

## DETERMINAÇÃO DO MODO DE REPRODUÇÃO EM CAPIM-GORDURA (*Melinis minutiflora* Beauv.) POR PADRÕES ENZIMÁTICOS<sup>1</sup>

### DETECTION OF THE MODE OF REPRODUCTION IN MOLASSES GRASS (*Melinis minutiflora* Beauv.) BY ENZYME PATTERNS

Lia Rejane Machado Silveira<sup>2</sup> Carlos Floriano de Moraes<sup>3</sup>

#### RESUMO

Com o objetivo de determinar o modo de reprodução do capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.), 24 ecótipos da coleção da Universidade Federal de Viçosa foram utilizados em cruzamentos, após emasculação massal por imersão da inflorescência em água quente, testando-se quatro faixas de temperatura. Analisaram-se, comparativamente, os padrões de isozimas dos progenitores e da descendência proveniente de panículas de polinização aberta e de panículas submetidas aos tratamentos de proteção; polinização e proteção; emasculação e proteção; e emasculação, polinização e proteção. A hipótese da apomixia ser o mecanismo reprodutivo operante no capim-gordura foi bastante favorecida pela extensiva uniformidade da progênie e semelhança isozimática com o progenitor feminino. Contribuiu para isso o fato de toda a população amostrada apresentar um padrão de bandas característico de heterozigotos para os sistemas enzimáticos leucina aminopeptidase e malato desidrogenase, uma vez que a apomixia, ao contrário da autofecundação, facilita a manutenção da heterozigosidade. Segregação isozimática entre plantas dos ecótipos CG4 e CG5, relativamente ao sistema fosfatase ácida, sugere, no entanto, a ocorrência de alguma porcentagem de fecundação cruzada, que foi confirmada pela detecção de hibridação entre os ecótipos CG2 e CG13 nas isoesterases. Esses resultados conduzem à conclusão de que um mecanismo facultativo (parcialmente sexual) de apomixia atua na reprodução do capim-gordura.

**Palavras-chave:** Capim-gordura, reprodução, padrões isozimáticos.

#### SUMMARY

Panicles of 24 molasses grass ecotypes were used in an experiment involving: bagging before anthesis; cross-pollination and bagging; emasculation and bagging; and emasculation, cross-pollination and bagging. Emasculation was accomplished by immersing the inflorescences into warm water, four temperature levels, for 12 minutes. The breeding system was assessed by comparing the isozyme patterns of the esterase, acid phosphatases, leucine aminopeptidases and malate dehydrogenases of the parental generations with their offsprings. The high uniformity of patterns obtained in the offsprings, the identical patterns found for both the female parents and their respective progenies and also the presence of banding patterns, characteristically shown by heterozygotes of the leucine aminopeptidase and malate dehydrogenase systems, are strong evidences for the hypothesis of apomictic reproduction in this species. In addition, the isozymic segregation for acid phosphatase observed in plants of CG4 and CG5 ecotypes and the detection of hybrids from CG2 x CG3 crosses, are indicating that the apomixis in molasses grass is facultative.

**Key words:** molasses grass, reproduction, isozyme patterns.

<sup>1</sup> Parte da tese apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Viçosa para obtenção do título de mestre em genética e melhoramento.

<sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo, M.Sc, Professora do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 97119-900, Santa Maria, RS. Autor para correspondência.

<sup>3</sup> Engenheiro Agrônomo, Ph.D, Professor do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 - Viçosa, MG.

## INTRODUÇÃO

O capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.) é uma gramínea forrageira de relevante participação na pecuária dos estados do Brasil Central, como espécie naturalizada. Apesar disso, seu potencial genético ainda não foi explorado e o levantamento de informações básicas acerca da espécie pode ser considerado incipiente. Em particular, em relação ao comportamento reprodutivo, há considerável controvérsia na literatura pertinente. Alguns autores consideram o capim-gordura apomítico (BOGDAN, 1960; CROWDER & CHEDDA, 1982), caracterizando tal apomixia como obrigatória (BURTON, 1970) ou facultativa (BUMPUS, 1961). KENYA (1958) sustenta ser a espécie autógama e MARTINS & OLIVEIRA (1972), observando a baixa porcentagem de formação de sementes em plantas protegidas e em plantas isoladas, consideram-na alógama.

