

CIRCULAR TÉCNICA

85

São Carlos, SP
Agosto, 2019

Avaliação da citologia, genética e biologia reprodutiva de espécies de *Paspalum* para o estabelecimento de um programa de hibridações

Alessandra Pereira Fávero



Avaliação da citologia, genética e biologia reprodutiva de espécies de *Paspalum* para o estabelecimento de um programa de hibridações¹

1 Introdução

A pecuária brasileira ocupa aproximadamente 180 milhões de hectares do território nacional, sendo que 80% são ocupados com espécies forrageiras exóticas, principalmente do gênero *Brachiaria*. Tal realidade torna a pecuária altamente vulnerável a danos por praga e/ou doença, com consequências potencialmente desastrosas. Além disso, a grande maioria das cultivares são apomíticas e, geralmente, cada uma representa um só genótipo, em razão de seu sistema reprodutivo. Isso pode ser exemplificado com a infestação de cigarrinha-das-pastagens em *Brachiaria decumbens* na região Centro-Oeste (COSENZA, 1982) e a “Síndrome da Morte Súbita” em pastagens de *Brachiaria brizantha* na Região Norte (BARBOSA, 2006).

Muitos campos naturais do Paraguai, Bolívia, sul do Brasil, norte da Argentina e norte do Uruguai possuem espécies nativas pertencentes ao gênero *Paspalum*. As introduções do cultivo e do melhoramento genético de espécies nativas de *Paspalum* podem ser um caminho para diversificar a oferta de cultivares forrageiras para o Brasil e países vizinhos. Sendo nativas, as espécies desse gênero oferecem menores riscos de provocar desequilíbrio ecológico com a introdução de doenças e pragas desconhecidas quando utilizadas em culturas extensivas, como gramados e pastagens, tornando-se, assim, um agronegócio de maior sustentabilidade.

O gênero *Paspalum* é o mais importante gênero da família Poaceae nas Américas (CHASE, 1929; BARRETO, 1974; GOMES, 1995; ALISCIONI, 2002). Dentro do gênero, há diversas espécies nativas do Brasil com alto valor forrageiro e, também, com possibilidade de uso como cobertura de solo.

¹ Alessandra Pereira Fávero, Dra., pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste

Essa realidade fundamenta o interesse por introduzir espécies do gênero ao cultivo e melhorá-las geneticamente com vistas a aumentar a diversidade de forrageiras disponíveis. O gênero compreende cerca de 330 espécies distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, basicamente no continente americano (ZULOAGA; MORRONE, 2005), das quais cerca de 220 são encontradas no Brasil (Valls, 1994).

Além disso, ocorre em todo Brasil, no leste da Bolívia, no Paraguai, no norte da Argentina e no Uruguai (QUARÍN; VALLS; URBANI, 1997). No Uruguai, Paraguai, Argentina e Brasil ocorrem cerca de três quartos das espécies conhecidas, em diferentes condições ecológicas e nas mais variadas formações vegetais (BARRETO, 1974), com grande variação morfológica.

Apesar de o Brasil estar entre os países com maior diversidade genética de *Paspalum* disponível, o uso comercial de espécies desse gênero é ainda muito pequeno como forrageira. Contudo, há muitas espécies de *Paspalum* em ocorrência natural nos campos sulinos, onde são pastejadas por bovinos e representam grande parte da ecologia das pastagens nativas. As poucas variedades comerciais de *Paspalum* disponíveis no mercado foram obtidas por meio da seleção de germoplasma nativo (ecótipos). Já em outros países, como nos Estados Unidos, diversas espécies de *Paspalum* nativas do Brasil, como *Paspalum notatum*, *P. atratum*, *P. dilatatum*, *P. plicatum* e *P. guenoarum*, são utilizadas com sucesso (Acuña et. al, 2011). A grama pensacola (*Paspalum notatum* cv Pensacola), cuja origem é do sul do continente americano, é utilizada principalmente na Região Sul do Brasil, como forrageira cultivada e, atualmente, está bastante difundida no sul dos Estados Unidos, principalmente na Flórida. Essa mesma espécie tem potencial para gramados, sendo amplamente cultivada em jardins residenciais e comerciais, conhecida popularmente como grama-batatais. Além dessa espécie, outras de porte baixo e crescimento mais lento, como *P. lividum*, *P. jesuiticum*, *P. leptum* e espécies do Grupo Notata, apresentam grande potencial para cobertura vegetal de solo.

A Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos, SP, abriga o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Paspalum*. Atualmente, conta com aproximadamente 500 acessos de 49 espécies distintas, distribuídas em 17 grupos informais. Diversos trabalhos publicados, desenvolvidos na Embrapa Pecuária Sudeste, demonstram seu grande potencial para uso como forragem (BATISTA;

GODOY, 1992a, 1992b, 2000; BATISTA; GODOY; PEREIRA, 1995; BATISTA; GODOY; REGITANO NETO, 1999), para fins de cobertura de solo e ornamental. Um desses grupos, o Plicatula, caracterizado por possuir antécio castanho-escuro a atropurpúreo e brilhante, e lema inferior com ondulações transversais (CHASE, 1929), se destaca por abrigar diversas espécies de grande potencial forrageiro, como *Paspalum atratum*, *P. plicatulum*, *P. guenoarum*, *P. glaucescens* e outras. Dos aproximadamente 500 acessos do BAG, pelo menos 250 são do grupo Plicatula. Esse grupo é considerado complexo, com mais de 30 espécies, sendo que muitas das espécies são de difícil diferenciação, por causa de gradações morfológicas (AGUILERA et al., 2011). A maioria das espécies desse grupo taxonômico é tetraploide apomítica e, como acontece naturalmente em apomíticos, são altamente heterozigotos. Como se reproduz por apomixia, a seleção de ecótipos superiores tem sido a principal forma de melhoramento, resultando no lançamento de cultivares de *P. plicatulum*, *P. nicorae*, *P. guenoarum* e *P. atratum* (EVERS; BURSON, 2004). A descoberta de citotipos diploides e sexuais, e a obtenção de protocolos de poliploidização viabilizaram os cruzamentos intra e interespecíficos no gênero *Paspalum*, porém, poucas cultivares se originaram de atividades de melhoramento com uso de hibridações (FORBES; BURTON, 1961a;b; QUARÍN et al., 2003; QUESENBERRY et al., 2010; URBANI et al., 2017). Se um germoplasma sexual tetraploide de alguma dessas espécies puder ser desenvolvido a partir de tipos sexuais de ocorrência natural, estes poderão ser cruzados com tetraploides apomíticos elite para a liberação da heterozigosidade nos apomíticos e novas cultivares apomíticas poderão ser selecionadas a partir de um programa de melhoramento genético.

