

## Contribuição da biotecnologia ao domínio da apomixia de *Brachiaria sp*

Vera Tavares de Campos Carneiro  
Ana Cláudia Guerra de Araújo  
Diva Maria de Alencar Dusi  
Gláucia Barbosa Cabral  
Júlio Carlyle Macedo Rodrigues  
Elizangela Ribeiro Alves  
Erica Duarte Silveira  
Ana Luisa Machado Lacerda  
Ana Cristina Gomes  
Rosana Falcão

A apomixia é um modo de reprodução assexual por sementes no qual as plantas geradas são idênticas à planta-mãe. Na apomixia o desenvolvimento do embrião ocorre sem a fertilização da oosfera. Na apomixia pseudogâmica, a fertilização da célula central do saco embrionário pelo gameta masculino é essencial para formação do endosperma das sementes. Já na apomixia autônoma a fertilização não é necessária em absoluto para a formação da semente. A apomixia é considerada um entrave ao melhoramento genético uma vez que as características paternas não são transmitidas à progênie. No entanto, pela capacidade das plantas apomíticas de clonagem através de sementes, este modo de reprodução despertou o interesse de pesquisadores da área de biotecnologia. Os genes responsáveis pela apomixia são considerados de interesse para espécies de importância agrônômica em frente aos recursos da engenharia genética e transformação de plantas. Entre outras perspectivas de aplicação destes genes está a possibilidade de sua transferência para cultivares elite, ou híbridos o que permitirá sua perpetuação por sementes, reduzindo custos de produção e trazendo ao agricultor, autonomia para produção de suas próprias sementes. Também, transformar espécies normal-

mente multiplicadas por estaquia em apomíticas, diminuirá a incidência de doenças transmitidas por vírus, mantendo as vantagens da clonagem.

O modo de reprodução apomítico caracteriza-se pelo desenvolvimento autônomo de um embrião, isto é, sem fecundação da oosfera, gameta feminino. Deste modo, a oosfera contém exclusivamente os cromossomos somáticos maternos, e a planta gerada apresenta constituição genética idêntica à planta-mãe. Em plantas que se reproduzem sexualmente, o saco embrionário é originário da célula-mãe do megásporo, após redução meiótica. Na apomixia diplospórica, a célula-mãe do megásporo não sofre divisão meiótica ou sofre uma meiose incompleta, levando à formação de um saco embrionário não-reduzido. Na apomixia apospórica, células nucleares somáticas diferenciam-se (células iniciais apospóricas) dando origem a sacos embrionários não-reduzidos (Nogler 1984, Asker e Jerling, 1992).

Em várias espécies de *Brachiaria* foi observado, dentro de uma mesma espécie, tanto acessos com modo de reprodução apomítico quanto com modo de reprodução sexual

(Valle 1990). No Brasil, esta forrageira de origem africana apresentou excelente adaptação à região de cerrados e estima-se uma área plantada de cerca de 40 milhões de hectares (Macedo, 1995). Praticamente duas espécies são cultivadas nesta área: *B. brizantha* e *B. decumbens*, seguidas pela *B. ruziziensis*. Por sua importância como forrageira a Embrapa introduziu uma coleção de germoplasma de *Brachiaria* no país e implantou um programa de melhoramento genético na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande-MS. Verificou-se que, entre as 13 diferentes espécies com cerca de 435 acessos, encontravam-se predominantemente tetraplóides apomíticas. Em algumas espécies, como *B. brizantha* e *B. decumbens* foram caracterizadas variedades sexuais diplóides e apomíticas tetraplóides (Valle & Savidan 1996). Análises em progênie de cruzamentos interespecíficos sugerem que a herança da apomixia é dominante e ligada a um único locus genético (Valle et al. 1994).

