



MEIOSE E ANÁLISE GENÔMICA EM
Pennisetum spp.

VÂNIA HELENA TECHIO

2002



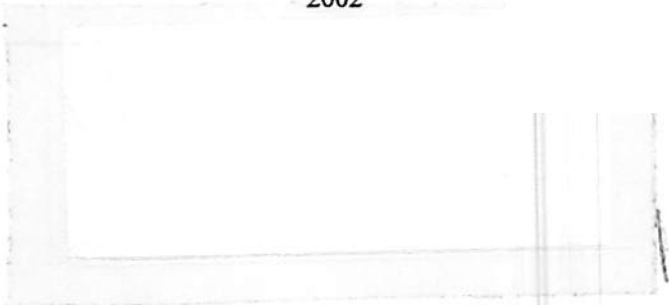
VÂNIA HELENA TECHIO

MEIOSE E ANÁLISE GENÔMICA EM
Pennisetum spp.

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

Orientadora
Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2002



Ficha catalográfica preparada pela Divisão de Processos
Técnico da Biblioteca Central da UFLA

Techio, Vânia Helena

**Meiose e análise genômica em *Pennisetum spp.* / Vânia Helena
Techio. – Lavras: UFLA, 2002.**

104 p. : il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Tese (Doutorado) - UFLA.

Bibliografia.

**1. Capim-elefante. 2. Citogenética. 3. Meiose. 4. Análise
genômica. 5. Melhoramento genético. 6. Germoplasma
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

CDD-633.20823

VÂNIA HELENA TECHIO

**MEIOSE E ANÁLISE GENÔMICA EM
Pennisetum spp.**

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

APROVADA em 21 de outubro de 2002.

Dra. Maria Suely Pagliarini

UEM

Dra. Cecília A. F. Pinto-Maglio


IAC

Dr. César A. B. P. Pinto

UFLA

Dr. Antônio Vander Pereira

Embrapa Gado de Leite


Profª. Dra. Lisete Chamma Davide
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Contestado - UnC, Unidade Universitária de Concórdia -SC, por investir na minha capacitação.

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, por possibilitar a complementação dos meus estudos.

À professora Lisete Chamma Davide, por sua dedicada e competente orientação e amizade.

Aos meus familiares, pelo apoio e incentivo constantes

Aos amigos, pelo convívio solidário e contribuições durante o curso e a realização da pesquisa

Ao Dr. Antônio Vander Pereira, pela sua disponibilidade e colaboração

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos

À banca examinadora, pelas valiosas contribuições.

À Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora, por oportunizar a pesquisa por meio do convênio com o setor de Citogenética da UFLA.



SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1	1
1 Introdução geral	1
2 Referencial teórico	3
2.1 Melhoramento genético e cruzamentos inter e intra-específicos em <i>Pennisetum</i>	3
2.2 Citogenética do milho (<i>P. glaucum</i>), do capim-elefante (<i>P. purpureum</i>) e dos híbridos interespecíficos	5
2.2.1 Meiose no milho (<i>P. glaucum</i>)	7
2.2.2 Meiose no capim-elefante (<i>P. purpureum</i>)	9
2.2.3 Meiose no híbrido entre o milho (<i>P. glaucum</i>) e o capim-elefante (<i>P. purpureum</i>)	11
2.3 Viabilidade do pólen	12
2.3.1 Viabilidade do pólen em <i>Pennisetum</i>	15
2.4 As contribuições dos estudos meióticos para análise genômica	16
2.4.1 Modelos matemáticos aplicados à análise genômica	20
2.4.2 Análise genômica em <i>Pennisetum</i>	23
3 Referências bibliográficas	26
CAPÍTULO 2 - Meiose em <i>Pennisetum purpureum</i>, <i>P. glaucum</i> e híbridos interespecíficos	
Resumo	35
Abstract	36
2.1 Introdução	37
2.2 Material e métodos	39
2.3 Resultados e discussão	42
2.3.1 Meiose nos acessos de milho (<i>P. glaucum</i>)– M24, M36 e M38.....	42
2.3.2 Meiose nos acessos de capim-elefante (<i>P. purpureum</i>)– BAG 63, BAG 75 e BAG 91	49
2.3.3 Meiose nos acessos híbridos interespecíficos entre o capim-elefante (<i>P. purpureum</i>) e o milho (<i>P. glaucum</i>)– F94-44-03, F94-49-06 e F94-60-01	58
2.3.4 Correlações entre fertilidade-irregularidades meióticas e fertilidade-índice meiótico	66
2.4 Conclusões	73
2.5 Referências bibliográficas	74

CAPÍTULO 3 - Análise genômica em híbridos de *Pennisetum purpureum* e *P. glaucum*

Resumo	86
Abstract	87
3.1 Introdução	88
3.2 Material e métodos	90
3.2.1 Material genético	90
3.2.2 Análise genômica	90
3.3 Resultados e discussão	95
3.4 Conclusões	102
3.5 Referências bibliográficas	103

RESUMO

TECHIO, Vânia Helena. Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp. 2002. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Os híbridos obtidos pelo cruzamento do capim-elefante (*P. purpureum*, $2n=4x=28$, A'A'BB) com o milheto (*P. glaucum*, $2n=2x=14$, AA) apresentam boa qualidade forrageira, revelando ser uma alternativa para incrementar a produção da pecuária leiteira. Uma das dificuldades para seu cultivo é a exigência de propagação vegetativa, visto que este híbrido apresenta infertilidade, que tem sido atribuída a irregularidades no processo meiótico advindas da sua condição triploide. Avaliações da meiose por meio de protocolo convencional permitiram descrever o comportamento cromossômico dos parentais milheto e capim-elefante e híbridos correspondentes, determinar a viabilidade do pólen e a afinidade genômica pela aplicação do modelo matemático de Alonso e Kimber (1981) revisado por Chapman e Kimber (1992). Para o milheto e o capim-elefante foram observados 7 e 14 bivalentes, respectivamente, regularmente distribuídos na placa equatorial e alta viabilidade de pólen pelos testes de coloração. Um dos acessos de capim-elefante (BAG 63), oriundo de cultura de tecidos, apresentou maior frequência de anormalidades meióticas. Nos testes de germinação *in vitro*, o milheto e capim-elefante exibiram uma frequência reduzida de pólenes funcionais, mostrando inabilidade para emitir tubo polínico nas condições artificiais do meio de cultura. Os três acessos híbridos apresentaram altas taxas de anormalidades caracterizadas pela segregação irregular dos cromossomos que resultaram na formação de grãos de pólen inviáveis. As estimativas das relações de pareamento nos três híbridos entre o capim-elefante e o milheto mostraram que os acessos M24 e BAG75, genitores do F94-60-01, apresentam uma maior proximidade genética entre os seus complementos cromossômicos.

* Comitê orientador: Lisete Chamma Davide - UFLA (Orientadora) e Antônio Vander Pereira - Embrapa Gado de Leite.

ABSTRACT

TECHIO, Vânia Helena. Meiosis and genomic analysis in *Pennisetum* spp. 2002. 104 p. Thesis (Doctorate in Genetics and Plant Breeding)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The hybrids obtained by crossing the elephantgrass (*P. purpureum* $2n=4x=28$, A'A'BB) with the pearl millet (*P. glaucum* - $2n=2x=14$, AA) present good forage quality, revealing to be an alternative to increase the dairy cattle production. One of the difficulties for their cultivation is the demand of vegetative propagation, because this hybrid presents infertility, that has been attributed to meiotic irregularities resultant from their triploid condition. The meiosis evaluations through conventional protocol allowed to describe the chromosome behavior of the pearl millet and elephantgrass progenitors and corresponding hybrids, to determine pollen viability and the genomic affinities for the application of Alonso and Kimber's mathematical model (1981), revised by Chapman and Kimber (1992). For the pearl millet and the elephantgrass, 7 and 14 bivalents were observed, respectively, regularly distributed in the equatorial plate and high pollen viability by the staining tests. One of the elephantgrass accessions (BAG 63), originated from tissue culture, presented larger frequency of meiotic abnormalities. The in vitro germination tests of pearl millet and elephantgrass exhibited a reduced frequency of functional pollens, showing inability to emit pollen tube in the artificial conditions of the culture media. The three hybrids accessions presented a high frequency of abnormalities characterized by irregular chromosome segregation that resulted in the formation of sterile pollen grains. The pairing relationships estimates showed that M24 and BAG 75 accessions, progenitors of F94-60-01, present the major genetic proximity among their chromosome complement.

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

1. INTRODUÇÃO GERAL

Pennisetum é um gênero composto por 140 espécies, a maioria delas de origem africana, mas com ampla distribuição tropical (Burton, 1942; Brunken, 1977; Kativu e Mithen, 1987).

Dentre essas espécies, destacam-se o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e o milheto (*P. glaucum* (L.) R. Br., sinônimas: *P. typhoides* e *P. americanum*). Segundo Janhar e Hanna (1998), a área cultivada com milheto no Brasil atingiu quase 1 milhão de hectares, em 1996. Já o capim-elefante tem sido empregado, em regime de pastejo, nas principais bacias leiteiras do Brasil, onde constata-se um aumento crescente nas instalações de sistemas intensivos de produção de leite em que se utilizam animais com potencial genético mais elevado.

Embora altamente difundido, o capim-elefante apresenta pouca disponibilidade de cultivares melhoradas adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas. A geração de variabilidade genética para o melhoramento do capim-elefante pode ser conseguida pela hibridação intra e interespecífica, uma vez que essa forrageira apresenta compatibilidade reprodutiva com outras espécies, especialmente com o milheto.

Os híbridos obtidos pelo cruzamento do capim-elefante com o milheto apresentam boa qualidade forrageira, revelando ser uma alternativa para incrementar a produção e rentabilidade da pecuária leiteira. O maior problema em relação à sua utilização é a infertilidade, que tem sido atribuída a irregularidades no processo meiótico, advindas da sua condição triplóide.

O estudo comparativo do comportamento meiótico dos híbridos entre o capim-elefante e o milheto, sobretudo as observações do pareamento cromossômico, pode permitir o estabelecimento do grau de afinidade genética entre ambos, auxiliando na produção de híbridos e cultivares mais produtivos.

A contribuição mais efetiva da análise genômica em termos de conhecimento da história evolutiva foi para a tribo Triticeae, com especial referência aos gêneros *Triticum* e *Aegilops* (Kihara, citado por Seberg e Petersen, 1998; Singh, 1993; Gupta, 1991), *Hordeum* (Bothmer, Flink e Landstrom, 1989a e 1989b) e *Elymus* (Aung e Walton, 1990; Salomon, 1993).

As informações citogenéticas obtidas permitiram uma melhor manipulação do germoplasma disponível, possibilitando explorar a variabilidade genética e contribuir com o aumento da produção e melhor adaptação das espécies às diferentes condições ambientais.

No caso específico do gênero *Pennisetum*, além de fornecer dados para análise genômica, o estudo da meiose pode contribuir para o entendimento dos aspectos envolvidos na esterilidade dos híbridos interespecíficos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Melhoramento genético e cruzamentos inter e intra-específicos em *Pennisetum*

O pressuposto básico dos programas de melhoramento genético vegetal está fundamentado na obtenção de cultivares superiores a partir da manipulação da variabilidade genética existente no germoplasma de determinado grupo. Essa possibilidade muitas vezes se restringe à variabilidade intra-específica, devido às barreiras existentes em cruzamentos interespecíficos. Assim, o entendimento da estrutura citogenética e das relações filogenéticas entre as espécies é fundamental na definição da participação dos complementos cromossômicos de diferentes espécies em híbridos interespecíficos.

Obviamente, a transferência genética ocorrerá mais facilmente entre espécies afins, cujos cromossomos apresentem maior homologia, o que reflete na obtenção de híbridos viáveis.

O germoplasma do gênero *Pennisetum*, família Poaceae, compreende 140 espécies e foi dividido por Harlan e de Wet (1971) em 3 conjuntos gênicos. O milheto (*P. glaucum* (L.) R. Br., sinônimas: *P. typhoides* e *P. americanum*) com $2n=2x=14$, juntamente com outras duas espécies diplóides selvagens (*P. mollissimum* e *P. violaceum*), integra o conjunto gênico primário. No segundo grupo, encontra-se o capim-elefante (*P. purpureum* Schum.) com $2n=4x=28$ e, no conjunto terciário, as demais espécies. Apesar de existirem alguns mecanismos que contribuem para a manutenção dessa estrutura genética, tais como ligação e competição gametofítica (Robert et al., 1991), algumas espécies são compatíveis sexualmente. Essa possibilidade de combinação interespecífica é particularmente importante para o melhoramento, pois permite a transferência de alelos desejáveis para espécies de importância econômica.

