., FRETES, R. An economic evaluation of buffelgrass in Paraguay. **Journal Range Manage**, v.25, p.261–266, 1972.

SINGH, R. J. Plant cytogenetics. **CRC**, Boca Raton, p. 391, 1993.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in Plant Breeding**. Berlin: [s. n.], p. 469. 1993.

SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. In: LELLEY, T. (Ed). **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna:Tullen, Áustria: Universitatverlag, p. 22-32, 1998.

VISSER, N.; SPIES, J. J.; VENTER, H. J .T. Meiotic chromosome behavior in *Cenchrus ciliaris* (Poacea Panicoideae). **Bothalia**, v. 28, p. 83-90, 1998.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DE APOMIXIA EM ACESSOS DE CAPIM BUFFEL (*Cenchrus ciliaris* L.) por meio de marcadores SCAR

AValiação DE APOMIXIA EM ACESSOS DE CAPIM BUFFEL (*Cenchrus ciliaris* L.) POR MEIO DE MARCADORES SCAR

Autora: Livia Pinto Brandão

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Coorientador: Nataniel Franklin de Melo

Resumo: *Cenchrus ciliaris* L. se reproduz predominantemente por apomixia na forma poliploide da espécie e há ocorrência de indivíduos sexual na forma diploide. A apomixia pode ter um grande impacto na produção de alimentos, forrageiras e fibras, que são propagadas por semente, em todo o mundo. Objetivou-se realizar um estudo preliminar em trinta acessos do BAG de capim Buffel da Embrapa semiárido por meio de marcadores SCAR para predição de indivíduos possivelmente apomíticos. Foram analisados 30 acessos com 3 primers SCAR (OPF08-600, 19G e 20G). A extração de DNA genômico foi realizada por o procedimento de Doyle e Doyle (1990) com modificações. O volume final da reação de amplificação foi de 20 µl, seguidas de amplificação em termociclador e separação em gel de agarose. As amplificações com marcadores SCARs revelaram fragmentos com tamanho de 600 (OPF08-600), 300 (19G) e 100 (20G) pb. O primer OPF08-600 revelou 83% (25 acessos) de presença de bandas apomíticas. E o primer 19G, 77% (23 acessos) dos acessos apresentaram bandas indicativas de apomixia. Enquanto que o primer SCAR 20G, revelou que 97% (29 acessos) são apomíticos e 3 sexual. É possível inferir que os marcadores SCARs permitiu a identificação preliminar de acessos apomíticos para uso no programa de melhoramento. Embora seja necessário a associação de outra técnica de identificação de para dar maior confiabilidade aos resultados.

Palavras chave: Marcador molecular; Forrageira; Modo de reprodução; BAG

EVALUATION OF APOMIXIS IN ACCESSIONS OF BUFFEL GRASS (*Cenchrus ciliaris* L.) Through of Markers SCAR

Author: Livia Pinto Brandão

Adviser: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-adviser: Nataniel Franklin Melo

Abstract: *Cenchrus ciliaris* L. reproduces predominantly by apomixis as polyploid species and there is occurrence of sexual individuals in diploid form. Apomixis can have a major impact on food production, forage and fibers, which are propagated by seed, worldwide. The objective was to conduct a preliminary study in thirty Buffel grass BAG accesses Embrapa Semiarid through SCAR markers to possibly apomictic prediction individuals were analyzed 30 hits with three SCAR primers. (OPF08-600, 19G and 20G) Extraction of genomic DNA was performed by the procedure of Doyle and Doyle (1990) with modifications. The final volume of the amplification reaction was 20ul, followed by amplification in a thermocycler and separation on agarose gel. Amplifications with the SCAR markers revealed, fragment size 600 (OPF08-600), 300 (19G) and 100 (20G) bp. The primer OPF08-600 revealed 83% (25 accessions) the presence of apomictic bands. And the primer 19G, 77% (23 accessions) accesses had bands indicative of apomixis. While the SCAR primer 20G, revealed that 97% (29 accessions) are apomictic and three sexual. It is possible to infer that the SCAR markers allowed the preliminary identification of apomictic access for use in the breeding program. While it is necessary to join another technique of identification to provide greater reliability to the results.

