



**MIXOPLÓIDIA EM HÍBRIDOS DE
CAPIM-ELEFANTE X MILHETO TRATADOS
COM AGENTES ANTIMITÓTICOS**

JUSCÉLIO CLEMENTE DE ABREU

2002

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Abreu, Juscélio Clemente de

Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes
antimitóticos / Juscélio Clemente de Abreu. -- Lavras : UFLA, 2002.

72 p. : il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Eliminação cromossômica. 2. Duplicação cromossômica. 3. Híbrido
interespecífico. 4. *Pennisetum purpureum*. 5. *Pennisetum glaucum*. 6. *Pennisetum*
sp. 7. Citogenética. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.171

-633.2

JUSCÉLIO CLEMENTE DE ABREU

MIXOPLDIA EM HÍBRIDOS DE CAPIM ELEFANTE X MILHETO
TRATADOS COM AGENTES ANTIMITÓTICOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 25 de Fevereiro de 2002

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini	UFJF
Dr. Antônio Vander Pereira	Embrapa Gado de Leite
Prof. Dr. José Cardoso Pinto	UFLA
Profa. Giovana Augusta Torres	UFLA



Profa. Dra. Lisete Chamma Davide
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Sebastião e Elvira.

A todas as pessoas que estiveram envolvidas, direta e indiretamente.

À minha querida filha, Laura.

OFEREÇO

À minha amada esposa, Elisandra.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por dar-me força nesta conquista.

Aos meus pais e a minha esposa, pelo apoio e incentivo para vencer mais esta etapa.

Ao meu irmão Juvenal e a sua esposa Rosimar e a minha irmã Viviane, pela confiança transmitida.

À orientadora, Lisete Chamma Davide, pelos ensinamentos passados, pela amizade, pela compreensão e pela brilhante orientação.

Ao co-orientador, Antônio Vander Pereira, pela amizade, pelo incentivo e ensinamentos transmitidos desde a iniciação científica.

Ao co-orientador, Moacir Pasqual e a todos os funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, pela orientação na condução dos experimentos.

A Professora Giovana Augusta Torres, pelas sugestões e correções.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia.

Aos amigos Sandro e Vânia, pelo convívio de vários anos, pelas palavras carinhosas de incentivo e ajuda na correção deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética, Alzira, Cláudia, Fábio, Fernanda, Isabella, Josiane, Juliane, Lilian, Roselaine e Tatiana.

Aos amigos Tharsio e Vantuil, pela ajuda durante a montagem dos experimentos.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro no início do meu Doutorado.

A Embrapa Gado de Leite e ao funcionário Vicente.

À Universidade Vale do Rio Verde (UNINCOR) e a todos colegas professores.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu êxito profissional.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Capim-elefante e milho: distribuição e características botânico-agronômicas.....	4
2.1.1 Capim-elefante.....	4
2.1.2 Milho.....	6
2.2 Melhoramento genético do capim-elefante e a obtenção de híbridos interespecíficos.....	8
2.3 Citogenética do capim-elefante, milho e seus híbridos.....	11
2.3.1 Capim-elefante.....	11
2.3.2 Milho.....	13
2.3.3 Híbridos interespecíficos de <i>P. purpureum</i> e <i>P. glaucum</i>	14
2.4 Indução de poliploidia: duplicação cromossômica e avaliação da ploidia....	17
2.5 Eliminação cromossômica somática.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Material genético.....	27
3.2 Certificação do número cromossômico dos híbridos interespecíficos.....	28
3.3 Indução de duplicação cromossômica.....	28
3.3.1 Exposição de plântulas.....	29
3.3.2 Exposição de gemas axilares.....	31
3.3.2.1 <i>In vivo</i>	31
3.3.2.2 <i>In vitro</i>	31
3.3.3 Exposição de perfilhos desenvolvidos de gemas axilares.....	32
3.3.3.1 <i>Protocolo A</i>	32
3.3.3.2 <i>Protocolo B</i>	33
3.3.3.3 <i>Protocolo C</i>	34
3.3.4 Exposição de sementes germinadas em placas de Petri.....	34
3.3.5 Exposição de plântulas cultivadas <i>in vitro</i>	35
3.4 Análise citogenética.....	36
3.5 Análise estatística.....	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 Indução de poliploidia em plântulas.....	38
4.2 Indução de poliploidia em gemas.....	42
4.3 Indução de poliploidia em perfilhos desenvolvidos de gemas axilares.....	42
4.3.1 <i>Protocolo A</i>	42
4.3.2 <i>Protocolo B</i>	45
4.3.3 <i>Protocolo C</i>	48

4.4 Indução de poliploidia em sementes germinadas em placas de Petri.....	50
4.5 Indução de poliploidia em plântulas cultivadas <i>in vitro</i>	51
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	71

RESUMO

ABREU, Juscélio Clemente de. **Mixoploidia em híbridos de capim-elfante x milho tratados com agentes antimitóticos.** 2002. 72 p. (Tese – Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG*

Do cruzamento entre capim-elfante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e milho [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] são produzidos híbridos triplóides ($2n = 3x = 21$, genomas AA'B) de grande interesse forrageiro. Entretanto, a esterilidade desses híbridos torna-se uma barreira para o programa de melhoramento genético e produção de sementes para implementação de pastagens, economicamente mais viáveis. Com o objetivo de promover a restauração da fertilidade dos híbridos entre capim-elfante e milho, foram utilizadas soluções de colchicina 0,05% e 0,1% e de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) aplicadas em gemas *in vivo* e *in vitro*, sementes, plântulas e perfilhos, em diferentes períodos de exposição. O efeito dos antimitóticos foi avaliado por meio da taxa de sobrevivência após tratamento, número cromossômico e presença de anomalias no ciclo celular em meristemas de raízes. Não houve sobreviventes quando foram tratadas sementes e gemas, tanto *in vitro* como *in vivo*. A colchicina apresentou melhor efeito sobre plântulas, enquanto que a ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína (1:1) atuou melhor sobre perfilhos. De modo geral, nos diferentes experimentos, observou-se a ocorrência de mixoploidia, com células apresentando desde 14 até 42 cromossomos, sendo que em média 86,4% das células analisadas apresentaram número cromossômico diferente de 21. Estes resultados indicam que houve tanto duplicação quanto eliminação cromossômica.

*Comitê Orientador: Dra. Lisete Chamma Davide – UFLA (Orientadora), Dr. Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite e Dr. Moacir Pasqual – UFLA.

ABSTRACT

ABREU, Juscélio Clemente de. **Mixoploidy in napiergrass x pearl millet hybrid treated with antimetabolic agents.** 2002. 72 p. Thesis (Doctoral degree in Genetics and Plants Breeding). Federal University of Lavras, Lavras-MG *

Triploid hybrids ($2n = 3x = 21$, genome AA'B) production from crosses between napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) and pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] presents high forage value. However, sterility of these hybrids becomes a barrier to include them in breeding programmes. With the objective of recovering fertility of napiergrass x pearl millet hybrids, it was used colchicine 0.05% and 0.1% solutions and 25 mg/L:300 mg/L cycloheximide, 8-hidroxyquinoline (1:1) applied to shoots *in vivo* and *in vitro*, seeds, seedlings and tillers. The effect of the antimetabolic substances was evaluated through the survival rate after treatment, chromosome number and presence of anomalies in the cell cycle. There were no survivors when seeds and shoots were treated. Best results were obtained when seedlings were treated with colchicine and tillers with cycloheximide: 8-hidroxyquinoline. In these cases, it was observed the occurrence of mixoploidy. Cytogenetic analysis showed cells presenting since 14 up to 42 chromosomes, with 86.4% presenting chromosome number different from 21. Such results indicate the occurrence of chromosome duplication, as well as chromosome elimination.

*Guidance Committee: Lisete Chamma Davide - UFLA (Major Professor),
Antônio Vander Pereira - Embrapa Gado de Leite and Moacir Pasqual - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Uma das preocupações da pecuária leiteira no Brasil tem sido a utilização de gramíneas forrageiras que possuam elevado potencial de produção de forragem e qualidade nutritiva. Estas, quando manejadas adequadamente, podem elevar as produções de leite por unidade de área.

Como tentativa de atender a esta demanda, vários são os estudos sobre o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), espécie alotetraplóide, com genoma A'A'BB e $2n = 4x = 28$ cromossomos e o milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.], espécie diplóide, com genoma AA e $2n = 2x = 14$ cromossomos. Ambas as espécies apresentam larga distribuição tropical e subtropical e estão entre as principais forrageiras que poderão proporcionar uma melhoria substancial na produtividade de leite a pasto. Essas gramíneas são importantes forrageiras, com larga distribuição tropical e subtropical.

O capim-elefante, além da elevada produção de matéria seca, apresenta boa palatabilidade, alto valor nutritivo e perenidade, quando comparado com outras espécies. Segundo Pereira (2001), esta forrageira está entre as espécies de maior eficiência fotossintética, apresentando elevada capacidade de produção e acúmulo de matéria seca de boa qualidade. A sua utilização mais freqüente ocorre no regime de corte (capineiras), podendo também ser utilizada para ensilagem e pastejo rotativo. Nesse último sistema, já se obteve produtividade acima de 15.000 kg de leite/ha/ano (Deresz, 1999).

Uma das grandes limitações à expansão da área cultivada com capim-elefante é a necessidade do uso da propagação vegetativa, visto que a maioria das cultivares produz sementes minúsculas, deiscentes e de baixo vigor. Segundo Pereira (2001), existem poucas cultivares melhoradas para diferentes ecossistemas e sistemas de utilização, especialmente sob pastejo rotativo. O

melhoramento da maioria das características de importância forrageira do capim-elefante pode ser conseguido por meio da exploração da variabilidade existente na própria espécie. Porém, considerando a capacidade do capim-elefante em trocar alelos com outras espécies de *Pennisetum*, o programa de melhoramento pode recorrer à utilização de germoplasma de espécies pertencentes a conjuntos gênicos compatíveis, como é o caso do *Pennisetum glaucum*. Este tipo de combinação genética busca reunir no híbrido algumas características desejáveis do milho, como qualidade da forragem, resistência à seca e tolerância a doenças, com a rusticidade, agressividade, perenidade e elevada produtividade de matéria seca do capim-elefante (Diz, 1994). Além disso, a forragem deste híbrido interespecífico apresenta melhor aceitação pelos bovinos que o próprio capim-elefante (Jauhar, 1981; Pereira et al., 2000).

O híbrido interespecífico de capim-elefante com milho, conhecido como “bana grass”, é um triploide estéril, com $2n = 3x = 21$ cromossomos e genoma AA'B, que pode ser mantido via propagação vegetativa. Entretanto, a esterilidade desse híbrido torna-se uma barreira para o programa de melhoramento genético do capim-elefante e produção de sementes para implementação de pastagens, economicamente mais viáveis.

A restauração da fertilidade do híbrido pode ser conseguida pela duplicação do conjunto cromossômico pelo uso de colchicina (Hanna, 1981; Hanna et al., 1984; Dujardin e Hanna, 1985; Hanna & Dujardin, 1986). Um hexaploide sintético é produzido, o qual apresenta meiose bastante regular, progênie com alta frequência de pólen e sementes de tamanho grande, viáveis e com menor deiscência, quando comparadas às do capim-elefante, viabilizando a propagação via semente. De acordo com Jauhar e Singh (1969), esses indivíduos hexaploides geralmente formam 21 bivalentes na meiose e raramente ocorre associação multivalente, comportando-se meioticamente como um típico diplóide.

Apesar de existir metodologia de duplicação cromossômica do híbrido triplóide de capim-elefante com milheto (Hanna, 1981 e Hanna et al., 1984), nenhum estudo ainda foi feito neste sentido para os híbridos desenvolvidos no Brasil. Além disso, até agora, somente "seedling" foi duplicado, o que não permite uma avaliação prévia do comportamento agrônômico do triplóide, podendo-se duplicar os cromossomos de híbridos sem valor forrageiro. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo implementar novas metodologias de duplicação cromossômica, para restaurar a fertilidade dos híbridos triplóides e contribuir para a obtenção de cultivares superiores que se propaguem via semente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Capim-elefante e milho: distribuição e características botânico-agronômicas

2.1.1 Capim-elefante

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é uma gramínea originária da África, onde ocorre naturalmente em vários países, encontrando-se distribuída entre as latitudes de 10°N e 20°S (Rodrigues et al., 1975). Os primeiros estudos sobre esta forrageira foram realizados na África do Sul, em 1910, pelo Coronel Napier (Bennett, 1972). Desde então, tem sido introduzida e utilizada na maioria das regiões tropicais e subtropicais do planeta, em decorrência do seu reconhecido valor forrageiro (Bogdan, 1977). Entre suas principais características, destacam-se a elevada capacidade de produção de matéria seca e a tolerância a períodos secos e a queimadas. Entretanto, segundo alguns autores, não tolera geadas e solos encharcados (Whyte et al., 1959; Souza, 1971; Nascimento Jr., 1981).

No Brasil, esta espécie foi introduzida, em 1920, a partir de estacas procedentes de Cuba (Granato, 1924), sendo rapidamente difundida para utilização como capineira. O sucesso na disseminação da espécie está relacionado ao seu valor nutritivo e à sua alta eficiência fotossintética, com uma produção de até 300 t/ha/ano de matéria verde (Carvalho, 1985). Além destas, o capim-elefante possui outras características favoráveis que contribuíram para sua disseminação, tais como facilidade de propagação vegetativa, resistência à pragas, boa palatabilidade e valor nutritivo quando jovem (Mozzer et al., 1986). Estes resultados têm contribuído para a seleção do capim-elefante como a espécie de maior potencial para produção de leite a pasto (Pereira et al., 2001).

Segundo Pereira et al. (2001), o capim-elefante é a forrageira mais utilizada para a formação de capineiras, devido à sua elevada capacidade de produção. No arraçãoamento animal, o capim-elefante tem sido fornecido como verde picado, sob a forma de silagem, feno e em pastejo direto. O uso sob pastejo, embora seja uma forma de utilização mais recente, tem se expandido rapidamente, em função dos excelentes resultados obtidos, com produções de até 20 t de leite/ha/ano. Esse valor poderá ser ultrapassado com uma cultivar melhorada que se adapte melhor ao pastejo.

O capim-elefante é uma gramínea pertencente à subfamília *Panicoidea*, da tribo *Paniceae* e do gênero *Pennisetum*, o qual possui mais de 140 espécies. Desde a sua primeira descrição, *Pennisetum purpureum* Schum. tem sido incluído em diferentes seções. Inicialmente, fez parte da seção *Penicillaria*, sendo atualmente incluído na seção *Pennisetum* (Brunken, 1977).

P. purpureum é uma espécie que apresenta ciclo vegetativo perene, crescimento cespitoso, porte elevado, colmos eretos, cilíndricos e cheios, folhas largas e compridas, inflorescência primária terminal do tipo panícula e abundante lançamento de perfilhos aéreos e basais (Diz, 1994). Além disso, é preferencialmente alógama, protogínica, mostrando forte depressão endogâmica (Javier, 1970; Pereira et al., 1997).

Os caracteres morfológicos do capim-elefante podem apresentar ampla variação entre diferentes ecotipos. O grau de variação morfológica chega a ser tão contrastante que, na evolução da classificação da espécie, *P. purpureum* passou por diversas denominações, tais como *P. macrostacyum* Benth; *P. benthamii* Stend; *Gymnothry nitens* Anderss; *P. nitens* (Anderss) Hack; *P. benthamii* var. *nudum* Hack; *P. pallescens* Leeke; *P. lachonorrhachis* A. Peters; *P. purpureum* subsp. *flexispica* (K. Schum.) Maire e Weiller; *P. purpureum* subsp. *benthamii* (Stend) Maire e Weiller (Pereira et al., 2001).

Uma das primeiras tentativas de se classificar a variabilidade dentro de *P. purpureum* foi apresentada por Maire (1952), que sugeriu a divisão da espécie em três subespécies: *bentharii* (Stend) Maire e Weiller, *purpureum* (Schum) e *flexispica* (K. Schum) Maire e Weiller

Outros critérios de divisão da variabilidade foram apresentados em relação à presença de pêlos (Bogdan 1977), época de florescimento, diâmetro do colmo e formato da touceira (Xavier et al., 1993).

Segundo Pereira et al. (2001), a época de florescimento pode variar com a cultivar e com as condições ambientais. Na região sudeste, o florescimento, normalmente, ocorre no período de março a agosto. De acordo com Xavier et al. (1993) e Pereira (1993), as cultivares podem ser classificadas quanto à época de florescimento em precoces (março e abril), intermediárias (abril e maio) e tardias (junho e julho), podendo ocorrer isolamento reprodutivo temporal entre variedades, principalmente entre as precoces e tardias.

Além destas, muitas outras características morfológicas de capim-elefante têm sido utilizadas para agrupar as variedades. Pereira (1993) classifica a variabilidade dentro do germoplasma de capim-elefante em cinco grupos distintos: cameroon, napier, merker, anão e híbridos Interespecíficos.