Este trabalho visou à adaptação de metodologias consagradas de caracterização citogenética, reprodutiva, molecular, de poliploidização de cromossomos e de resgate de embriões, para viabilizar a obtenção de tetraploides sexuais sintéticos dentro do gênero *Paspalum*. A sequência de atividades desde a identificação de um indivíduo diploide até seu uso em cruzamentos está ilustrada na Figura 1. Todas essas metodologias serão aplicadas nessa sequência e serão de fundamental importância para o desenvolvimento do programa de melhoramento genético de *Paspalum*, abrindo novas possibilidades de desenvolvimento de cultivares e ampliando a diversidade de cultivares disponível para o produtor, principalmente em áreas de ocorrência de estresses bióticos e abióticos.

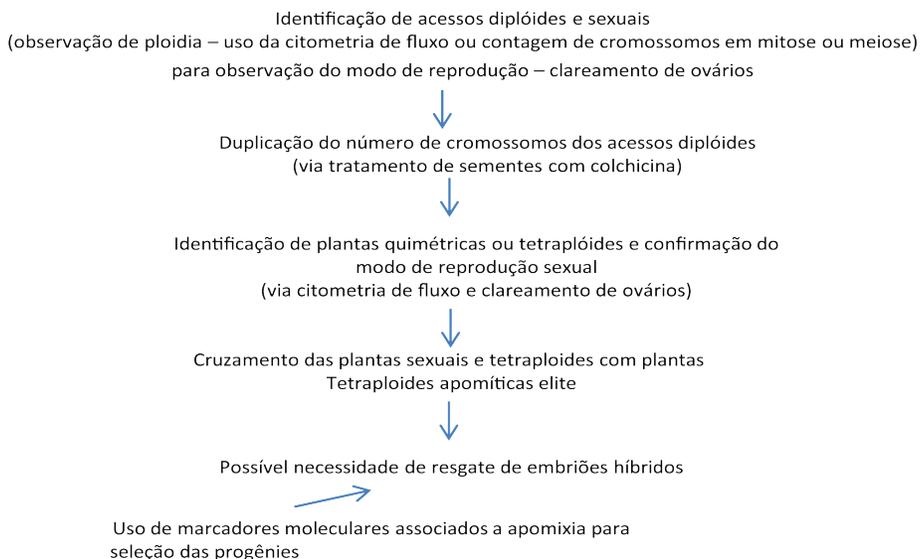


Figura 1. Sequência de atividades realizadas para a obtenção de acessos tetraploides sexuais e seu uso em cruzamentos.

2 Material e métodos

Foram utilizadas espécies de *Paspalum* conservadas na coleção da Texas A&M University, plantas espontâneas encontradas em jardins da universidade e materiais comerciais.

2.1 Contagem do número de cromossomos em mitose

Foram avaliadas plantas de *Paspalum notatum*. O protocolo para a contagem cromossômica se baseou na coleta de pontas de raiz entre 9h e 10h da manhã e imersão em solução de 1-bromonaftaleno por 2h. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução de Carnoy 3:1 (álcool absoluto: ácido acético) por duas horas. Posteriormente, foram lavadas em água e hidrolisadas em HCl 1N por 10 minutos em banho-maria a 60 °C. As raízes foram lavadas e colocadas em solução de Schiff por 2h. As amostras foram conservadas

em água. As pontas de raízes foram maceradas em lâminas com carmin acético 2%, cobertas com lamínula e observadas em microscópio óptico com e sem contraste de fase. Os cromossomos foram contados principalmente em células em pro-metáfase ou metáfase mitóticas.

2.2 Número cromossômico e o comportamento meiótico

O número cromossômico e o comportamento meiótico foram determinados pela observação das células-mãe de grãos pólen em desenvolvimento nas anteras utilizando o microscópio de contraste de fase.

As espécies avaliadas foram *P. dilatatum* var. comum, *P. pauciciliatum* (Grupo Informal Dilatata), *P. notatum* var. sauræ (Grupo Notata), *P. distichum* (Grupo Disticha) e *P. pubiflorum* (Grupo Livida). Lâminas permanentes da coleção do USDA relativas a outras espécies de *Paspalum* também foram avaliadas como treinamento de interpretação quanto ao comportamento meiótico.

Inflorescências dentro do cartucho foram coletadas e imersas em Solução Carnoy (6 Álcool Etilico: 3 clorofórmio: 1 ácido acético) por 1h30min. Após esse processo, o material foi conservado em álcool 70%. As inflorescências foram armazenadas dentro do cartucho, facilitando a identificação do estádio e a localização das células-mãe de grãos de pólen. Os floretes foram dissecados em microscópio estereoscópio e as anteras foram maceradas em lâmina com uma gota de carmin acético 2%. Após o aquecimento da lâmina em lamparina e colocação da lamínula, o material foi avaliado em microscópio óptico com contraste de fase. As melhores lâminas foram transformadas em permanentes, com uso de terebentina. A técnica consiste em aplicar uma gota de terebentina de um lado da lamínula e, com um papel de filtro do outro lado, absorver o carmin acético existente, de modo que a terebentina migre por baixo da lamínula substituindo o carmin acético.