Vários exemplos de hibridações entre espécies de *Pennisetum* são encontrados na literatura. Jauhar e Hanna (1998) mencionaram que muitas espécies podem ser cruzadas com facilidade, possibilitando a criação de genótipos úteis para produção de forragem. Dentre elas, o milheto é a mais empregada nos cruzamentos devido à sua proximidade genética com várias espécies do gênero. Na formação dos híbridos, o milheto contribui com caracteres como vigor, qualidade forrageira e tamanho das sementes, enquanto que hábito de crescimento perene e propagação vegetativa, sensibilidade a dias curtos e apomixia são fornecidos pelos outros genitores (Dujardin e Hanna, 1989; Jauhar e Hanna, 1998).

O híbrido originado do cruzamento do capim-elefante com o milheto, denominado PMN (do inglês pearl millet e napiergrass) e descrito pela primeira vez por Burton (1944), é considerado o mais importante desse gênero por apresentar produção e qualidade forrageiras superiores aos de seus genitores (Osgood, Hanna e Tew, 1997; Jauhar e Hanna, 1998). Esse híbrido pode ser produzido facilmente por polinização manual e ser propagado vegetativamente ou por meio de sementes híbridas comerciais. Essas sementes são produzidas em regiões tropicais utilizando uma variedade de milheto macho estéril citoplasmática (pms) (Osgood, Hanna e Tew, 1997).

A maior limitação em relação à utilização do híbrido PMN é a infertilidade, o que impede a sua utilização em cruzamentos. O número de cromossomos não balanceado é apontado como a principal causa da esterilidade, pois o híbrido reúne 21 cromossomos pertencentes aos genomas A oriundos do milheto e A' e B, do capim-elefante. Nesse caso, a alternativa para resgatar a fertilidade é promover a duplicação cromossômica. Por meio da colchicina, Hanna (1981) e Hanna et al. (1984) relataram a obtenção do hexaplóide ($2n=6x=42$) com meiose regular, fértil e com sementes vigorosas.

Híbridos interespecíficos envolvendo outras espécies de *Pennisetum* foram produzidos (Patil e Singh, 1980; Jauhar, 1981; Dujardin e Hanna, 1989; Hanna et al., 1992). Entretanto, existem poucas informações a respeito da qualidade forrageira.

No Brasil, os programas de melhoramento genético de *Pennisetum* visam desenvolver cultivares de capim-elefante adaptadas aos diferentes ecossistemas e sistemas de produção. A opção pelo melhoramento genético do capim-elefante reside no fato de ser uma forrageira cultivada em todo país, tradicionalmente utilizada pelos produtores de leite e com elevada produção de matéria seca (Pereira et al., 2001).

O melhoramento da maioria das características de importância forrageira do capim-elefante tem sido conseguido por meio da exploração da variabilidade genética existente na própria espécie. Outra alternativa que vem sendo empregada é a utilização do germoplasma do milheto como reservatório de genes úteis na produção dos híbridos PMN.

Considerando o potencial dessa forrageira, os melhoristas brasileiros têm buscado explorar as fontes de genes disponíveis para produção de genótipos úteis à pecuária nacional. Na condução desses programas de melhoramento genético, os conhecimentos de citotaxonomia, estrutura citogenética e relações filogenéticas são essenciais para determinar o procedimento adequado para cruzamentos e introgressões bem sucedidos.

2.2 Citogenética do milheto (*P. glaucum*), do capim-elefante (*P. purpureum*) e de híbridos interespecíficos correspondentes

Apesar de sua considerável importância econômica, existem poucos estudos citogenéticos com espécies de *Pennisetum*. A exceção do milheto, para o qual são encontradas amplas revisões (Burton e Powell, 1968; Jauhar, 1981; Pantulu e Rao, 1982; Minocha, 1991; Jauhar e Hanna, 1998), para as demais

espécies, os relatos restringem-se à determinação do número cromossômico. As informações sobre citogenética de híbridos intra e interespecíficos, avaliações das relações de pareamento cromossômico, análise genômica e seu emprego na elucidação de posicionamentos taxonômicos e filogenéticos, bem como outros aspectos citológicos do gênero, são limitadas.

Evidentemente, essa situação mostra ser necessário ampliar o número de espécies e híbridos estudados e o enfoque dos estudos citogenéticos na tentativa de obter outros subsídios para melhor conservação e aproveitamento do germoplasma disponível. Ainda assim, o aspecto mais importante é a integração das informações obtidas, a fim de contribuir para o entendimento das relações filogenéticas entre as espécies. As pesquisas conduzidas pelas equipes coordenadas por Jauhar e Hanna (1998) e Pantulu e Rao (1982), entre outros, trabalharam nesse sentido.

No Brasil, um projeto amplo com esta finalidade vem sendo conduzido desde 1996 no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em Lavras, MG, utilizando genótipos do Banco de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite de Coronel Pacheco-MG. As avaliações objetivam a utilização dos dados para identificação taxonômica, acompanhamento citogenético de diferentes combinações genômicas de genitores e híbridos interespecíficos e indução de duplicação cromossômica em híbridos triplóides estéreis.

Até o momento, 60 acessos, entre eles *P. purpureum*, *P. glaucum*, híbridos interespecíficos, *P. setosum* e *P. nervosu*, foram identificados por meio do número de cromossomos. Para alguns deles, também foram utilizados caracteres morfológicos reprodutivos. Para sete destes acessos foi proposta nova classificação botânica, sendo que em um deles observou-se variação cromossômica numérica em células de um mesmo meristema. As descrições dos complementos cromossômicos de cinco famílias constituídas pelos híbridos *P.*

purpureum e *P. glaucum* e de seus genitores permitiram estabelecer as relações cariotípicas entre os genitores, identificar cromossomos nos híbridos e classificar os cariótipos quanto à simetria. Em relação à duplicação dos cromossomos dos híbridos entre *P. purpureum* e *P. glaucum*, os tratamentos utilizados até o momento resultaram em mixoplóides, em função da eliminação cromossômica completa e parcial de genomas (Abreu, 2002; Barbosa, 2000; Techio, 1998).

O acompanhamento do comportamento meiótico de três famílias constituídas por acessos híbridos e seus genitores milheto e capim-elefante, principal objetivo deste trabalho, está incluído nessa proposta de avaliação citogenética integrada do gênero *Pennisetum*.

2.2.1 Meiose no milheto (*P. glaucum*)

O milheto tem se destacado nos estudos citogenéticos e melhoramento de *Pennisetum* por apresentar uma série de características favoráveis. Trata-se de uma espécie agronomicamente importante, cujos grãos são utilizados como fonte de alimento humano e na produção de ração animal. Suas folhas e colmos são utilizados como forragem e como opção para cobertura de solos no inverno. Características mais específicas, como a protoginia, complemento cromossômico com número reduzido e o tamanho dos cromossomos e a presença de organizadores nucleolares (Jauhar e Hanna, 1998; Barbosa, 2000), favorecem a consolidação da hegemonia do milheto sobre as outras espécies, como opção para avaliações citogenéticas e de melhoramento.

O número cromossômico do milheto foi determinado por Rau (1929) como $2n=2x=14$ e, posteriormente, Krishnaswamy, Raman e Nair (1950) designaram a constituição genômica como AA.

As avaliações da meiose têm mostrado que o milheto apresenta sete bivalentes e dois quiasmas em cada um, exceto o bivalente nucleolar que, geralmente, apresenta um quiasma (Jauhar, 1981; Hanna, 1981). De acordo com

Sujatha et al. (1989), os bivalentes apresentam orientação regular na metáfase I, disjunção na anáfase I e fertilidade do pólen de 92%.

Uma característica marcante na meiose do milheto é a rápida terminalização de quiasmas, de forma que na diacinese muitos bivalentes em anel com dois quiasmas terminalizados são observados (Jauhar, 1981).

A morfologia dos bivalentes no paquíteno foi descrita por Pantulu (1958) e Venkateswarlu e Pantulu (1968) na variedade AKP 3 e por Lobana e Gill (1973) em BIL 4. Existem diferenças nas relações de braços para alguns cromossomos, comparando-se as duas variedades. Em AKP 3 foi observada uma boa correlação entre os dados do paquíteno e o cariótipo somático, enquanto que em BIL 4 tal correlação não foi evidenciada. Essa diferença provavelmente deve-se à relativa abundância de heterocromatina em BIL 4 e sua limitada ocorrência em AKP 3. Em vista do papel regulatório da heterocromatina extra no pareamento cromossômico e na formação de quiasmas, Pantulu e Rao (1982) recomendaram um estudo de variedades de milheto provenientes de diferentes regiões agroecológicas.

As análises do paquíteno permitiram a Pantulu (1958) agrupar os sete pares de cromossomos em quatro categorias: 1) os dois maiores tendo centrômeros medianos; 2) os dois menores com centrômeros mediano a submediano; 3) os dois com tamanho médio e centrômeros submedianos e 4) o menor par cromossômico com a região organizadora do nucléolo.

A maioria das linhagens do milheto avaliadas tem mostrado um par de cromossomos com a região organizadora do nucléolo. Entretanto, Pantulu e Rao (1982) relataram que, em algumas variedades africanas, foi verificado que um ou dois pares de cromossomos maiores apresentavam constrições secundárias em seus braços longos. Powell e Burton (1966) também encontraram dois cromossomos comumente associados ao nucléolo em plantas oriundas da Nigéria. Barbosa (2000), avaliando cinco acessos de milheto, relatou a presença

de satélites no braço curto em um dos homólogos do 1º e do 7º pares de cromossomos em quatro acessos e de um satélite no braço curto de um dos homólogos do par VII em um acesso.

Algumas populações de milheto, segundo Jauhar (1981), apresentam associações secundárias de bivalentes. Embora o significado filogenético dessas associações em espécies diplóides permaneça controverso, elas não podem ser consideradas completamente sem-sentido. No trigo hexaplóide, por exemplo, tais associações ocorrem entre cromossomos genética e evolutivamente relacionados. No milheto, os bivalentes associados dessa maneira são muito similares, embora seus relacionamentos genético e filogenético não tenham ainda sido determinados. No complemento haplóide, os cromossomos envolvidos nessas associações secundárias formam bivalentes. Essas observações, de acordo com esse autor, sugerem que o complemento do milheto origina-se do número básico $x=5$ cromossomos.

2.2.2 Meiose no capim-elefante (*P. purpureum*)

O capim-elefante, cuja constituição genômica foi designada A'A'BB por Krishnaswamy, Raman e Nair (1950) é a espécie alotetraplóide ($2n=4x=28$) mais conhecida do gênero *Pennisetum* (Jauhar, 1981, Martel, Richroch e Sarr, 1996; Jauhar e Hanna, 1998).

A proximidade genética com o milheto, a distribuição tropical e o potencial forrageiro fazem do capim-elefante um material atrativo para o melhoramento genético. Apesar disso, do ponto de vista citogenético e evolutivo, algumas informações à respeito da sua constituição genômica e origem precisam ser esclarecidas para que seu germoplasma seja conservado e aproveitado adequadamente.

Evidências de várias pesquisas têm mostrado que os cromossomos do genoma A' são homólogos/ homeólogos aos do genoma A do milheto, enquanto

que os cromossomos do genoma B não têm sua origem definida (Krishnaswamy e Raman, 1954; Raman, 1964; Pantulu, 1967; Jauhar, 1968 e 1981). Técnicas de genética e citogenética molecular poderiam auxiliar na definição da espécie doadora do genoma B. Com esta finalidade, seria recomendável investigar outras taxa que apresentam $2n=2x=14$, tais como *P. violaceum*, *P. fallax*, *P. ancylochaete*, *P. gambiense*, *P. matwa* e *P. nigritarum* (Jauhar e Hanna, 1998), na tentativa de localizar nesses genótipos cromossomos homólogos àqueles pertencentes ao genoma B encontrados no capim-elefante.