2.1.2 Milheto

Os primeiros cultivos do milheto foram realizados no norte e oeste da África. Esta espécie foi domesticada como cereal, no sul do Sahara, há aproximadamente 4.000 a 5.000 anos. Hoje em dia, a espécie está distribuída nas áreas tropicais semi-áridas da África e Ásia (Davies, 1968 e Munson, 1975, citados por Diz, 1994). Já na Índia, além de fazer parte da alimentação humana, começou a ser pesquisado e melhorado como forragem para o gado, o que o

levou a conquistar espaço como "pastagem da seca", também nos Estados Unidos.

Os primeiros relatos de sua presença no Brasil situam-se no Rio Grande do Sul (RS), mais especificamente na Estação Zootécnica de Montenegro. Datam de 1929, tendo sido avaliado por Anacreonte A. de Araújo (Medeiros, 1977). Segundo Bonamigo (1999), a avaliação sistemática por meio de testes de pesquisas teve início no RS com a Secretaria de Agricultura e com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no final dos anos 1960 e início dos anos 70, com a introdução de diversos materiais do estado norte-americano da Geórgia. Outro local significativo da pesquisa com milho foi Pernambuco, no Instituto de Pesquisa Agropecuária (IPA) e com a Universidade Federal de Pernambuco, com muitos trabalhos de testes, avaliações e divulgação. Atualmente, a área ocupada com o milho, no Brasil, está próxima de 2,1 milhões de ha (Bonamigo, 1999).

O milho apresenta boa resistência à seca e a doenças, é tolerante a baixos níveis de fertilidade do solo e apresenta boa produção de sementes não deiscentes, produzindo cerca de 500 kg/ha. Além disso, essa gramínea proporciona elevado rendimento de matéria seca, chegando próximo de 22 t/ha (Andrade & Andrade, 1982).

Pennisetum glaucum também é comumente denominado de pasto italiano, capim-charuto e tifóide. Seus grãos são utilizados na alimentação humana e a planta inteira é utilizada como forragem verde ou conservada para o gado, pois produz grande quantidade de folhagem tenra, nutritiva, palatável e livre de compostos tóxicos (Minocha, 1991).

O milho é considerado o sexto cereal mais importante do mundo. Nutricionalmente, o grão do milho é superior ao do trigo, do arroz e do milho em relação ao conteúdo mineral (Pantulu & Rao, 1982), além de apresentar 16% de proteína.

O milheto, assim como o capim-elefante, pertence à família *Poaceae*, subfamília *Panicoidea* e gênero *Pennisetum*. Esta espécie apresenta ciclo vegetativo anual, porte ereto, podendo apresentar um único caule, de 1 a 3 m, compacto, exceto abaixo da panícula. As folhas medem de 20 a 100 cm de comprimento e de 5 a 10 mm de largura. A inflorescência é uma panícula densa ou contraída com 10 a 50 cm de comprimento de 0,5 a 4 cm de diâmetro (Alcântra & Bufarah, 1988).

2.2 Melhoramento genético do capim-elefante e a obtenção de híbridos interespecíficos

Buscando obter novas combinações gênicas para atender à demanda nacional dos produtores por cultivares forrageiras superiores, a Embrapa Gado de Leite, a partir de 1991, iniciou o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético do capim-elefante. Esse programa visava explorar a variabilidade genética existente entre 120 acessos de capim-elefante, 50 acessos de milheto e 15 acessos de outras espécies de *Pennisetum* que compõem o Banco Ativo de Germoplasma do Capim-Elefante (BAGCE).

Segundo Pereira et al. (2001), as principais coleções de capim-elefante do Brasil encontram-se localizadas na Embrapa Gado de Leite, Universidade Federal de Pelotas/RS, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina/SC e Instituto Pernambucano de Agropecuária/PE. Entretanto, a maioria dos acessos destas coleções são comuns e foram introduzidos do Banco de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite (BAGCE).

Pelo exposto, percebe-se que o capim-elefante é uma espécie amplamente difundida por todo o Brasil, sendo cultivada em condições ambientais bastante diversificadas. Entretanto, existem poucas cultivares melhoradas para os diferentes ecossistemas e sistemas de utilização,

especialmente sob pastejo rotativo. A exceção é a recente cultivar lançada pela Embrapa Gado de Leite, denominada Pioneiro, que é destinada ao uso sob pastejo (Pereira et al., 1997).

Uma das grandes limitações à maior expansão da utilização do capim-elefante é a necessidade do uso da propagação vegetativa, visto que a maioria das cultivares produz sementes de baixo vigor. Considerando que a maioria das cultivares existentes é de são clones e sendo esta forrageira quase sempre cultivada sob condições de manejo deficiente, a expressão do potencial da espécie é comprometida pela dificuldade da planta de se adaptar aos diferentes ambientes. Uma solução econômica para este problema é o desenvolvimento de cultivares superiores, adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas. O uso de cultivares melhoradas, além de contribuir para o aumento e redução do custo da produção animal, constitui uma tecnologia acessível à maioria dos produtores (Pereira et al., 2001).

No programa de melhoramento genético do capim-elefante conduzido pela Embrapa Gado de Leite, buscam-se cultivares que apresentam: maior velocidade de crescimento, maior produtividade, melhor qualidade forrageira, maior eficiência na utilização de nutrientes, distribuição mais equitativa da produção de matéria seca durante o ano, elevada produção de sementes viáveis para a propagação via semente, tolerância à seca e resistência ao pisoteio, a pragas e doenças (Pereira, 1994).

O melhoramento da maioria das características de importância forrageira do capim-elefante pode ser conseguido por meio da exploração da variabilidade existente na própria espécie (melhoramento intravarietal). Porém, considerando a capacidade do capim-elefante de trocar alelos com outras espécies de *Pennisetum*, o programa de melhoramento pode recorrer à utilização de germoplasma de espécies pertencentes a conjuntos gênicos próximos, tais como o milheto (Pereira et al., 2001). Este tipo de combinação genética busca reunir

no híbrido algumas características desejáveis do milho. Entre essas características estão: qualidade da forragem, resistência à seca e tolerância a doenças, a rusticidade, agressividade, perenidade e elevada produtividade de matéria seca do capim-elefante (Diz, 1994). Além disso, a forragem deste híbrido interespecífico apresenta melhor aceitação pelos bovinos que o próprio capim-elefante (Jauhar, 1981). De acordo ainda com Jauhar (1981), em função da ampla variabilidade genética do milho, sua utilização no melhoramento genético do capim-elefante permitirá maiores avanços na obtenção de cultivares híbridas superiores.

Os híbridos triplóides têm apresentado grande variabilidade para caracteres de importância forrageira, já tendo sido selecionados materiais com 23% de proteína bruta nas folhas, valor este superior à média de 16% encontrada para o capim-elefante (Pereira et al., 2000). Entretanto, estes híbridos são estéreis, o que constitui uma barreira para o programa de melhoramento genético. Por isso, torna-se indispensável a restauração da sua fertilidade, para que os mesmos voltem ao programa de melhoramento genético, transferindo alelos de características desejadas ao capim-elefante.

Por meio da duplicação cromossômica, Hanna (1981) e Hanna et al. (1984) produziram um híbrido hexaplóide com meiose regular, que apresenta sementes maiores e mais vigorosas quando comparadas com as minúsculas sementes de baixo vigor do capim-elefante. Fica assim facilitada a propagação do híbrido via semente. No entanto, até o momento não foram realizados trabalhos sobre duplicação cromossômica com os híbridos obtidos em programas de melhoramento nacionais.

2.3 Citogenética do capim-elefante, milheto e seus híbridos

2.3.1 Capim-elefante

O gênero *Pennisetum* tem números básicos de cromossomos iguais a 5, 7, 8 e 9. A seção *Pennisetum*, que inclui o capim-elefante e o milheto, tem número básico 7. O capim-elefante é alotetraplóide ($2n = 4x = 28$ cromossomos), com comportamento citogenético diplóide normal (Brunken, 1977), possuindo genomas A'A'BB (Jauhar, 1981). O primeiro destes apresenta grande homologia com o genoma A do milheto (*P. glaucum*) e o outro é proveniente de um ancestral desconhecido (Jauhar, 1981; Dujardin & Hanna, 1985). Para Martel et al. (1997), as técnicas de citogenética molecular, como hibridação *in situ*, podem testar a origem alotetraplóide ou diplóide de *P. purpureum*. O autor descreve, ainda, que essa espécie pode ter sido originada por mecanismo de produção do anfidiplóide por meio de gametas não reduzidos, seguido pela diminuição do tamanho dos cromossomos. Por outro lado, o cariótipo de *P. purpureum* pode ter sido originado da fragmentação de cromossomos maiores de um suposto ancestral com $2n = 14$ cromossomos. Para esse propósito, o DNA genômico total de *P. glaucum* (4,71 picogramas) pode ser investigado nos cromossomos de *P. purpureum* (4,59 picogramas) (Martel et al., 1997).

Segundo Pantulu e Venkateswarlu (1968), estudos sobre a morfologia dos cromossomos no paquíteno mostraram que os cromossomos 1 e 14 do capim-elefante apresentam os organizadores nucleolares e o primeiro mostrou-se 2,7 vezes maior que o último, caracterizando um cariótipo assimétrico. Para Jauhar (1981), o cariótipo do capim-elefante é constituído de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e um acrocêntrico. Com base nestas

observações, o cariótipo do capim-elefante foi incluído na categoria 2b da classificação de assimetria proposta por Stebbins (1958).

No entanto, Manara (1973), analisando oito variedades de capim-elefante, relatou a ocorrência de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e que a relação entre o maior e o menor cromossomo foi inferior a 2:1. Esses dados, associados à ausência de cromossomos acrocêntricos, levaram a autora a incluir o cariótipo das oito variedades na categoria 1a de Stebbins (1958). Barbosa (2000), estudando cinco acessos de capim-elefante do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite (BAGs 54, 63, 65, 75 e 91), observou a presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos em algumas metáfases. Contudo, ao obter as médias das metáfases avaliadas para cada acesso, os cromossomos submetacêntricos foram suprimidos por estarem presentes em algumas poucas metáfases. Foi observado ainda que, entre os sete primeiros pares de cromossomos, há, pelo menos, dois pares submetacêntricos e entre os sete pares restantes ocorre pelo menos um par submetacêntrico. Este fato, associado à diferença de comprimento relativo ser praticamente o dobro entre o maior e o menor par nos BAGs 54, 65 e 91, sugere a inclusão do cariótipo desses acessos na categoria 2b, de acordo com a classificação de Stebbins (1958). Para os acessos BAGs 63 e 75, devido à relação entre o maior e menor braço ter sido menor que 2:1, o cariótipo enquadra-se na categoria 1a - simétrico.

Essa divergência de resultados confirma a ocorrência de variação intravarietal em *P. purpureum* e permite inferir que as alterações estruturais, como deleções e adições, devem ter contribuído para aumentar ou diminuir a diferença de tamanho entre o maior e o menor cromossomo dos diferentes acessos de capim-elefante (Barbosa, 2000).

2.3.2 Milheto

O milheto é uma espécie diplóide anual com $2n = 2x = 14$ cromossomos e genoma AA, de polinização cruzada, principalmente por causa do seu hábito de floração protogínica (Powell et al., 1975).

P. glaucum é um excelente material para a pesquisa de citogenética, mas foi somente nas duas últimas décadas que estas pesquisas avançaram. Segundo Minocha (1991), as pesquisas têm avançado mais em relação aos seguintes tópicos: nomenclatura; produção de haplóides, polipóides, incluindo triplóides e tetraplóides; aneuplóides, incluindo trissômicos primários e terciários; variações cromossômicas, incluindo procedimentos citológicos e identificação cromossômica; designação de grupos de ligação e hibridização de células somáticas, além das transformações genéticas.

Os relatos sobre o cariótipo do milheto têm sido divergentes. Alguns autores (Avdulov, 1931; Burton & Powell, 1968; Pantulu & Venkateswarlu, 1968) determinaram que o cariótipo do milheto é constituído de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e que o menor cromossomo é, aproximadamente, $2/3$ do comprimento do maior cromossomo. Já para Virmani e Gill (1972) e Tyagi (1975), o cariótipo do milheto, além de apresentar cromossomos metacêntricos (pares 1, 2, 3 e 5) e submetacêntricos (pares 4 e 6), apresentam também um cromossomo acrocêntrico com satélite (par 7).

Jauhar (1981) apresentou o cariótipo do milheto como simétrico, devido à presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, e pelo fato de o maior deles ser 1,5 vez maior que o menor. Portanto, é incluído na categoria 1a de Stebbins (1958). Este mesmo resultado foi verificado por Barbosa (2000), que observou que, além dos cromossomos do milheto serem metacêntricos e submetacêntricos, a diferença entre o maior e o menor par de cromossomos é 1,6 de vez, classificando também o cariótipo como simétrico.

Jauhar (1981) e Barbosa (2000) relatam que as divergências entre os trabalhos relacionados à classificação dos cromossomos e localização do satélite são notórias. Considerando uma metáfase mitótica com os cromossomos condensados, não seria inesperado que um pesquisador classificasse o centrômero como mediano, tendo outro classificado-o como submediano. Acrescentam, ainda, que essas diferenças podem estar relacionadas à magnitude de erro na medição dos cromossomos, tendo em vista que esse procedimento é geralmente feito na metáfase, após pré-tratamentos para condensação e espalhamento dos cromossomos.

2.3.3 Híbridos interespecíficos de *P. purpureum* e *P. glaucum*

Os híbridos de capim-elefante e milheto são obtidos com grande facilidade por meio do cruzamento interespecífico, pois são espécies estreitamente relacionadas. Estes híbridos apresentam florescimento precoce, esterilidade resultante de constituição cromossômica desbalanceada ($2n = 3x = 21$ cromossomos) do genoma AA'B, morfologia e características químicas intermediárias às dos progenitores. Os principais exemplos são pusa napier, bana grass (badala napier grass), mineiro x 23A e mineiro x 29DA (Pereira, 1994).

O interesse primordial na obtenção desses híbridos, como citado anteriormente, foi combinar as qualidades do milheto como forrageira (boa produção de sementes, sementes não deiscentes e resistência a doenças) com a agressividade, rusticidade e hábito perene do capim-elefante. Além disso, a forragem destes híbridos é mais produtiva e mais aceitável pelos bovinos do que a do capim-elefante (Jauhar, 1981).

Na meiose destes híbridos interespecíficos estéreis, foi observada a formação de pontes, tétrades anormais e aborto de todas as quatro megásporas (Hanna, 1981 e Jauhar, 1981). De acordo com Techio et al. (2001), na meiose

dos híbridos interespecíficos produzidos pela Embrapa Gado de Leite (F94-60-01; F94-52-02 e F94-53), foram observados 7 bivalentes e 7 univalentes. Também foram encontradas anormalidades relacionadas à segregação irregular dos cromossomos, caracterizada pela presença de cromossomos com ascensão precoce nas metáfases I e II ou retardatários nas anáfases I e II. Os autores acrescentam, ainda, que foram observados micronúcleos nas telófases II e tétrades, possivelmente como consequência das irregularidades citadas, além de pontes cromossômicas múltiplas nas anáfases I e II e aderência entre cromossomos.

A restauração da fertilidade do híbrido pode ser conseguida pela duplicação do conjunto cromossômico (Hanna, 1981; Hanna et al., 1984; Dujardin & Hanna, 1985; Hanna & Dujardin, 1986), produzindo um hexaplóide sintético que apresenta megasporogênese e desenvolvimento do saco embrionário normal, como no capim-elefante (Hanna, 1981). Para Jauhar e Singh (1969), esses indivíduos hexaplóides geralmente formam 21 bivalentes na meiose e raramente ocorre associação multivalente, comportando-se meioticamente como típicos diplóides.

Para Barbosa (2000), a contribuição do genitor capim-elefante, em termos de quantidade de DNA, determinada com base no comprimento do lote haplóide (CTLH), é similar àquela fornecida pelo milho, embora os híbridos, fenotipicamente, assemelhem-se mais ao capim-elefante. De acordo com Gonzalez & Hanna (1984), o genoma B tem um efeito dominante sobre o genoma A em capim-elefante com relação ao tamanho da semente, juvenildade e características de inflorescência e folha.

Vários autores citados por Jauhar (1981) descreveram que o híbrido hexaplóide tem uma maior semelhança ao capim-elefante, devido a uma maior contribuição genômica deste. Comentam também que o genoma A de *P. glaucum* e A' de *P. purpureum* são similares no conteúdo gênico. Estes, no

hexaplóide, têm um efeito de quatro genomas A, embora a maior semelhança do hexaplóide à *P. purpureum* demonstre que os genomas A e A' são suficientemente diferentes, apresentando expressões fenotípicas diferentes. Também, mais provavelmente, que o genoma B domina os genomas A e A'. Krishnaswamy e Raman (1949, 1953, 1954, 1956), citados por Jauhar (1981), consideram o genoma B dominante pois, alterando-se a proporção do genoma A em relação ao genoma B de 2:1 para 5:1, a manifestação fenotípica do genoma B é maior que a dos genomas A combinados. No híbrido com constituição genômica AAAAA'B, por exemplo, a única dose do genoma B faz com que este se assemelhe mais ao *P. purpureum*. Isso indica que o genoma B foi dominante ou, talvez, epistático sobre as cinco doses do genoma A.