A determinação do modo de reprodução da maioria das espécies de gramíneas tem-se baseado nos resultados comparativos de formação de sementes em inflorescências protegidas, isoladas e de polinização aberta (BOGDAN, 1959). Um procedimento alternativo para detectar e estimar a apomixia/sexualidade em populações vegetais baseia-se nos padrões de segregação de locos marcadores em testes de progênies, mais especificamente de marcadores isozimáticos (MARSHALL & BROWN, 1974). Isso foi efetuado com a descendência de plantas típicas e variantes de *Panicum maximum* Jacq. (SMITH, 1972), na progênie S<sub>1</sub> de plantas de uma linha de sorgo sob suspeita de ser apomítica (MARSHALL & DOWNES, 1977) e para descrever e quantificar a variabilidade resultante de reprodução sexual ou mistura clonal em quatro cultivares de capim chorão - *Eragrostis curvula*. (Schrad.) Nees (DI RENZO et al., 1990). Como prova final de sexualidade, nas introduções de *Panicum maximum* Jacq., SMITH (1972) considerou a transferência dos marcadores genéticos isozimáticos à progênie por fecundação cruzada.

Também há referências da utilização de padrões isozimáticos na confirmação de hibridações dirigidas em várias espécies, como, por exemplo, em *Brassicoraphanus* (KATO & TOKUMASU, 1979), em triticale (CHEN & BUSHUK, 1970), em *Festucalolium* (EMOTO, 1988). As bandas isozimáticas dos híbridos são referidas como um resumo das bandas derivadas dos progenitores, algumas das quais estão ausentes, em adição ao aparecimento de outras bandas novas.

Em hibridações dirigidas é conveniente proceder-se à emasculação de flores hermafroditas. Para contornar as dificuldades de emasculação de flores de reduzido tamanho, STEPHENS & QUINBY (1933) propuseram uma técnica massal que utiliza imersão em água quente. Essa técnica, desenvolvida para panículas de sorgo, foi, subsequentemente, adaptada para várias outras gramíneas. As partes masculina e feminina da flor apresentam sensibilidade diferencial, o androceu sendo ligeiramente mais sensível ao calor. Em sorgo, essa diferença parece ser de 1°C, ou menos, e água, a 48°C, por 10min, destrói a viabilidade do pólen (QUINBY & MARTIN, 1954). JODON (1938) testou temperaturas de 0-50°C em flores de arroz, em períodos que variaram de 2-25min, observando que tratamentos de 10 min, a 40-44°C, destruíram a viabilidade do pólen sem injuriar outros órgãos florais.

O sucesso da emasculação pode ser determinado, de acordo com STEPHENS & QUINBY (1933), pela polinização das flores tratadas com pólen que possua algum tipo de marcador e analisando a progênie.

Em capim-gordura, os padrões de segregação de esterase, fosfatase ácida e peroxidase permitiram a separação de 24 ecótipos e a estimação de índices de similaridade entre pares de ecótipos (PEREIRA, 1986). No presente trabalho, cujo objetivo foi determinar o modo de reprodução do capim-gordura, foram selecionados os ecótipos mais dessemelhantes, sendo efetuada a análise isozimática comparativa dos progenitores e da sua descendência.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Vinte e quatro ecótipos de capim-gordura foram utilizados, nas florações de 1987, 1988 e 1989, em Viçosa-MG, em estudos envolvendo emasculação, cruzamentos e análises isozimáticas. Foram selecionados ecótipos com padrões de esterase, fosfatase ácida e peroxidase mais contrastantes, isto é, aqueles pares com índices de similaridade (IS) igual ou inferior a 60 estimados por PEREIRA (1986).

As panículas dos progenitores femininos foram submetidas aos seguintes tratamentos: a) polinização aberta; b) proteção com saco plástico incolor em panículas no campo e com saco de papel em plantas mantidas em casa de vegetação, da pré-antese até a colheita; c) polinização recíproca e proteção; d) emasculação com água quente, em quatro faixas de temperatura (40-42°C, 42-44°C, 44-46°C e 46-48°C), por 12 min, e proteção; e) emasculação,

nas quatro faixas de temperatura citadas, por 12min, polinização recíproca e proteção.