2.3 Método de reprodução via clareamento de ovário

Inflorescências dentro do cartucho e em antese de cinco espécies (*P. distichum*, *P. pauciciliatum*, *P. dilatatum* comum, *P. notatum* Pensacola e *P. pubiflorum*) foram colhidas e fixadas em solução de formol e ácido acético

(FAA) por 24h e conservadas em álcool 70%. Os floretes foram dissecados e os pistilos foram colocados em pequenos quadrados de papel tipo *Kimwipes* e foram posteriormente acondicionados em pequenos frascos com tampa para a realização do clareamento. O protocolo de clareamento de ovário utilizado foi uma adaptação do original descrito por Young; Sherwood; Bashaw (1979). Os sacos embrionários foram observados em microscópio óptico em aumento de 100 x, 200 x e 400 x.

2.4 Poliploidização

Para realizar as atividades de poliploidização em *Paspalum*, foi utilizada a cultivar comercial Pensacola de *P. notatum*. Foram retiradas as estruturas externas dos floretes com a fricção destes com uma borracha, em uma caixa. Em seguida, as cariopses foram separadas dos floretes inteiros com o uso de uma peneira 6/28. Para separar as cariopses da palha, as amostras foram passadas no soprador na abertura três. As cariopses que não apresentaram danos foram limpas e armazenadas em tubos Eppendorfs no freezer (-14°C) até o momento do uso.

Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento, porém, o número de sementes tratadas foi dependente da disponibilidade de cariopses.

Ao todo, foram testados 16 tratamentos distintos (Tabela 1). Foram testados tratamentos previamente descritos na literatura para outras espécies de *Paspalum* (SARTOR; QUARIN; ESPINOZA, 2009; QUARIN; HANNA, 1980; CÁCERES et. al, 1999). Nos tratamentos com papel de filtro embebido com colchicina, foram utilizados 4 mL de solução. Nos tratamentos controle, foi colocada água destilada no lugar da colchicina + dimethyl sulphoxide (DMSO). Todas as amostras foram agitadas para homogeneização da mistura.

Ao final de todos os tratamentos, as cariopses foram lavadas em água corrente em papel de filtro, com uso de funil e Erlenmeyer por cinco minutos. Em seguida, as cariopses foram colocadas em placas de Petri com 4 mL de solução de 0.2% KNO_3 + Captan em cada repetição. As condições do germinador foram de luz 35 °C por 12h e escuro 20 °C por 12h.

Tabela 1. Tratamentos utilizados para poliploidização de cariopses de *P. notatum* e referências bibliográficas em que citam os protocolos de duplicação de cromossomos.

	Tratamento	Referências
T1	PF1 com colchicina 0,1% por 6h	
T2	PF com colchicina 0,1% por 12h	
T3	PF com colchicina 0,1% por 18h	
T4	PF com colchicina 0,1% por 24h	
T5	PF com colchicina 0,1% por 48h	<i>P. hexastachyum</i> – Quarín; Hanna (1980).
T6	PF com colchicina 0,1% por 72h	<i>P. simplex</i> - Caceres et. al (1999).
T7	PF com colchicina 0,1% + DMSO2 2% por 6h	
T8	PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% por 12h	
T9	PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% por 18h	
T10	PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% por 24h	
T11	PF com colchicina 0,1% + KNO3 0,2% por 24h	
T12	PF com água por 24h / PF com colchicina 0,1% por 24h	
T13	PF com água por 24h / PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% por 6h	
T14	PF com água por 24h / PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% por 12h	
T15	PF com água por 24h / PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% por 18h	
T16	PF com água por 24h / PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% por 24h	<i>P. plicatulum</i> – Sartor; Quarin; Espinoza (2009).

⁽¹⁾ Papel de Filtro - PF; ⁽²⁾ Dimetilsulfóxido – DMSO.

2.5 Identificação do conteúdo de DNA em cada planta utilizando a citometria de fluxo

Para a identificação de plantas diplóides, tetraplóides ou quiméricas, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo.

Folhas de plantas de *P. notatum*, oriundas dos tratamentos descritos na Tabela 1, foram coletadas em casa de vegetação e acondicionadas em caixas de isopor com gelo. Cerca de 1 cm² de tecido vegetal foi colocado em placas de Petri e adicionados 1,4 mL de tampão LB01 (DOLEZEL; BINAROVÁ; LUCRETTI, 1989). O tecido vegetal foi triturado e a solução foi filtrada em filtros de 30 µm e acondicionada em tubos Eppendorf. Em seguida, 25 µl de solução de iodeto de propídeo foram adicionados por tubo. Após 20 minutos,

as amostras foram avaliadas no citômetro de fluxo, marca Partec. Para cada amostra, foram analisados pelo menos dois mil núcleos. O tecido foliar padrão utilizado foi de *Stenotaphrum secundatum* cv. Raleigh (padrão interno de referência com 1,15 pg de conteúdo DNA (MILLA-LEWIS et al., 2013)).

2.6 Resgate e cultura de embriões

A técnica de resgate de embriões foi realizada com inflorescências de *Cenchrus ciliaris* pela facilidade de ocorrência de florescimento. Essa técnica pode ser utilizada da mesma forma com espécies do gênero *Paspalum*. As inflorescências foram ensacadas um dia antes da antese. Como as plantas são do tipo protogâmicas, no dia seguinte, foram retirados os saquinhos e polinizados com pólen de outra planta. Este procedimento foi realizado em duas etapas; na primeira, foram aguardados sete dias, na segunda, 14 dias, para a retirada dos pistilos e colocação nas placas de Petri. Com o auxílio de um microscópio estereoscópio e pinças, os pistilos foram retirados das espiguetas em câmara de fluxo laminar. Os pistilos foram colocados em água destilada, em seguida, foram colocados em álcool 50% por um período entre um e três minutos, seguido de enxágue por duas vezes em água destilada autoclavada. Por fim, os pistilos foram colocados nas placas de Petri com meio de cultura.