De acordo com Burton (1942) e Jauhar (1981), existe grande facilidade para identificar os cromossomos somáticos das duas espécies pelo tamanho e pela forma, pois os cromossomos de *P. glaucum* são maiores que os de *P. purpureum*. Porém, Barbosa (2000) relata ser possível distinguir parcialmente os cromossomos parentais no híbrido, por meio de pequenas diferenças no cariótipo. Mas, sugere que a utilização de técnicas de bandeamento cromossômico possibilitariam acompanhar de maneira mais precisa o comportamento dos dois conjuntos cromossômicos das espécies genitoras no triplóide, auxiliando na ordenação precisa dos cromossomos no cariograma.

A maioria das caracterizações citogenéticas existentes para os híbridos entre capim-elefante e milho é baseada no comportamento cromossômico durante a meiose (Burton, 1942; Burton & Powel, 1968; Jauhar, 1981; Pantulu e Rao, 1982). Contudo, Barbosa (2000), estudando a mitose de acessos de híbridos cedidos pela Embrapa Gado de Leite, verificou que, com relação ao comprimento relativo, em células somáticas, o maior cromossomo do híbrido chega a ser 2,6 vezes maior que o menor cromossomo. Baseado nesta informação, esse mesmo autor determinou que os cariótipos dos acessos híbridos

analisados incluem-se na categoria 2b de Stebbins (1958) e relatou que, na maioria destes acessos, foram observados cromossomos metacêntricos e submetacêntricos.

2.4 Indução de poliploidia: duplicação cromossômica e avaliação da ploidia

A hibridação e a poliploidia são dois processos estreitamente relacionados e de grande importância na evolução das plantas (Stebbins, 1971) e para o melhoramento genético. Segundo DeWet (1980), a poliploidia é um notável aspecto da evolução dos cromossomos. Os poliplóides, como definição geral, combinam três ou mais genomas básicos de um grupo taxonômico ao qual eles pertencem.

Stebbins (1971) refere-se à poliploidia como sendo o processo citogenético mais difundido e mais distintivo que afetou a evolução das plantas superiores. Esse autor estima que de 30% a 35% das espécies de fanerógamas têm número de cromossomos gaméticos múltiplos do número básico característico do gênero ao qual elas pertencem. Para Guerra (1989), a poliploidia é um fenômeno muito comum em plantas, especialmente em pteridófitas, cuja maioria das espécies tem número gamético muito elevado.

Os poliplóides são classificados, sobre a base da sua origem, em autopoliplóides (genoma básico repetido) e alopoliplóides (dois ou mais genomas distintos). Segundo DeWet (1980), a tetraploidia é o maior sucesso natural da poliploidia e, provavelmente, combina dois diferentes genomas adaptados, mas citogeneticamente de taxa aparentado. Para Guerra (1989), embora existam muitos exemplos de poliploidia intraespecífica, como *Caesalpinia ferrea* e *Odontophrynus americanus*, a maioria dos poliplóides conhecidos é de origem interespecífica, isto é, os poliplóides constituem espécies isoladas.

Implicações genéticas e evolutivas dos poliplóides são freqüentemente discutidas, mas a origem é pouca debatida. Segundo DeWet (1980), as duplicações cromossômicas meristemática e zigótica têm sido aceitas como os eventos naturais mais comuns da origem dos poliplóides. Entretanto, a origem pode também ocorrer pela não redução de gametas femininos e masculinos.

Roth (1984), em ampla revisão de literatura, descreve que a poliploidização produz uma série de efeitos morfo-fisiológicos. O efeito imediato é o aumento do tamanho das células devido ao volume nuclear maior, conduzindo a uma redução do número de divisões celulares durante o desenvolvimento. O conhecido efeito "gigas" encontra-se comumente em órgãos de padrão de crescimento altamente determinado, como flores e sementes.

A literatura cita diversas técnicas físicas e químicas de se obter poliplóides artificiais, tais como injúrias, choques térmicos, centrifugação, uso de agentes químicos como podofilina, vincalécoblastina (VLB), óxido nitroso (N_2O), hormônios, herbicidas, ciclohexamida, 8-hidroxiquinoleína e colchicina. Segundo Chalak & Legave (1996), a colchicina tem sido usada desde 1937, na indução de plantas poliplóides. Em muitas espécies, a colchicina é conhecida por causar efeitos, como esterilidade, desenvolvimento anormal e indução de plantas quimeras, devido à assincronia da divisão celular (Wan et al., 1989). Jensen (1974) descreve que, em concentrações elevadas, a colchicina possui efeitos tóxicos, levando à morte células e plantas e que a tolerância à colchicina varia de acordo com a espécie.

Para Geoffriau et al. (1997), outros agentes, tais como herbicidas antimicrotubulares [orizalina, trifluralina, amiprofosmetil (AMP) e pronamide] têm demonstrado maior especificidade para a tubulina de plantas *in vitro*, do que a colchicina. Segundo Van Tuyl et al. (1992), os compostos dinitroanilinas, usados como herbicidas têm alta atividade de poliploidização com baixa toxicidade. Um destes compostos, a orizalina (3,5-dinitro-N4.N4-

dipropilsulfanilamida), possui alta atividade, na despolimerização dos microtúbulos, em baixas concentrações (Morejohn et al., 1987, citados por Duren et al., 1996). Porém, a manipulação desta substância, pelo homem, é considerada arriscada pelas empresas que a sintetizam, podendo ser fatal se absorvida através da pele ou inalada.

Wan et al. (1991) descrevem que os herbicidas orizalina, trifuralina, amiprofosmetil (AMP) e pronamide, aplicados na cultura de calos de antera de milho, foram eficientes. No entanto, a orizalina, além de induzir eficientemente a duplicação cromossômica, também afetou a capacidade de regeneração dos calos. Geoffriau et al. (1997) relataram que a proporção de explantes de *Allium cepa* (L.) sobreviventes foi maior nos tratamentos com orizalina do que nos com colchicina. Porém, a orizalina induziu poucos dihaplóides quando comparada com a colchicina.

Sree Ramulu et al. (1991), Wan et al. (1991) e Bouvier et al. (1994), citados por Chalak & Legave (1996), demonstraram que a orizalina é mais eficiente que a colchicina para a duplicação cromossômica. DeBuyser & Henry (1980), citados por Chalak & Legave (1996), demonstraram que mais de 54,4% das plantas haplóides de trigo tratadas com colchicina produziram sementes depois de duplicadas. Metz et al. (1988), estudando o efeito do emprego da colchicina em duas linhagens de trigo, demonstraram que 98% das plantas tratadas produziram sementes. Em milho, calos tratados com 0,025% a 0,05% de colchicina por 24 horas regeneraram 50% de plantas dihaplóides e aqueles tratados por 72 horas regeneraram 100% de plantas dihaplóides (Wan et al., 1989).

Seis hexaplóides de trigo cultivado e cinco linhagens de centeio foram usadas para o estudo da influência do genótipo parental sobre a duplicação cromossômica depois do tratamento com colchicina. Diferenças significativas

foram demonstradas e atribuídas aos efeitos independentes dos parentais (Tanner, 1981).

A investigação citológica da meiose de três híbridos do cruzamento de *Hordeum chilense* com tritcale, tratados com colchicina, demonstrou que o número cromossômico dos polihaplóides e anfidiplóides foi bastante estável (Scharder & Pohler, 1985). Segundo Dahleen & Joppa (1992), os tratamentos com colchicina têm sido usados para dobrar o número cromossômico de muitos híbridos. Mas, o sucesso não é garantido, pois, trabalhando com híbridos de *H. vulgare* com *Elymus canadensis* (centeio selvagem), os autores só conseguiram dobrar o número cromossômico de $2n = 21$ para $2n = 42$ em apenas dois clones.


Roth (1984), citando vários autores, descreve que as principais variáveis no tratamento com colchicina são (a) concentração variando de 0,0006% a 3,0%, (b) tempo de exposição à droga variando de uma hora a vários dias, (c) forma de aplicação, desde a imersão de sementes e embriões ao tratamento local de meristemas em plantas desenvolvidas.

O maior problema da indução via colchicina resulta do fato de a substância só agir efetivamente sobre as células que estão em divisão. Desse modo, a poliploidização geralmente não atinge todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixoplóides e quimeras. Em consequência, surge o problema relativo à estabilidade da condição poliplóide. É freqüente a reversão parcial ou total à condição diplóide, após alguns ciclos de divisão, principalmente devido à proliferação das células diplóides remanescentes que se multiplicam a taxas superiores àquelas das células poliplóides. Em decorrência dessas dificuldades, tem-se variado bastante a forma de aplicação dos indutores de poliploidia, buscando uma maior eficiência do tratamento (Roth, 1984).

Em gramíneas (*Poaceae*), o que se tem observado na literatura é que a colchicina tem apresentado bons resultados na poliploidização. Saisingtong et al.

(1996) conseguiram a produção de dihaplóides de milho, partindo de culturas de anteras em meio de cultura contendo colchicina. Hanna (1981) e Hanna et al. (1984) obtiveram sucesso na produção de hexaplóides, derivados de triplóides interespecíficos de capim-elefante com milheto, usando colchicina. Vários outros trabalhos, tais como em sorgo (Sun, 1994) e em arroz (Huang, 1995), também obtiveram sucesso na poliploidização com o uso da colchicina. Hassawi e Liang (1991), estudando o efeito de três agentes antimitóticos em duas concentrações, demonstraram que a colchicina é mais eficiente do que a trifuralina e a orizalina para induzir a duplicação cromossômica em células de calos de antera de trigo. Neste trabalho, 89% das plantas regeneradas foram tratadas com colchicina e apenas 18,8% e 7,7% de plantas regeneradas foram tratadas com trifuralina e orizalina, respectivamente. Sanford (1983), citado por Duren et al. (1996), descreve que a colchicina é muito usada para a indução de poliplóides em um grande número de espécies de plantas. Hassawi e Liang (1991) descrevem que, apesar de a colchicina ser o melhor agente antimitótico, ela é muito dispendiosa e carcinogênica. Assim é necessário que outros agentes antimitóticos sejam testados em várias concentrações e durações para se obter o máximo de eficiência.

Na literatura, percebe-se que a indução de poliploidia em vegetais não é uma tarefa fácil. Em vários trabalhos verifica-se que as metodologias variam muito, principalmente com relação aos tipos e tempos de ação dos indutores, as concentrações e os tecidos alvo, buscando sempre uma maior eficiência do tratamento. Observa-se também que, uma vez conseguida a poliploidização, a frequência de plantas mixoplóides é grande e as de poliplóides estáveis é muito pequena. Além disso, quando altas frequências de plantas induzidas à poliploidia são obtidas, estas são, na verdade, dihaplóides. Isso porque a própria condição haplóide favorece a duplicação cromossômica, como no caso de regeneração de



plantas com base no cultivo de anteras de cevada, quando foi possível observar duplicação cromossômica espontânea superior a 92% (Hanson, 1984).

Segundo Duren et al. (1996), o método mais usado para confirmar se a indução à poliploidia deu certo é o de contagem de cromossomos. Porém, este método gera algumas dificuldades para a investigação em larga escala. A análise do conteúdo de DNA por meio da citometria de fluxo tem sido muito utilizada atualmente para a investigação de poliplóides, por produzir resultados com maior confiabilidade e facilidade de análise.

2.5 Eliminação cromossômica somática

O fenômeno da eliminação cromossômica somática foi descoberto inicialmente na França, por Cauderon e Cauderon, em 1956, por meio de cruzamentos entre *Hordeum vulgare* e *Hordeum bulbosum*, apresentando grande potencialidade no melhoramento genético (Kasha & Kao, 1970; Picard et al., 1994).

A eliminação cromossômica somática é um mecanismo que pode levar ao isolamento reprodutivo, podendo ser total ou parcial de um dos genomas parentais como consequência da condição híbrida, ou seja, desajuste entre os genomas de espécies diferentes. As espécies mais estudadas neste aspecto são os híbridos de *Hordeum*, *Avena*, *Brassica* e de trigo com centeio (triticale) (Sundberg & Glimelius, 1991; O'Donoghue & Bennett, 1994; Picard et al., 1994).

A combinação de dois genomas distintos em híbridos frequentemente resulta em divisões mitóticas e meióticas aberrantes e, às vezes, conduz à eliminação de cromossomos. Uma correlação positiva entre a eliminação de cromossomos e a distância genética entre as espécies parentais foi observada em *Brassicaceae* (Sundberg & Glimelius, 1991).

As plantas híbridas exibem eliminação espontânea de cromossomos em regiões meristemáticas, como nas pontas das raízes (Noda & Kasha, 1981). Várias hipóteses foram sugeridas para explicar o mecanismo de eliminação de cromossomos. Estas hipóteses incluem o tempo do ciclo celular assíncrono entre os dois genomas do núcleo híbrido e fatores assíncronos que regulam o movimento dos cromossomos durante a mitose, como má formação do fuso ou supressão da função do centrômero (Kasha, 1974).

As eliminações cromossômicas também ocorrem espontaneamente em organismos de populações naturais (híbridos de *H. vulgare* com *H. bulbosum*) e, como alternativa, podem ser induzidas experimentalmente. Na agricultura, o tipo mais explorado de eliminação cromossômica induzida tem sido a eliminação somática para a produção de haplóides. Ela envolve o resgate e a cultura *in vitro* de embriões imaturos resultantes de cruzamentos interespecíficos e intergenéricos, os quais são originados por eliminação somática do genoma doador do pólen (Peters et al., 1999).

Evidências de sucesso na fertilização intergenérica para a produção de embriões imaturos que, posteriormente, resultaram em haplóides gimnogenéticos, foram demonstradas entre arroz e *Pennisetum* sp., cana-de-açúcar e sorgo e arroz e sorgo. Mais recentemente, também entre trigo e milho, milheto e milho, trigo e sorgo, cevada e milho, aveia e milho, *Triticum durum* e milho (Ahmad & Comeau, 1990; Rines & Dahleen, 1990; O'Donoghue & Bennett, 1994).

Riera-Lizarazu et al. (1996), após realizarem o cruzamento intergenérico entre aveia hexaplóide ($2n=6x=42$) e milho ($2n=2x=20$), conseguiram recuperar 90 progênies por cultura de embriões. Destas, 58% eram haplóides de aveia ($2n=3x=21$), demonstrando que ocorreu a eliminação total dos cromossomos de milho; 31% eram híbridas parciais e estáveis com 1 ou 4 cromossomos de milho

além do lote haplóide de 21 cromossomos de aveia ($2n = 21+1$ a $2n = 21+4$) e 11% apresentaram quimeras.

A eliminação somática do genoma paterno em híbridos imaturos obtidos de cruzamentos interespecíficos ou intergenéricos é progressiva. Isso se deve à dessincronização dos ciclos mitóticos entre as duas espécies, anomalias do fuso mitótico e inativação do genoma paterno e depende do sentido do cruzamento e do genótipo dos genitores masculino e feminino. A eliminação dos cromossomos envolve uma progressiva perda da atividade centromérica e redução no tamanho dos cromossomos (Peters et al. 1999), mas o mecanismo exato em muitas espécies é, ainda, obscuro (Giacomelli, 2000).

No gênero *Hordeum*, a eliminação somática está sob controle de genes localizados, tanto na cevada (*H. vulgare*) como em *H. bulbosum* (Picard et al., 1994). A taxa de eliminação de cromossomos em híbridos de *H. vulgare* x *H. bulbosum* é dependente de uma relação bem definida entre a proporção dos genomas parentais, bem como pela influência de “fatores genéticos de eliminação” dos cromossomos de *H. vulgare*. A proporção em relação aos “fatores genéticos de estabilização” de cromossomos de *H. bulbosum* é crítica (Subrahmanyam e Kishor, 1997).

Nos haplóides, produzidos via eliminação somática, a formação do embrião ocorre entre cinco e dez dias após o cruzamento de trigo x milho e de trigo x sorgo. A eliminação do genoma parental masculino ocorre durante as três primeiras divisões mitóticas e o embrião formado apresenta seis ou mais células, com muitos micronúcleos (Comeau et al., 1988; Laurie & Bennett, 1986, 1988).