A meiose no capim-elefante caracteriza-se pela formação de bivalentes (Jauhar, 1968 e 1981; Hanna, 1981). O controle genético da herança dissômica nessa espécie, que é alotetraplóide, é outro aspecto que ainda não foi investigado. No trigo hexaplóide (Okamoto, 1957; Sears, 1976), por exemplo, as bases para esse sistema de diploidização foram reconhecidas pela descoberta de um gene Ph1, supressor do pareamento homeólogo, e parece se repetir no capim-elefante.

Estudos posteriores mostraram que, além do gene Ph, existem outros supressores e promotores do pareamento homólogo e homeólogo em diversos cromossomos do trigo e também em outras espécies, como o centeio, *Triticum turgidum* e *T. timopheevii* (Feldman, 1966; Sears, 1976).

A ocorrência desse sistema de diploidização é fundamental para a estabilidade genética e alta fertilidade no trigo e no próprio capim-elefante.

Além disso, poucas descrições sobre o processo meiótico e relatos da existência ou não de distúrbios de pareamento e segregação são encontrados para o capim-elefante.

Pantulu e Venkateswarlu (1968), em observações feitas no paquíteno, revelaram que os cromossomos 1 e 14 apresentam regiões organizadoras do nucléolo e que, em todos os cromossomos, os centrômeros mostram-se flanqueados por regiões fortemente coradas. Segundo os autores, 7 dos 14

cromossomos apresentam knobs no braço longo, que é a principal característica que os diferenciam dos 7 cromossomos do milheto, embora esses knobs não estejam presentes uniformemente em todas as populações.

Na diacinese existe uma rápida terminalização dos quiasmas, que é também característica do milheto. Em geral, os bivalentes menores apresentam um quiasma, enquanto que os maiores exibem dois quiasmas. A frequência de quiasmas por célula e por cromossomo pareado é de 18,9 e 0,68, respectivamente (Jauhar, 1981).

Sujatha et al. (1989) observaram cromossomos atrasados em número variando de 1 a 4 na telófase I em 34% das células, de fusos tripolares em 6% das células e de cromossomos atrasados na telófase II. A fertilidade do pólen observada foi de aproximadamente 78%.

2.2.3 Meiose nos híbridos entre capim-elefante (*P. purpureum*) e milheto (*P. glaucum*)

A relação genômica entre o capim-elefante e o milheto foi descrita por Krishnaswamy e Raman (1954 e 1956), Pantulu (1967), Jauhar (1968 e 1981) e Sethi, Kalia e Ghai (1970).

Krishnaswamy e Raman (1954), analisando o pareamento em meiócitos desses híbridos, verificaram que, geralmente, 14 dos 21 cromossomos formavam pares e que 7 permaneciam como univalentes. A formação dos 7 bivalentes foi atribuída à sinapse entre os genomas A e A', enquanto que os univalentes pertenciam ao genoma B.

Com base em observações feitas no paquíteno por Pantulu (1967) e confirmadas por Pantulu e Rao (1982), verificou-se que os cromossomos 1 a 5 do milheto apresentam homologia com os mesmos cromossomos do capim-elefante e os cromossomos 6 e 7 do milheto têm homologia com os cromossomos 8 e 14 do capim-elefante, respectivamente.

Sethi, Kalia e Ghai (1970) relataram que, em três híbridos de capim-elefante e milheto, a meiose foi muito irregular, mostrando configurações variando de 1 trivalente + 7 bivalentes + 4 univalentes a 4 bivalentes + 13 univalentes. Para estes autores, conforme era esperado, o comportamento dos trivalentes e dos univalentes foi também muito irregular na anáfase I, onde foi possível verificar a ocorrência de 5 a 11 cromossomos nos dois pólos e univalentes atrasados, resultando em apenas 3,20% a 8,88% de pólen férteis.

No estudo feito por Sree Rangasamy (1972), foram observadas associações cromossômicas na diacinese de 8 bivalentes + 5 univalentes; 9 bivalentes + 3 univalentes e 10 bivalentes + 1 univalente. A formação de mais do que 7 bivalentes foi atribuída ao pareamento autossindético ou também a associações heterocromáticas.

Hanna (1981) e Jauhar (1981) acrescentaram que, na meiose dos híbridos, observa-se a formação de pontes cromossômicas, tétrades anormais e formação de grãos de pólen inviáveis.

2.3. Viabilidade do pólen

A viabilidade do pólen é uma etapa imprescindível em programas de melhoramento genético e em estudos da biologia do pólen, uma vez que ele é o veículo dos cromossomos nos cruzamentos. Os dados de viabilidade permitem fazer correlações com anormalidades meióticas e auxiliar na seleção de genótipos, tornando-se uma ferramenta útil na condução de experimentos nas áreas agrícola e biotecnológica.

A análise da viabilidade do pólen pode ser realizada por meio dos métodos de coloração e germinação.

A coloração é um procedimento bastante simples, barato e que fornece resultados rapidamente, tornando-se bastante atrativa para a palinologia. Considerando que existe uma correlação viabilidade-coloração, a estimativa é

dada pela contagem dos pólenes não abortados e abortados que mostram-se corados e não corados, respectivamente.

Vários são os corantes empregados com esta finalidade. Dentre eles quais destacam-se: carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (Hauser e Morrison, 1964; Stanley e Linskens, 1974; Shivanna e Rangaswamy, 1982), cloreto de trifeniltetrazólio (TCC), tetrazólio vermelho (Shivanna e Rangaswamy, 1982), verde malaquita com fucsina ácida (Alexander, 1969 e 1980) e fluorosceína di-acetato (Cardoso et al., 2000).

Na literatura não há a descrição de um teste de viabilidade universal com a utilização de um corante específico. A maioria dos trabalhos relata o uso dos corantes nucleares, sobretudo carmim acético, para vários grupos de plantas.

A utilização desses corantes foi questionada por Alexander (1969 e 1980), pelo fato dos pólenes inviáveis não serem corados. Segundo o autor, esse é um fator limitante no estudo de pólenes com paredes espessas, mucilaginosas e com presença de espículas, pois dificultam a penetração do corante e, conseqüentemente, a coloração. Nessa condição, pólenes viáveis podem não apresentar coloração e ser equivocadamente classificados como abortados.

Alternativamente, Alexander (1969 e 1980) propôs a utilização de um corante diferencial à base de verde malaquita e fucsina ácida, em que o pólen inviável cora-se de verde e o viável de vermelho. O procedimento para diferenciação do pólen envolve a manipulação do tempo de exposição ao corante. Além de produzir melhor diferenciação para pólenes, esse corante mostra bons resultados em hifas, esporos, leveduras, fungos e bactérias.

Considerando todos estes aspectos, recomenda-se que os procedimentos para coloração visando o estudo da viabilidade do pólen devem ser determinados a partir de vários testes, os quais poderão auxiliar na padronização de um protocolo para a espécie em estudo, levando em conta as características morfofisiológicas e químicas do grão de pólen.

A coloração, embora seja um procedimento simples e barato, não é totalmente confiável, pois, conforme já relatado, pode fornecer uma informação equivocada da viabilidade. Nesse caso, pode-se optar pela observação da capacidade germinativa dos grãos de pólen, em razão de ser um caráter que correlaciona-se diretamente com a habilidade para fertilização.

A germinação do pólen é uma característica que pode auxiliar no entendimento de mecanismos como a capacidade e taxa de germinação e crescimento do tubo polínico, possivelmente associados com diferenças genéticas entre genótipos na macho-transmissão dos alelos (Pfahler, Pereira e Barnett, 1997).

Nos testes de germinação *in vivo* deposita-se o grão de pólen no estigma receptivo. Após um determinado tempo, o estigma é removido para fazer a contagem do número de tubos polínicos emitidos. Essa metodologia apresenta algumas desvantagens, do ponto de vista prático, que podem refletir na avaliação da viabilidade, tais como: a dificuldade da penetração do tubo polínico na superfície cuticular; a presença de água no estigma podendo levar à ruptura do pólen; a não receptividade do estigma ou a incompatibilidade genética entre o pólen e o pistilo; a aplicação de alta concentração de pólen que poderá inibir a penetração do tubo polínico no estilete e a queda acentuada na temperatura, podendo modificar drasticamente a germinação do pólen *in vivo* (Stanley e Linskens, 1974).

A avaliação da viabilidade do pólen *in vivo* também pode ser feita por meio de sua capacidade de produzir sementes. Nesse caso, o tempo necessário para as observações é um dos fatores que limita o seu emprego. Para a maioria das angiospermas, por exemplo, são necessários 1 a 3 meses para a produção de sementes (Stanley e Linskens, 1974).

Nos testes de germinação *in vitro*, o pólen é espalhado sobre um meio de cultura que, geralmente, contém sacarose (Boden, 1958; Gabrielli, Cunha e

Maule, 1965; Cangianni, 1988) e a viabilidade é observada por meio da porcentagem de grãos de pólen que emitem tubo polínico. O grão de pólen é considerado viável quando o comprimento do seu tubo polínico é maior do que o seu tamanho (Shivanna e Rangaswamy, 1982).

Conforme enfatizaram Taylor e Hepler (1997), embora forneça um sistema experimental controlado, a germinação *in vitro* não reproduz completamente o crescimento do tubo polínico *in vivo*. Utilizando um meio de cultura otimizado, o crescimento do tubo polínico atinge somente 30% a 40% do comprimento observado *in vivo* e anomalias estruturais são freqüentemente observadas. Além disso, o pólen de algumas espécies, tais como *Arabidopsis thaliana*, não apresenta boa germinação *in vitro*.

Baseado nisso e considerando que o meio de cultura pode afetar o metabolismo do pólen em que somente uma fração dos pólenes viáveis produzem tubo polínico, Taylor e Hepler (1997) sugeriram que os resultados dos testes *in vitro* nem sempre devem ser extrapolados como demonstrativos da dinâmica interação pólen-pistilo, embora existam exceções.

2.3.1 Viabilidade do pólen em *Pennisetum*

Para *Pennisetum*, a maioria dos estudos sobre a viabilidade do pólen foi conduzida na década de 1970 utilizando carmim acético na diferenciação de pólenes abortados e não abortados (Sree Ramulu, 1968; Sethi, Kalia e Ghai, 1970; Sree Rangasamy, 1972). Para o milheto, a taxa de fertilidade variou de 87% a 97% (Sree Ramulu, 1968; Sethi, Kalia e Gahi, 1970; Sujatha et al., 1989) e, para o capim-elefante, esses valores foram de 61% a 95% (Sethi, Kalia e Gahi, 1970; Sree Rangasamy, 1972; Sujatha et al., 1989). Esses mesmos autores relataram para os híbridos entre o capim-elefante e o milheto, 2% a 5% de pólenes viáveis.

Anormalidades meióticas, como segregação irregular dos cromossomos, cromossomos retardatários e formação de fusos tripolares são eventos descritos pelos autores como responsáveis pela menor porcentagem de pólen viáveis nos híbridos interespecíficos. A maior taxa de fertilidade no milho é atribuída à sua diploidia, estabilidade genética e não ocorrência de irregularidades no processo meiótico.

Estudos com 14 acessos de milho, capim-elefante e híbridos realizados por Pedrozo et al. (2002), comparando a eficiência dos corantes carmim propiônico, orceína acética e corante de Alexander, têm mostrado que o mais indicado para determinar a viabilidade do pólen nessas taxas é o corante de Alexander, pois os dois corantes nucleares não evidenciaram a esterilidade do híbrido.

Em relação à germinação *in vitro*, trabalhos conduzidos por Ayyangar e Rao (1935) e Chaudhury e Shivanna (1986) mostraram uma queda acentuada na taxa de viabilidade dos grãos de pólen do milho quando comparada com aquelas obtidas por meio de coloração. Ayyangar e Rao (1935) descreveram que os grãos de pólen do milho e de espécies de *Sorghum* e *Andropogon* sofrem plasmólise em meio de cultura e não germinam. Para o capim-elefante, Aken'ova e Chheda (1970) também relataram uma redução na taxa de viabilidade dos grãos de pólen.