Keywords: Molecular marks; Forage; Reproduction of mode: BAG

INTRODUÇÃO

Apomixia é um modo assexual de reprodução por sementes no qual há produção de progênie idêntica a planta mãe e os embriões se desenvolvem sem que ocorra a fecundação e a meiose. A apomixia é prevalente em um grande número de famílias de angiosperma (OZIAS-AKINS, 2006). Em *Cenchrus ciliaris* L. (capim buffel), Poaceae, o mecanismo de reprodução apomítico é por aposporia, em que há formação de um saco embrionário não reduzido (diplóide) logo após a diferenciação da célula mãe de megásporo (ASKER & JERLING, 1992).

Embora a reprodução predominante em *C. Ciliaris* seja por apomixia e esse fenômeno esteja restrito ao nível poliploide da espécie, genótipos sexuais também foram identificados na natureza em plantas diploides (FISHER et al., 1954; SNYDER et al., 1955; BASHAW, 1962; BRAY, 1978; SHERWOOD et al., 1980; GUPTA et al., 2001).

A apomixia já foi considerada uma barreira para o melhoramento genético. No entanto, nas últimas duas décadas, este modo de reprodução tem despertado interesse de pesquisadores devido à descoberta de plantas parcialmente apomíticas (apomíticas facultativas) em espécies cultivadas (HANNA & POWELL, 1973; ARTHUR et al., 1993), além do conhecimento de plantas sexuais em espécies apomíticas (BASHAW, 1962; HANNA et al., 1973) e à aquisição de informações sobre o controle genético da apomixia (BASHAW, 1980; NOGLER, 1984; KOLTUNOW, 1993). Estas descobertas são de grande importância para a utilização da apomixia em programas de melhoramento.

Para Hanna (1995), a apomixia pode ter um grande impacto na produção de alimentos, forrageiras e fibras, que são propagadas por sementes, em todo o mundo.

O uso da apomixia em larga escala poderá aumentar a diversidade genética existente, uma vez que de cada cruzamento entre uma planta sexual com uma planta apomítica poderá resultar uma combinação gênica única, independentemente da heterozigose ou homozigose dos parentais (HANNA, 1995).

A manipulação da apomixia já tem sido usada com sucesso há algum tempo no melhoramento de plantas forrageiras (BASHAW et al., 1980), com excelentes

resultados. Em *C. ciliaris*, a descoberta de uma única planta poliploide sexual permitiu a manipulação de um germoplasma até então não disponível para os melhoristas e geneticistas (TALIAFERRO & BASHAW, 1966).

Uma alternativa que vem sendo utilizada com sucesso para estudos em espécies apomíticas, é a tecnologia dos marcadores moleculares. O emprego dessas metodologias possibilita acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético podendo promover grandes avanços no desenvolvimento de variedades melhoradas (GUIMARÃES et al. 2009)

Dentre as muitas classes de marcadores moleculares, as do tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) são consideradas interessantes, pois são marcadores amplificados com primers específicos baseados em sequências geralmente já caracterizadas e mapeadas (PARAN & MICHELMORE, 1993). Estes primers são obtidos da conversão de outros marcadores, muitos deles a partir dos marcadores RAPD (SCOTTI et al., 1998).

Na literatura existem alguns trabalhos com abordagens diferenciadas que utilizam marcadores SCAR em capim buffel (YADAV et al., 2012; SIMON et al., 2013; DWIVEDI et al., 2007; GOEL et al., 2006). Os trabalhos de Yadav et al. (2012) e Dwivedi et al. (2007) serviram de base para a escolha dos primers do presente estudo, em que os autores demonstraram a presença da banda de marcador SCARs na identificação de apomixia em capim buffel.

Assim sendo, objetivou-se realizar um screening em trinta acessos do BAG de Capim Buffel da Embrapa Semiárido por meio de marcadores SCAR para predição de indivíduos possivelmente apomíticos, e selecionar esses acessos para estudos com outras metodologias que associados ao estudo molecular, revelem o modo de reprodução de cada acesso utilizado no Programa de Melhoramento de forrageira da Embrapa Semiárido.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram avaliados 30 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de capim buffel da Embrapa Semiárido, localizado em Petrolina (Tabela 1).

Tabela 1. Informações dos acessos de capim buffel analisados do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Petrolina, PE, Brasil, 2015.