Vários autores, citados por Peters et al. (1999), sugerem que, em trigo o método de produção de haplóides gimnogenéticos apresenta limitações devido à presença de genes para incompatibilidade. Os alelos *Kr 1*, *Kr 2* e *Kr 3*, localizados nos cromossomos 5B, 5A e 5D do trigo de panificação (*T. aestivum*), são responsáveis pela incompatibilidade, tanto nos cruzamentos trigo x centeio

como trigo x *H. bulbosum* (Falk & Kasha, 1981, 1983). Segundo Barclay (1975), haplóides de trigo podem ser produzidos quando, em vez de diplóides, utilizam-se plantas tetraplóides de *H. bulbosum*.

Peters et al. (1999) descrevem que os cruzamentos entre trigo e milho têm sido explorados para a obtenção de dihaplóides de trigo. Inúmeros trabalhos foram desenvolvidos, utilizando tanto cultivares hexaplóides como tetraplóides de trigo, bem como diferentes genótipos de milho. Os autores enfatizam, também que a utilização do milho como polinizador elimina a incompatibilidade causada pelos alelos *Kr*. Para *Triticum durum*, espécie recalcitrante à cultura de anteras, o uso do milho como polinizador é relatado como boa solução para produzir plantas haplóides (Amrani et al., 1993; Riera-Lizarazu et al., 1992).

Laurie (1989) descreve que a hibridização intergenérica de trigo com milho e trigo com milheto (*P. americanum*) é uma das alternativas para produção de haplóides de trigo, por meio da eliminação cromossômica.

Na literatura, é relatado que o uso de auxinas exógenas tem efeito benéfico para o embrião, principalmente durante os estágios iniciais de desenvolvimento. Tratamento de ovários *in vivo*, por 20 a 120 horas após a polinização, com reguladores de crescimento, tais como o 2,4-D, tem sido muito utilizado para promover o desenvolvimento de embriões imaturos. Provavelmente, o 2,4-D favorece o desenvolvimento do embrião, bem como aumenta a taxa de fertilização (Peters et al., 1999).

No gênero *Pennisetum*, poucos são os trabalhos que descrevem a eliminação cromossômica. Gildenhuis & Brix (1961, 1964), citados por Jauhar (1981), descrevem que o anfidiplóide hexaplóide de capim-elefante com milheto, induzido pelo tratamento do híbrido triplóide com colchicina, demonstrou instabilidade no número cromossômico somático. Ele apresentou uma variação cromossômica de 36 a 49, com $2n = 42$ cromossomos ocorrendo mais frequentemente. Os autores concluíram que a variação do número

cromossômico é, provavelmente, controlada geneticamente e que esses genes só se expressam quando estão em dose dupla ou elevada. Aparentemente, estes genes são hemizigóticos ineficientes.

A eliminação dos cromossomos de *P. glaucum* também foi observada quando este foi utilizado para produção de haplóides gimnogenéticos de trigo (Laurie, 1989; Matzk & Mahn, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

Foram utilizados híbridos triplóides ($2n = 3x = 21$) obtidos do cruzamento entre capim-elefante (*P. purpureum* - $2n = 4x = 28$), utilizado como parental masculino, e milho (*P. glaucum* - $2n = 2x = 14$), utilizado como parental feminino. Ambos estão descritos na Tabela 1. Eles foram selecionados por apresentar características genéticas de importância forrageira complementares. Os acessos foram obtidos no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG. A única exceção foi para os híbridos triplóides obtidos dos cruzamentos entre capim-elefante F92-38-02 (híbrido intraespecífico) x milho M64, uma vez que cruzamentos recíprocos foram realizados.

TABELA 1 Híbridos interespecíficos selecionados pela Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG e utilizados nos experimentos. UFLA. Lavras, MG, 2002.

Genitores		Híbridos
Capim-elefante	milho	
BAG75	M24	F94-60-01
BAG65	M42	F94-54-03
BAG54	M36	F94-43-01
BAG91	M38	F94-49-05
BAG65	M36	F94-61-01
F92-38-02 ♀ (BAG49 x BAG57)	M64 ♂	F2000-120
F92-38-02 ♂ (BAG49 x BAG57)	M64 ♀	F2000-120

3.2 Certificação do número cromossômico dos híbridos interespecíficos

Para a confirmação da condição triplóide ($2n = 3x = 21$) dos híbridos citados na Tabela 1, foi feita a contagem do número cromossômico de, no mínimo, 10 metáfases mitóticas de 5 meristemas radiculares por híbrido. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento, de acordo com o tópico 3.4.

3.3 Indução de duplicação cromossômica

Foram utilizados diferentes protocolos, variando-se as concentrações de substâncias antimitóticas, os tempos de exposição às mesmas, bem como o tecido alvo (Quadro 1).

Para cada experimento utilizou-se um único híbrido, de acordo com a disponibilidade de material botânico. Nos experimentos onde foram utilizadas estacas como fonte de material botânico a ser submetido à duplicação, o híbrido foi selecionado em função da disponibilidade e uniformidade deste material para a condução de um dado experimento.

Nos experimentos em que sementes foram submetidas à duplicação, procurou-se trabalhar com os cruzamentos híbridos mais prolíficos. Já no experimento no qual plântulas cultivadas *in vitro* foram expostas aos antimitóticos, utilizou-se o híbrido que melhor se adaptou a essas condições.

Dos sobreviventes de cada experimento, obtiveram-se raízes que foram utilizadas para avaliação citogenética, de acordo com o tópico 3.4.

Os experimentos realizados são descritos a seguir, de acordo com o material botânico utilizado.

QUADRO 1 Resumo dos tratamentos utilizados para indução de duplicação cromossômica em híbridos de capim-elefante x milheto.

Material botânico	Híbrido	Antimitótico	Concentração	Tempo
Plântulas (<i>in vivo</i>)	F94-61-01	Colchicina	0,1%	12h
			0,05%	24h
		C:H (1:1)	25mg/L:30mg/L	2:30 e 4:30h
Gemas (<i>in vivo</i>)	F94-60-01	Colchicina	0,05 e 0,1%	24h
		C:H (1:1)	25mg/L:30mg/L	2:45 e 5:30h
Gemas (<i>in vitro</i>)	F94-43-01	Colchicina + DMSO 2%	0,05%	3, 5 e 7 dias
		Colchicina + DMSO 2%	0,1%	3, 5 e 7 dias
		C:H (1:1) + DMSO 2%	25mg/L:30mg/L	3, 5 e 7 dias
Perfilhos	Protocolo A F94-54-03	Colchicina + DMSO 2%	0,05 e 0,1%	24h
		C:H (1:1) + DMSO 2%	25mg/L:30mg/L	2:30 e 4:30h
	Protocolo B F94-49-05	C:H (1:1)	25mg/L:30mg/L	2:30, 3:00, 3:30, 4:00 e 4:30h
	Protocolo C F2000-120	C:H (1:1)	25mg/L:30mg/L	4:30h
Sementes	F94-60-01	Colchicina + DMSO 2%	0,05%	3, 5 e 7 dias
		Colchicina + DMSO 2%	0,1%	3, 5 e 7 dias
		C:H (1:1) + DMSO 2%	25mg/L:30mg/L	3, 5 e 7 dias
Plântulas (<i>in vitro</i>)	F94-43-01	Colchicina	0,05%	1, 3, 6 e 9 dias
			0,1%	1, 3, 6 e 9 dias
			0,2%	1, 3, 6 e 9 dias
			0,4%	1, 3, 6 e 9 dias

C:H (1:1) – Ciclohexamida:8 hidroxiquinolcina (1:1)

DMSO – Dimetilsulfóxido

3.3.1 Exposição de plântulas

Sementes obtidas do cruzamento de capim-elefante BAG 65 x milheto M36 (híbrido F94-61-01) foram semeadas em copos plásticos contendo substrato (vermiculita) adubado conforme recomendações existentes para capim-elefante (Martins e Fonseca, 1994). Quando as plântulas híbridas atingiram aproximadamente 10 cm de altura (do colo à lígula da primeira folha completamente expandida), tiveram suas raízes lavadas até a retirada total da vermiculita e foram submetidas aos seguintes tratamentos: solução de colchicina nas concentrações de 0,05% por 24 horas e 0,1% por 12 horas e solução de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) por 2:30 e 4:30 horas. Em cada tratamento foram utilizadas 30 plântulas. Em seguida, as raízes foram lavadas em água corrente por 30 minutos e as plântulas foram submetidas a cultura hidropônica, conforme recomendado no kit de hidroponia residencial®, da empresa Aquaplanta Viçosa LTDA (Figura 1).



FIGURA 1 Plântulas híbridas de capim-elefante x milheto, após tratamentos com as soluções antimitóticas, cultivadas no kit de hidroponia residencial® da empresa Aquaplanta Viçosa LTDA.

As pontas das raízes das plântulas sobreviventes de cada tratamento foram coletadas para análise citogenética, após ficarem vigorosas e terem desenvolvido novas raízes com aproximadamente 0,5 cm de comprimento.

3.3.2 Exposição de gemas axilares

3.3.2.1 *In vivo*

Estacas do híbrido F94-60-01, contendo apenas um nó, foram imersas em solução de hidroxiuréia a 2,5mM por 14 horas, para induzir a sincronização da divisão celular da gema (Techio, 1998). Após esta etapa, as estacas foram lavadas e imersas em água destilada por 6 horas para a retomada da divisão celular. Depois do tempo de recuperação, as estacas contendo as gemas axilares em estágio inicial de desenvolvimento foram submetidas aos seguintes tratamentos: solução de colchicina nas concentrações de 0,05% e 0,1% por 24 horas e solução de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) por 2:45 horas e por 5:30 horas. Em cada tratamento, foram utilizadas 20 estacas. Após esta etapa, as estacas foram lavadas até a retirada do excesso da solução e foram mantidas em sistema de hidroponia, conforme relatado no protocolo anterior, para posterior análise citogenética dos meristemas radiculares.

3.3.2.2 *In vitro*

Em placas de Petri esterilizadas contendo meio composto pelos sais do MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 3 mg/L de 6-benzilamino-purina (BAP) e acrescido de soluções antimitóticas de colchicina ou ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína, em diferentes concentrações, foram

colocados segmentos nodais de aproximadamente 0,5 cm, retirados do híbrido F94-43-01 cultivado *in vitro* (sais do MS + 3 mg/L de BAP).

Os tratamentos foram compostos de 3, 5 e 7 dias de exposição dos segmentos nodais nas soluções de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) mais DMSO 2% (dimetilsulfóxido) e de colchicina nas concentrações de 0,05% e 0,1% mais DMSO 2%. Em cada tratamento foram utilizados 10 segmentos nodais. Para adicionar as soluções antimitóticas ao meio de cultivo utilizou-se filtro Millipore de 20 µm em câmara de fluxo laminar. Após estes procedimentos, os segmentos nodais foram transferidos para o meio composto pelos sais do MS, suplementado com 3 mg/L de BAP para desenvolvimento e posterior análise.

3.3.3 Exposição de perfilhos desenvolvidos de gemas axilares

3.3.3.1 Protocolo A

Estacas do híbrido F94-54-03 com um nó contendo perfilho desenvolvido, com aproximadamente 10 cm do nó até o início do limbo expandido (Figura 2), partidas longitudinalmente ao meio (corte radial), foram separadas em 2 grupos de 60 estacas cada. Um dos grupos passou pelo tratamento com hidroxiuréia a 2,5mM por 14 horas e o outro não. Estacas dos dois grupos foram submetidas aos seguintes tratamentos: colchicina nas concentrações de 0,05% e 0,1%, mais DMSO 2%, por 24 horas e solução de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) mais DMSO 2% por 2:30 horas e por 4:30 horas. Em cada tratamento foram utilizadas 15 estacas. Após esta etapa, as estacas foram lavadas por 30 minutos e submetidas à cultura de hidroponia, como relatado anteriormente.

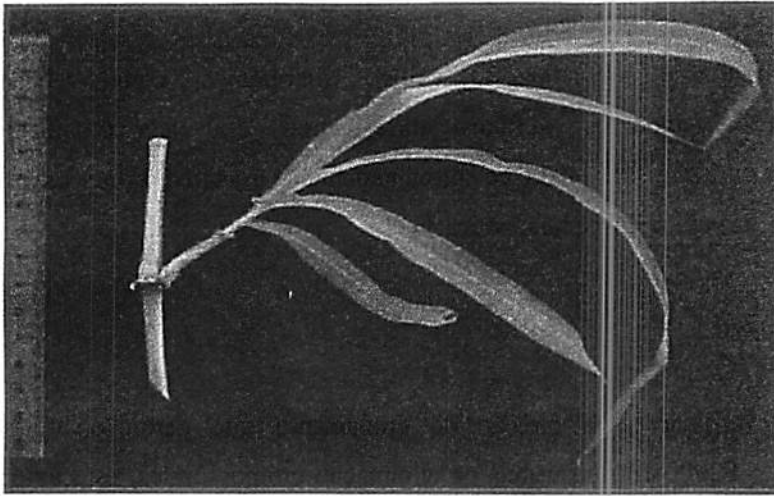


FIGURA 2 Estaca do híbrido de capim-elefante x milheto contendo perfilho.

Quando os perfilhos sobreviventes apresentaram raízes de aproximadamente 0,5 cm, estas foram coletadas para análise citogenética deste estágio de desenvolvimento (fase jovem). As plântulas sobreviventes foram mantidas em cultivo hidropônico até atingirem a fase adulta, que foi determinada pela presença de panículas. Nessa fase, as estacas das plantas sobreviventes foram coletadas, cortadas em colmo de 2 nós e colocadas para enraizar em água para comparação do comportamento citogenético nas duas fases do desenvolvimento.

3.3.3.2 Protocolo B

Para verificar o efeito do tempo de exposição à solução antimetabólica ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1), estacas do híbrido F94-49-05 selecionadas da mesma forma como descrita no *Protocolo A* foram submetidas aos tratamentos de 2:30, 3:00, 3:30, 4:00 e 4:30 horas. Em cada tratamento utilizaram-se 10 estacas. Após esta etapa, as estacas foram lavadas

por 30 minutos e submetidas a cultivo hidropônico, como relatado anteriormente. Quando os perfilhos sobreviventes, em cada tratamento, começaram a enraizar, suas raízes, de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, foram coletadas para análise citogenética.

3.3.3.3 Protocolo C

Para verificar se a direção do cruzamento que gerou o híbrido interespecífico F2000-120 influencia na eliminação cromossômica, estacas dos cruzamentos recíprocos (F92-38-02♀ x M64♂ e F92-38-02♂ x M64♀), contendo perfilhos desenvolvidos de gemas axilares, como descrito no *Protocolo A*, foram submetidas ao tratamento com solução de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) em um único tempo de exposição (4:30 horas). Neste experimento foram utilizados 15 perfilhos por cruzamento. Depois do tratamento com a solução antimitótica, as estacas de cada cruzamento foram lavadas por 30 minutos e submetidas a cultivo hidropônico, como relatado anteriormente. Quando os perfilhos sobreviventes de cada cruzamento começaram a enraizar, coletou-se material para análise citogenética.

3.3.4 Exposição de sementes germinadas em placas de Petri

Sementes obtidas do cruzamento de capim-elefante BAG 75 x milheto M24 (híbrido F94-60-01) foram desinfestadas em álcool etílico 70% durante um minuto. Subseqüentemente, foram mergulhadas em uma solução de hipoclorito de sódio a 1,25%, por 15 minutos. Após esta etapa, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada e foram colocadas para germinar em Placa de Petri previamente esterilizada, contendo papel filtro umedecido com as seguintes substâncias antimitóticas: solução de colchicina nas concentrações de

0,05% e 0,1% mais DMSO 2% e solução de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) mais DMSO 2%. Em cada tratamento foram colocadas 50 sementes para germinar.

Os tempos de permanência nas duas substâncias antimitóticas foram 3, 5 e 7 dias. Como testemunha, utilizaram-se sementes germinadas em papel filtro umedecido com solução de DMSO 2%. Para adicionar as substâncias antimitóticas nas placas utilizou-se filtro Millipore 20 µm em câmara de fluxo laminar. Após os tratamentos, as plântulas que enraizaram tiveram suas raízes coletadas para análise citogenética. Em seguida, foram transferidas para meio de cultivo (sais do MS suplementado com 4 mg/L de BAP mais 5 mg/L de giberilina - GA₃) para o desenvolvimento.

3.3.5 Exposição de plântulas cultivadas *in vitro*

Meios de cultivo (sais do MS suplementado com 3 mg/L de BAP) adicionados de solução de colchicina nas concentrações de 0,05%, 0,1%, 0,2% e 0,4% mais DMSO 2% foram autoclavados a 120°C por 20 minutos. Segmentos nodais de aproximadamente 5 cm do híbrido F94-43-01, cultivados *in vitro* em sais do MS adicionado de 3 mg/L de BAP, foram transferidos para os meios de indução de poliploidia onde permaneceram por 1, 3, 6 e 9 dias. Cada tratamento foi repetido 16 vezes. Após estes dias, os segmentos nodais foram transplantados para meio de cultivo sem colchicina, onde permaneceram até o desenvolvimento. As plântulas que se desenvolveram em cada tratamento foram transplantadas para meio de cultivo líquido composto pelos sais do MS mais 0,5 mg/L de ácido indolbúlfírico (AIB) para enraizarem. Após o enraizamento, as raízes foram coletadas para análise citogenética.