Foram utilizadas três a seis plantas por ecótipo, sendo que, no mínimo, uma panícula de cada ecótipo foi submetida a cada tratamento. Foram utilizadas panículas que já tinham exposto cerca de 2/3 de suas flores, eliminando-se aquelas em antese, na extremidade apical da inflorescência. Na emasculação, as inflorescências permaneciam, por 12min, em recipientes contendo água, mantida dentro da faixa de temperatura considerada. A polinização foi realizada tão logo a maior parte das flores se abriam, naturalmente, ou naquelas tratadas, após o estímulo proporcionado pela temperatura.

Após a colheita, as panículas foram deixadas secar à sombra e armazenadas em sacos de papel em condições ambientais. As sementes obtidas germinaram em areia esterilizada ou em germinador de umidade constante (100% UR) e temperaturas alternadas de 20/30°C por 16 e 8h, respectivamente, na presença de luz, pelo período de duas semanas, sendo as plântulas de dois-três dias de idade transferidas para a areia.

Plantas com cerca de um mês de idade foram colocadas em copos plásticos de 300cc, contendo areia e material orgânico na proporção de 2:1, permanecendo em casa de vegetação. Com aproximadamente 60 dias, todas as plantas obtidas tiveram amostras de raiz e de folha submetidas à eletroforese horizontal em gel de amido. Os tecidos macerados forneceram um extrato bruto que foi absorvido em papel filtro Whatman (0,4 x 0,1cm).

Os géis de amido foram preparados a 12%, com 42g de amido de milho (maizena) adicionados a 350ml da solução tampão. O tempo de cozimento requerido foi de 4min. As migrações eletroforéticas foram conduzidas em câmara fria, com temperatura aproximada de 4°C. A diferença de potencial foi mantida ao redor de 10V/cm e a migração, interrompida quando a frente formada pelos tampões e pelo corante anilina atingiu a distância de 8cm a partir da origem.

Para os sistemas isozimáticos fosfatase ácida e malato desidrogenase utilizou-se o sistema-tampão contínuo tris - ácido cítrico, proposto por SHAW & PRASAD (1970). O tampão borato (SHAW & PRASAD, 1970), foi utilizado no preparo do gel e nas cubas dos eletrodos para a análise dos sistemas isozimáticos esterase e leucina aminopeptidase.

A eletroforese foi conduzida por 30min a 150V, após o que os papelotes embebidos com as amostras foram removidos e a voltagem, ajustada para 300V, assim permanecendo até que a migração atingisse 8cm.

Os sistemas isozimáticos fosfatase ácida e malato desidrogenase foram estudados, simultaneamente, na mesma corrida. O gel foi cortado, horizontalmente, três vezes, obtendo-se quatro fatias. A primeira fatia, que em geral não apresenta boa resolução, foi descartada; a segunda foi corada para revelar a atividade das bandas de fosfatase ácida e a quarta, as de malato desidrogenase.

Em outro gel, foi analisada, conjuntamente, a atividade dos sistemas isozimáticos esterase e leucina aminopeptidase. Da mesma forma, terminada a corrida, a segunda fatia foi destinada à revelação das bandas de leucina aminopeptidase, e a terceira, às esterases.

As bandas de esterase e de leucina aminopeptidase foram reveladas utilizando-se o sistema de coloração proposto por SOLTIS et al. (1983); as bandas de fosfatase ácida, com o uso de solução corante recomendada por BREWBAKER et al. (1960) e modificada por HILDEBRAND et al. (1980). As isozimas de malato desidrogenase foram reveladas utilizando-se o método de coloração indicado por SHAW & PRASAD (1970). Após a adição da solução corante efetuou-se a incubação em estufa, a aproximadamente 37°C, por 1h.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em geral, a descendência de panículas protegidas apresentou um padrão de bandas idêntico ao da progênie de panículas de polinização aberta, indicando que o capim-gordura reproduz-se por autofecundação ou por apomixia. A predominante uniformidade isozimática da descendência de panículas submetidas a ambos os tratamentos reforça, entretanto, a hipótese de apomixia. PEREIRA (1986), analisando os mesmos ecótipos, também não encontrou variação isozimática entre plantas do mesmo ecótipo, apenas entre ecótipos diferentes, enquadrando cada um em somente um padrão de isozimas. Em *Panicum maximum* Jacq., SMITH (1972) investigou a variabilidade de progênies segregantes e apomíticas por meio de esterases e de peroxidases, registrando uniformidade qualitativa em todas as linhas apomíticas e amplas diferenças isozimáticas nas progênies segregantes, como se espera encontrar na descendência de plantas sexuais.