Identificação do acesso	Data de introdução	Número no CPATSA	Origem
3	06/03/2014	POA-03	Petrolina-PE
5	06/03/2014	POA-04	Petrolina-PE
6	06/03/2014	POA-06	Petrolina-PE
40	06/03/2014	POA-40	Petrolina-PE
52	14/03/1977	7752	Matão-SP (IRI)
Pusa Giant	06/03/1979	79119	Índia (IARI)
Antan			
West Austrália	07/04/1979	79123	Austrália (CSIRO)
138	26/06/1979	79138	Quissamã-SE
141	26/06/1979	79141	Quissamã-SE
158	26/06/1979	79158	Quissamã-SE
195	11/05/1980	80195	Tanzânia (Cenargen)
198	11/05/1980	80198	Tanzânia (Cenargen)
237	06/03/2014	POA-237	Petrolina-PE
302	11/01/1982	82302	Irã
433	28/06/1983	83433	Austrália (CSIRO)
434	28/06/1983	83434	Austrália (CSIRO)
Buchuma conosite	12/06/1987	87541	Kênia (NARS)
571	10/09/1990	90571	USA (Texas A&M)
572	10/09/1990	90572	USA (Texas A&M)
579	10/09/1990	90579	USA (Texas A&M)
585	10/09/1990	90585	USA (Texas A&M)
590	10/09/1990	90590	USA (Texas A&M)
598	10/09/1990	90598	USA (Texas A&M)
603	10/09/1990	90603	USA (Texas A&M)
617	10/09/1990	90617	USA (Texas A&M)
7754	14/03/1977	7754	Matão-SP (IRI)
Áridus	11/05/1980	80196	Tanzânia (Cenargen)
Biloela	26/02/1976	7602	Pernambuco (Agroceres)
Gayndah	26/02/1976	7603	Pernambuco (Agroceres)
Grei ou Grass	19/11/1979	79176	Bahia

Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o procedimento de Doyle & Doyle (1990) com pequenas modificações, conforme anexo 1.

A quantificação do DNA extraído foi realizada por meio da comparação visual com bandas obtidas do DNA de fago λ de 10 ng, em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídio, visualizadas através de luz ultravioleta e registrada em aparelho fotodocumentador modelo LPix Image (Loccus Biotecnologia). Com base nas concentrações estimadas, as amostras foram diluídas para 10 ng/ μL^{-1} e armazenadas a -20 °C.

Marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*)

Três pares de iniciadores SCAR foram utilizados no *screening* de 30 acessos pertencentes ao BAG de *C. ciliaris* da Embrapa semiárido para possível identificação de acessos apomíticos (Tabela 2)

Tabela 2: Marcadores SCAR utilizados no *screening* de 30 acessos pertencentes ao BAG de *C. ciliaris* da Embrapa semiárido para possível identificação de acessos apomíticos.

SCAR	Sequência	Pb	Referência
OPF08-600*	Forward: CAATGTCCAGGACTCCTTTTTGG Reverse: AGGTGATAGGGGAATTGCTAAAGT'	600	Dwivedi, (2007)
19G*	Forward: CTGCTTCATTGATGCTCTCC Reverse: CAAGGAAGACTCACGCTTCG	300	Yadav, (2012)
20G*	Forward: CACTTTGCTGGTTGGTTGG Reverse: GCACCTAACATGGAAGATACAC	100	Yadav, (2012)

* Sequência de marcador SCAR para identificação de apomixia

As reações de amplificação foram realizadas contendo um volume final de 20 µL, utilizando os seguintes reagentes: 2,0 mM MgCl₂, 0,4 µM de cada um dos dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 10 pm de cada *primer*, 1x tampão PCR, uma unidade de Taq polimerase e 10 ng de DNA genômico, sendo o volume final ajustado com água miliQ.

As amplificações foram conduzidas em termociclador Gene Amp 9600 (Applied Biosystems). As condições de amplificação incluíram um ciclo de desnaturação de 3 min. a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação de 45 s a 94 °C, 1 min. de anelamento a 63 °C, 95 s de extensão a 72 °C, finalizando com uma extensão final de 10 min a 72 °C.

Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 2% (p/v) em voltagem constante de 80 V por 3h. A amplificação foi visualizada sob luz ultravioleta depois

de coradas com brometo de etídio. Utilizou o marcador de peso molecular de 1 kb (Ludwing) para determinar o tamanho dos fragmentos.

Análise dos dados

As imagens obtidas dos géis foram digitalizadas em fotodocumentador LPix Image (Loccus Biotecnologia) e os fragmentos amplificados via marcadores SCAR, interpretadas na forma de (1) presença - apomítico ou (0) ausência - sexual.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os marcadores SCAR OPF08-600, 19G e 20G amplificaram fragmentos com tamanho de 600 pb, 300 pb e 100 pb respectivamente. Apresentaram resultados satisfatórios na indicação preliminar de apomixia em acessos de *C. ciliaris* do banco de germoplasma de capim buffel da Embrapa Semiárido.

Dos 30 acessos testados, com o primer OPF08-600 83% (25 acessos) apresentaram perfis eletroforéticos com presença da banda, o que indica grande probabilidade para o modo de reprodução apomítico nesses acessos. Para tal primer os acessos 13, 16, 17, 23 e 29 não apresentaram bandas indicativas de apomixia, exaltando a possibilidade da existência de cinco indivíduos sexuais nesse grupo de acessos (Figura 1).

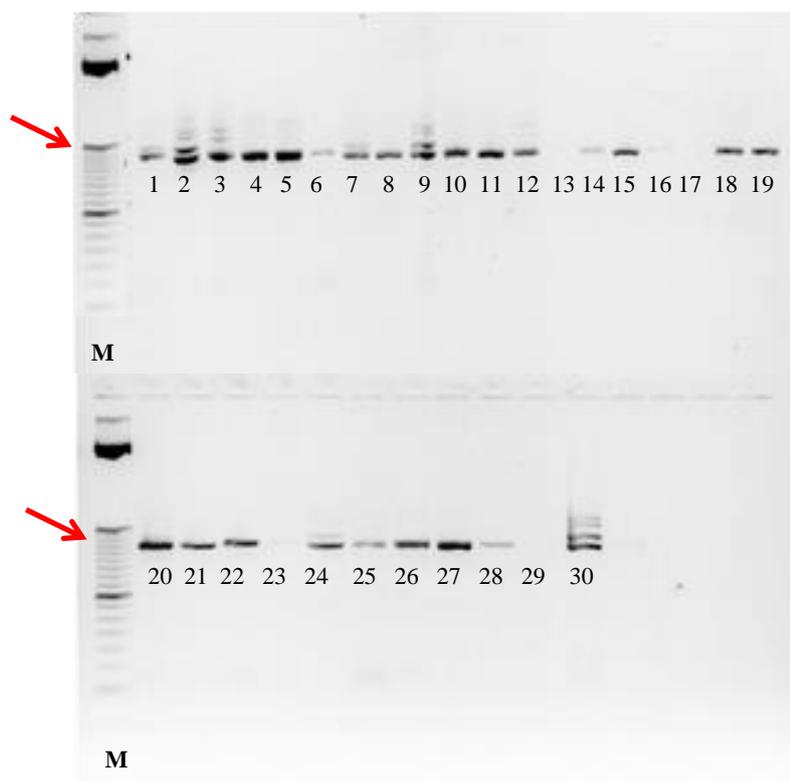


Figura 1: Perfil eletroforético primer SCAR OPF08-600 em gel de agarose 2 %. Amostras 1 a 30 (Tabela 1). Seta vermelha: Primer SCAR OPF08-600 com 600 pb; M = 1Kb (Affymetrix™).

São poucos os estudos em *C. ciliaris* utilizando marcadores SCARs ligados à apomixia. A pesquisa de Dwivedi et al. (2007), que serviu como direcionamento para o trabalho atual, desenhou um sequência de primers SCAR (OPF08-600) utilizando-se de 20 primers RAPD polimórficos para a apomixia dentre os 208 primers RAPD testados. A amplificação dos fragmentos de bandas específicas para a apomixia apresentaram tamanho de 600 pb. Além do uso dos marcadores RAPD, foi utilizando a técnica de clareamento de saco embrionário para selecionar os genótipos apomíticos e sexual com maior precisão. No presente trabalho, o primer OPF08-600 apresentou bandas possivelmente apomíticas, no tamanho de 600 pb, para os 25 acessos de capim buffel do BAG de capim buffel da Embrapa Semiárido, o que reforça a probabilidade desses acessos serem apomíticos.