3.4 Análise citogenética

A eficiência dos métodos empregados para a indução da duplicação cromossômica dos híbridos triploides foi averiguada pela da contagem do número cromossômico em meristemas de raízes e pelo acompanhamento do ciclo celular para detecção de anomalias no processo mitótico. Para isso, as raízes das plantas sobreviventes dos tratamentos com os agentes antimitóticos foram separadas em dois grupos. Para obtenção de metáfases as raízes foram pré-tratadas com solução de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) por 2:45 horas. Para a análise do ciclo celular não foram realizados pré-tratamentos.

As raízes dos dois grupos foram fixadas em solução de Carnoy (3 partes de álcool : 1 parte de ácido acético glacial), hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N a 60°C por 8 minutos foram, então, coradas com reativo de Schiff (por aproximadamente 15 minutos) e esmagadas com ácido acético 45%. As lâminas foram montadas com Entellan®, após a retirada da lamínula em nitrogênio líquido.

Para cada experimento, foram analisadas 10 raízes por tratamento. Cerca de 290 metáfases foram analisadas por tratamento/experimento. O número total de metáfases contadas por tratamento/experimento ficou próximo do número determinado pelo do dimensionamento de amostras com nível de significância de 95% e erro amostral de 2%. Para a contagem de aberrações cromossômicas avaliaram-se todas as células meristemáticas da lâmina, por tratamento, nas 10 lâminas confeccionadas.

A contagem do número de cromossomos e a avaliação das anomalias foram feitas em objetiva de imersão (100x), em microscópio Olympus BX 60.

As melhores metáfases colchicínicas foram fotomicrografadas utilizando-se filmes preto e branco Fuji ASA 100, revelados com D-76 e copiados em papel Kodabrome Printe RCF3. As melhores lâminas contendo as anomalias cromossômicas foram fotomicrografadas utilizando-se filmes coloridos Kodak ASA 400 e revelados automaticamente.

3.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas de acordo com cada experimento que gerou híbridos sobreviventes após os tratamentos de indução de poliploidia. Foram realizados testes de significância para igualdade de duas proporções para as variáveis taxa de sobrevivência, percentagem de números cromossômicos e percentagens de aberrações cromossômicas. As análises de regressão foram realizadas para as variáveis tempo de exposição ao antimetabólico com percentagens de números e aberrações cromossômicas.

4 RESULTADOS

Antes de serem submetidos aos tratamentos para indução da duplicação cromossômica, todos os híbridos interespecíficos entre *P. purpureum* e *P. glaucum*, listados na Tabela 1, tiveram a sua condição triploide confirmada em metáfases mitóticas de meristemas radiculares.

A análise citogenética mostrou o comportamento dos híbridos em cada experimento e, juntamente com a percentagem de sobrevivência, permitiu avaliar o efeito genotóxico dos tratamentos realizados em cada experimento, como será descrito a seguir.

4.1 Indução de poliploidia em plântulas

Nenhuma das plântulas do híbrido F94-61-01 sobreviveram aos tratamentos com ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1).

Do total das plântulas tratadas com colchicina, 13% sobreviveram ao tratamento 0,05% por 24 horas e 20% ao tratamento 0,1% por 12 horas. Ambos os tratamentos geraram plantas mixoplóides com aberrações cromossômicas (Figuras 3 e 4).

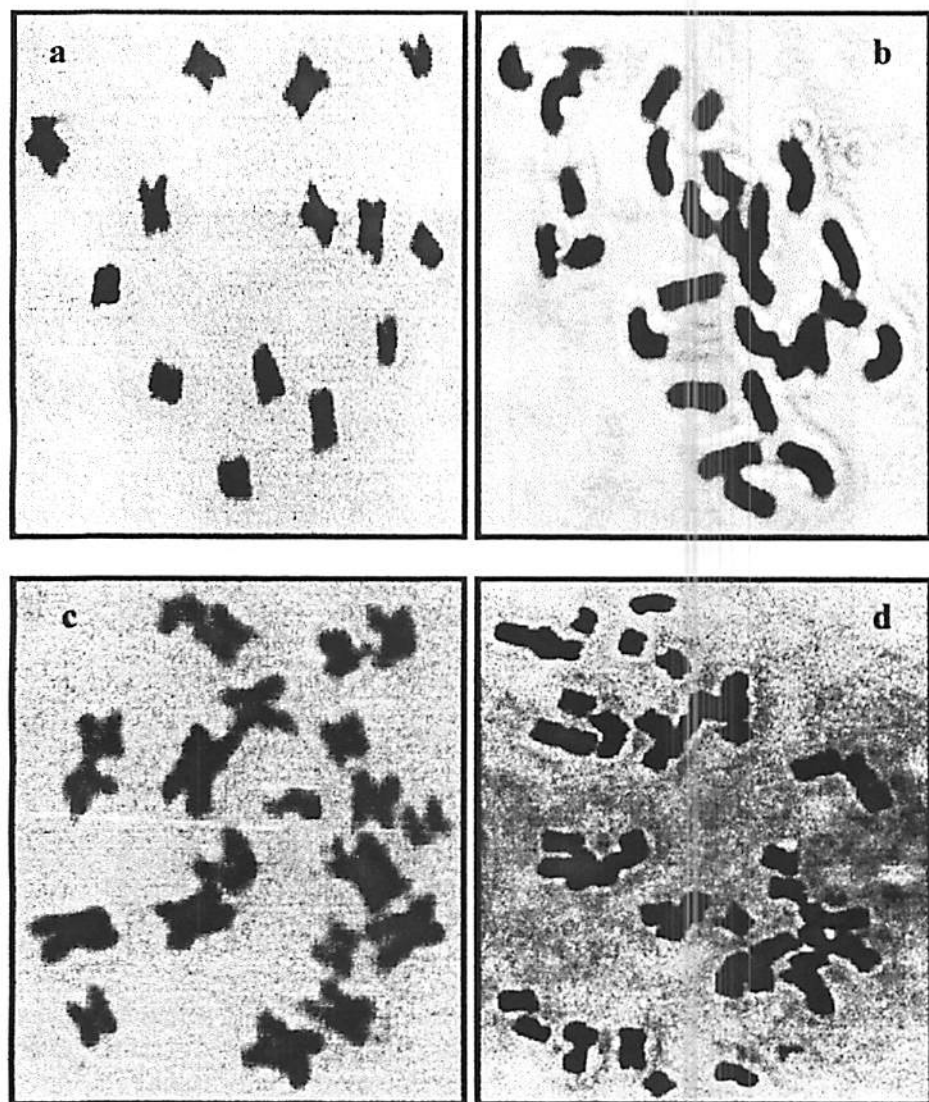


FIGURA 3 Metáfases de híbridos de capim-elefante e milho após os tratamentos com as substâncias antimitóticas. a) 14 cromossomos, b) 28 cromossomos, c) 21 cromossomos, d) 42 cromossomos. UFLA. Lavras, MG, 2002.

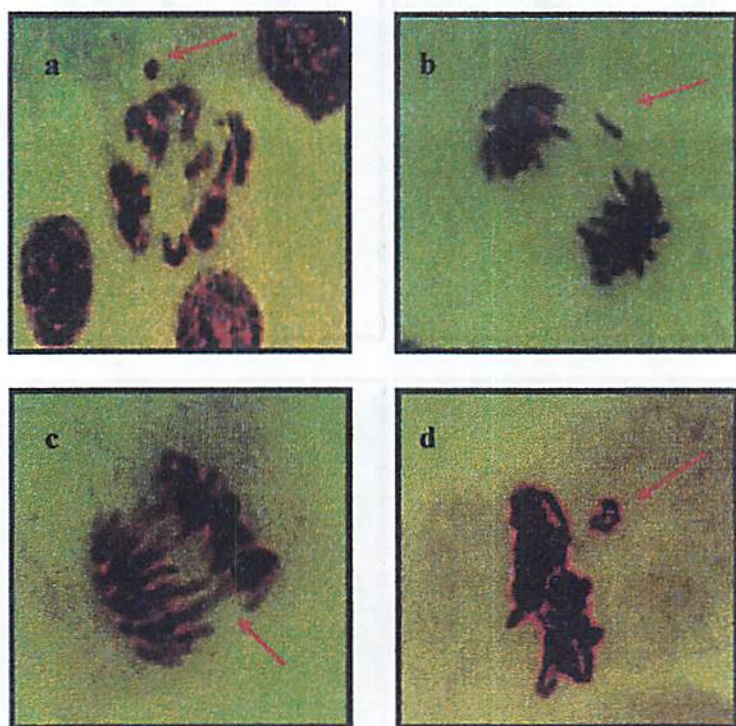


FIGURA 4 Anormalidades no ciclo celular (setas vermelhas) em híbridos de capim-elefante e milho tratados com soluções antimitóticas. **a)** micronúcleos; **b)** anáfase com cromossomo atrasado; **c)** anáfase com pontes; **d)** cromossomos não-orientados na metáfase. UFLA, Lavras, MG, 2002.

No tratamento com colchicina 0,05% por 24 horas, os números cromossômicos mais freqüentemente encontrados foram 14 (52%), 21 (13%) e 28 (30%); as demais freqüências somadas dentro do intervalo entre 14 e 42 cromossomos corresponderam a 5%. No tratamento com colchicina 0,1% por 12 horas, os dados foram semelhantes, sendo 14 (47%), 18 (12%), 21 (14%) e 28 (23%) os valores mais freqüentes (Tabela 2).

TABELA 2 Percentagens do número de cromossomos encontrados, por classe e por tratamento com colchicina no híbrido F94-61-01. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Tratamentos	Classes de números cromossômicos										
	14	16	18	21	24	28	30	32	34	38	42
0,05% / 24h	52,0	-	1,7	13,0	0,7	30,0	0,3	-	1,0	-	1,4
0,1% / 12h	47,0	1,7	12,0	14,0	-	23,0	-	1,0	-	0,3	0,7

As aberrações cromossômicas mais freqüentemente encontradas no tratamento com colchicina 0,05% por 24 horas e 0,1% por 12 horas foram as metáfases c (64% e 62%, respectivamente) e metáfases com cromossomos perdidos (31% e 27%, respectivamente). Micronúcleos, anáfases com pontes e anáfases com cromossomos atrasados representaram 4% e 12% (Figura 4).

A ocorrência de metáfases com 42 cromossomos nos dois tratamentos (Tabela 2) demonstrou que a duplicação cromossômica ocorreu, porém esta não se manteve. A alta freqüência de 14 cromossomos nos dois tratamentos, juntamente com a observação de outros números em menores freqüências, no intervalo entre 14 e 42, sugere a ocorrência de eliminação de cromossomos. Somente em torno de 13% das células, nas duas concentrações, a condição híbrida foi observada, isto é, a presença de 21 cromossomos.

A realização dos testes de significância para igualdade de duas proporções, para as variáveis taxa de sobrevivência, proporção dos números cromossômicos e freqüência de aberrações, mostrou que não existe diferença

significativa entre os tratamentos, a 5% de probabilidade. Este fato demonstra que, nas condições deste experimento, a diminuição do tempo e o aumento da concentração de colchicina não influenciaram estas características.

4.2 Indução de poliploidia em gemas

Os experimentos *in vivo* utilizando gemas axilares do híbrido F94-60-01 e *in vitro* utilizando segmentos nodais de aproximadamente 0,5 cm do híbrido F94-43-01, foram conduzidos com o intuito de promover a indução de poliploidia no estágio inicial do desenvolvimento dos mesmos, para se evitar ao máximo a mixoploidia. Porém, as gemas e os segmentos nodais, neste estágio, não resistiram aos tratamentos com colchicina e ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína.

4.3 Indução de poliploidia em perfilhos desenvolvidos de gemas axilares

Os resultados deste experimento serão descritos de acordo com cada protocolo (A, B e C), conforme apresentado no item que descreve material e métodos.

4.3.1 Protocolo A

Todos os tratamentos com colchicina não permitiram sobrevivência dos perfilhos, mostrando que os mesmos reagem de maneira diferenciada a diferentes substâncias.

Os tratamentos utilizando sincronização demonstraram ser mais tóxicos do que aqueles sem sincronização, pois houve apenas perfilhos sobreviventes nestes últimos.

O período de 4:30 horas de exposição em solução de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) mais DMSO 2% também foi letal para o desenvolvimento dos perfilhos. Apenas no tratamento de 2:30 horas obtiveram-se 3 plântulas sobreviventes (P1, P2 e P3), que representam 20% do total dos 15 perfilhos. Neste experimento, a exposição de perfilhos com aproximadamente 10 cm de altura foi decorrente dos resultados de um pré-teste. Neste verificou-se que perfilhos de menor tamanho não sobreviveram aos tratamentos, demonstrando que o estágio de desenvolvimento do perfilho é um fator crucial para a condução do experimento.

As análises citogenética realizadas na fase jovem (primeiro enraizamento dos perfilhos) e na fase adulta (presença de panículas) mostraram variação de 14 a 42 cromossomos. Esse resultado foi semelhante ao do experimento no qual induziram-se plântulas (Tabelas 2, 3 e Figura 5).

Observando a Tabela 3, verifica-se que 21 foi o número cromossômico mais freqüente (37% em média) nas três plantas e nas duas épocas. Isso demonstra que esse tratamento foi pouco eficiente na indução da duplicação.

TABELA 3 Percentagens do número de cromossomos encontrados, por classe, no híbrido F94-54-03 tratado com ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) mais DMSO 2% - fases jovem e adulta. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Plantas	Classe de números cromossômicos										
	14	16	18	21	24	28	30	32	34	38	42
P1 jovem	11,5*	12,5	25,0	37,5	3,8	1,9	0,96	0,96	2,9	1,9	1,0
P1 adulta	17,2	19,3	30,1	29,8	1,9	2,1	-	-	-	-	-
P2 jovem	5,9	10,2	34,4	43,0	1,6	1,9	0,5	1,0	0,5	1,0	-
P2 adulta	8,7	17,8	31,5	40,2	1,2	-	-	1,0	-	0,2	-
P3 jovem	3,6	11,7	25,5	36,5	2,2	8,7*	-	4,4	3,6	3,6	-
P3 adulta	9,4	15,3	30,3	38,5	2,1	2,9	0,7	-	-	-	-

* - Diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de igualdade de duas proporções.

É possível observar o comportamento global da variação do número cromossômico das plântulas mixoplóides sobreviventes, tanto na fase jovem das

plantas quanto na fase adulta (Tabela 3 e Figura 5). De um modo geral, não existem diferenças significativas pelo teste de igualdade de duas proporções ao nível de 5% de probabilidade, para as percentagens de número cromossômico entre as plantas e entre as fases. As exceções de significância foram encontradas na fase jovem (plântulas 1 e 3 na classe 14 cromossomos e da plântula 3, em relação às demais, na classe 28 cromossomos).

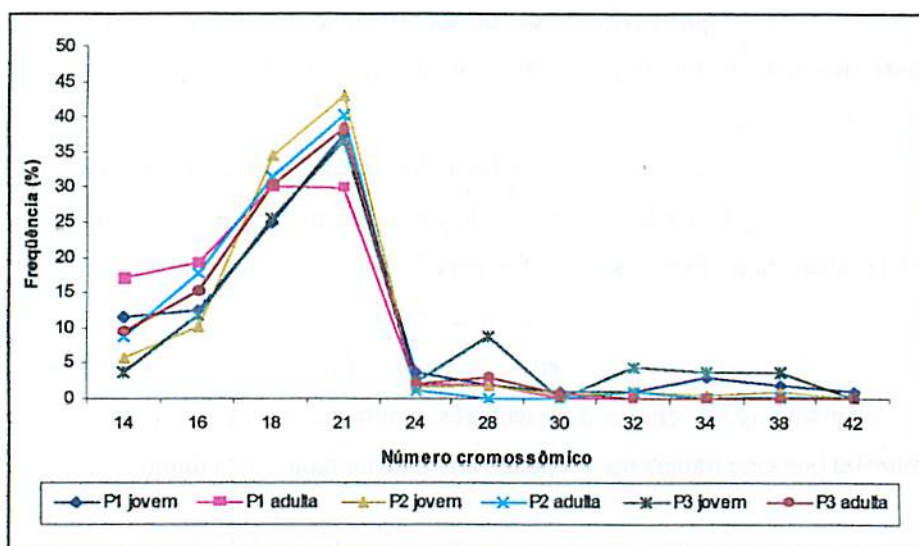


FIGURA 5 Histograma das percentagens do número de cromossomos encontrados, por classe, no híbrido F94-54-03 tratado com ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) mais DMSO 2% - fases jovem e adulta. UFLA, Lavras, MG, 2002.