2.4 As contribuições dos estudos meióticos para análise genômica

A expressão análise genômica, segundo Sybenga (1992) e Seberg e Petersen (1998), foi empregada pela primeira vez em 1930, por Kihara. Considerando seu sentido amplo, a análise genômica refere-se à descrição de características do genoma das espécies empregando diversas técnicas. Conforme Seberg e Petersen (1998), aplicam-se aqui análises cariotípicas e de pareamento cromossômico meiótico, medições da quantidade de DNA, hibridação *in situ*,

análises com enzimas de restrição, mapeamento genômico, entre outros. Em seu sentido mais restrito, a análise genômica inclui o estudo do pareamento cromossômico na metáfase I da meiose em híbridos, com o propósito de estabelecer relacionamentos filogenéticos entre um grupo de organismos. Nesse caso, a metodologia baseia-se no pressuposto de que somente cromossomos similares (homólogos) pareiam na meiose e que o grau de pareamento nos híbridos reflete o grau de relacionamento entre as espécies parentais (Dewey, 1982).

Afirmações semelhantes são apresentadas por Riley (1966) ao considerar que duas espécies têm genomas distintos quando seus cromossomos são diferentes em estrutura e conteúdo gênico, de forma que não pareiam na meiose quando reunidos em um híbrido. Esse comportamento leva à esterilidade e, conseqüentemente, ao isolamento genético entre as espécies.

Chapman e Kimber (1992) enfatizaram que a análise meiótica aplicada ao estabelecimento das relações genômicas apresenta vantagens teóricas e práticas sobre outros métodos que comparam, direta ou indiretamente, o DNA de diferentes espécies. Kimber, Alonso e Salle (1981) e Kimber e Yen (1990) compartilham dessa opinião quando citam que, para estudos meióticos, a demanda de equipamentos e reagentes químicos é menor do que a necessária para estudos moleculares e, ainda, porque o estudo do comportamento meiótico permite acessar uma porção maior do DNA, melhor representada entre e dentro dos cromossomos. Os autores acrescentaram que os resultados obtidos com esses estudos são de relevância para a genética de populações, preservação de recursos genéticos e para o melhoramento, pois a demonstração de que dois genomas são suficientemente similares exibindo pareamento na meiose, é a evidência direta de que pode haver fluxo gênico entre eles, por meio de recombinação.

A análise genômica tem sido amplamente empregada na elucidação de posicionamentos taxonômicos e filogenéticos, sobretudo em espécies de importância agrônoma como aquelas pertencentes aos gêneros *Triticum*, *Brassica*, *Gossypium* e *Oryza* (Chapman e Kimber, 1992).

A contribuição mais efetiva da análise genômica, em termos de conhecimento da história evolutiva, foi para a tribo Triticeae, com especial referência aos gêneros *Triticum* e *Aegilops* (Kihara citado por Seberg e Petersen, 1998; Singh, 1993; Gupta, 1991), *Hordeum* (Bothmer, Flink e Landstrom, 1989a e 1989b) e *Elymus* (Aung e Walton, 1990; Salomon, 1993). As informações citogenéticas obtidas permitiram uma melhor manipulação do germoplasma disponível, possibilitando explorar a variabilidade genética e contribuir com o aumento da produção e melhor adaptação das espécies às diferentes condições ambientais.

Ao considerar o pareamento cromossômico como principal fonte de informação para análise genômica, deve-se levar em conta as diferentes configurações apresentadas pelos cromossomos durante as diacineses e metáfases I para, então, definir o grau de afinidade entre os genomas das espécies parentais. Baseado nisso, Singh (1993) apresentou três tipos de pareamento, os quais denominou de intragenômico, intergenômico e mínimo e variável.

O pareamento intragenômico ocorre quando as espécies parentais apresentam genomas semelhantes, de tal forma que os híbridos exibem pareamento completo ou quase completo em 75% a 100% dos meiócitos. Algumas vezes, os genomas das espécies podem diferir devido a translocações ou inversão paracêntricas.

No pareamento intergenômico, as configurações cromossômicas dependem do grau de afinidade genômica das espécies parentais. Se estas são distantemente relacionadas é comum a formação de univalentes, como resultado

de diferenças estruturais entre os cromossomos. Híbridos gerados de parentais com genomas dissimilares geralmente são estéreis, frágeis e com pouco crescimento vegetativo e reprodutivo.

O pareamento mínimo e variável (homeólogo - semi-homólogo) é comum em híbridos intergenômicos, mas pode ocorrer também nos intragenômicos. Nesses casos, podem ser também formados bivalentes normais, mas fracamente associados, sugerindo que existe pouca afinidade cromossômica. É preciso considerar que, quanto maior o número de univalentes, menor a afinidade genômica.

Singh (1993) relatou também o pareamento em esquema *Drosera*, o qual foi observado por Rosenberg, em 1909 em híbridos de *Drosera longifolia* ($2n=4x=40$) x *Drosera rotundifolia* ($2n=2x=20$), que exibiam 7 bivalentes + 7 univalentes como configurações cromossômicas predominantes na metáfase I. Krishnaswamy e Raman (1954) propuseram que os híbridos entre milho e capim-elefante também exibem pareamento tipo *Drosera*, devido à frequente formação de 7 bivalentes e 7 univalentes.

Além do pareamento nas diacineses e metáfases I, os estágios subsequentes da meiose devem ser observados nas análises genômicas. Avaliações a partir da anáfase I podem fornecer informações sobre as propriedades dos cromossomos envolvidos, mostrando-se úteis no diagnóstico de irregularidades (Sybenga, 1992). Anormalidades controladas geneticamente (assinapses, dessinapses, diferentes tipos de restituição nuclear, ausência de citocinese) também precisam ser observadas nos estudos meióticos, cuja finalidade é análise genômica.

A utilização de dados de pareamento cromossômico em filogenia é questionada por alguns autores. Jackson (1991) mencionou que é preciso ter precaução ao relacionar a afinidade genômica e a taxonomia, referindo-se ao controle genético do pareamento. O autor citou como exemplo os resultados com

mutantes PC (controle do pareamento) e as análises clássicas no trigo com o gene Ph e seus alelos que mostram que um único gene mutante converte um bivalente de um aloploplóide em univalente e multivalente.

Seberg e Petersen (1998) apontaram 4 razões para sustentar suas críticas em relação à utilização da análise genômica em filogenia: 1) a falta de relação entre o conceito de homologia na análise genômica e o conceito clássico em morfologia e sistemática molecular; 2) a possível influência do ambiente, de genes específicos e dos cromossomos B sobre o pareamento; 3) a magnitude e padrão de variação do pareamento cromossômico em híbridos; 4) o problema de identificação dos pareamentos durante a meiose.

Com base no exposto, parece razoável que a avaliação exclusiva das configurações de pareamento não seja empregada como prova contundente para o estabelecimento das relações filogenéticas, mas sim um indicativo da proximidade genética a ser associado com outras informações sobre as espécies.

A utilização da afinidade genômica tem sua maior aplicabilidade no melhoramento genético, pois mostra diferentes possibilidades de transferência de alelos e pode ser útil na seleção de genótipos (Seberg e Petersen, 1998).

2.4.1 Modelos matemáticos aplicados à análise genômica

A fim de estimar o pareamento preferencial em híbridos triplóides ou com nível de ploidia superior, vários modelos matemáticos foram descritos (Driscoll, Gordon e Kimber, 1980; Alonso e Kimber, 1981; Jackson e Casey, 1982; Jackson e Hauber, 1982; Sybenga, 1988; Crane e Sleper, 1989; Chapman e Kimber, 1992; Sybenga, 1994).

Para formar a base pragmática dos modelos, em geral, aceitam-se várias simplificações a respeito do processo meiótico e que são empregadas pela maioria dos autores. A primeira delas considera que cada braço cromossômico representa um elemento pareado independente, não influenciado pelo

pareamento do outro braço. A segunda pressuposição é que o pareamento de um braço cromossômico exclui qualquer envolvimento de um terceiro. Isso deriva de observações de que em muitos híbridos predominam figuras meióticas simples (em bastão ou anel). As figuras mais complexas indicam translocações e como, geralmente, são eventos raros, acabam sendo negligenciadas pelos modelos. A última consideração é a de que a tendência de pareamento entre braços homeólogos de dois genomas é a mesma, independente dos grupos homeólogos ou braços cromossômicos que representam (Chapman e Kimber, 1992). Em alguns casos, os modelos empregam diferentes variáveis que refletem nas estimativas obtidas.

Os principais termos e definições empregados na análise genômica são apresentados por Kimber, Alonso e Sallee (1981) e Chapman e Kimber (1992).

No modelo proposto por Menzel e Martin (1970) obtém-se um Índice de Afinidade Genômica (IAG) a partir da frequência média de bivalentes (e multivalentes) dividida pelo número básico de cromossomos para definir genomas e estimar seus relacionamentos. Na meiose de híbridos F1 com pareamento completo ou quase completo, o IAG varia de 0,9 a 1,0, sugerindo que os genomas das espécies parentais são similares. Híbridos intergenômicos apresentam valores de IAG com variação de 0,0 a 0,89, dependendo do grau de homologia cromossômica. Esse modelo mostrou-se adequado para estabelecer a relação de homologia cromossômica entre espécies diplóides de *Hibiscus*.

O modelo apresentado por Alonso e Kimber (1981) para análise da associação cromossômica em híbridos triplóides preconiza que há uma relação simétrica entre os genomas, em que os genomas 1 e 2 são mais relacionados (não necessariamente homólogos) com uma afinidade relativa de x e ambos são distantemente relacionados ao genoma 3, com uma afinidade relativa y , de forma que $x > y$. A proporção entre os genomas (1:2) (1:3) e (2:3) é $x:y:y$. Para relacionar as duas variáveis, considera-se $x + 1 = y$, em que x varia de 0,5 a 1,0.

Esse modelo requer o registro do número de univalentes, bivalentes em anel e em bastão e trivalentes. Essa informação é importante, pois a formação de bivalentes em anel e trivalentes é inversamente relacionada. A ocorrência de trivalentes reduz o número de bivalentes em anel e univalentes e deve ser esperada, exceto quando $x=1$.

Se o número de trivalentes observados é maior do que o número de bivalentes em anel ($x < 0,8$), então o híbrido deve ser classificado como 3:0, em que todos os seus genomas são idênticos (autopoliplóide) ou são diferentes (alopoliplóides). Se o número de trivalentes é menor do que o de bivalentes em anel, o grau de homologia é duvidoso e os valores da afinidade relativa (x) e a frequência média com que dois braços cromossômicos relacionados pareiam (c) devem ser considerados. Já os híbridos do tipo 2:1 apresentam dois genomas mais relacionados e ambos apresentam menor afinidade com o terceiro genoma (Alonso e Kimber, 1981).

Chapman e Kimber (1992) revisaram a teoria do modelo de Alonso e Kimber (1981) e eliminaram a tendência que existia na estimativa da afinidade relativa (x), usando a média ponderada das frequências das figuras meióticas calculadas e observadas pelo número de cromossomo em cada tipo de figura. Essa tendência na estimativa de x do modelo de Alonso e Kimber (1981) seria fornecida pela frequência dos univalentes, pois a mesma consideração é dada para um univalente como para um trivalente.

No modelo de Sybenga (1988), as afinidades entre os três genomas reunidos em um híbrido triploide são representadas separadamente, considerando as três combinações possíveis entre três cromossomos. Essa condição produz uma série de possibilidades para cada fator de afinidade, estimado como fatores de pareamento preferencial (p). Assim, existem três valores de p , um para cada uma das três possíveis combinações: p_1 , p_2 e p_3 . Quando um valor de p é positivo (frequência de pareamento $>$ em relação a um

terceiro), isso deve ser compensado pelo valor negativo, para uma ou ambas, das outras combinações.

Crane e Sleper (1989) propõem o uso de nove variáveis envolvendo todas as possibilidades de pareamento entre os três genomas. A consequência é que obtêm-se vários parâmetros de afinidade, em vez de um único resultado, pois existem mais variáveis do que graus de liberdade nos dados dos quais eles são estimados.

Para Chapman e Kimber (1992), a complexidade do modelo de Crane e Sleper (1989) não se justifica, pois eles utilizam as mesmas simplificações classicamente aceitas pela análise genômica. Além disso, na comparação feita entre os dois modelos, as relações genômicas obtidas não foram expressivamente diferentes. Seberg e Petersen (1998) também concordam com essa opinião.