A preocupação de aumentar a base genética de *Brachiaria* nas pastagens aponta diferentes demandas do melhoramento. Primeiramente, é necessária a obtenção de novas variedades: sexuais tetraplóides e apomíticas diplóides que permitam cruzamentos intraespecíficos, sobretudo dentro das espécies de *B. brizantha* e *B. decumbens*. Isto porque atualmente, todo o programa de melhoramento de *Brachiaria* utiliza como progenitor feminino uma única espécie de *B. ruziziensis* tetraplóide artificial. A quebra da apomixia nestas variedades permitirá a introdução, por cruzamentos, de novas características agrônômicas. A identificação de marcadores moleculares permitirá a triagem precoce de variedades dos modos de reprodução sexual e apomítico, sem necessidade de chegar-se à floração para análise de sacos embrionários. Finalmente, a identificação de genes responsáveis pela apomixia possibilitará o controle deste modo de reprodução, visando impedir sua expressão quando a introdução de novas características for de interesse.

Neste cenário, um projeto de estudo da apomixia foi lançado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, em 1995 dentro do Programa de Pesquisa Básica em Biotecnologia. Realizou-se um estudo comparativo dos mecanismos de reprodução apomítico e sexual nas espécies *B. brizantha* e *B. decumbens* por estas apresentarem os dois modos de reprodução (Dusi e Willemse, 1998, 1999a, b; Araújo et al. 2000). A inflorescência de braquiária é uma panícula com dois a cinco racemos que sustentam as espiguetas dispostas em duas fileiras. Normalmente, a floração das plantas de braquiária no Brasil se dá no período que vai de dezembro a julho. A espiguetas contém duas flores sendo uma hermafrodita, composta de três anteras e um pistilo com um ovário e um só óvulo. A outra flor, estaminada,

apresenta três anteras. A diferença mais visível entre as plantas apomíticas e sexuais está na estrutura dos sacos embrionários localizados dentro dos óvulos. A apomixia descrita é do tipo apospórica, e o saco embrionário do tipo *Panicum* com quatro núcleos, enquanto as plantas sexuais apresentam sacos embrionários do tipo *Polygonum* com oito ou mais núcleos.

Estabeleceu-se método de regeneração de plantas por organogênese a partir de tecidos meristemáticos (Carneiro et al. 1995) e embriogênese a partir de embriões maduros (Lenis-Manzano 1998; Costa et al. 2001) e embriões imaturos (Rodrigues-Otubo et al. 2000). Foram obtidas plantas de *B. brizantha* e *B. decumbens* com o número de cromossomos duplicados a partir de variedades sexuais diplóides (Pinheiro et al. 2000). Análises das primeiras florações apontam para manutenção do modo de reprodução sexual (Pozzobon & Araújo 1997) e a estabilidade do número de cromossomos duplicados será verificada na progênie destas plantas. Um método de transformação genética por biobalística em embriões maduros foi também desenvolvido em colaboração entre a Embrapa e o CIAT (Lenis-Manzano 1998; Lentini et al. 1999) e, atualmente, busca-se a confirmação de eficiência de diferentes promotores para trabalhos de transformação com genes de interesse (Silveira et al. 2000)

Verificou-se que as etapas de desenvolvimento de plantas de *Brachiaria* relacionadas à megasporogênese se dão em estágios precoces do desenvolvimento do ovário (Gobbe et al. 1982; Lutts et al. 1994; Dusi & Willemse 1998; 1999a; 1999b; 1999c; Araújo et al. 2000). Estes ovários foram caracterizados pelo tamanho e aspecto dos estigmas, ainda dentro da flor. Nos estágios relacionados a megagametogênese encontram-se estigmas plumosos em ovários maiores, em estágios anteriores à antese. Portanto, para se identificar genes responsáveis pela programação da formação de um saco embrionário em apomítico é necessário que esta busca seja realizada em estágios precoces de desenvolvimento do ovário. A técnica denominada "Differential Display PCR (DDPCR)" foi utilizada para comparar o perfil de expressão gênica em ovários de plantas apomíticas e sexuais. Através dela, 60 seqüências de c-DNA amplificadas por PCR de mRNA dos ovários das plantas sexuais e apomíticas foram isoladas em um primeiro passo para a caracterização do genoma funcional desta forrageira (Rodrigues et al. 2001).