A frequência percentual de aberrações cromossômicas em cada fase (jovem e adulta) das três plantas (P1, P2 e P3) variou muito (Tabela 4). Não foi possível estabelecer relação para o parâmetro analisado, como foi feito para o número cromossômico, a não ser pelo fato das aberrações cromossômicas (exceção das metáfases colchicínicas) constituírem evidências da eliminação cromossômica.

TABELA 4 Percentagens de aberrações cromossômicas encontradas no híbrido F94-54-03 tratado com ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) mais DMSO 2%, nas fases jovem e adulta de três plantas sobreviventes (P1, P2 e P3). UFLA, Lavras, MG, 2002.

Aberrações cromossômicas	Plantas					
	P1		P2		P3	
	Fase jovem	Fase adulta	Fase jovem	Fase adulta	Fase jovem	Fase adulta
MTC	43,1	51,8	38,5	34,0	53,3	45,1
CNM	25,3	14,3	23,0	12,2	7,7	11,8
MIC	29,4	33,9	38,5	53,0	37,8	43,0
ACP	1,3	-	-	-	1,1	-
ACA	0,7	-	-	0,7	-	-
Total absoluto de aberrações	153	209	195	147	182	102

MTC - metáfase colchicínica; CNM - cromossomos não-orientados na metáfase; MIC - micronúcleos; ACP - anáfase com ponte e ACA - anáfase com cromossomos atrasados

4.3.2 Protocolo B

Neste experimento obtiveram-se, aproximadamente, 20% de perfilhos sobreviventes em todos os tratamentos [2:30, 3:00, 3:30, 4:00 e 4:30 horas em solução de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1)]. A ausência do DMSO à solução antimitótica permitiu obter sobreviventes na exposição por 4:30 horas. A taxa de sobrevivência foi a mesma obtida no *Protocolo A*, porém, foram obtidos sobreviventes em todos os tempos de exposição testados. Os resultados mostraram uma variação idêntica aos outros experimentos, em relação ao número de cromossomos por células (14 a 42) (Tabela 5), demonstrando que, além da duplicação, ocorreu também a eliminação cromossômica que foi diretamente proporcional ao aumento do tempo de exposição na solução (Figura 6).

TABELA 5 Percentagens do número de cromossomos encontrados, por classe, no híbrido F94-49-05 tratado com ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1), nos diferentes períodos de exposição. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Tempos	Classes de números cromossômicos										
	14	16	18	21	24	28	30	32	34	38	42
2:30	8,3	6,9	24,6	49,1	1,0	2,0	0,3	3,5	1,3	1,0	2,0
3:00	11,3	8,9	23,9	45,3	2,7	2,2	0,5	1,9	0,7	1,0	1,6
3:30	15,7	9,7	26,7	43,9	1,0	0,4	-	1,3	-	1,3	-
4:00	21,5	20,2	36,9	15,4	-	1,5	-	-	1,5	1,5	1,5
4:30	55,3	12,0	12,7	13,5	0,7	2,1	-	-	1,5	1,5	0,7

Na Figura 6 pode-se observar também que as freqüências de células com 21 cromossomos decresceram à medida em que se aumentou o tempo de exposição à solução.

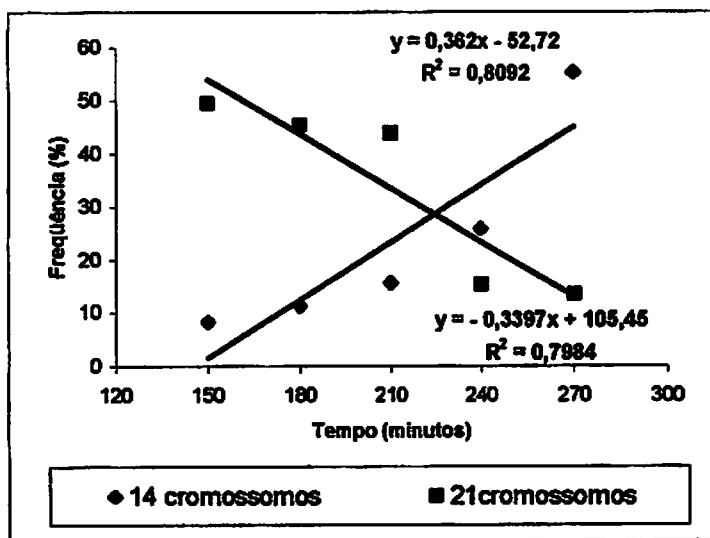


FIGURA 6 Percentagens de 14 e 21 cromossomos relativos ao tempo de exposição dos perfílos do híbrido F94-49-05 à solução de ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína. UFLA. Lavras, MG, 2002.

Estes dados reafirmam o que foi comentado anteriormente. Com o aumento do tempo de exposição ao antimetabólico, um número maior de células do perfilho duplicou e eliminou os seus cromossomos, até atingir 14 cromossomos.

Em todos os tratamentos, encontraram-se aberrações cromossômicas que evidenciam a eliminação cromossômica (Tabela 6 e Figuras 4 e 7). Observando a Tabela 6 e a Figura 7, verifica-se que o número total de aberrações cromossômicas e as percentagens de micronúcleos aumentaram à medida em que se aumentou o tempo de exposição dos perfilhos ao antimetabólico.

TABELA 6 Percentagens de aberrações cromossômicas encontradas no híbrido F94-49-05 tratado com ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1), nos diferentes períodos de exposição. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Tempos	Aberrações cromossômicas					Total de aberrações
	MTC	CNM	MIC	ACP	ACA	
2:30	68,6	22,0	8,5	0,6	-	118
3:00	82,3	8,1	10,5	-	-	124
3:30	66,9	13,4	13,4	4,7	1,6	127
4:00	45,6	10,1	39,1	5,1	-	138
4:30	36,9	9,8	48,3	3,3	1,6	184

MTC - metáfase colchicínica; CNM - cromossomos não-orientados na metáfase; MIC - micronúcleos; ACP - anáfase com ponte e ACA - anáfase com cromossomos atrasados

Na Figura 7 também é possível observar que existe linearidade ascendente entre as variáveis estudadas (tempo com número total de aberrações e com percentagens de micronúcleos). Isso reforça a verificação de que um maior tempo de exposição dos perfilhos à substância utilizada provoca uma maior taxa de eliminação cromossômica.

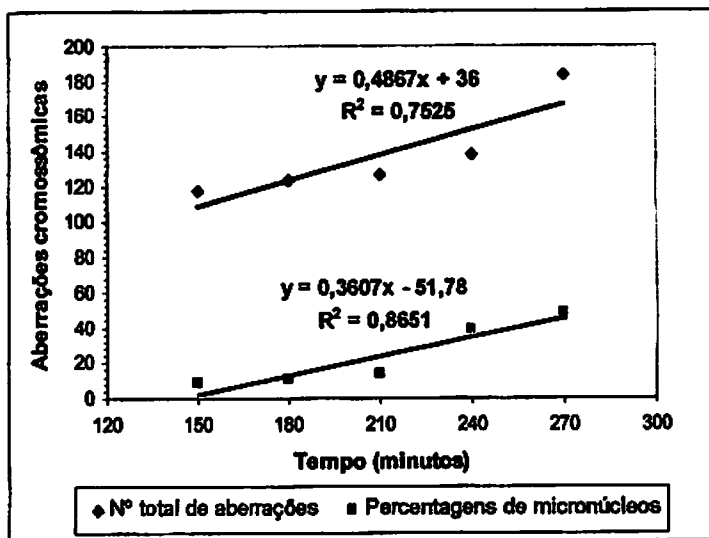


FIGURA 7 Número total de aberrações cromossômicas e percentagens de micronúcleos encontradas no híbrido F94-49-05 tratado com ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1), nos diferentes períodos de exposição. UFLA, Lavras, MG, 2002.

4.3.3 Protocolo C

O *Protocolo C* procurou verificar o efeito da direção do cruzamento na duplicação de cromossomos de híbridos submetidos à exposição de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) no tempo de 4:30 horas.

A taxa de sobrevivência para os dois cruzamentos foi similar às taxas apresentadas nos *Protocolos A* e *B*. Não houve diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de igualdade de duas proporções entre os protocolos e entre os cruzamentos. Para o cruzamento F92-38-02♀ x M64♂, a taxa de sobrevivência foi de 27% e para o cruzamento F92-38-02♂ x M64♀ a taxa foi de 33%.

O tipo de cruzamento também não influenciou na eliminação cromossômica. Ambos os cruzamentos apresentaram resultados semelhantes (Tabela 7), com exceção da classe com 28 cromossomos que demonstrou diferença significativa entre as frequências a 5% de probabilidade pelo teste de significância para igualdade de duas proporções.

Comparando-se as Tabelas 5 e 7, verifica-se que, neste experimento, as frequências das classes dos números cromossômicos em relação ao apresentado pelo híbrido F94-49-05 no tratamento de 4:30 horas do *Protocolo B* foram diferentes. Porém, observando as frequências da classe com 21 cromossomos, verifica-se que a mesma não apresentou diferença significativa. Isso demonstra que a proporção de células com 21 cromossomos no tratamento de 4:30 horas de exposição de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) ficou próximo de 13%, independente do genótipo híbrido utilizado. Nas mesmas Tabelas, verifica-se também que a percentagem de células abaixo da classe com 21 cromossomos foi maior do que aquela com mais de 21 cromossomos nos dois experimentos (56,5% em média neste *Protocolo* e 80% no *Protocolo B*).

Este fato foi também observado no experimento de indução de poliploidia em plântulas. Neste verificou-se, em média, que 57,2% das células, nos dois tratamentos, apresentaram-se com menos de 21 cromossomos. Provavelmente, as plantas híbridas mixoplóides tenderão a estabilizar suas células com número cromossômico entre 21 e 14 cromossomos.

TABELA 7 Percentagens de número de cromossomos encontrados, por classe, nos híbridos F2000-120 obtidos por cruzamentos recíprocos tratados com ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1). UFLA, Lavras, MG, 2002.

Tipo de cruzamento do híbrido F2000-120	Classes de números cromossômicos										
	14	16	18	21	24	28	30	32	34	38	42
F92-38-02♀ X M64♂	8,0	12,2	33,4	12,3	10,0	16,4*	2,2	2,2	2,2	1,1	-
F92-38-02♂ X M64♀	10,0	13,5	36,0	15,1	15,3	8,3	1,8	-	-	-	-

* - Diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de igualdade de duas proporções.

4.4 Indução de poliploidia em sementes germinadas em placas de Petri

Nenhuma semente submetida ao tratamento com ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) mais DMSO 2% sobreviveu. Somente as sementes submetidas aos tratamentos com DMSO 2% (testemunha) e colchicina 0,05%, por 3 dias, germinaram na placa de Petri. De um total de 50 sementes, 16% germinaram após exposição à colchicina. Pelo fato de as plântulas terem apresentado radículas muito finas, foram transferidas para meio de cultura, onde, devido à contaminação com fungos, não foi possível prosseguir com o experimento.

Na solução de DMSO 2%, 80% de plântulas sobreviveram apresentando desenvolvimento normal. Após análise citogenética, verificou-se que o DMSO 2% não provocou aberrações cromossômicas.

Tanto a colchicina quanto a ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína, nas suas respectivas concentrações, mostraram efeito fitotóxico para germinação das sementes do híbrido de capim-elefante e milho.

4.5 Indução de poliploidia em plântulas cultivadas *in vitro*

Entre os vários híbridos enviados pela Embrapa Gado de Leite, o que se adaptou *in vitro* e brotou intensamente após as repicagens foi o F94-43-01. Por isso ele foi escolhido para os experimentos de cultura de tecido.

A estratégia de trabalhar com segmentos nodais de, aproximadamente, 5 cm permitiu que vários sobrevivessem e desenvolvessem, principalmente nos menores tempos de exposição à solução de colchicina (Tabela 8). No entanto, obteve-se pouca raiz *in vitro* e, além disso, as raízes eram extremamente finas, com região meristemática muito pequena. Apesar de terem sido examinadas poucas lâminas por tratamento, foi possível verificar a ocorrência de mixoploidia e que as aberrações cromossômicas eram as mesmas dos experimentos anteriores (Figura 4).

TABELA 8 Taxa de sobrevivência do híbrido F94-43-01, após os tratamentos com a solução de colchicina mais DMSO 2%. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Concentrações	Dias			
	1	3	6	9
0,05%	75%	56%	37%	31%
0,1%	43%	25%	25%	-
0,2%	37%	19%	12%	-
0,4%	6%	-	-	-

É interessante ressaltar que a colchicina não perdeu a sua atividade antimitótica após ter sido autoclavada a 120°C. As análises da curva termogravimétrica (TG) também confirmam este dado, demonstrando que a colchicina começa a perder a sua atividade por volta de 140°C, apresentando uma queda brusca acima de 280°C (Anexo).

5 DISCUSSÃO

A escolha das duas substâncias antimitóticas como indutores da duplicação cromossômica dos híbridos triplóides *P. purpureum* x *P. glaucum* foi determinada pelo fato de a colchicina ter sido considerada na literatura, por diversos autores, como a melhor substância antimitótica para se trabalhar com *Poaceae* (gramíneas) (Hanna, 1981; Hanna et al., 1984; Hassawi & Liang, 1991; Sun et al., 1994; Huang et al., 1995 e Saisingtong et al., 1996). A solução de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) foi determinada por Techio (1998) como a melhor substância para promover metáfases colchicínicas no gênero *Pennisetum*.

A utilização da hidroxiuréia, com o objetivo de promover a sincronização das células em divisão e, conseqüentemente, obter maior número de células duplicadas, levou à morte dos perfilhos tratados com as duas soluções antimitóticas. A sincronização da divisão celular se deve ao bloqueio das células na fase S da intérfase, inibindo a síntese de DNA e, após a sua remoção, as células iniciam a etapa de recuperação, prosseguindo, simultaneamente, nas fases subseqüentes do ciclo celular (Neumann et al., 1998). A outra substância utilizada para incrementar o processo de duplicação foi o DMSO (dimetilsulfóxido), um solvente empregado em experimentos de poliploidização para facilitar a passagem de compostos pela membrana plasmática (Chalak & Legave, 1996; Geoffriau et al., 1997). A utilização do DMSO também contribuiu para o baixo nível de sobrevivência dos perfilhos expostos aos antimitóticos, pois nos experimentos *in vivo*, em que não se utilizou DMSO, houve sobreviventes em todos os tratamentos. Ao contrário do que se obteve *in vivo*, o DMSO não afetou o desenvolvimento das plântulas, quando as mesmas foram expostas *in vitro*. Também não afetou o ciclo celular, uma vez que, no

experimento, onde foram expostas sementes germinadas em placa de Petri não se observou alteração no número de cromossomos do híbrido F94-60-01 usado como testemunha.

Comparando-se os efeitos dos dois antimitóticos utilizados, verificou-se que a colchicina afetou negativamente o desenvolvimento dos perfilhos. Já a solução de ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína (1:1) foi prejudicial para o desenvolvimento de plântulas. Ambas as soluções antimitóticas foram letais para as gemas axilares *in vivo* e os segmentos nodais *in vitro*. Isto parece ser um fato muito comum na literatura, pois vários autores relatam o efeito diferencial de antimitóticos quando diferentes tecidos-alvo são expostos (Wang et al., 1984; Zhao et al., 1991; Schubert et al., 1991 e Lee et al., 1996). Como a toxicidade das substâncias antimitóticas é alta e, nestes experimentos, a sobrevivência de um número adequado de plantas é importante, a variação do material botânico a ser utilizado torna-se um procedimento indispensável.

A exposição de plântulas cultivadas *in vitro* demonstrou que a colchicina não teve a sua atividade antimitótica alterada, após ter sido autoclavada junto com o meio de cultura a uma temperatura de 120°C. Este fato também foi demonstrado por Geoffriau et al. (1997) e corroborado pela análise da curva termogravimétrica (TG) (Anexo). Os resultados obtidos com a exposição de plântulas revelaram que, diminuindo o tempo de exposição e aumentando, proporcionalmente, a concentração, a colchicina mantém a mesma atividade. Apesar de a colchicina apresentar algumas limitações, como a possibilidade de provocar aglomerações cromossômicas e fissão do centrômero, principalmente após longos períodos de tratamento, além da sua baixa afinidade pela tubulina vegetal (Hansen & Andersen, 1996), ela ainda tem sido considerada uma das substâncias mais eficazes na inibição da polimerização dos microtúbulos, principalmente em gramíneas (*Poaceae*) (Hassawi & Liang, 1991).