Na revisão feita por Seberg e Petersen (1998), várias críticas são feitas à aplicação dos modelos matemáticos, principalmente quando os resultados são extrapolados para definições de relações evolutivas. Ao assumir as pressuposições clássicas da análise genômica, os modelos tendem a dar uma idéia simplificada do processo meiótico. Os autores citaram, por exemplo, o fato dos modelos assumirem que todos os grupos homeólogos apresentam comportamentos idênticos, negligenciam as translocações e assumem a relação direta de ocorrência entre pareamento e quiasmas.

2.4.2 Análise genômica em *Pennisetum*

A relação genômica em *Pennisetum* foi estudada em um híbrido entre o milho e o capim-elefante por Jauhar (1968 e 1981). O estudo das relações cromossômicas inter e intragenomas nesses híbridos é favorecido porque o milho é a espécie da Tribo Paniceae que apresenta os maiores cromossomos,

facilitando a sua identificação nos híbridos F1 e permitindo a determinação do pareamento auto e alossindético (Burton, 1944; Jauhar, 1968 e 1981).

Segundo Jauhar (1968), o pareamento alossindético ocorre entre os cromossomos do genomas A do milheto e A' do capim-elefante e é responsável pela formação da maioria dos bivalentes, distintamente heteromórficos, no híbrido. O pareamento autossindético foi observado dentro dos três genomas (A, A' e B), com maior predominância entre os cromossomos do genoma A.

Para esse autor, a formação de bivalentes intragenômicos indica que ocorreu duplicação dos cromossomos do milheto. As sinapses intra-haplóides poderiam ser atribuídas à homologia existente entre 4 cromossomos do complemento que podem ter se originado como resultado de duplicações durante o curso da evolução das espécies. Entretanto, para Kimber e Riley (1963) e Riley (1966), o fato dos bivalentes autossindéticos com um ou dois quiasmas serem formados regularmente em 40% das células avaliadas por Jauhar (1968), descarta a possibilidade que tal pareamento seja devido aos segmentos duplicados, pois a relação direta entre homologia e formação de quiasmas já está bem estabelecida.

Outra evidência apresentada por Jauhar (1968) em favor da afinidade intragenômica surge da tendência de 4 bivalentes no milheto exibirem associação secundária em dois grupos na diacinese e metáfase I. A partir dessas observações, Jauhar (1968) argumentou que o milheto não parece ser um "diplóide verdadeiro", mas sim um "diplóide secundário", cujo número básico de cromossomos igual a 7 derivou do número básico original ou primário igual a 5.

A tendência de pareamento inter e intragenomas parece ter um ponto de apoio no número básico de cromossomos. É provável que o genoma A do milheto e A' do capim-elefante tenham se originado de um genitor comum ou de espécies relacionadas com $x=5$. O fato das duas espécies cruzarem facilmente

confirma que são relacionadas filogeneticamente. O genoma B, contudo, pode ter se originado de uma espécie diferente, mas que também apresentava $x=5$. Em *Pennisetum*, a espécie *P. ramosum* apresenta $x=5$ cromossomos, o que contribui para sustentar essa hipótese (Jauhar, 1968 e 1981).

As observações de Sethi, Kalia e Ghai (1970) e Sree Ramulu (1971) não confirmam a ocorrência de pareamento intragenômico. Pantulu (1967), como já mencionado, conseguiu diferenciar, no paquíteno, os cromossomos com knobs oriundos do capim-elefante dos cromossomos sem knobs do milho e concluiu que o pareamento ocorreu entre os cromossomos do milho e seus homólogos do genoma A' do capim-elefante. Hanna (1979) também não citou qualquer tipo de pareamento entre os cromossomos do milho no híbrido.

Apesar de existirem estas descrições a respeito das relações de pareamento entre os genomas do capim-elefante e do milho, nenhum estudo foi feito aplicando modelos matemáticos a fim de estimar quantitativamente a afinidade genômica nos híbridos triplóides interespecíficos.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. C. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimutagênicos. 2002. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

AKEN'OVA, M. E.; CHHEDA, H. R. Effects of storage on viability of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pollen. *The Nigerian Agricultural Journal*, Ibadan, v. 7, n. 1, p. 111-114, 1970.

ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology*, Baltimore, v. 44, p. 117-122, 1969.

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology*, Baltimore, v. 55, p. 13-18, 1980.

ALONSO, L. C.; KIMBER, G. The analysis of meiosis in hybrids. II. Triploid hybrids. *Canadian Journal of Genetic Cytology*, Ottawa, v. 23, n. 2, p. 221-234, 1981.

AUNG, T.; WALTON, P. D. Morphology and cytology of the reciprocal hybrids between *Elymus trachycaulus* and *Elymus canadensis*. *Genome*, Ottawa, v. 33, n.1, p. 123-130, 1990.

AYYANGAR, G. N. R.; RAO, V. P. Pollen dummy. *Current Science*, Bangalore, v. 19, p. 315, 1935.

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

BODEN R. W. Handling and storage of pollen in *Eucalyptus* breeding. *Australian Forestry*, Camberra, v.12, n.2, p.73-81, 1958.

BOTHMER, R. von; FLINK, N.; LANDSTROM, T. Meiosis in interspecific *Hordeum* hybrids. VI. Hexaploid hybrids. *Evolutionary Trends in Plants*, Leamington, v.3, n. 1, p. 53-58, 1989a.

BOTHMER, R. von; FLINK, N.; LANDSTROM, T. Meiosis in interspecific *Hordeum* hybrids. V. Pentaploid hybrids. *Hereditas, Landskrona*, v.110, n. 3, p. 217-226, 1989b.

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

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

BURTON, G. W. Hybrids between napier grass and cattail millet. *Journal of Heredity, Washington* v. 35, p. 227-232, 1944.

BURTON, G. W.; POWELL, J. B. Pearl millet breeding and cytogenetics. *Advances in Agronomy, New York*, v.20, p. 49-89, 1968.

CANGIANI, S. M. P. Extração e armazenamento de pólen em *Eucalyptus camaldulensis*. In: _____Circular Técnica. Instituto de pesquisa e estudos florestais, n. 162, 1988.

CARDOSO, M. B.; KALTCHUK-SANTOS, E.; MUNDSTOCK, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Viabilidade do pólen em anteras de soja cultivadas *in vitro*. In: GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY, 46, 2000, Águas de Lindóia. Programa e Resumos...Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, 2000. p. 376.

CHAPMAN, C. G. D.; KIMBER, G. Developments in the meiotic analysis of hybrids. I. Review of theory and optimization in triploids. *Heredity, Oxford*, v. 68, n.2, p. 97-103, 1992.

CHAUDHURY, R.; SHIVANNA, K. R. Studies on pollen storage of *Pennisetum typhoides*. *Phytomorphology, New Dehli*, v. 36, p. 211-218, 1986.

CRANE, C. F. Numerical meiotic models for the interference of genomic affinity in polyploids. In: JAUHAR, P. P. (eds.). *Methods of genome analysis in plants*. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 61-79.

CRANE, C. F.; SLEPER, D. A. A model of meiotic chromosome association in triploids. *Genome, Ottawa*, v. 32, n. 1., p. 82-98, 1989.

DEWEY, D. R. Genomic and phylogenetic relationships among North American perennial Triticeae. In: ESTES et al. (eds.) Grasses and grasslands. Oklahoma, University of Oklahoma Press, 1982. p. 51-81.

DRISCOLL, C. J.; GORDON, G. H.; KIMBER, G. Mathematics of chromosome pairing. *Genetics*, Baltimore, v. 95, n.1, p. 159-169, 1980.

DUJARDIN, M.; HANNA, W. W. Crossability of pearl millet with *Pennisetum* species. *Crop Science*, Madison, v. 29, n.1, p. 77-80, 1989.

FELDMAN, M. The effect of chromosome 5B, 5D and 5A on chromosomal pairing in *Triticum aestivum*. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of American*, Washington, v. 55, n.6, p. 1447-1453, 1966.

GABRIELLI, A. C.; CUNHA, R. A. ; MAULE, V. Conservação do pólen de diversas espécies de *Eucalyptus* para fins de cruzamento. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v. 40, n. 2, p. 52-57, 1965.

GUPTA, P. K. Cytogenetics of wheat and its close wild relatives - *Triticum* and *Aegilops*. In: GUPTA, P. K.; TSUCHIYA, T. (Eds.) *Chromosome engineering plants: genetics, breeding, evolution*. New York: Elsever, 1991. Part A, p. 243-262.

HANNA, W. W. Interspecific hybrids between pearl millet and fountain grass. *Journal of Heredity*, Washington, v. 70, n.6, p. 425-427, 1979.

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

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. 1, p. 969-971, 1984.

HANNA, W. W.; DUJARDIN, M.; OZIAS-AKIN, P.; ARTHUR, L. Transfer of apomixis in *Pennisetum*. In: _____ *Proc. of Apomixis Workshop*. Springfield: National Technical Service, 1992. p. 30-33.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, Utrecht, v. 20, p. 509-517, 1971.

HAUSER, E. J. P.; MORRISON, J.H. The cytochemical reduction of nitro blue

tetrazolium as an index of pollen viability. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 51, n. 7, p. 748-752, 1964.

JACKSON, R. C.; CASEY, J. Cytogenetic analyses of autopolyploids: models and methods for triploids to octoploids. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 69, n. 4, p. 487-501, 1982.

JACKSON, R. C.; HAUBER, D. P. Autotriploid and autotetraploid analyses: correction coefficients for proposed binomial models. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 69, n. 4, p. 644-646, 1982.

JACKSON, R. C. Cytogenetics of polyploids and their diploid progenitors. In: In: GUPTA, P. K.; TSUCHIYA, T. (Eds.) *Chromosome engineering plants: genetics, breeding, evolution*. New York: Elsevier, 1991. Part A, p. 159-180.

JAUHAR, P. P. Inter- and intra-genomal chromosome pairing in an inter-specific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. *Genetica*, Dordrecht, v. 39, n. 3-4, p. 360-370, 1968.

JAUHAR, P. P. Cytogenetics of pearl millet. *Advances in Agronomy*, New York, v. 34, p. 407-479, 1981.

JAUHAR, P. P.; HANNA, W. W. Cytogenetics and genetics of pearl millet. *Advances in Agronomy*, New York, v. 64, p. 1-26, 1998.

KATIVU, S.; MITHEN, R. *Pennisetum* in Southern Africa. *Plant Genetics Research Newsletter*, Rome, v.73/74, n.1, p. 1-8, 1987.

KIMBER, G.; RILEY, R. Haploid angiosperms. *Botanical Review*, Bronx, v. 29, n. 4, p. 480-531, 1963.

KIMBER, G.; ALONSO, L. C.; SALLEE, P. J. The analysis of meiosis in hybrids. I. Aneuploid hybrids. *Canadian Journal of Genetic Cytology*, Ottawa, v. 23, n. 2, p. 209-219, 1981.

KIMBER, G.; YEN, Y.. The genomic analysis of diploid plants. *Proceedings of the National Academy Science of the United States*, Washington, v. 87, n. 8, p. 3205-3209, 1990.

KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V. S.; NAIR, N. H. An autotetraploid in pearl millet. *Current Science*, Bangalore, v. 19, p. 252-253, 1950.

- KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V. S. Studies on the interspecific hybrid of *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. x *P. purpureum* Schumach. III. The cytogenetics of the colchicine-induced amphidiploid. *Genetica*, Dordrecht, v. 27, n. 1/2, p. 253-272, 1954.
- KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V. S. Studies on the interspecific hybrid of *Pennisetum typhoides* x *P. purpureum* IV. Cytogenetics of the allotetraploids. *Genetica*, Dordrecht, v. 28, n. 3/4, p. 345-360, 1956.
- LOBANA, K. S.; GILL, B. S. Pachytene chromosomes of *Pennisetum typhoides*. *Cytologia*, Tokyo, v. 38, n. 4, p. 713-717, 1973.
- MARTEL, E.; RICHROCH, A.; SARR, A. Assessment of genome organization among diploid species ($2n=2x=14$) belonging to primary and tertiary gene pools of pearl millet using fluorescent in situ hybridization with rDNA probes. *Genome*, Ottawa, v. 39, n. 4, p. 680-687, 1996.
- MENZEL, M. Y.; MARTIN, D. W. Genome affinities of four african diploid species of *Hibiscus* sect. *Furcaria*. *Journal of Heredity*, Washington, v. 61, n. 5, p. 179-184, 1970.
- MINOCHA, J. L. Pearl millet cytogenetics. In: GUPTA, P. K.; TSUCHIYA. *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. New York: Elsevier, 1991. Part A, p. 599-611.
- OKAMOTO, M. Asynaptic effect of chromosome V, *Wheat Information Service*, Washington, v. 5, p. 6, 1957.
- OSGOOD, R. V.; HANNA, W. W.; TEW, T. L. Hybrid seed production of pearl millet x napiergrass triploid hybrids. *Crop Science*, Madison, v.37, n.3, p. 998-999, 1997.
- PANTULU, J. V. A case of chromosomal interchange in pearl millet. *Current Science*, Bangalore, v. 27, p. 497-498, 1958.
- PANTULU, J. V. Pachytene pairing and meiosis in the F1 hybrid of *Pennisetum typhoides* and *P. purpureum*. *Cytologia*, Tokyo, v. 32, n. 3/4, p.532-541, 1967.
- PANTULU, J. V. ; VENKATESWARLU, J. Morfology of the pachytene chromosomes of *Pennisetum purpureum* Schum. *Genetica*, Dordrecht, v 39, n. 1, p. 41-44, 1968.

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

PATIL, B. D.; SINGH, A. Genetic and cytogenetic improvement of *Pennisetum* and its allied species for grassland and pasture production. In: GUPTA, V. P.; MINOCHA, J. L. (eds.). *Trends in Genetics Research in Pennisetums*. Ludhiana: Punjab Agric. Univ., 1980. p. 112-122.

PEDROZO, C. A.; SOUZA, T. M.; DAVIDE, L. C.; TECHIO, V. H.; PEREIRA, A. V. Estimativa da viabilidade de pólen em *Pennisetum* spp.. In: CONGRESSO DA PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 10, 2001, Lavras. Programa e Resumos... Lavras: Universidade Federal de Lavras/ Capes, 2001. 1 CD-ROM.

✓ PEREIRA, A. V.; VALLE, C. B.; FERREIRA, R. P.; MILES, J.W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L. et al. Recursos genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.

PFAHLER, P. L.; PEREIRA, M. J.; BARNETT, R. D. Genetic variation for in vitro sesame pollen germination and tube growth. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.95, n. 8, p. 1218-1222, 1997.

POWELL, J. B.; BURTON, G. W. Nucleolus-organizing accessory chromosomes in pearl millet, *Pennisetum typhoides*. *Crop Science*, Madison, v.6, n.2, p.131-134, 1966.


RAU, N. S. On the chromosome numbers of some cultivated plants of south India. *Journal of the Indian Botanical Society*, Madras, v. 8, n. 2, p. 126-128, 1929.

RILEY, R. The secondary pairing of bivalents with genetically similar chromosomes. *Nature*, London, v. 185, n. 4715, p. 751-752, 1966.

RILEY, R.; LAW, C. N. Genetic variation in chromosome pairing. *Advances in Genetics*, New York, v. 13, p. 57-114, 1965.

ROBERT, T.; LESPINASSE, R.; PERNÈS, J.; SARR, A. Gametophytic competition as influencing gene flow between wild and cultivated forms of pearl millet (*Pennisetum typhoides*). *Genome*, Ottawa, v. 34, n.5, p. 195-200, 1991.

- ↘ SALOMON, B. Interspecific hybridizations in the *Elymus semicostatus* group (Poaceae). *Genome, Ottawa*, v. 36, n.5, p. 899-905, 1993.
- ↘ SEARS, E. R. Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Annual Review in Genetics, Palo Alto*, v. 10, p. 31-51 1976.
- SEBERG, O.; PETERSEN, G. A critical review of concepts and methods used in classical genome analysis. *The Botanical Review, Bronx*, v. 64, n. 4, p. 372-417, 1998.
- SETHI, G.S.; KALIA, H. R.; GHAI, B. S. Cytogenetical studies of three interspecific hybrids between *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. and *P. purpureum* Schumach. *Cytologia, Tokyo*, v. 35, n.1, p. 96-101, 1970.
- SHIVANNA, K.R.; RANGASWAMY, N.S. *Pollen biology*. Berlin: Springer-Verlag, 1982. 119 p.
- SINGH, R. J. *Plant cytogenetics*. Florida: CRC Press, 1993. 391 p.
- SREE RAMULU, K. Meiosis and fertility in derivatives of amphiploid *Pennisetum*. *Caryologia, Firenze*, v. 21, n.2, p. 147-156, 1968.
- SREE RAMULU, K. Cytomorphology of the progeny of a raw allopolyploid in *Pennisetum*. *Cytologia, Tokyo*, v. 36, n.6, p. 652-668, 1971.
- SREE RANGASAMY, S. R. Cytological studies on diploid and polyploid taxa of the genus *Pennisetum* Rich. *Genetica, Dordrecht*, v. 43, p. 257-273, 1972.
- STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. *Pollen biology biochemistry management*. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307 p.
- ↘ SUJATHA, D. M.; MANGA, V.; SUBBA RAO, M. V.; MURTY, J. S. R. Meiotic studies in some species of *Pennisetum* (L.) Rich. (Poaceae). *Cytologia, Tokyo*, v. 54, n.6, p. 641-652, 1989.
- SYBENGA, J. Mathematical models for estimating preferential pairing and recombination in triploid hybrids. *Genome, Ottawa*, v. 30, n.5, p. 745-757, 1988.
- SYBENGA, J. *Cytogenetics in plant breeding*. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 469 p.



SYBENGA, J. Preferential pairing estimates from multivalent frequencies in tetraploids. *Genome*, Ottawa, v. 37, n.6, p. 1045-1055, 1994.

TAYLOR, L. P.; HEPLER, P. K. Pollen germination and tube growth. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 48, p. 461-491, 1997.

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

VENKATESWARLU, J.; PANTULU, J. V. The cytological behaviour of B-chromosomes in *Pennisetum typhoides*. *Cytologia*, Tokyo, v. 35, p. 444-448, 1968.

CAPÍTULO 2

MEIOSE EM *Pennisetum purpureum*, *P. glaucum* E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS

RESUMO

TECHIO, Vânia Helena. Meiose em *Pennisetum purpureum*, *P. glaucum* e híbridos interespecíficos. In: _____ Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp. 2002. Cap. 2, p. 34- 84. Tese (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

P. purpureum - capim-elefante ($2n=4x=28$, A'A'BB) e *P. glaucum* - milho ($2n=2x=14$, AA) são espécies cultivadas e sexualmente compatíveis. A possibilidade de hibridação entre ambas favorece a ampliação da base genética desse gênero e a introgressão de alelos de interesse em programas de melhoramento genético. O maior problema em relação à utilização dos híbridos interespecíficos é a infertilidade, que limita o seu emprego nos cruzamentos. A sua condição triploide ($2n=3x=21$, AA'B) tem sido apontada como a principal causa da esterilidade. Este trabalho objetivou descrever a meiose em acessos híbridos de capim-elefante e milho e seus parentais, detalhando os aspectos citogenéticos envolvidos na sua esterilidade, bem como estimar a viabilidade do pólen e correlacioná-la com as irregularidades e com a instabilidade meiótica fornecida pelo índice meiótico. As panículas foram coletadas e preparadas de acordo com o protocolo convencional para estudos meióticos, empregando carmim propiônico 0,5%. Para viabilidade do pólen utilizou-se o corante de Alexander e indução de germinação em meio de cultura. Os acessos de milho apresentaram meiose regular com 7 bivalentes e alta viabilidade do pólen demonstrada por meio de coloração. Para os acessos de capim-elefante observaram-se 14 bivalentes nas diacineses e metáfases I. Entretanto, os acessos BAG 63 e BAG 91 também apresentaram univalentes e trivalentes. O acesso BAG 63, oriundo de cultura de tecidos, apresentou maior frequência de anormalidades meióticas. Em relação à germinação *in vitro*, o milho e o capim-elefante exibiram uma frequência reduzida de pólenes funcionais, mostrando inabilidade para emitir o tubo polínico nas condições artificiais do meio de cultura. Os três acessos híbridos de capim-elefante e milho apresentaram alta taxa de anormalidades caracterizadas pela segregação irregular dos cromossomos que resultaram na formação de grãos de pólen com número não balanceado de cromossomos e inférteis. Existe uma alta correlação negativa entre a fertilidade do pólen e as irregularidades meióticas e uma correlação alta e positiva entre fertilidade-estabilidade meiótica, expressa pelo índice meiótico

* Comitê orientador: Lisete Chamma Davide - UFLA (Orientadora) e Antônio Vander Pereira - Embrapa Gado de Leite.

ABSTRACT

TECHIO, Vânia Helena. Meiosis in *Pennisetum purpureum*, *P. glaucum* and interspecific hybrids In: _____ *Meiose e análise genômica em Pennisetum spp.* 2002. Cap. 2, p. 34- 84. Thesis (Doctorate in Genetics and Plant Breeding)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

P. purpureum - elephantgrass ($2n=4x=28$, A'A'BB) and *P. glaucum* - pearl millet ($2n=2x=14$, AA) are cultivated and sexually compatible species. The possibility of hybridization between these species favors the genetic background amplification of the genus and the introgression of favorable alleles in breeding programs. The largest problem in relation to the use of the interspecific hybrids is infertility, that limits their employment in crossings. Their triploid condition ($2n=3x=21$, AA'B) has been pointed out the principal cause of sterility. This work aimed to describe the meiosis in hybrid accessions of elephantgrass and pearl millet and their parentals, detailing the cytogenetics aspects involved in their sterility, as well as to evaluate the pollen viability and to correlate it with the meiotic irregularities and instability supplied by the meiotic index. The panicles were collected and prepared according to conventional protocol for meiotic studies, using 0.5% propionic carmine. For pollen viability, Alexander's stain and germination induction in culture media were used. The pearl millet accessions presented regular meiosis with 7 bivalents and high pollen viability demonstrated through coloration. For elephantgrass accessions 14 bivalents in the diakinesis and metaphase I were observed. However, BAG 63 and BAG 91 accessions also presented univalents and trivalents. The BAG 63 accession, originated from tissue culture, presented high frequency of meiotic abnormalities. In relation in vitro germination, pearl millet and elephantgrass presented a reduced frequency of functional pollen, showing inability to emit pollen tube in the artificial conditions of the culture media. The three hybrid accessions presented a high frequency of abnormalities characterized by irregular segregation of chromosomes that resulted in the formation of infertile pollen with non balanced chromosome number. There is a high negative correlation between pollen fertility and meiotic irregularities and a high and positive correlation between fertility-meiotic stability, expressed by the meiotic index.

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

2.1 INTRODUÇÃO

Os primeiros relatos de estudos citogenéticos em *Pennisetum* foram feitos por Rau (1929) e Avdulov (1931), seguidos por outros autores (Burton, 1942; Veyret, 1957, Burton e Powell, 1968; Jauhar, 1968 e 1981; Harlan e de Wet, 1971), que estabeleceram número básico de cromossomos como $x=5, 7, 8$ e 9 e dividiram as espécies em três conjuntos gênicos e em diferentes níveis de ploidia variando de diplóide a octaplóide.

Entre as espécies de *Pennisetum*, as de maior importância econômica são *P. glaucum* (milheto), utilizada como cereal e forrageira e *P. purpureum* (capim-elefante), como forrageira. O milheto é anual, alógama com $2n=2x=14$ e genoma AA e integra o conjunto gênico primário, juntamente com *P. violaceum* e *P. mollissimum*. O capim-elefante é perene, alógama com $2n=4x=28$ e genomas A'A'BB e pertence ao conjunto gênico secundário. No conjunto terciário encontram-se os demais taxa (Harlan e de Wet, 1971; Martel, Ricroch e Sarr, 1996).

O milheto e o capim-elefante, mesmo integrando conjuntos gênicos distintos e apresentando níveis de ploidia diferenciados, são compatíveis sexualmente, possibilitando a introgressão de alelos desejáveis do milheto, como, por exemplo, de resistência à seca e sementes de maior tamanho, para genótipos de capim-elefante de importância agronômica.