Foram identificados marcadores moleculares que segregam com o caráter apospórico em *B. brizantha*. Utilizando seqüências derivadas de milho, esses marcadores foram localizados no cromossomo 5 de seu genoma (Pessino et al. 1997; 1998). Leblanc et al. (1997) isolaram fragmentos de cDNA específicos de plantas apomíticas pertencen-

tes a uma população segregante originada de cruzamentos entre *B. brizantha* (apomítica) e *B. ruziziensis* (sexual). A identificação de marcadores moleculares para a apomixia permitirá ao melhoramento a seleção precoce do modo de reprodução, aumentando a eficiência na identificação das progênies antes de levá-las ao campo.

A formação da semente na planta apomítica foi observada em *B. brizantha* (Alves 2000). O pólen produzido por estas plantas é reduzido, contem três núcleos e sua viabilidade e diâmetro variam ao longo do período de floração. A pseudogamia foi evidenciada em *B. brizantha* observando-se a não formação de sementes em plantas com estigmas excisados e a fertilização do núcleo polar pelo gameta masculino foi visualizada por microscopia ótica (Alves et al. 2001). O embrião partenogenético é oriundo da oosfera e o desenvolvimento inicial do endosperma é do tipo nuclear-livre e está sempre associado à presença de um embrião. Análises citogenéticas do endosperma confirmam a taxa de 2:1 na contribuição dos genomas materno: paterno, respectivamente.

A continuidade deste trabalho deverá contribuir de maneira direta ao melhoramento genético de *Brachiaria* pela obtenção de novos cultivares e identificação de marcadores moleculares, bem como pelo desenvolvimento de estratégia de transformação genética que permitirá trazer novas características a estas plantas, independentemente da compatibilidade.

## Referências bibliográficas

- ALVES E. R. **Aspectos da reprodução em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. 2000. 94 p. Tese (Mestrado) - Departamento de Botânica. Universidade de Brasília, Brasília.
- ALVES, E. R.; CARNEIRO, V.; ARAUJO, A. C. G. Direct evidence of pseudogamy in an apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 207-212, 2001.
- ARAÚJO, A. C. G.; MUKHAMBETZHANOV, S.; POZZOBON, M. T.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. C. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales - Le Botaniste**, Paris, t. 23, v. 1-2, p. 13-28, 2000. .
- ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 298 p.
- CARNEIRO, V. T. C.; MARTINS, G.; BEZERRA, I. C. Direct development of plantlets from immature panicles of *Brachiaria brizantha* *in vitro*. In: ENCUESTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1995, Puerto Iguazu- Argentina. **REDBIO95**. [S.l.: s.n], 1995.
- COSTA, S. S.; SILVEIRA, D. S.; CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. C. Otimização do método de regeneração de *Brachiaria brizantha*. In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 6., 2001, Brasília, DF. **Anais: resumos dos trabalhos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.
- DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Apomixis in *Brachiaria decumbens*: calendar, carbohydrates and callose. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON SEXUAL PLANT REPRODUCTION, 15., 1998, Wageningen. [**Proceedings**. s.l.: s.n, 1998].
- DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Activity and localisation of sucrose synthase and invertase in ovules of sexual and apomictic *Brachiaria decumbens*. "**Protoplasma**, Vienna, v. 208, p. 173-185, 1999a.
- DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Botanica Cracoviensia Series Botanica**, v. 41, p. 151-162, 1999b.
- DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Carbohydrate metabolism during ovule development in sexual and apomictic *Brachiaria decumbens*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 7., 1999, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 1999c.
- GOBBE, J.; LONGLY, B.; LOUANT, B. P. Calendrier des sporogénèse et gametogénèse femelles chez le diploïde et le tetraploïde induit de *Brachiaria ruziziensis* (Graminée). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60, p. 2032-2037, 1982.
- LEBLANC, O.; ARMSTEAD, I.; PESSINO, S.; ORTIZ, J. P. A.; EVANS, C.; VALLE, C. B. do; D.HAYWARD, M. D. Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualise gene expression in mature ovaries of *Brachiaria hybrids* derived from *B. brizantha*, an apomictic tropical forage. **Plant Science**, v. 126, n. 1, p. 49-58, 1997.
- LENIS-MANZANO, S. J. **Desenvolvimento de um método de transformacao genetica de *Brachiaria spp*, por bombardeamento de particulas**. 1998. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília.