O meio de cultura foi elaborado com a diluição de 17,21 g de Meio Murashige & Skoog, vitaminas e sucrose em forma de kit (Phytotechnologies Laboratory®) em 500 mL de água destilada e 2% de ágar, autoclavado em sequência. Em cada placa de Petri estéril foram adicionados 10 mL de meio de cultura em condição de câmara de fluxo laminar.

Um pistilo foi colocado em cada placa de Petri e cada um mantido em condições de luz branca por 24h e temperatura ambiente.

2.7 Marcadores moleculares

Paspalum notatum diploide, *P. notatum* tetraploide e acessos de *P. plicatulum* (um acesso diploide e demais tetraploides) e *P. guenoarum* (tetraploide), da coleção de germoplasma do USDA, foram avaliados na tentativa de identificação de marcadores moleculares tipo SSR e EST-SSR associados à apomixia. Quinze marcadores EST-SSR desenvolvidos para *Pennisetum* e ligados ao caráter apomixia (JESSUP, 2005) foram testados como, também, outros 14 marcadores EST-SSR não ligados à apomixia (DOWLING; BURSON; JESSUP, 2014), porém, amplificaram em *Paspalum floridanum*. Além desses, outros 16 marcadores moleculares tipo SSR que foram desenvolvidos a partir de sequências de *P. notatum* (dados não publicados) e desenhados em regiões que continham as mesmas sequências gênicas para a apomixia em *Pennisetum*. Ao todo, foram testados 45 marcadores moleculares: bm9, cyn 16, os4 21, os4 27, pcar 2, pcar 16, pcar 88, pcar 105, pcar 107, pcar 175, pcar 177, pcar 239, pcar 251, pcar 300, PCAB 01, PCAB 02, PCAB 04, PCAB 05, PCAB 06, PCAB 07, PCAB 08, PCAB 09, PCAB 10, PCAB 12, PCAB 13, PCAB 14, PCAB 15, PCAB 16, PCAB 17, PN 01, PN 02, PN 03, PN 04, PN 05, PN 06, PN 07, PN 08, PN 09, PN 10, PN 11, PN 12, PN 13, PN 14, PN 15, PN 16.

O DNA total dos genótipos foi extraído com o uso do kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG). Foi realizada a PCR com um volume final de 20 µL, composto por 50 ng de DNA genômico, 10,8 µL PCR H₂O, 1 µL de 4mM desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), 2 µL de 1X Promega MgCl₂-free PCR buffer, 2 µL de 2.5 mM MgCl₂, 0.2 µL de Taq polymerase e 1 µL de cada um dos primers forward e reverse. A reação de PCR se deu em 40 ciclos de 25s a 95 °C, 25s a X °C e 45s a 72 °C, seguido de um ciclo de alongação a 72 °C por cinco minutos, sendo 'X' a temperatura específica de cada par de *primers*. Foi utilizado gel de poliacrilamida 6% para a separação das bandas e coloração com Brometo de etídio para visualização das bandas. O *ladder* utilizado foi de 50bp. A eletroforese foi realizada a 350 V por 2h ou 4h, a depender do *primer* utilizado.

3 Resultados e discussão

3.1 Número cromossômico e comportamento meiótico

Foram avaliados 14 acessos de *Paspalum* (Tabela 2) quanto ao número de cromossomos (via técnica de análise meiótica ou mitótica).

Tabela 2. Número e comportamento meiótico dos cromossomos.

Espécie	No. acesso	No. de cromossomos	Observações
<i>P. alcalinum</i>	251	40	Meiose irregular
<i>P. denticulatum</i>	246	20	Meiose regular
<i>P. dilatatum var. comum</i>	Coleta	50	Meiose irregular
<i>P. distichum</i>	Coleta	60	Meiose regular
<i>P. indecorum</i>	346	20	Meiose regular
<i>P. maculosum</i>	646	40	Meiose regular
<i>P. maculosum</i>	645	40	Meiose regular
<i>P. monostachyum</i>	Monosty	20	Meiose regular
<i>P. notatum var. sauræ</i>	Coleta	20	Meiose regular
<i>P. paniculatum</i>	685	20	Meiose regular
<i>P. pauciliatum</i>	Coleta	40	Meiose regular
<i>P. paucifolium</i>	19	40	Meiose irregular
<i>P. paucifolium</i>	662	40	Meiose irregular
<i>P. pubiflorum</i>	Coleta	60	Meiose regular

Na Figura 2, é possível observar algumas células e comportamento meiótico.