No entanto, o maior problema em relação à utilização dos híbridos entre o capim-elefante e o milheto é a infertilidade, que limita o seu emprego no melhoramento. A sua condição triplóide ($2n=3x=21$, genomas AA'B) tem sido apontada como a principal causa da esterilidade. Estudos meióticos realizados por Sree Rangasamy (1972), Pantulu (1967), Jauhar (1968 e 1981) têm mostrado que, geralmente, formam-se, na diacinese, sete bivalentes do pareamento dos

cromossomos dos genomas A e A' do milheto e do capim-elefante, respectivamente e sete univalentes do genoma B, provenientes do capim-elefante. Os univalentes, de maneira geral, apresentam segregação irregular, levando à formação de gametas aneuplóides.

A análise do comportamento cromossômico dos híbridos pressupõe o entendimento do comportamento citogenético dos parentais, pois diferentes combinações genéticas podem refletir graus variáveis de irregularidades nos descendentes. As descrições existentes na literatura consultada não estabelecem correlações entre a meiose dos genótipos do capim-elefante e do milheto com seus respectivos híbridos e também não descrevem com detalhes as anormalidades decorrentes da segregação irregular e se existem outros eventos envolvidos na infertilidade.

Além disso, em se tratando de análise citogenética, a exceção do milheto, para o qual são encontradas amplas revisões (Burton e Powell, 1968; Jauhar, 1981; Pantulu e Rao, 1982; Minocha, 1991; Jauhar e Hanna, 1998), para as demais espécies e híbridos são poucas as referências disponíveis.

Isto posto, este trabalho objetivou analisar a meiose em acessos híbridos de capim-elefante e milheto e seus parentais, detalhando os aspectos citogenéticos envolvidos na sua esterilidade, bem como estimar a viabilidade do pólen e correlacioná-la com as irregularidades e com a instabilidade meiótica fornecida pelo índice meiótico.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O material biológico utilizado neste estudo (Tabela 1) foi coletado nos meses de abril a julho, de 1999 a 2002, no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Forrageiras da Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco, MG. Os acessos de capim-elefante e milheto foram selecionados por apresentarem características genéticas complementares de importância forrageira.

Os dados climáticos apresentados durante o período da coleta estão apresentados na Tabela 2 e foram fornecidos pelo Setor de Meteorologia da Embrapa Gado de Leite.

TABELA 1 Espécies parentais e respectivos híbridos avaliados do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG.

Acesso	Denominação comum	Identificação
BAG 63	Cuba 169	<i>P. purpureum</i>
BAG 75	IJ 7136	<i>P. purpureum</i>
BAG 91	Pasto Panamá	<i>P. purpureum</i>
M 36	AFPOP 88	<i>P. glaucum</i>
M 24	ICMB 90111	<i>P. glaucum</i>
M 38	AFPOP 90	<i>P. glaucum</i>
CNPGL F94-44-03	BAG 63 x M 36	Híbrido interespecífico
CNPGL F94-60-01	BAG 75 x M 24	Híbrido interespecífico
CNPGL F94-49-06	BAG 91 x M 38	Híbrido interespecífico

TABELA 2 Temperatura (°C), precipitação (mm), umidade relativa (%) e insolação (horas) médias registradas pela Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG, no período de abril a julho, de 1999 a 2002.

	1999	2000	2001	2002
Precipitação	16,0	11,9	13,5	16,9
Umidade relativa	82,7	81,2	78,2	79
Temperatura média	18,8	18,2	19,5	19,7
Insolação	193,4	212,2	214,5	220,9

Para o estudo meiótico, as inflorescências foram coletadas em vários estádios de desenvolvimento entre 8h30 e 10horas, fixadas em álcool etílico: ácido propiônico (3:1) e armazenadas a -4°C , até o momento de serem utilizadas.

As lâminas foram preparadas de acordo com o protocolo convencional para estudos meióticos por meio de esmagamento e coloração com carmin propiônico 0,5%.

Para cada genótipo foram observadas 1300 células, quantificando-se as células em estágios normais e as irregularidades meióticas. Foi obtida a frequência de anormalidades para o total de células analisadas. Nos híbridos, os univalentes foram registrados como irregularidades quando excediam o padrão esperado de segregação de 7 bivalentes e 7 univalentes.

Para determinação do índice meiótico, ou seja, a porcentagem de tétrades normais, foram avaliadas 150 tétrades por acesso, sendo consideradas plantas estáveis aquelas que apresentaram índice meiótico superior a 90%, conforme sugerido por Love (1951).

A viabilidade do pólen foi estimada tanto pela capacidade de coloração dos mesmos como por meio de testes de germinação *in vitro*.

Utilizando o corante de Alexander (Alexander, 1980), foram considerados viáveis os pólenes que apresentaram coloração roxa e inviáveis aqueles corados de verde.

A germinação dos grãos de pólenes foi induzida em meio de cultura contendo 9g de sacarose, 30mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10mg de H_3BO_3 e 0,7g de ágar diluídos em 100mL de água destilada. Os grãos de pólen retirados de anteras provenientes de panículas recém-coletadas foram espalhados sobre uma placa escavada contendo o meio. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e incubadas em estufa com temperatura de 27°C , durante 3 horas. A viabilidade do pólen foi dada em função da porcentagem de pólenes germinados, sendo

considerados viáveis aqueles grãos de pólen que apresentavam tubo polínico com comprimento igual ou superior ao seu diâmetro.

Nas análises de viabilidade de pólen, foram avaliados 10 lâminas e 100 grãos de pólen por lâmina por acesso.

A associação entre as irregularidades meióticas e os valores de fertilidade e instabilidade meiótica foi avaliada por meio da correlação de Pearson.

As fotomicrografias dos meiócitos foram feitas com fotomicroscópio Olympus BX60, utilizando-se filtro verde e filmes preto e branco Kodak asa 100, revelados com D-76 (Kodak) e copiados em papel Kodabrome Print RCF3. Para as fotomicrografias dos grãos de pólen utilizaram-se filmes Kodak color asa 400.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Meiose nos acessos de milheto (*P. glaucum*) – M24, M36 e M38

Nas avaliações da meiose feitas nos três acessos de milheto (M24, M36 e M38), confirmou-se a condição diplóide com $2n=2x=14$, observando-se diacineses e metáfases I com sete bivalentes distribuídos regularmente (Figuras 1A e B). Resultados semelhantes foram descritos por Burton e Powell (1968), Jauhar (1981) e Jauhar e Hanna (1998).

A taxa de irregularidades foi muito baixa, perfazendo uma média de 0,4% (Tabela 4). Dentre essas, a ascensão precoce de cromossomos foi a mais freqüente e observada nos três acessos. Apesar disso, as fases subseqüentes da meiose não foram afetadas, revelando que esses cromossomos foram incluídos nos núcleos em formação, conforme pode ser constatado pela porcentagem de tétrades normais, expressa pelo índice meiótico e pela viabilidade do pólen (Tabela 4). Esse comportamento pode estar associado a uma característica freqüentemente observada no milheto, também relatada por Jauhar (1981) e Jauhar e Hanna (1998), que é a rápida terminalização dos quiasmas, de forma que os bivalentes, nas diacineses e metáfases I, muitas vezes, aparecem dissociados como 14 univalentes (Figura 1C e D). A maioria dos bivalentes observados nas diacineses apresenta forma de anel com quiasmas terminalizados e, freqüentemente, dois deles aparecem em forma de bastão ou abertos (presos em uma das extremidades) (Figura 1A), podendo ser atribuído a estes últimos a migração precoce na metáfase I (Figura 1C).

Na literatura já está bem estabelecido que os quiasmas, além de serem decorrentes de eventos de recombinação genética, desempenham também importante papel na manutenção da associação dos homólogos até a metáfase I, a fim de permitir a ocorrência de perfeita disjunção cromossômica (Zarchi et al.,

1972; Aguiar-Perecin, Pagliarini e Villamizar, 1985; Pagliarini, 1989; Sybenga, 1992). Esse papel de assegurar a segregação cromossômica é atribuído, principalmente, aos quiasmas terminais. Segundo alguns autores (Sybenga, 1972; Zarchi et al., 1972; Hillel, Feldman e Simchen, 1973), apenas os quiasmas intersticiais seriam efetivamente relacionados à permuta genética. Entretanto, essa informação tem sido contestada a partir de estudos com bandeamento cromossômico que revelaram que em algumas espécies, as associações cromossômicas terminais podem representar sítios de permuta genética (Jones e Tease, 1984; Rufas et al., 1988).

TABELA 4 Frequência observada (%) de células com anormalidades meióticas, índice meiótico e frequência de grãos de pólen viáveis (%) obtidos por meio de coloração e germinação *in vitro* para os acessos de milho

	Acessos		
	M36	M24	M38
Total de irregularidades	0,3	0,6	0,3
Índice meiótico	100	99,2	100
VPC ¹	100	100	100
VPG ²	47,6	6,0	6,8

¹ VPC= Viabilidade do pólen por coloração; ²VPG= Viabilidade do pólen por germinação

Também nas diacineses foi possível verificar a associação do menor bivalente ao nucléolo nos acessos M36 e M38 (Figura 1A) e dois bivalentes nucleolares no M24 (Figura 1B). Avaliações de metáfases mitóticas dos acessos M36 e M38, realizadas por Barbosa (2000), mostraram dois cromossomos portadores de satélites, enquanto que no M24 o satélite ocorria em um cromossomo.

Pantulu (1960), Jauhar (1968 e 1981) e Jauhar e Hanna (1998) mencionaram que apenas o menor par cromossômico mitótico apresenta satélite. Entretanto, para algumas variedades de origem africana avaliadas por Powell e

Burton (1966) e por Pantulu e Rao (1982), até dois pares exibiam constrição secundária em seus braços longos.

Com base nessas observações, pode-se afirmar que existe variação em relação à ocorrência de satélite entre as variedades de milheto, como resultado de rearranjos ocorridos no processo evolutivo. Estudos com bandeamento NOR e com hibridação *in situ* comparando variedades de milheto podem auxiliar nesse sentido. Recentemente, Reader, Miller e Purdie (1996) usaram hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para caracterizar o complemento cromossômico do milheto. A dupla exposição da metáfase a uma sonda de rDNA e ao DAPI permitiu observar dois locos maiores e dois menores para a RON.

Nos acessos M24 e M38 foram observadas configurações tetravalentes nas diacineses e metáfases I (Figura 1A). Jauhar (1981) descreveu esse evento como sendo associação secundária de dois bivalentes. Outra explicação para formação de multivalentes é a ocorrência de translocações, também já relatada para o milheto (Pantulu, 1968; Powell e Burton, 1969; Pantulu e Rao, 1982). No entanto, nos meiócitos dos acessos analisados, configurações em cruz no paquíteno e em anel na diacinese, típicas de translocações, raramente foram observadas.

Jauhar (1968 e 1981) sugeriu que o pareamento autossindético com a formação de bivalentes intragenômicos no milheto indica a ocorrência de duplicação de cromossomos no curso evolutivo dessa espécie. Baseado nessa suposição, o autor mencionou a possibilidade do complemento cromossômico do milheto ter derivado de um número básico primário ou original igual a cinco. Nessas condições, esses cromossomos duplicados teriam sofrido diferenciações/mutações, de modo a estabelecer o pareamento em bivalentes originando o milheto diplóide. O milheto, então, não seria considerado um diplóide "verdadeiro", mas "secundário", tendo número básico de cromossomos "secundário" igual a sete.

A análise meiótica de plantas haplóides foi feita por diversos pesquisadores (Pantulu e Manga, 1969; Manga e Pantulu, 1971; Gill, Sharma e Dhesi, 1973; Powell, Hanna e Burton, 1975 e Jauhar, 1981) com o intuito de auxiliar na determinação da constituição cromossômica do milheto. Em todos os trabalhos, verificou-se a ocorrência de dois a três bivalentes nos haplóides.

Por outro lado, Pantulu e Manga (1969), Manga e Pantulu (1971) e Gill, Sharma e Dhesi (1973) contrariaram a proposição de Jauhar (1968), sugerindo que os bivalentes (referidos como pseudobivalentes) formam pares ao acaso, como resultado da presença de segmentos homólogos entre alguns cromossomos.