Quando a emasculação é bem sucedida, espera-se, em espécies sexuadas, que flores emasculadas e protegidas de outras fontes de pólen não formem sementes ou o façam em taxas reduzidas. No experimento conduzido, observou-se um grande decréscimo



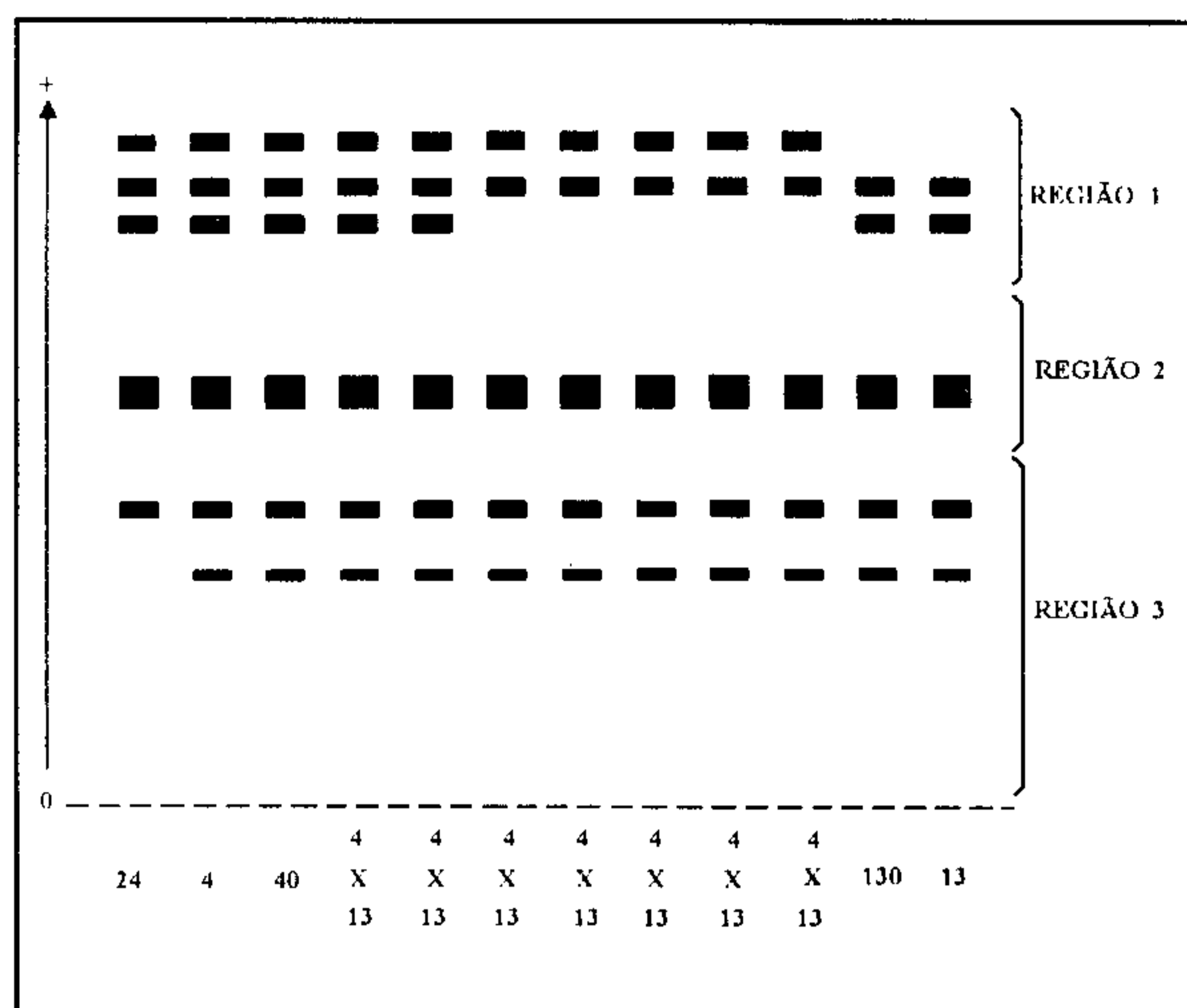


Figura 3. Diagrama dos padrões eletroforéticos de fosfatase ácida em raízes, observados em plantas individuais dos ecótipos CG4 e CG13 de *Melinis minutiflora* Beauv. (⊗ = autopolinização).