Fotos: Alessandra Pereira Favero

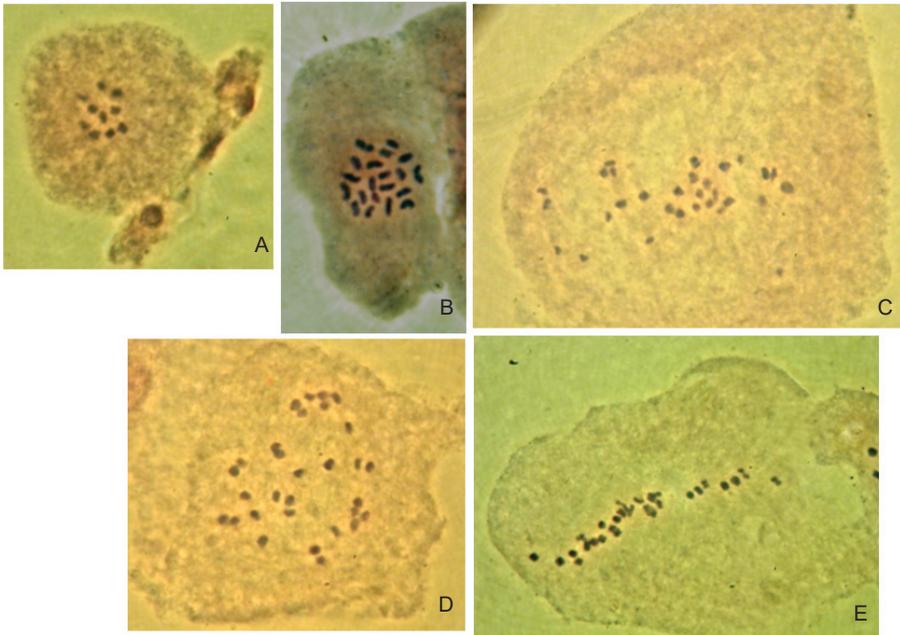


Figura 2. *P. notatum* (em meiose – $2n=20$) (a); *P. notatum* (em mitose – $2n=20$) (B); *P. dilatatum* (em meiose – $2n=50$) (C); *P. pubiflorum* (em meiose – $2n=60$) (D); *P. distichum* (em meiose – $2n=60$) (E).

3.2 Método de reprodução via clareamento de ovário

Cinco espécies foram avaliadas quanto ao modo de reprodução via uso da técnica de clareamento de ovários (Tabela 3). Observou-se diferença no resultado do clareamento para acessos que tinham anteras roxas daqueles com anteras amarelas, pois, na primeira situação, o clareamento não é tão eficiente, sendo algumas vezes melhor o uso da técnica de cortes histológicos.

Tabela 3. Modo de reprodução de espécies de *Paspalum* via clareamento de ovários.

Espécie	Modo de reprodução
<i>P. dilatatum</i> comum	Apomítico
<i>P. distichum</i>	Apomítico
<i>P. notatum</i> cv. Pensacola	Sexual
<i>P. pauciciliatum</i>	Apomítico
<i>P. pubiflorum</i>	Apomítico

Na Figura 3, é possível observar sacos embrionários de *Paspalum distichum*, evidenciando que é um acesso apomítico.

Fotos: Alessandra Pereira Favero



Figura 3. Ovário de *P. distichum* após uso de técnica de clareamento de ovários.

3.3 Poliploidização

Ao final de todos os tratamentos, 4668 cariopses foram tratadas com colchicina. A germinação média do lote de sementes foi de 58%. Nos tratamentos com colchicina em papel de filtro, observou-se a presença de estruturas que pareciam ‘calos’ (Figura 4), ou seja, a germinação não era normal, com o aparecimento direto de primeiros brotos foliares. Às vezes surgiam só os brotos foliares, às vezes só as raízes.

Todos os tratamentos em que se utilizou a solução de colchicina em papel de filtro com DMSO 2% apresentaram pelo menos uma planta quimérica. Foi observado que, quanto maior o tempo de exposição, maior o número de plantas quiméricas. O mesmo aconteceu com os tratamentos com apenas a solução de colchicina em papel de filtro, a exceção do tempo de exposição de 12h, em que não foi observada nenhuma plântula quimérica. Logo, dos 16 tratamentos iniciais, sete apresentaram plantas quiméricas. Apesar desse resultado, as plantas aparentemente diplóides não foram descartadas, pois, após serem colocadas a campo, é possível o aparecimento de tecidos tetraplóides não detectados anteriormente.

Apenas 216 plantas sobreviveram e foram mantidas em casa de vegetação para futuramente serem colocadas a campo. Na Tabela 4, é possível observar que houve grande diferença na germinação de plântulas e na obtenção de plantas quiméricas. Não foi obtida, até o final do trabalho, uma planta totalmente tetraplóide. Observaram-se apenas plantas quiméricas, pois o conteúdo de DNA tetraplóide em algumas plantas era maior que o esperado. Tal identificação foi realizada pelo uso do citômetro de fluxo. Morfologicamente, as plantas não apresentaram diferenças. O próximo passo é aguardar as plantas crescerem e florescerem para colher espiguetas dos perfilhos marcados como quiméricos. Nesse caso, serão refeitas as análises de citometria de fluxo para identificar as plantas totalmente tetraplóides.

Fotos: Alessandra Pereira Favero



Figura 4. Germinação normal das plântulas (controle) (A); Presença de 'calos' em cariopses tratadas com colchicina no papel de filtro (B); Plântula tratada com colchicina em papel de filtro sem emissão de raiz (C); Tratamento T21 (D).

3.4 Identificação do conteúdo de DNA em cada planta utilizando a citometria de fluxo

Aproximadamente 800 análises foram realizadas. Das 413 plantas analisadas, apenas 22 apresentaram comportamento quimérico. A interpretação se deve à quantidade de células consideradas com conteúdo de DNA duplicado, ou seja, o pico 4x estava muito maior do que era esperado para se considerar apenas células em divisão. Na Figura 5, pode-se observar um histograma de uma planta controle, sem tratamento com colchicina (A) e um histograma de uma planta tratada com colchicina e quimérica (B). O número de células com conteúdo de DNA na situação B é muito maior que na A. Tomou-se sempre a precaução de coletar folhas adultas, pois a divisão celular não estaria acelerada, o que poderia mascarar os resultados.