LENTINI, Z.; CARNEIRO, V. T. C.; MANZANO, S. J. L.; GALINDO, L. **Processo de regeneração de plantas e transformação genética de espécies de *Brachiaria***. Brasil: EMBRAPA; Cali: CIAT, 1999. PI 9903700-9,

LUTTS, S.; NDIKUMANA, J.; LOUANT, B. P. Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F1 hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 78, p. 19-25, 1994.

MACEDO, M. C. M. Pastagens no ecossistema cerrados: pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 22., 1995, Brasília, DF. **Anais da 22a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia e Simpósio sobre Pastagens no Ecossistemas Brasileiros: pesquisas para o desenvolvimento sustentável**, Brasília: SBZ, 1995. p. 28-62.

NOGLER, G. A. Gametophytic Apomixis. In: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 475-518.

PESSINO, S. C.; EVANS, C.; ORTIZ, J. P. A.; ARMSTEAD, I.; VALLE, C. B. do; HAYWARD, M.D. A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria hybrids*: identification of the two markers closely associated with the trait." **Hereditas**, Lund, Sweden, v. 128, p. 153-158, 1998.

PESSINO, S. C.; ORTIZ, J. P. A.; LEBLANC, O.; VALLE, C. B. do; EVANS, C.; HAYWARD, M. D. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, n. 3-4, p.439-444, 1997.

PINHEIRO, A. A.; POZZOBON, M. T.; VALLE, C. B. do; PENTEADO, M. I. O.; CARNEIRO, V. T. C. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants, using colchicine. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 3, p. p.274-278, 2000.

POZZOBON, M. T.; ARAÚJO, A. C. G. Analysis of *Brachiaria* and *Paspalum* (Gramineae) embryo sacs using Herr's clearing modified technique and interferencial microscopy. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, SP, v. 20, 1997. Sup. J7.

RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. C. Isolation of differentially expressed cDNA sequences from ovaries of sexual and apomictic *Brachiaria brizantha*. In: INTERNATIONAL APOMIXIS CONFERENCE, 2., 2001, Como, Itália. [Proceedings. S.l.: s.n., 2001].

RODRIGUES-OTUBO, B.; PENTEADO, M. I. D. O.; VALLE, C. B. do. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 61, n. 3, p. 175-182, 2000.

SILVEIRA, E. D.; RODRIGUES, J. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. Construção de vetores para transformação por biobalística. In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 5., 2000, Brasília, DF. **Anais: resumos dos trabalhos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.

VALLE, C. B. do. **Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1990. 33 p. (EMBRAPA-CNPQC. Documentos, 46).

VALLE, C. B. do; GLIENKE, C.; LEGUISAMON, G. O. C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. **Apomixis Newsletter**, v. 7, p. 42-43, 1994.

VALLE, C. B. do; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do. KUMBLE, V. (Ed). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT/Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1996. 288p. (CIAT. Publication, 259).

#### Comunicado Técnico, 101

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia** Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) - Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 <http://www.cenargen.embrapa.br> e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



1ª edição

1ª impressão (2003): 150 unidades

#### Comitê de publicações

**Presidente:** José Manuel Cabral de Sousa Dias  
**Secretário-Executivo:** Maria José de Oliveira Duarte  
**Membros:** Maurício Machaim Franco

Regina Maria Dechechi G. Carneiro  
Luciano Lourenço Nass  
Sueli Correa Marques de Mello  
Vera Tavares Campos Carneiro

#### Expediente

**Supervisor editorial:** Maria José de Oliveira Duarte  
**Normalização Bibliográfica:** Maria Alice Bianchi  
**Editoração eletrônica:** Giscard Matos de Queiroz