Embora seja necessário, por apresentar maior confiabilidade à pesquisa, a associação de técnicas para identificação da apomixia, os dados aqui relatados

assemelharam-se com os descritos por Dwivedi et al. (2007) o que é um indicativo relevante para aprofundar o estudo apomítico nesses acessos.

Segundo Bashaw et al. (1980), a determinação do modo de reprodução de uma espécie deve ser realizada pela associação de diferentes técnicas, podendo ser análises citológicas da origem e subsequente desenvolvimento do saco embrionário e análises de progênie. Nenhum estudo isolado é conclusivo, pois as observações citológicas informam o tipo de apomixia, mas não indicam a frequência em que sementes assexuais são formadas em apomíticos facultativos. Ao contrário, as análises de progênie informam sobre a percentagem de indivíduos da progênie idênticos e diferentes da planta mãe e, por isso, fornecem uma boa estimativa da frequência de apomixia, mas não revelam o mecanismo envolvido (aposporia, diplosporia ou embriônia adventícia) (BASHAW et al., 1980).

A técnica da análise do polimorfismo do DNA, como RAPD, SCAR, RFLP), entre outros, também tem contribuído para a determinação do modo de reprodução de diferentes espécies de plantas de capim buffel (ORTIZ et al., 1997; NASSAR et al., 1998).

Para primer 19G, 77% dos acessos (23 acessos) apresentaram bandas indicativas de apomixia, sendo que os acessos 10, 13, 18, 24, 26, 27 e 28 não apresentaram bandas provavelmente apomíticas, apontando a possibilidade de modo sexual entre os sete acessos (Figura 2). O perfil eletroforético do primer SCAR 20G, revelou que 97% dos acessos analisados (29 acessos) são apomíticos e três sexuais (16) (Figura 3).

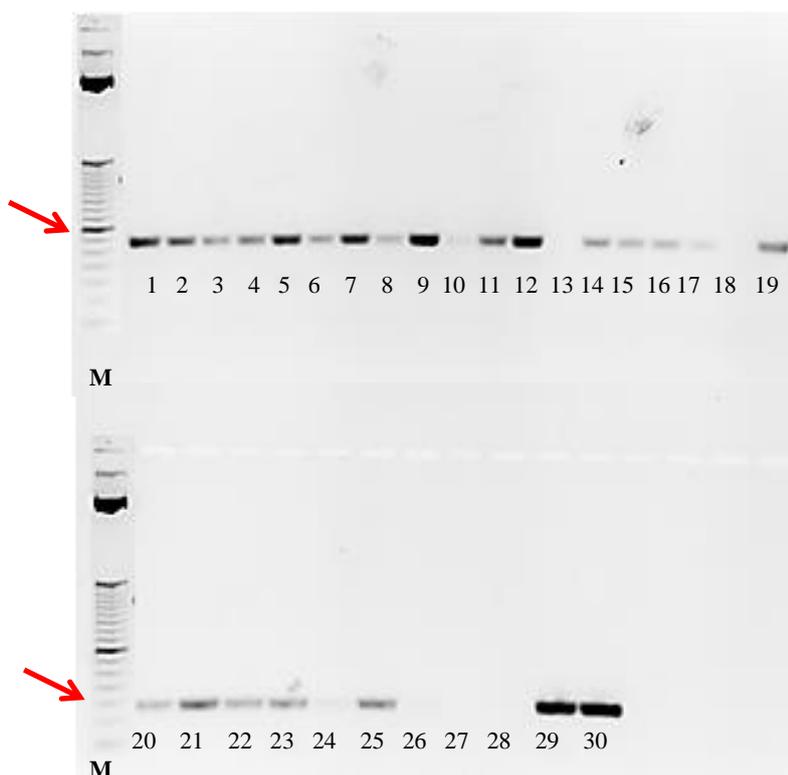


Figura 2: Perfil eletroforético do primer SCAR 19G em gel de agarose 2 %. Amostras 1 a 30 (Tabela 1). Seta vermelha: Primer SCAR 19G com 300 pb; M = 1Kb (Affymetrix™).