Essas diferenças nos padrões isozimáticos entre plantas do mesmo ecótipo podem ser resultantes de fecundação cruzada, constituindo, assim, evidências a serem acrescentadas à hipótese de um mecanismo facultativo de apomixia em capim-gordura, ou de modificações na estrutura primária, secundária ou terciária da proteína. Mutações ou mudanças conformacionais da proteína não implicam, porém, necessariamente, em efeitos fenotípicos detectáveis e plantas isozimaticamente diferentes podem apresentar-se morfologicamente semelhantes.

Progênes provenientes de inflorescências emasculadas e, subseqüentemente, polinizadas e protegidas também repetiram o padrão de bandas do progenitor feminino e apresentaram-se isozimaticamente uniformes.

Em relação às isozimas de leucina aminopeptidase, não se verificou variação, qualitativa ou quantitativa, entre os ecótipos analisados, a exemplo do descrito por PEREIRA (1986). Atividade mais freqüente e visível foi obtida em raiz, com duas bandas anódicas de mobilidades relativas de 1,0 e 0,7, respectivamente, presentes em todos os ecótipos.

Um padrão de duas bandas é típico de organismos heterozigotos para genes que codificam enzimas formadas por uma cadeia polipeptídica, como é o caso da leucina aminopeptidase (PASTEUR et al., 1988). Se a população amostrada for, de fato, constituída por heterozigotos, essa é mais uma evidência a ser adicionada à hipótese de existência de reprodução apomítica na espécie, uma vez que, em

contraste à auto-fecundação, a apomixia facilita a manutenção da heterozigosidade e do vigor híbrido resultante (DOBZHANSKY, 1970).

À semelhança do sistema anterior, não se observou variação nas isozimas de malato desidrogenase entre os ecótipos de capim-gordura. Em raiz, observam-se, na maioria dos casos, três bandas com mobilidades relativas de 1,0; 0,93; e 0,87 respectivamente. Em folha, verifica-se a atividade de quatro bandas com mobilidades relativas de 1,0; 0,93; 0,9; e 0,86 respectivamente.

Para esse sistema enzimático, o tipo heterozigoto, constituído por alelos que codificam duas cadeias polipeptídicas, que se associam ao acaso, formando três tipos de moléculas (dois homodímeros e um heterodímero, a molécula híbrida) é muito comum. Se a enzima funcional é um dímero, após a eletroforese são reveladas três bandas regularmente distanciadas (PASTEUR et al., 1988), como as que se observam em amostras de raiz.

A análise genética dos zimogramas de malato desidrogenase conduz, portanto, às mesmas inferências de propagação por apomixia do capim-gordura, tecidas em relação ao sistema anterior.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que o capim-gordura se reproduz por apomixia facultativa (parcialmente sexual), com taxa reduzida de fecundação cruzada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOGDAN, A.V. The breeding behaviour of molasses grass in Kenya. *East Afr Agr J*, Nairobi, n. 26, p. 49-50, 1960.
- BOGDAN, A.V. The selection of tropical ley grasses in Kenya: general considerations and methods. *East Afr Agr J*, Nairobi, p. 206-217, 1959.
- BREWBAKER, J.L., UPADHYA, M.D., MAKINEN, Y. et al. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III: Gel electrophoretic methods and applications. *Physiol Plant*, Copenhagen, n. 21, p. 930-940, 1960.
- BUMPUS, E.D. Annual report of the grassland research team, 1958. s.n.t., p. 74-91. In: *Plant breeding abstracts*, Farham Royal, v. 31, n. 2, p. 283, 1961.
- BURTON, G.W. *The philosophy of the genetic improvement of forage grass*. Coastal Plain Sta., Tifton, Georgia: USDA, 1970. p. 21-29.
- CHEN, C.H., BUSHUK, W. Nature of proteins in triticale and its parental species. III. A comparison of their electrophoretic patterns. *Can J Plan Sci*, Ottawa, n. 50, p. 25-30, 1970.