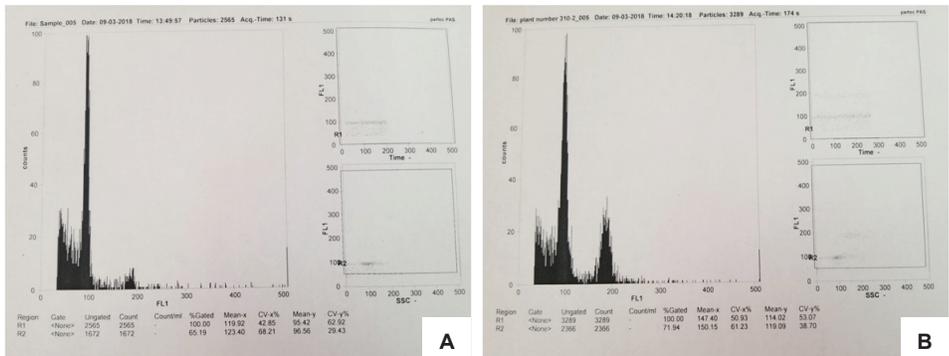


Figura 5. Histograma de uma planta de *P. notatum* sem tratamento com colchicina (controle) (A) e Histograma de um indivíduo de *P. notatum* tratado com colchicina e quimérica (B).

Tabela 4. Tratamentos utilizados para poliploidização de cariopses de *P. notatum*. Número de sementes tratadas (NST), número de plantas vivas (NPV), porcentagem de plantas vivas (PPV), número de plantas quiméricas (NPQ), % de plantas quiméricas (%PQ), porcentagem de plantas quiméricas em relação a plantas vivas (%PQxPV). Em vermelho, tratamentos em que foram obtidas plantas quiméricas.

Tratamento	NST	NPV	% PV	NPQ	% PQ	% PQxPV
T1 PF1 com colchicina 0,1% por 6h	352	18	5,1	2	0,6	11,1
T2 PF com colchicina 0,1% por 12h	328	6	1,8	0	0,0	0,0
T3 PF com colchicina 0,1% por 18h	308	32	10,4	1	0,3	3,1
T4 PF com colchicina 0,1% por 24h	680	19	2,8	3	0,4	15,8
T5 PF com colchicina 0,1% por 48h	100	0	0,0	0	0,0	0,0
T6 PF com colchicina 0,1% por 72h	100	0	0,0	0	0,0	0,0
T7 PF com colchicina 0,1% + DMSO2 2% por 6h	272	30	11,0	1	0,4	3,3
T8 PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% por 12h	284	50	17,6	4	1,4	8,0
T9 PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% por 18h	672	42	6,3	3	0,4	7,1
T10 PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% por 24h	360	15	4,2	5	1,4	33,3
T11 PF com colchicina 0,1% + KNO3 0,2% por 24h	100	0	0	0	0,0	0,0
T12 PF com água por 24h / PF com colchicina 0,1% por 24h	100	0	0,0	0	0,0	0,0
T13 PF com água p/ 24h / PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% p/ 6h	248	3	1,2	0	0,0	0,0
T14 PF com água p/ 24h / PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% p/ 12h/	208	1	0,5	0	0,0	0,0
T15 PF com água p/ 24h / PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% p/ 18h	232	0	0,0	0	0,0	0,0
T16 PF com água p/ 24h / PF com colchicina 0,1% + DMSO 2% p/ 24h	324	0	0,0	0	0,0	0,0
Total	4668	216		19		

(¹) Papel de Filtro - PF; (²) Dimetilsulfóxido - DMSO.

3.5 Resgate e cultura de embriões

Aproximadamente 50 pistilos foram dissecados, 25 após sete dias e os demais após 14 dias de polinização. Nenhuma placa foi descartada por contaminação por bactérias ou fungos. Apesar de os pistilos resgatados após sete dias de polinização não terem se deteriorado até o final das avaliações, nenhum embrião se desenvolveu para estágio de plântula, sendo considerado, então, um resgate muito precoce (Figura 6A). Já os pistilos resgatados após 14 dias de polinização apresentaram uma morfologia mais próxima do que se conhece de uma cariopse e foram considerados mais maduros (Figura 6B).

Após três dias do resgate, já foram observadas as primeiras plântulas (Figura 6C). De 25 pistilos dissecados, 18 plântulas foram obtidas. As plântulas foram removidas das placas de Petri e colocadas em pequenos vasos em condições de câmara úmida para aclimatação. Essa técnica será muito útil para resgate de embriões oriundos de cruzamentos interespecíficos em *Paspalum* quando se observa o aborto pós-zigótico. Além disso, pode ser utilizada para acessos suscetíveis a fungos de sementes, na tentativa de obtenção de mais plantas para conservação no banco de germoplasma.