A colchicina é um alcalóide que se liga reversivelmente ao dímero de tubulina α e β , causando mudança conformacional que impede a polimerização do fuso mitótico e, conseqüentemente, bloqueia a célula em metáfase. Como os sítios específicos aos quais a colchicina se liga aos dímeros α e β são inacessíveis quando a tubulina está polimerizada na forma de microtúbulos, tal substância atua na tubulina solúvel, impedindo-a de se polimerizar. Em microtúbulos já formados, a colchicina impede o crescimento destas estruturas durante a divisão celular (Sluder, 1991). Com relação à 8-hidroxiquinoleína e à ciclohexamida, poucas referências foram encontradas. A 8-hidroxiquinoleína é um outro composto bastante utilizado no bloqueio de células vegetais em metáfase, através de distúrbios nas tubulinas formadoras dos microtúbulos, impedindo a formação do fuso mitótico (Schuster, 1996; Singh, 1993; Sharma & Sharma, 1999). Já a ciclohexamida é uma substância que inibe a síntese de proteínas (Wheatley & Kasha, 2002). A solução de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) por 4:30 horas teve efeito semelhante em perfilhos, quando comparada com a colchicina nas concentrações de 0,05% por 24 horas e de 0,1% por 12 horas, em plântulas dos híbridos de capim-elefante com milho.

Nos diferentes experimentos, as duas substâncias antimitóticas promoveram a alteração do número de cromossomos na grande maioria das células dos tecidos híbridos testados. Isso ocorreu, principalmente, nos tratamentos de 4:30 horas em solução de ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína (1:1) (experimento “exposição de perfilhos desenvolvidos de gemas axilares” – *Protocolos B e C*), que geraram, em média, 86,4% de células não triplóides, contra apenas 13,6% de células triplóides. Nos tratamentos com colchicina *in vivo*, que geraram, em média, os mesmos resultados, 86,5% de células eram não triplóides e 13,5% de células eram triplóides. Infelizmente, não foi possível realizar esta comparação com os tratamentos de colchicina *in vitro* porque os

mesmos não geraram raízes suficientes para se computar as frequências das diferentes classes cromossômicas.

Estes dados mostram que, mesmo utilizando-se materiais botânicos e genéticos diferentes nos vários experimentos, as substâncias antimitóticas (ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína (1:1) e colchicina) demonstraram efeitos semelhantes na duplicação cromossômica e na indução de mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho. O tempo de exposição às substâncias antimitóticas também foi um fator crucial para promover a duplicação e a mixoploidia nos híbridos, principalmente nos tratamentos com solução de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L(1:1) (Figura 6). Quanto maior o tempo de exposição, maior o número de células com alterações no número de cromossomos.

A exposição de perfilhos desenvolvidos de gemas axilares, *Protocolos B e C* e exposição de plântulas *in vivo*, revelou também que existe uma certa tendência das células mixoplóides apresentarem número cromossômico entre 14 e 21 (Tabelas 2, 5 e 7). Isto aconteceu tanto nas plantas avaliadas após tratamentos quanto nas avaliadas após a emissão de panículas. Portanto, as duas substâncias testadas, nas suas respectivas concentrações, tempos de exposição de tratamento e tecidos-alvo, têm atividades idênticas na alteração do número de cromossomos dos híbridos de capim-elefante com milho. As células hexaplóides formadas eliminam, normalmente, mais de 21 cromossomos, formando plantas mixoplóides.

A eliminação cromossômica é um fenômeno comum entre outros híbridos interespecíficos de gramíneas, tais como *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum* e *Avena sativa* x *A. sterilis* (Giacomelli et al., 2000).

Muitos exemplos na literatura demonstram que a eliminação cromossômica pode ser parcial ou total de um genoma parental (Adamowski et al., 1998). Em muitos casos, a eliminação cromossômica é tecido-dependente e é

influenciada pelas condições fisiológicas das células. Diversos mecanismos de eliminação cromossômica já foram descritos, incluindo fragmentação de cromossomos, formação de micronúcleos, degradação da cromatina, cromossomos não-orientados na metáfase e retardatários em anáfase (Singh, 1993). Essas alterações foram também observadas neste trabalho (Figura 4). Várias hipóteses foram sugeridas, em uma tentativa de explicar este fenômeno. Entre elas, a inativação de cromossomos através de nucleases, formação de fusos multipolares, síntese assíncronica de nucleoproteínas, proporções de genomas, separação espacial dos genomas, supressão de função de centrômero nos cromossomos eliminados e fases assíncronicas do ciclo celular (Adamowski et al., 1998). Contudo, o mecanismo exato em muitas espécies é ainda obscuro (Giacomelli et al., 2000).

Segundo Davies (1974), nos cruzamento de *H. vulgare* com *H. bulbosum*, no nível diplóide, ocorre uma completa perda dos cromossomos de *H. bulbosum* no embrião híbrido. O mesmo processo de eliminação ocorre quando ambos os parentais são tetraplóides ou quando *H. vulgare* tetraplóide é cruzado com *H. bulbosum* diplóide. A principal exceção para a eliminação de cromossomos ocorre quando os embriões são produzidos como resultado do cruzamento entre *H. bulbosum* tetraplóide e *H. vulgare* diplóide. O autor descreve também que a regra geral é que células híbridas com proporção do genoma diferente de 1V:2B (V = *H. vulgare* e B = *H. bulbosum*) têm perda dos cromossomos.

Os híbridos triploides interespecíficos de capim-elefante (tetraplóide) com milho (diplóide) também são estáveis, tendo uma proporção genômica de 2C:1M (C = genomas A'B de capim-elefante e M = genoma A do milho). Porém, quando se alterou esta proporção, devido à ação das substâncias antimitóticas, as células induzidas dos híbridos começaram a eliminar os cromossomos.

Houve eliminação, tanto de genomas completos, como, possivelmente, do B que não foi observado nas células com 28 cromossomos e também de cromossomos individuais. Células mixoplóides, principalmente contendo entre 14 e 21 cromossomos (números diferentes da série euplóide), foram encontrados nas plantas jovens e na adulta.

As eliminações cromossômicas ocorreram, provavelmente, devido tanto a problemas de proporções de genomas como de controle da expressão gênica. A hipótese de divisão assincrônica foi descartada porque nos híbridos triplóides os genomas A, A' e B segregam normalmente. Gildenhuis & Brix (1961, 1964), citados por Jauhar (1981), mostraram que o anfidiplóide hexaplóide de capim-elfante com milho, induzido pelo tratamento do híbrido triplóide com colchicina, demonstrou instabilidade no número cromossômico somático, apresentando uma variação de 36 a 49, com $2n = 42$ cromossomos ocorrendo mais frequentemente. Os autores concluíram que a variação do número cromossômico é, provavelmente, controlada geneticamente e que esses genes só se expressam quando estão em dose dupla ou elevada. Aparentemente, segundo os autores, estes genes são hemizigóticos ineficientes.

Raman & Krishnaswami (1960), citados por Jauhar (1981), relataram a eliminação do genoma B no híbrido triplóide obtido do cruzamento de milho $2x$ (AA) com um autoalotetraplóide (AAA'B), inferindo que há grandes chances de se obter um híbrido alodiplóide AA' fértil com caracteres desejáveis de *P. purpureum* e *P. glaucum*. Em sucessivos cruzamentos de *P. glaucum* ($2x$) com anfidiplóide ($6x$), Gildenhuis & Brix (1969) citados por Jauhar (1981), observaram uma seletiva eliminação cromossômica nos zigotos híbridos e sugeriram que os cromossomos do genoma B têm uma maior chance de serem eliminados do que os do genoma A' de *P. purpureum*.

Como relatado anteriormente, a exposição de perfilhos desenvolvidos de gemas axilares - *Protocolos B e C* - e de plântulas mostrou que existe uma

tendência das células mixoplóides apresentarem em torno de 14 cromossomos, morfológicamente semelhantes (Figura 3), podendo corresponder a núcleos AA, A'A' ou AA'. Estudos morfométricos e de bandejamento cromossômico estão sendo conduzidos para tentar confirmar essa hipótese.

Segundo Subrahmanyam & Kishor (1997), a taxa de eliminação de cromossomos em híbridos de *H. vulgare* x *H. bulbosum* é dependente de uma relação bem definida entre a proporção dos genomas parentais. Também está sob influência de “fatores genéticos de eliminação” dos cromossomos de *H. vulgare*, cuja proporção em relação aos “fatores genéticos de estabilização” de cromossomos de *H. bulbosum* é crítica. No caso dos híbridos entre capim-elefante e milho, poder-se-ia sugerir que há uma maior proporção de fatores estabilizantes dos genomas A e A', em relação aos de eliminação do genoma B.

Existem muitas dúvidas para explicar como a eliminação cromossômica deve ser controlada. Contudo, pôde-se verificar, por meio através do experimento “indução de poliploidia em perfilhos – Protocolo C”, que ela, provavelmente, recebe controle nuclear em vez de citoplasmática, pois a direção do cruzamento para obtenção do híbrido não influenciou na eliminação cromossômica.

A eliminação cromossômica não foi descrita por Hanna et al. (1984). Esses autores relataram que 30% dos híbridos triplóides sobreviventes de capim-elefante com milho eram hexaplóides após a ação de colchicina 0,05% por 24 horas. A diferença de comportamento dos híbridos, neste trabalho, pode ter sido decorrência do fato destes autores terem relatado apenas o sucesso da duplicação cromossômica, não mencionando a eliminação cromossômica. Isso porque a duplicação em seus estudos não foi confirmada por meio de análise citogenética e, sim, pela presença de pólen nas panículas. Uma outra explicação seria a utilização de ecotipos com controle genético diferenciado. Os híbridos triplóides empregados nos estudos de Hanna et al. (1984) foram obtidos de cruzamentos

que utilizaram apenas duas cultivares de milho macho estéril (Tift 23DA e Tift 23A) que, possivelmente, não continham o controle genético (já descrito) para eliminação de cromossomos durante a duplicação.

Neste trabalho foram utilizados seis clones e um híbrido intraespecífico de capim-elefante e seis cultivares de milho (Tabela 1). É possível que todos os clones de capim-elefante utilizados apresentassem o controle genético para eliminação de cromossomos. Além disso, a amostra de clones utilizada para obtenção dos triplóides pode não ter sido representativa da variabilidade existente entre os 120 acessos do Banco de Germoplasma, visto que o critério utilizado para seleção foi a superioridade para caracteres forrageiros. É possível também que os clones utilizados apresentassem relações de parentesco genético e, portanto, compartilhassem o mesmo controle genético para eliminação de cromossomos. Nesse caso, seria interessante testar, em estudos futuros, a duplicação de triplóides, cujos genitores do capim-elefante fossem geneticamente distantes, não importando os atributos forrageiros.

Outra hipótese que poderia ser levantada é que o processo de duplicação é extremamente suscetível à variação do tempo de exposição e concentração dos antimitóticos. Neste caso, as pequenas diferenças das condições deste trabalho em relação às do trabalho de Hanna et al. (1984), podem explicar estes resultados.

Por outro lado, a eliminação de cromossomos em híbridos interespecíficos é uma ferramenta muito valiosa em programas de melhoramento genético (Giacomelli et al., 2000). Com a eliminação parcial de cromossomos podem-se gerar novas variedades de híbridos. Já a eliminação total de um genoma do híbrido de capim-elefante e milho pode permitir a formação de variedades diplóides férteis, que poderão servir de ponte nos cruzamentos com milho para, futuramente, por meio de retrocruzamentos, introduzir características desejáveis no capim-elefante.

6 CONCLUSÕES

As duas soluções antimitóticas, colchicina ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína, atuaram de maneira semelhante sobre os híbridos triplóides (*P. purpureum* x *P. glaucum*), induzindo mixoploidia, demonstrando que houve tanto duplicação como eliminação completa e parcial de genomas.

As duas soluções antimitóticas, ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína (1:1) e colchicina, demonstraram efeitos semelhantes em materiais botânicos e genéticos diferentes em híbridos de capim-elefante x milheto.

A eliminação cromossômica é uma característica expressada quando diferentes proporções genômicas são produzidas nos híbridos de capim-elefante x milheto.

Nos híbridos de capim-elefante x milheto, o controle da eliminação cromossômica é nuclear.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; BATISTA, L. A. R. Chromosome elimination in *Paspalum subciliatum* (Notata group). *Sex. Plant Reprod*, v. 11, p. 272-276, 1998.

AHMAD, F.; COMEAU, A. Wheat x pearl millet hybridization: consequences and potential. *Euphytica*, v. 50, p.181-190, 1990.

ALCÂNTARA, P. B.; BUFARAH, G. Plantas forrageiras: gramíneas e leguminosas. São Paulo: Nobel, 1988. 162 p.

AMRANI, N.; SARRAFI, A.; ALIBERG, G. Genetic variability for haploid production in crosses between tetraploid and hexaploid wheats with maize. *Plant Breeding*, v. 110, p. 123-128, 1993.

ANDRADE, J. B.; ANDRADE, P. Produção de silagem do milheto [*P. americanum* (L.) K. Schum.]. *Boletim de Indústria Animal*. Nova Odessa, v. 39, n. 2, p. 155-165, jul./dez. 1982.

ARMSTRONG, S. W.; DAVIDSON, D. Cell cycle duration and time of DNA synthesis in binucleate cells induced in *V. faba* meristems by caffeine or isobutyl-methylxanthine. *Protoplasma*, v. 102, p. 281-293, 1980.

AVDULOV, N. P. Karyosystematische Untersuchung der Familie Gramineen. *Bulletin Applied Botany and Plant Breeding*. Leningrad, v. 4, p. 421-428, 1931. Supplement.

BARBOSA, S. Citogenética de híbridos entre *Pennisetum purpureum* Schumack e *Pennisetum glaucum* L. e seus genitores. 2000. 48 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BARCLAY, I. R. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature*, v. 256, p. 410-411, 1975.

BENNETT, H. W. Pasto Johnson, pasto alfombra y otras gramíneas del sur humedo de los Estados Unidos. In: HUGES, H. D.; HEATH, M.; METEALFE, D. S. Forrages: la ciencia de la agricultura basada en la produccion de pasto. 3.ed. México: Compania Editorial Continental, 1972. Cap. 29, p.321-334.

BOGDAN, A.V. Tropical pastures and fodder plant: grasses and legumes. London: Longman, 1977. 241 p. (Tropical Agricultural Series).

BONAMIGO, L. A. A cultura do milheto no Brasil, implantação e desenvolvimento no cerrado. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE MILHETO, 1999, Planaltina. Anais... Planaltina, 1999. p. 31-65.

BRUNKEN, J.N. A systematic study of *Pennisetum* Sect. *Pennisetum* (graminea). *American Journal of Botany*, New York, v. 64, n. 2, p. 161-176, 1977.

BURTON, G. W. A cytological study of some species in the Tribe *Paniceae*. *American Journal of Botany*, New York, v. 29, p. 355-361, 1942.

BURTON, G. W.; POWELL, J. B. Pearl millet breeding and cytogenetics. In: _____. *Advances in agronomy*. New York: Academic, 1968. p. 49-89.

CARVALHO, M. M. Melhoria da produtividade das pastagens através da adubação. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 11, p.23-32, 1985.

CHALAK, L.; LEGAVE, J. M. Oryzalin combined with adventitious regeneration for an efficient chromosome doubling of trihaploid kiwifruit. *Plant Cell Reports*. v. 16, p. 97-100, 1996.

COMEAU, A. et al. Production of doubled haploid wheat lines by wheat x maize hybridization. *Genome*, v.30, n.1, p. 42, 1988. Supplement.

DAHLEEN, L. S.; JOPPA, L. R. Hybridization and tissue culture of *Hordeum vulgare* x *Elymus canadensis*. *Genome*, v. 35, p. 1045-1049, 1992.

DAVIES, D. R. Chromosome elimination in inter-specific hybrids. *Heredity*, v. 32, n. 2, p. 267-270, 1974.

DE WET, J. M. J. Origins of polyploids. In: LEWIS, W. H. *Polyploidy biological relevance*. New York : Plenum, 1980. p. 3-16.

DIZ, D. A. Breeding procedures and seed production management in pearl millet x elephant grass hexaploids hybrids. 1994. 118 p. Thesis (Doctoral degree in Genetics and Plants Breeding)-University of Florida, Gainesville.

DUJARDIN, M.; HANNA, W. W. Cytology and reproductive behaviour of pearl millet-napiergrass hexaploids x *Pennisetum squamulatum* trispecific hybrids. *Journal Heredit*, New York, v. 72, p. 382-384, Sept./Oct. 1985.

DUREN, M. VAN.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. *Euphytica*, v. 88, p. 25-34, 1996.

FALK, D. E.; KASHA, K. J. Comparisons of the crossability of rye (*Secale cereale*) and *Hordeum bulbosum* onto wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 23, p. 81-88, 1981.

FALK, D. E.; KASHA, K. J. Genetic studies of hexaploid wheat with rye and *Hordeum bulbosum*. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 64, p. 303-307, 1983.

GEOFFRIAU, E. et al. Ploidy stability and *in vitro* chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Science*, v. 122, p. 201-208, 1997.

GIACOMELLI, F. R. B.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. de. Elimination of micronuclei from microspores in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. *Genetic Molecular Biology*, v. 23, n. 3, Sept. 2000.