- CROWDER, L.V. CHEDDA, H.R. **Tropical grassland husbandry**. New York: Longman, 1982. 402 p.
- DI RENZO, M.A., POVERENE, M.M., TIRANTI, I.N., et al. Polimorfismos isoenzimáticos en cuatro cultivares de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. **Turrialba**, San Jose, v. 40, n. 3, p. 397-402, 1990.
- DOBZHANSKY, T. **Genetics of the evolutionary process**. New York: Columbia Univ. Press, 1970. 392 p.
- EMOTO, T. Intergeneric relationships among the *Lolium* species, *Festucalolium* and *Festuca pratensis* Huds. based on phospho-glucose isomerase isozyme variation. **Bull Akita Prefec Cool Agric**, n. 13, p. 51-57, 1987. In: **Plant breeding abstracts**, Farham Royal, v. 58, n. 10, p. 944, 1988.
- HILDEBRAND, D.F. ORF, J.H. HYMOWITZ, T. Inheritance of an acid phosphatase and its linkage with the kunitz inhibitor in seed protein of soybeans. **Crop Sci**, Madison, n. 20, p. 83-85, 1980.
- JODON, N.E. Experiments on artificial hybridisation of rice. **J Amer Soc Agr**, Madison, n. 30, p. 294-305, 1938.
- KATO, M., TOKUMASU, S. An electrophoretic study of esterase and peroxidase isozymes in *Brassicoraphanus*. **Euphytica**, Wageningen, n. 28, p. 339-349, 1979.
- KENYA, Department of Agriculture, Colony and Protectorate. Annual report for 1956 (s.1), v. 2, p. 181, 1958. In: **Plant breeding abstracts**, Farham Royal, v. 28, n. 4, p. 700, 1958.
- MARSHALL, D.R., BROWN, A.H.D. Estimation of the level of the apomixis in plant populations. **Heredity**, London, n. 32, p. 321-333, 1974.
- MARSHALL, D.R., DOWNES, R.W. A test for obligate apomixis in grain sorghum R473. **Euphytica**, Wageningen, n. 26, p. 665-679, 1977.
- MARTINS, P.S., OLIVEIRA, E.M.P. Estudo sobre o modo de reprodução do capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.). II. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 9, 1972. Viçosa, MG. **Anais...**, Viçosa, Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1972, p. 263-264.
- MELLO, L.R.S. **Determinação do modo de reprodução de *Melinis minutiflora* Beauv. por Padrões Isozimáticos**. Viçosa, MG. 91 p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOME, F., et al. **Practical isozyme genetics**. New York: Halsted Press, 1988. 215 p.
- PEREIRA, E.A. **Caracterização morfoisozimática de 24 ecótipos de capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.)**. Viçosa, MG. 63 p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, 1986.
- QUINBY, J.R., MARTIN, J.H. Sorghum improvement. **Adv Agron**, New York, n. 6, p. 327-328, 1954.
- SADOWSKY, J., WIATROSAK, I., DAUSSANT, J. Variability of  $\beta$ -amilase isoenzymes within a collection of inbred lines of rye (*Secale cereale* L). **Experientia**, Basel, v. 4, n. 4, p. 352-354, 1988.
- SHAW, C.R., PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. **Biochem Genet**, New York, n. 4, p. 297-320, 1970.
- SMITH, R.L. Sexual reproduction in *Panicum maximum* Jacq. **Crop Sci**, Madison, n. 12, p. 624-627, 1972.
- SOLTIS, D.E., HAUFLE, C.H., DARROW, D.C., et al. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **Amer Fern J**, Berlington, v. 73, n. 1, p. 9-27, 1983.
- STEPHENS, J.C., QUINBY, J.R. Bulk emasculation of sorghum flowers. **J Amer Soc Agron**, Madison, n. 25, p. 233-234, 1933.
- WU, N.Y., QI, J.W. Identification of the hybrids between *Saccharum arundinaceum* retz. and sugarcane varieties. **J South China Agr Univ**, v. 8, n. 2, p. 28-34, 1987. In: **Plant breeding abstracts**, Farham Royal, v. 58, n. 10, p. 959, 1980.