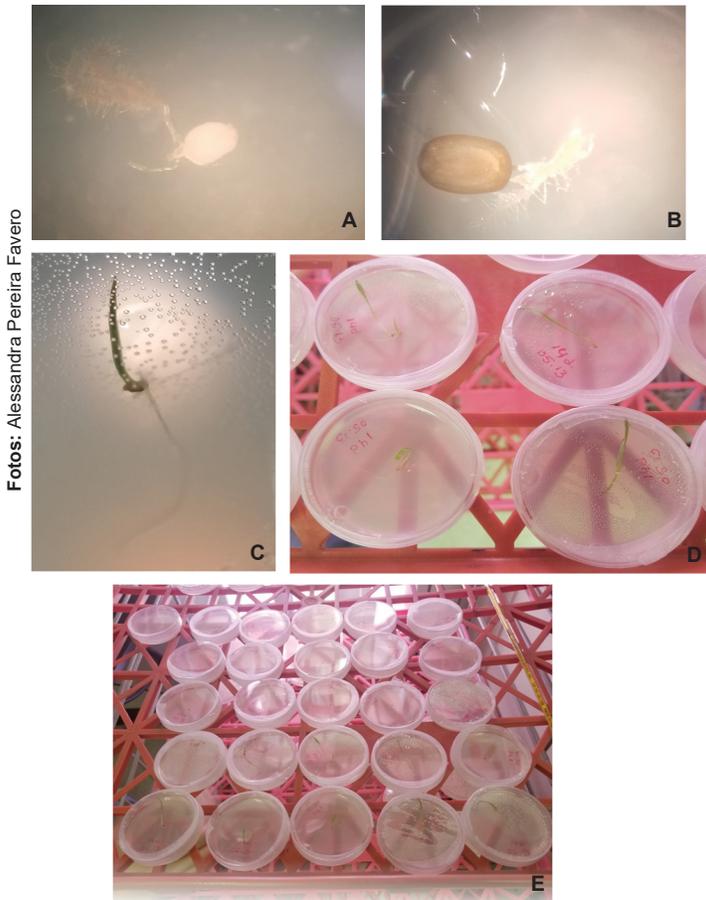


Figura 6. Pistilo dissecado após sete dias de polinização (A); Pistilo dissecado após 14 dias de polinização (B); Plântula obtida após três dias de montagem da placa de resgate (tratamento após 14 dias de polinização) (C); Plântulas após 10 dias de resgate (tratamento após 14 dias de polinização) (D); Vista geral do ensaio (E).

3.6 Marcadores moleculares

Dos 15 marcadores PCAB testados, nenhum funcionou para nossas amostras. Dos 16 marcadores desenhados para *P. notatum*, oito funcionaram para todos os acessos (PN 05, PN 06 - Figura 7, PN 09, PN 11, PN 12, PN 13, PN 14 e PN 16), quatro funcionaram somente para *P. notatum* (PN 01, PN 03, PN 07, PN 10 e PN 15) e três não funcionaram para nenhum acesso (PN 02, PN 04 e PN 08). Dos marcadores que funcionaram previamente para *P. floridanum*, apenas dois funcionaram para todos os acessos (Pcar 105 e Pcar 175). Logo, de todos os 45 marcadores moleculares testados, apenas 10 funcionaram para todos os acessos. Desses acessos que apresentaram bandas, houve a observação da mesma banda em acessos sexuais e apomíticos, em todas as situações. Esses resultados sugerem que, para a identificação de marcadores ligados a apomixia em espécies do grupo Plicatula, talvez seja necessário o uso de sequenciamento de RNA e o trabalho na linha de epigenética, pois aparentemente há indícios de eventos de metilação em acessos sexuais que não ocorrem em acessos apomíticos.

Fotos: Alessandra Pereira Favero

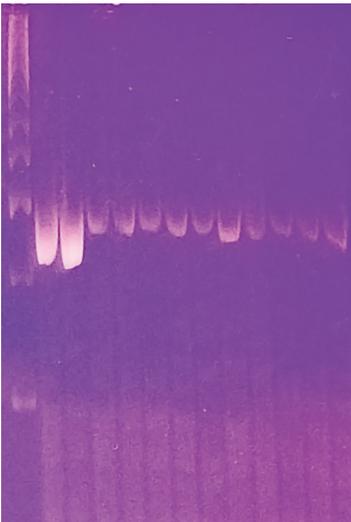


Figura 7. DNA de acessos de *Paspalum* após uso do *primer* PN06. Setas brancas indicam acessos sexuais. 2a. e 3a. coluna - *P. notatum*. Demais colunas - acessos de espécies do grupo Plicatula. Ladder de 50pb.

4 Conclusão

Foi possível adaptar metodologias consagradas de caracterização citogenética, reprodutiva, molecular, poliploidização de cromossomos e resgate de embriões em espécies de *Paspalum*. Tais técnicas serão utilizadas na obtenção de novas plantas tetraploides sexuais sintéticas do grupo Plicatula, importantes dentro do programa de melhoramento genético de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Byron L. Burson e ao Dr. Russell Jessup pelo suporte às atividades realizadas na Texas A&M University.

Bibliografia consultada

ACUÑA, C. A.; BLOUNT, A. R.; QUESENBERRY, K. H.; KENWORTHY, K. E.; HANNA, W. W. Tetraploid bahiagrass hybrids: breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids. *Euphytica*, v.179, n.2, p.227-235, may 2011.

AGUILERA, P. M.; SARTOR, M. E.; GALDEANO, F.; ESPINOZA, F.; QUARIN, C. L. Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: sexual *Paspalum plicatulum* and apomitic *P. guenoarum*. *Crop Science*, v.51, n.4, p.1544-1550, july/aug. 2011.

ALISCIONI, S. S. Contribución a la filogenia del género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Annal of the Missouri Botanical Garden*, v.89, n.4, p.504-523, oct. 2002.

BARBOSA, R. A. (Ed.). **Morte de pastos de braquiárias**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2006. 206 p.

BARRETO, I. L. **O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul**. 1974. 258 f. Tese (Livre docência) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1974.

BARTEK, M. S.; HODNETT, G. L.; BURSON, B. L.; STELLY, D. M.; ROONEY, W. L. Pollen tube growth after intergeneric pollination of iap-Homozigous *Sorghum*. *Crop Science*, v.52, n.4, p.1553-1560, july/aug. 2012.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Avaliação de germoplasma de forrageiras do gênero *Paspalum*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 29, 1992. Lavras. **Anais...** Lavras: SBZ, 1992a. p.79.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Caracterização de germoplasma do gênero *Paspalum* na região central do Estado de São Paulo, Brasil. Características vegetativas. In: REUNIÃO SABANAS, 1., 1992, Brasília. **Anais...** Brasília: Red Internacional de Evaluacion de Pastos Tropicales – RIEPT. Brasília: EMBRAPA – CPAC: CIAT, 1992b, n.114, p.97-106.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Caracterização preliminar e seleção de germoplasma do gênero *Paspalum* para produção de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p.23-32, 2000.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R.; PEREIRA, J. M. C. Potencial forrageiro de acessos do gênero *Paspalum* no ensaio de 1993/94. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., 1995, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: SBZ, 1995. p.66-64.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R.; REGITANO NETO, A. Recursos genéticos de forrageiras do gênero *Paspalum* na Embrapa Pecuária Sudeste. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 1999, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

BURSON, B. Pollen germination, pollen tube growth and fertilization following self and interspecific pollination of *Paspalum* species. **Euphytica**, v.36, n.2, p.641-650, 1987.