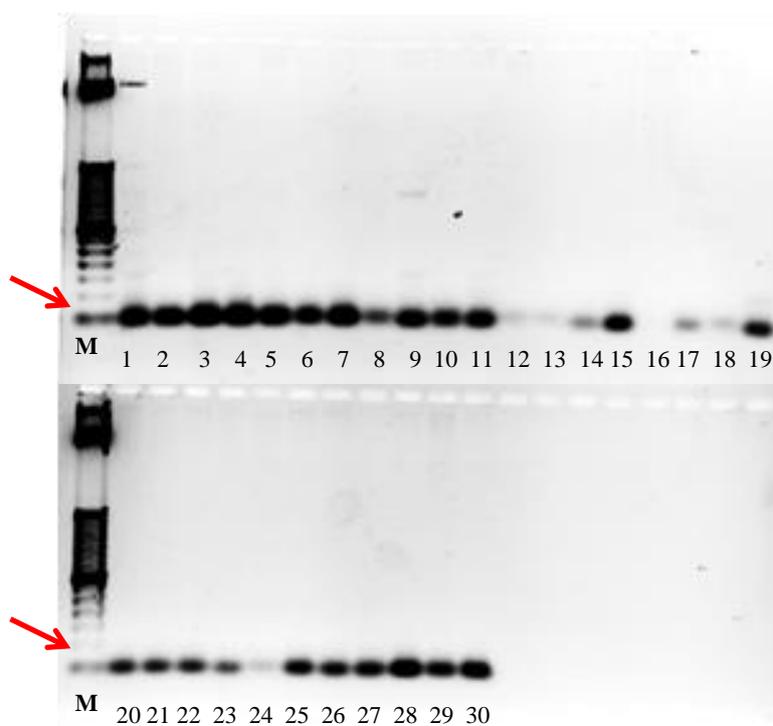


Figura 3: Perfil eletroforético primer SCAR 20G em gel de agarose 2 %. Amostras 1 a 30 (Tabela 1). Seta vermelha: Primer SCAR 20G com 100 pb; M = 1Kb (Affymetrix™).

Acredita-se que a ausência de bandas nesses acessos esteja ligada ao modo reprodutivo sexual, devido a relação estreita do loco 19G com a apomixia. Yadav et al. (2012) utilizaram 180 marcadores de polimorfismo AFLP, dos quais 42 estavam associados a apomixia e 29 ao modo sexual em *C. ciliaris*, esses marcadores foram mapeados em torno dos loci apomíticos e sexuais e os marcadores 18G, 19G e 20G mostraram estreita relação de ligação em torno do loco apomítico. Enquanto que os marcadores 12FS, 4HS e 12b mostraram estreita relação de ligação em torno do loco sexual. Resultando no desenvolvimento de sete marcadores SCAR ligados a apomixia e um marcador SCAR ao traço sexual.

Na análise dos perfis eletroforético dos três géis gerados com o primer SCAR, foi possível observar a reincidência de ausência de bandas apomíticas entre os acessos 13 (Figuras 1 e 2) e 16 (Figuras 1 e 3) . O que indica a forte possibilidade desses acessos serem de reprodução sexual.

Como ocorreu variação nos resultados de presença de bandas apomíticas para os três primers em estudo, acredita-se que a técnica molecular isolada não é suficiente para reprodução robusta e precisa dos resultados.

CONCLUSÕES

Os marcadores SCARs permitem a identificação preliminar de possíveis acessos apomíticos no BAG da Embrapa Semiárido para uso no programa de melhoramento de forrageira.

Faz-se necessário a associação de outra técnica de identificação de apomixia entre tais acessos de capim buffel, para dar maior confiabilidade aos resultados.

REFERÊNCIAS

ARTHUR, L.; OZIAS-AKINS, P.; HANNA, W. W. Female sterile mutant in pear evidence for initiation of apospory. **The Journal of Heredity**, New York, v. 84, p.112-115, 1993.

ASKER, S.E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC, 298 p. 1992.

BASHAW, E.C. Apomixis and sexuality in buffelgrass. **Crop Science**, v. 2, p.412-415, 1962.

BASHAW, E. C. Apomixis and its application in crop improvement. In: FEHR, W. R.; HADLEY, H. H. **Hybridization of Crop Plants**. Madison: American Society of Agronomy, Cap. 3, p.45-63,1980.