GONZALEZ, B.; HANNA, W.W. Morphological and fertility responses in isogenic triploid and hexaploid pearl millet x napiergrass hybrids. *Journal Heredit*, New York, v. 75, n. 4, p. 317-318, 1984.

GRANATO, L.O. *Capim-elefante (Pennisetum purpureum* Schum.). São Paulo: Secretaria de Agricultura, 1924. 96 p.

GUERRA, M. dos S. *Introdução à citogenética geral*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1989. 142 p.

HANNA, W. W. Method of reproduction in napiergrass and in the 3X and 6X allopolyploid hybrids with pearl millet. *Crop Science*, v. 21, p. 123-126, Jan./Feb. 1981.

HANNA, W. W.; DUJARDIN, M. Cytogenetic of *Pennisetum schweinfurthii* Pilzer and its hybrids with pearl millet. *Crop Science*, Madison, v. 26, n. 3, p. 499-553, 1986.

HANNA, W. W. et al. Effect of ploidy on yield and quality of pearl millet x napier grass hybrids. *Agronomy Journal*, Madison, v. 76, n. 6, p. 969-971, 1984.

HANSEN, N. J. P.; ANDERSEN, S. B. In vitro chromosome doubling potential of colchicines, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica*, v. 88, n. 2, p. 159-164, 1996.

HANSON, M. R. Anther and pollen culture. In: SINK, K. C. *Petunia*. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 139-150.

HASSAWI, D. S.; LIANG, G. H. Antimitotic agents: effects on double haploid production in wheat. *Crop Science*, v. 31, p. 723-726, May/June 1991.
HUANG, H. J.; HUANG, D. Q.; LIU, L. X. Induction and heredity of somatic autotetraploids. *Guandong Agricultural Sciences*, v. 1, p. 9-12, 1995.

JAUHAR, P. P. *Citogenetics and breeding of pearl millet and related species*. New York: A. R. Liss, 1981. 289 p.

JAUHAR, P. P.; SINGH, U. Amphidiploidization induced by decaptation in interspecific hybrid of *Pennisetum*. *Curr. Science*, v. 38, p. 420-421, 1969.

JAVIER, E. Q. The phenology flowering habit and mode of reproduction of *Pennisetum purpureum* Schum., *Brachiaria mutica* (Forsk) Stapf and *Panicum maximum* Jacq. Dissertation Abstracts International - Section B, Annual Arbor, v. 30, n. 9, p. 949-950, 1970.

JENSEN, C. J. Chromosome doubling techniques in haploids. *Haploids in higher plants: advances and potentials*. Guelph, 1974. p. 153-192.

KASHA, K. J. Haploids from somatic cells. In: _____. *Haploids in higher plants: advances and potential*. Guelph: University of Guelph, 1974. p. 67-87.

KASHA, K. J.; KAO, K. N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare*). *Nature*, v. 225, p. 874-876, 1970.

LAURIE, D. A. The frequency of fertilization in wheat x pearl millet crosses. *Genome*, Ottawa, v. 32, n. 6, p. 1063-1067, Dec. 1989.

LAURIE, D. A.; BENNETT, M. D. Wheat x maize hybridization. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 28, p. 313-316, 1986.

LAURIE, D. A.; BENNETT, M. D. Cytological evidence for fertilization in hexaploid wheat x sorghum crosses. *Plant Breeding*, v. 100, p. 73-82, 1988.

LEE, J. H. et al. Cell synchronization and isolation of metaphase chromosomes from maize (*Zea mays* L.) root tips for flow cytometric analysis and sorting. *Genome*, v. 39, n. 4, p. 697-703, 1996.

MAIRE, R. Flore de l'Afrique du Nord. Paris: Paul Lechevalier, 1952. 276 p.

MANARA, N. T. F. Citogenética das variedades de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). 1973. 63 p. Dissertação (Mestrado em Genética de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MARTEL, E. et al. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. *The Journal of Heredity*, Whashington, v. 88, n. 2, p. 139-143, 1997.

MARTINS, C. E.; FONSECA, D. M. Manejo de solo e adubação de pastagem de capim-elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM-ELEFANTE, 2., 1994, Juiz de Fora. Anais... Coronel Pacheco-MG: EMBRAPA - CNPGL, 1994. p. 1-11.

MATZK, F.; MAHN, A. Improved techniques for haploid production in wheat using chromosome elimination. *Plant Breed*, Berlin: Blackwell Wissenschaft, v. 113, n. 2, p.125-129, Oct. 1994

METZ, S. G. et al. Chromosome doubling and aneuploidy in anther-derived plants from two winter wheat lines. *Genome*, v. 30, p. 177-181, 1988.

MINOCHA, J. L. Pearl Millet Cytogenetics. In: GUPTA, P. K.; TSUCHIVA. Chromosome engineering in plants genetics, Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 599-611.

MEDEIROS, R. B. Formação e manejo de pastagens para a região do Planalto Médio e Missões. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura/Governo do Estado do Rio Grande do Sul, 1977. 48p.

MOZZER, O. L.; SIQUEIRA, C.; NOVAES, L. P. Capineira: formação e utilização. 2.ed. São Paulo: Nestlé, 1986. 163 p. 3º Curso de Pecuária Leiteira.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO JUNIOR, D. Informações sobre plantas forrageiras. Viçosa, MG: UFV, 1981. 56p.

NEUMANN, P. et al. Isolation of chromosome from *Pisum sativum* L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry. *Plant Science*, v. 137, n. 2, p. 205-215, 1998.

NODA, K.; KASHA, K. J. Chromosome elimination in different meristematic regions of hybrids between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Jpn. Journal Genetic* v. 56, p. 193-204, 1981.

O'DONOUGHUE, L. S.; BENNETT, M. D. Comparative response of tetraploid wheats polinated with *Zea mays* L. and *Hordeum bulbosum* L. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 87, p. 673-680, 1994.

PANTULU, J. V.; RAO, K. Cytogenetics of pearl millet. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 61, p. 1-17, 1982.

PANTULU, J. V.; VENKATESWARLU, J. Morphology of pachytene chromosome of *Pennisetum purpureum* Schum. *Genética*, Grauehage, v. 39, p. 41-44, 1968.

PEREIRA, A. V. Escolha de variedades de capim-elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 10., 1992, Piracicaba. *Anais... Piracicaba: FEALQ*, 1993. p. 45-62.

PEREIRA, A. V. Germoplasma e diversidade genética do capim-elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM-ELEFANTE, 2., 1994, Juiz de Fora. *Anais... Coronel Pacheco-MG: EMBRAPA-CNPGL*, 1994. p. 1-11.

PEREIRA, A. V. et al. de P. Protogynous interval in elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum). In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 1997, Canadá. *Proceedings. Canadá, 1997*. p. 662-663.

PEREIRA, A. V. et al. Pioneiro – nova cultivar de capim-elefante para pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora. *Resumos... Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 1997. p. 102-104.

PEREIRA, A.V. et al. Variação da qualidade de folhas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e híbridos de capim-elefante x milheto (*P. purpureum* x *P. glaucum*), em função da idade da planta. *Ciências e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, n. 2, p. 490-499, 2000.

PEREIRA, A. V. et al. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L. et al. Recursos genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.

PETERS J. A.; BOBROWSKI V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplo-haplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa/CBAB, 1999. v. 2, p. 569-611.

PICARD, E. et al. Évolution des méthodes d'haplodiploidisation et perspectives pour l'amélioration des plantes. *Compte Rendu des Seances de la Société de Biologie Paris*, v. 188, p.109-141, 1994.

POWELL, J.; HANNA, W.; BURTON, G. Origin, cytology, and reproductive characteristic of haploids in pearl millet. *Crop Science*, v. 15, p. 389-392, May/June 1975.

RIERA-LIZARAZU, O.; MUJEEB-KAZI, A.; WILLIAM, M. D. H. Maize (*Zea mays* L.) mediated polyhaploid production in some *Triticeae* using a detached method. *Journal of Genetics and Breeding*, v. 46, p. 335-346, 1992.

RIERA-LIZARAZU, O.; RINES, H.W.; PHILLIPS, R.L. Cytological and molecular characterization of oat x maize partial hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 93, n. 1/2, p. 123-135, July 1996.

RINES, H. W.; DAHLEEN, L. S. Haploid oat plants produced by application of maize pollen to emasculate oat florets. *Crop Science*, v. 30, p. 1073-1078, 1990.

RODRIGUES, L. R. O.; PEDREIRA, J. V. S.; MATTOS, H. B. Adaptação ecológica de algumas plantas forrageiras. *Zootecnia*, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 201-218, 1975.

ROTH, P. S. Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. 1984. 79 p. Dissertação (Mestrado em Genética de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

- SAISINGTONG, S. et.al. Colchicine mediated chromosome doubling anther culture of maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 92, n. 8, p. 1017-1023, 1996.
- SCHRADER, O.; POHLER, W. Seed set from a colchicines treated trigenic hybrid of the cross *Hordeum chilense* (2x) x *triticale* (6x). *Cereal Res. Commun.*, v. 13, p. 63-69, 1985.
- SCHUBERT, I. et al. Refined examination of plant metaphase chromosome structure at different levels made feasible by new isolation methods. *Chromosoma*, v. 102, n. 2, p. 96-101, 1991.
- SCHUSTER, M. Cytogenetics in fruit breeding: preparation methods for mitotic chromosomes. *Gartenbauwissenschaft*, v. 61, n. 6, p. 273-275, 1996.
- SHARMA, A. K.; SHARMA, A. *Plant chromosome: analysis, manipulation and engineering*. Amsterdam: Hardwood Academic, 1999. 371 p.
- SINGH, R.J. *Plant cytogenetics*. Boca Raton: CRC, 1993.
- SLUDER, G. The practical use of colchicine and cocemid to reversibly block microtubule assembly in living cells. In ADOLPH, K.W. *Advanced techniques in chromosome research*. New York: Marcel Dekker, 1991. 427-447p.
- SOUZA, R. M. Avaliação de híbridos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com pearl millet (*Pennisetum typhoides* (Brum.) Stapf e Hubbard) e seus progenitores. 1971. 38 p. Dissertação (Mestrado em Genética de Plantas)-Universidade federal de Viçosa, Viçosa.
- STEBBINS, G. L. Longevity, habitat, release of genetic variability in the higher plants. *Col Spring Symposium Quantitative Biology*, v. 23, p. 365-387, 1958.
- STEBBINS, G. L. *Chromosomal evolution in higher plants*. Reading: Addison Wesley, 1971. 215 p.
- SUBRAHMANYAM, N. C.; KISHOR, P. B. K. Haploids from wide hybridizations in grass genera: progress and perspectives. In: SYMPOSIUM HELD AT HYDERABAD, India, 1997. *Proceedings...* India, 1997. p. 11-21.
- SUN, Y; CHENG, S. Q. ; LIANG, G. H. Induction of autotetraploid plants of *Sorghum versicolor*. *Cytologia*, v. 59, n. 1, p. 109-114, 1994.

SUNDBERG, E.; GLIMELIUS, K. Effects of parental ploidy and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within Brassicaceae. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 83, p. 81-88, 1991.

TANNER, D. G. Parental effects on chromosome doubling for the production of primary triticales. *Canadian Journal Genetic Cytology*, v. 23, p. 191-193, 1981.

TECHIO, V. H. Citotoxanomia de algumas espécies e de híbridos interespecíficos de *Pennisetum*. 1998. 112 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Análise meiótica em um híbrido entre *Pennisetum purpureum* e *P. glaucum*. In: ENCONTRO MINEIRO DE GENETICISTA, 6., 2001, Lavras. Anais... Lavras: UFLA, 2001. p. 24.

TYAGI, B. R. Karyomorphology of somatic chromosome in pearl millet. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, Bangalore, v. 41, part B, p. 462-465, 1975.

VAN TUYL, J. M.; MEIJER, B.; DIN, M. P. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in vitro chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. *Acta Horticulturae*, v. 325, p. 625-630, 1992.

VIRMANI, S. S.; GIL, B. S. Somatic chromosome of *Pennisetum typhoides* (Burm) S & H. *Cytologia*, v. 37, p. 257-260, 1972.

WAN, Y.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicines treatment of anther-derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 77, p. 889-892, 1989.

WAN, Y. et al. The use of anti-microtubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 81, p. 205-211, 1991.

WANG, A. S.; PHILLIPS, R. L. Synchronization of suspension culture cells. In: VASIL, I. K. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Orlando: Academic, 1984. v. 1825, p. 175-181.

WHEATLEY, W. G.; KASHA, K. J. Effects of cycloheximide treatments on prophase and metaphase cells of a (2x) *H. vulgare* x (2x) *H. bulbosum* hybrid. Disponível em: <<http://www.wheat.pw.usda.gov/ggppages/bgn/12/12p72.html>>. Acesso em; 28 fev. 2002.

WHYTE, R. O.; MOIR, T. R. G.; COOPER, J. P. Las gramíneas en la agricultura. Rome: FAO, 1959. 465 p. (FAO - Estudios Universitarios, 42).

XAVIER, D. F. et al. Poder germinativo de sementes de capim-elefante. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.22, n. 4, p. 565-571, 1993.

ZHAO, J. P.; WANG, G. R.; LUI, F. Abnormalities of cells in roots of *Vicia faba* induced by 8-hydroxylquinoline. *Hereditas*, v. 13, n. 6, p. 5-10, 1991.

ANEXO

ANEXO A

Página

FIGURA 1A Curva termogravimétrica (TG)..... 71

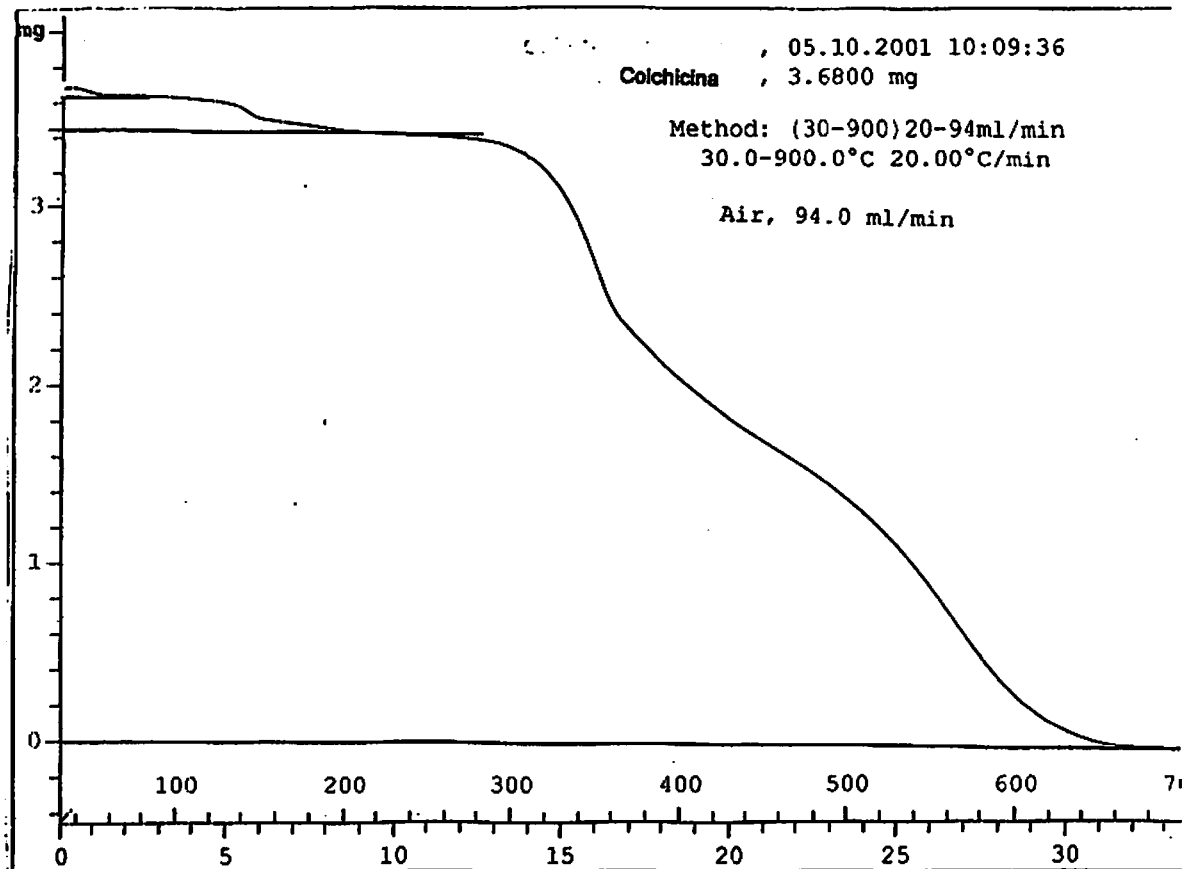


FIGURA 1A Curva termogravimétrica (TG). Eixo das abscissas (x) – temperatura em °C e eixo das ordenadas (y) – peso em mg.