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

CACERES, M. E.; PUPILLI, F.; QUARIN, C. L.; ARCIONI, S. Feulgen-DNA densitometry of embryo sacs permits discrimination between sexual and apomictic plants in *Paspalum simplex*. **Euphytica**, v.110, n.3, p.161-167, 1999.

CHASE, A. The north american species of *Paspalum*. **Contributions from the United States National Herbarium**, v.28, p.1-310, 1929.

COSENZA, G. W. **Resistência de gramíneas forrageiras à cigarrinha-das-pastagens *Deois flavopicta* (Stal 1854)**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1982. 22 p. (EMBRAPA-CPAC. Boletim de Pesquisa, 7).

DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum** v.31, n.2, p.113-120, 1989.

DOWLING, C. D.; BURSON, B. L.; JESSUP, R. W. Marker-assisted verification of Kinggrass (*Pennisetum purpureum* Schumach. x *Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.). **Plant Omics**, v.7, n.2, p.72-79, apr. 2014.

EVERS, G. W.; BURSON, B. L. Dallisgrass and other *Paspalum* species. In: MOSER, L. E.; BURSON, B. L.; SOLLENBERGER, L. E. **Warm-season (C4) grasses**. Madison, WI: American Society of Agronomy - Crop Science Society of America - Soil Science Society of America, 2004. p.681-713.

FORBES, I.; BURTON, G. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intra-species hybrids of Bahiagrass, *Paspalum notatum* Flugge. **Crop Science**, v.1, p.402-406, 1961.

FORBES, I.; BURTON, G. W. Induction of tetraploidy and a rapid field method of detecting induced tetraploidy in *Pensacola* bahiagrass. **Crop Science**, v.1, p.383, sep. 1961.

GOMES, M. J. I. R. **Estudos taxonômicos no gênero *Paspalum* L., grupos *Virgata* e *Quadrifaria*, no Brasil**. 1995. 141 f. Dissertação (Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1995.

JESSUP, R. W. **Molecular tools for marker-assisted breeding of buffelgrass**. 2005. 75 f. Dissertation (Doctor in philosophy) - Texas A&M University, 2005.

KHO, Y. O.; BAER, J. Observing pollen tubes by means of fluorescence. **Euphytica**, v.17, n.2, p.298-302, 1968.

MILLA-LEWIS, S. R.; ZULETA, M. C.; ESBROECK, G. A. V.; QUESENBERRY, K. H. Cytological and molecular characterization of genetic diversity in *Stenotaphrum*. **Crop Science**, v.53, p.296-308, 2013.

QUARÍN, C. L.; HANNA, W. W. Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. **Crop Science**, v.20, n.1, p.69-75, jan. 1980.

QUARIN, C. L.; URBANI, M. H.; BLOUNT, A. R.; MARTÍNEZ, E. J.; HACK, C. M.; BURTON, G. W.; QUESENBERRY, K. H. Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of bahiagrass. **Crop Science**, v.43, p.745-746, 2003.

QUARÍN, C. L.; VALLS, J. F. M.; URBANI, M. I. Cytological and reproductive behavior of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. **Tropical Grasslands**, v.31, p.114-116, 1997.

QUESENBERRY, K. H.; DAMPIER, J. M.; LEE, Y. Y.; SMITH, R. L.; ACUÑA, C. A. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. **Euphytica**, v.175, n.1, p.43-50, sep. 2010.

SARTOR, M. E.; QUARIN, C. L.; ESPINOZA, F. Mode of reproduction of Colchicine-Induced *Paspalum plicatum* tetraploids. **Crop Science**, v.49, n.4, p.1270-1276, jul. 2009.

URBANI, M. H.; ACUÑA, C. A.; DOVAL, D. W.; SARTOR, M. E.; GALDEANO, F.; BLOUNT, A. R.; QUESENBERRY, K. H.; MACKOWIAK, C. L.; QUARIN, C. L. Registration of 'Boyero UNNE' Bahiagrass. **Journal of Plant Registrations**, v.11, p.26-32, 2017.

VALLS, J. F. M. O potencial de plantas forrageiras tropicais americanas. In: SIMPOSIO BRASILEIRO DE FORRAGEIRAS E PASTAGENS, 1994, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1994. p.1124.

VIELLE, J. P.; BURSON, B. L.; BASHAW, E. C.; HUSSEY, M. A. Early fertilization events in the sexual and aposporous egg apparatus of *Pennisetum ciliare* (L.) Link. **The Plant Journal**, v.8, n.2, p.309-316, aug. 1995.

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

ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. **Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral (Argentina, Bolivia, Sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)**. St. Louis, Mo: Missouri Botanical Garden Press, 2005. 297 p. (Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 102).

Embrapa Pecuária Sudeste
Rod. Washington Luiz, km 234,
Caixa Postal 339
13560-290, São Carlos, SP
Fone: (16) 3411-5600
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
1ª edição on-line: 2019



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Pecuária Sudeste

Presidente

Alexandre Berndt

Secretário-Executivo

Simone Cristina Méo Niciura

Membros

Emília Maria Pulcinelli Camarnado, Mara Angélica

Pedrochi, Maria Cristina Campanelli Brito, Milena

Ambrosio Telles, Simone Cristina Méo Niciura

Normalização bibliográfica

Mara Angélica Pedrochi

Editoração eletrônica

Maria Cristina Campanelli Brito

Fotos da capa

Alessandra Pereira Fávoro

CGPE: 15436