BRAY, R. A. Evidence for facultative apomixis in *Cenchrus ciliaris*. **Euphytica**, v. 27, p. 801-804, 1978.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.1315, 1990.

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**, v. 172, p. 788- 795, 2007.

FISHER, W. D., BASHAW, E. C.; HOLT, E. C. Evidence for apomixis in *Pennisetum ciliare* and *Cenchrus setigerus*. **Agronomy journal**, v.46, p. 401–404, 1954.

GOEL, S.; CHEN, Z.; AKIYAMA, Y.; CONNER, J. A.; BASU, M.; GUALTIERI, G.; HANNA, W. W.; OZIAS-AKINS, P. Comparative physical mapping of the apospory-specific genomic region in two apomictic grasses: *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. **Genetics**, v.173, p. 389-400, 2006,

GUIMARÃES, C. T.; MAGALLIÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCLIUSTER Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n. 253, p. 24-33, 2009.

GUPTA, S.; GUPTA, M. G.; BHAT, B. V.; BHAT, V. Status of apomixis and sexuality in four species of *Cenchrus*. **Journal of Plant Biology**, v. 28, p. 153–159, 2001.

HANNA, W. W. Use of apomixis in cultivar development. **Advances in Agronomy**, v. 54, p.333- 350, 1995.

HANNA, W. W.; POWELL, J. B. Stubby head, an induced facultative apomictic in pearl millet. **Crop Science**, Madison, v. 13, p.726-728. 1973.

HANNA, W. W.; POWELL, J. B.; MILLOT, J. C.; BURTON, G. W. Cytology of obligate sexual plants in *Panicum maximum* Jacq. and their use in controlled hybrids. **Crop Science**, Madison. v. 13, p.695-697, 1973.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p.1425- 1437, 1993.

NASSAR, N. M. A.; VIEIRA, M. A.; VIEIRA, C.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular and embryonic evidence of apomixis in cassava interspecific hybrids (*Manihot* ssp.). **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 78, p.349-352, 1998.

NOGLER, G. A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, H. M. Embryology of angiosperms. Berlin: **Springer-Verlag**, p.475-519, 1984.

ORTIZ, J. P. A.; PESSINO, S. C.; LEBLANC, O.; HAYWARD, M. D.; QUARIN, C. L.. Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p. 850–856, 1997.

OZIAS-AKINS, P. Apomixis: developmental characteristics and genetics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.25, 2006.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, n. 8, p. 985-993, 1993.

SCOTTI, I.; TROGGIO, M.; SORANZO, N.; VENDRAMIN, G. G.; BUCCI, G. A. New set of PCR-based, locus-specific markers for *Picea abies*(L.) Karst. **Molecular Ecology**, Loughborough, v.7, p.783-785, 1998.

SIMON, B.; CONNER, J. A.; OZIAS-AKINS. P. Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in apomictic and sexual *Cenchrus ciliaris*. **BMC Research Notes**, v.6, 397p., 2013.

SHERWOOD, R. T.; YOUNG, B. A.; BASHAW, E. C. Facultative apomixis in buffelgrass. **Crop Science**, v.20, p. 375–379, 1980.

SYDNER, L. A.; HERNANDEZ, A. R.; WARMKE, H. E. The mechanisms of apomixis in *Pennisetum ciliare*. **Botanical Gazette**, v. 116, p. 209-221, 1955.

TALIAFERRO, C. M.; BASHAW, E. C. Inheritance and control of obligate apomixis in breeding buffelgrass, *Pennisetunz ciliare*. **Crop Science**, Madison, v. 6, p.473-476, 1966.

YADAV, C. B.; ANUJ; 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**, v.30, p. 239-250, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na região semiárida do nordeste brasileiro, a atividade pecuária ocupa um lugar de destaque, uma vez que é considerada uma das principais atividades econômicas.

Levando em consideração o elevado custo da alimentação animal, existe uma forte demanda por forrageiras mais produtivas, com melhor qualidade nutricional e boa adaptação às condições ambientais do semiárido.

O capim buffel é uma importante forrageira para a pecuária, sendo utilizada como fonte nutritiva para os caprinos e ovinos em nossa região. Nesse sentido, a Embrapa Semiárido está iniciando um programa de melhoramento de capim buffel, com a finalidade de implementar estratégias que possibilitem o desenvolvimento de novos genótipos, que reúnam características agronômicas de interesse e ajustadas às condições do semiárido.

A maior limitação para o desenvolvimento do programa de melhoramento para tal forrageira, consiste na ausência de informações básicas entre os acessos da coleção da Embrapa Semiárido, Petrolina-Pe. Desconhece-se o modo de reprodução de cada indivíduo, assim como, a existência de variabilidade, além de informações relativas ao genoma (como número cromossômico). A citogenética da espécie está altamente relacionada ao desenvolvimento de novas cultivares, pois é necessário a identificação de plantas sexuais diploides, para realizar cruzamentos intraespecíficos devido ao modo de reprodução em capim buffel ser predominantemente por apomixia.

Entretanto, o pequeno número de cultivares disponíveis nessa coleção e a carência de informações que discriminem os acessos justifica a iniciativa deste trabalho. Nesse processo, tanto o conhecimento do polimorfismo entre os acessos quanto a citogenética são indispensáveis para discriminação de genótipos, certificações de ploidia, determinação do número cromossômico, de similaridades cromossômicas e ainda para verificar existência de anormalidades cromossômicas. Tais informações subsidiam as decisões dos melhoristas e contribuem para reduzir tempo na escolha dos genótipos mais estáveis e compatíveis.

Contudo, esse trabalho se reveste da importância ao fomentar o programa de melhoramento genético de capim bufell da Embrapa Semiárido, com informações preliminares para início de atividades.

ANEXO

ANEXO I

**PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDO VEGETAL (MINI-PREP)
(Doyle & Doyle, 1987, com modificações)**

Solução tampão de extração

SOLUÇÕES / REAGENTES/ CONC. FINAL	V. Final 10 ml
CTAB a 2,0 %	2,0 mL
NaCl a 5 M 1,4 M	2,8 mL
Tris HCl a 1M pH 8,0 0,1 M	1,0 mL
EDTA a 0,5 M 20 mM	400 µL
2-mercaptoetanol 0,4 %	40 µL
H2O de milli-Q	3,76 mL

1. Coletar as amostras de folhas de plantas, de preferência jovens e saudáveis, evitando áreas atacadas por pragas e doenças. De modo geral deve-se lavar as folhas em água corrente, usando sempre que necessário detergente. Enxaguar com água destilada e secar com papel toalha.
2. Macerar 300 mg do tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido ou diretamente no tubo usando um micro-pistilo.
3. Transferir a amostra para tubo de eppendorf de 2 mL e adicionar 700 µL da solução tampão de extração a 65°C. Homogeneizar suavemente, pôr inversão, durante 5 minutos.
4. Incubar os tubos em banho-maria a 65°C por 45 minutos, e homogeneizar a cada 15 minutos.
5. Retirar do banho-maria.

6. Adicionar 700 μ L de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1), e homogeneizar suavemente.
7. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm.
8. Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos.
9. Adicionar 700 μ L de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1), e homogeneizar suavemente.
10. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm.
11. Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos.
12. Adicionar 450 μ L de álcool Isopropílico (gelado). Tem que ser equivalente a aproximadamente 2/3 do volume coletado. Homogeneizar suavemente, incubar a (-20°C) por 20 minutos.
13. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm.
14. Ressuspender o DNA isolado em 600 μ L de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM).
15. Fechar o tubo e misturar suavemente por inversão para homogeneizar a solução. Incubar no gelo por 15 minutos.
16. Centrifugar por 15 minutos a 12.000 rpm. Transferir o sobrenadante para um novo tubo.
17. Adicionar 800 μ L de ETANOL ABSOLUTO ao sobrenadante e misture suavemente por inversão. Incube por 1 hora a -20°C.
18. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm.
19. Lavar o precipitado com etanol 70% gelado (v/v) (500 μ L) e centrifugar novamente nas mesmas condições anteriores por 3 minutos.
20. Secar o precipitado e dissolver em 100 μ L de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) + 1 μ L de RNase (10 mg/ml).
21. Colocar na estufa à 37°C durante 1 hora.
22. Guardar o DNA no -20°C (armazenamento).