Essas pressuposições permanecem sem esclarecimentos. Jauhar (1981) e Minocha (1991) sugeriram observar se o pareamento nos haplóides é acompanhado pela formação do complexo sinaptonêmico. Entretanto, esse dado parece não ter significado na determinação do complemento cromossômico do milheto, pois, de acordo com Hobolth (1981), Gillies (1984) e Hasenkampf (1984), o complexo sinaptonêmico pode estar envolvido também no pareamento de segmentos não homólogos.

Para elucidar a origem do complemento cromossômico do milheto seria recomendável utilizar a hibridação genômica *in situ* (GISH). Essa técnica já está sendo empregada no estudo do complexo *Phaseolus vulgaris* - *P. coccineus* com o objetivo de investigar a possível origem híbrida de *P. coccineus* e a relação genética entre espécies e subespécies que compõem esse complexo (Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 1996 e 1998). Os resultados desses estudos têm mostrado um alto grau de homologia genética entre os membros desse grupo.

Estudos moleculares também podem contribuir na identificação de regiões duplicadas no genoma do milheto. Um trabalho conduzido por Liu et al.

(1994) mostrou alguns locos duplicados no mapa de ligação obtido com RFLP para o milho.

Em relação à viabilidade do pólen, os testes de coloração mostraram que os acessos de milho apresentam alta taxa de fertilidade (Tabela 4 e Figura 1E). Tais resultados foram superiores aos obtidos para essa espécie por Sree Ramulu (1968), Sethi, Kalia e Ghai (1970) e Sujatha et al. (1989), cujos valores variaram de 87% a 97%.

A máxima viabilidade observada com a coloração nos acessos de milho analisados (Tabela 4 e Figura 1E) pode estar associada ao horário da coleta, padronizado entre 8:30 e 10 horas. Nesta ocasião, as anteras começam a se tornar deiscentes, levando a crer que a viabilidade atinja seu ponto máximo nessa fase, apresentando maior disponibilidade de pólenes férteis.

Para viabilidade de pólen observada pela emissão do tubo polínico em meio de cultura, os acessos de milho exibiram uma baixa frequência de pólenes funcionais (Tabela 4 e Figura 1F). Vários testes foram realizados utilizando meios de cultura com composição e concentrações diferentes e os resultados de baixa viabilidade persistiram.

Esse comportamento é compatível com a descrição feita por Ayyangar e Rao (1935). Segundo esses autores, os grãos de pólen do milho e de espécies de *Andropogon* e *Sorghum* plasmolisam e não germinam em meio de cultura. Chaudhury e Shivanna (1986) descreveram, também para o milho, uma taxa reduzida de pólenes germinados *in vitro*, cuja frequência foi de 57,6%, 18,1% e 12% para três amostras.

Uma das explicações para esse comportamento é o fato de que a maioria dos grãos de pólen de gramíneas perde viabilidade rapidamente (Stanley e Linsken, 1974). Portanto, é possível que após a coleta, os grãos de pólen tenham deteriorado rapidamente pela exposição às condições ambientais mostrando-se incapazes de emitir tubo polínico. Para gramíneas, Kihara (1982)

recomendou que o acompanhamento da germinação seja feito por meio de observações *in vivo* das interações pólen-pistilo.

Outro aspecto que precisa ser considerado é que o comportamento do pólen varia consideravelmente entre indivíduos de uma mesma espécie e entre amostras de um mesmo indivíduo. A taxa de viabilidade obtida com germinação *in vitro* para o acesso M36 (Tabela 4) ilustra bem essa situação, se compararmos aos demais acessos. O período de florescimento e os diferentes horários de coletas, bem como alterações ambientais e diferenças genotípicas, podem contribuir para tal variabilidade (Shivanna e Rangaswamy, 1992).

A viabilidade e a longevidade dos grãos de pólen também dependem da sua composição celular. Shivanna e Rangaswamy (1992) descrevem que a maior limitação dos testes de germinação *in vitro* é a dificuldade em obter uma germinação satisfatória em muitas espécies, principalmente aquelas que apresentam grãos tricelulares, como é o caso da família Poaceae. Esse tipo de grão de pólen respira e germina mais rapidamente e apresenta menor longevidade do que os bicelulares (Hanna e Towill, 1995).

Embora, em condições artificiais, o milho apresente queda no poder germinativo do grão de pólen, a reduzida taxa de irregularidades meióticas e o índice meiótico mostram que os acessos avaliados são estáveis meioticamente (Tabela 4), confirmando que são genótipos recomendáveis para os programas de hibridação.

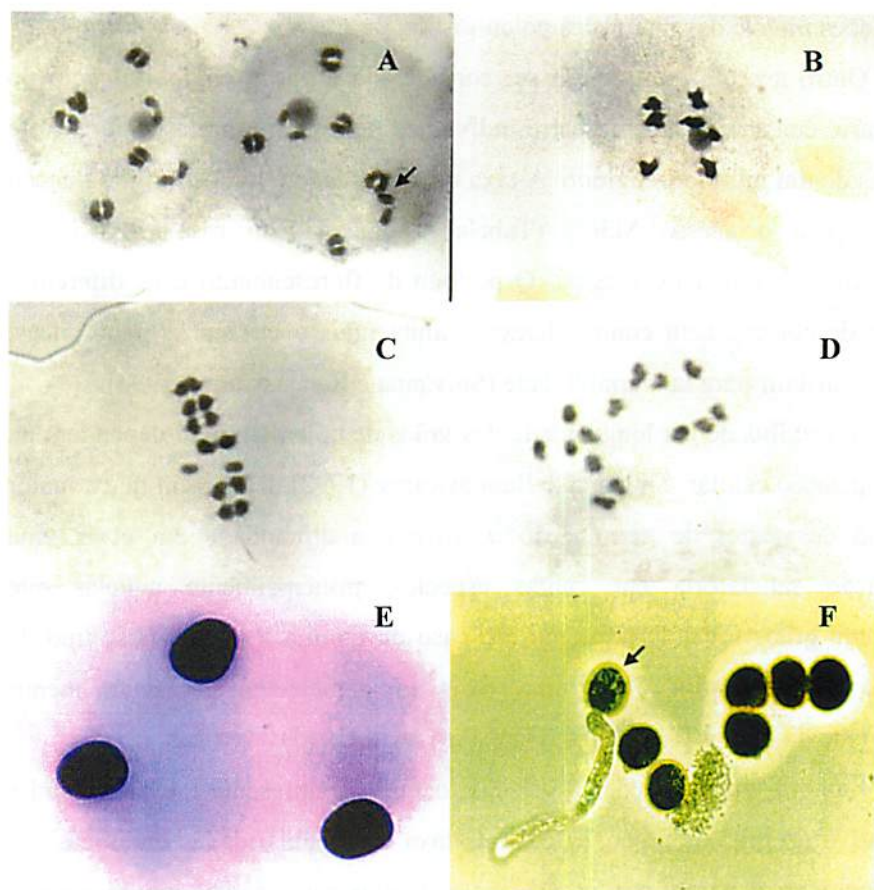


FIGURA 1 Meiócitos e grãos de pólen de acessos de milho (*P. glaucum*). A. Diacinese com 7 bivalentes, sendo 1 bivalente nucleolar e diacinese com configuração tetravalente (seta); B. Diacinese com 7 bivalentes, sendo dois ligados ao nucléolo; C. Metáfase I com terminalização precoce de cromossomos e em D. com 14 univalentes; E. Pólens viáveis corados - corante de Alexander e F. Pólens viável (seta) e inviáveis - germinação *in vitro*.

2.3.2 Meiose nos acessos de capim-elefante (*P. purpureum*) – BAG 63, BAG 75 e BAG 91

A freqüente formação de 14 bivalentes nas diacineses e metáfases I dos acessos avaliados (Figuras 2A e C) confirma, que apesar de ser alotetraplóide, o capim-elefante comporta-se, em termos de segregação cromossômica, como um típico diplóide, conforme já haviam relatado Jauhar (1968 e 1981) e Sujatha et al. (1989). Com base nesse comportamento, depreende-se que essa espécie, assim como o trigo (Riley e Chapman, 1958; Sears, 1976), pode apresentar gene(s) supressor(es) do pareamento homeólogo que impede(m) a formação de multivalentes e garantem a sua diploidização.

A exemplo do que ocorre no trigo alohexaplóide (*Triticum aestivum*), no zigóteno poderia haver a formação de multivalentes e, antes da permuta genética, ocorreria a “transformação” em bivalentes, garantindo a segregação regular dos cromossomos e a herança dissômica (McGuire e Dvorak, 1982).

O entendimento desse sistema regulatório no capim-elefante pode ser interessante para o melhoramento, por permitir a manipulação do pareamento homeólogo e viabilizar a introdução de alelos de outras espécies relacionadas. Utilizando-se dessa estratégia, Riley, Chapman e Johnson (1968) introduziram a resistência à ferrugem de *Aegilops comosa* no trigo hexaplóide.

Outra alternativa para explorar a recombinação intergenômica no capim-elefante seria por meio do tratamento pré-meiótico do tecido esporogênico com colchicina. Esse tratamento causa um efeito similar ao dos alelos mutantes PC (genes que controlam o pareamento) e permitiria a recombinação entre genomas que não ocorreria na história do poliplóide. Tais recombinantes podem produzir novos genótipos impossíveis de serem obtidos sob condições normais (Jackson, 1991). A aplicação de colchicina em baixas concentrações ($0,5 \times 10^{-4}M$) induz o pareamento homeólogo (multivalentes e bivalentes heteromórficos) e não causa assinapse (Driscoll e Barber, 1967).

Esse procedimento foi utilizado para induzir a formação de tetravalentes em *Helianthus annuus* (Jackson e Murray, 1983) e no milho (Poggio, Molina e Naranjo, 1990). Neste último, o tratamento induziu a formação de 1 a 5 tetravalentes e aumentou de 5 para 10 tetravalentes em *Zea perennis*. Esses resultados, segundo os autores, confirmaram a natureza alotetraplóide do milho apresentando dois genomas homeólogos (A2A2B2B2) e a alooctoploidia para *Zea perennis*, com genomas A'1A'1A''2A''2C1C1C2C2.

A ocorrência de univalentes e trivalentes foi observada no BAG 63 e no BAG 91 (Figura 2B). O BAG 63 apresentou também a maior frequência de anormalidades (Tabela 5 e Figura 3) entre os genótipos de capim-elefante avaliados. Esse acesso é proveniente de Cuba e foi obtido por Martinez et al. (1986) via cultura de calos de meristemas apicais de capim-elefante. Considerado como um mutante, juntamente com outras dez plantas, esse acesso (referido como Cuba T 169) diferiu fenotipicamente da planta doadora do explante em relação à largura, altura e ângulo de inserção da folha, forma do colmo e dimorfismo estacional (Martinez et al., 1990).

Muitos registros de variações genéticas e citogenéticas durante o cultivo *in vitro* são encontrados na literatura (Bayliss, 1980; Lee e Phillips, 1988; Phillips, Kaepler, Peschke, 1990; Phillips, Kaepler e Olhoff, 1994; Ronchi, 1995). A condição artificial do meio, os reguladores de crescimento, o genótipo e a idade da cultura têm sido apontados como principais fontes causadoras dos distúrbios (Bayliss, 1980; Peschke e Phillips, 1992; Sybenga, 1992), que variam de não disjunção e duplicação cromossômica a aberrações cromossômicas estruturais (Sybenga, 1992).

Na análise dos meiócitos do BAG 63 verificou-se que o comportamento dos univalentes e trivalentes resultou em cerca de 8% de células com segregação irregular e formação de micromícleos na meiose I (Tabela 5 e Figura 3). Alguns destes cromossomos que chegaram precoce ou tardiamente aos pólos podem ter

sido incluídos nos núcleos onde formaram produtos meióticos normais, pois o percentual de tétrades com micronúcleos foi de, aproximadamente, 1% (Tabela 5).

Em relação ao comportamento dos multivalentes, pressupõe-se que na anáfase esses cromossomos apresentem também distribuição irregular, constituindo outra fonte para formação de gametas aneuplóides. A presença dessas configurações levanta a suspeita de translocações nos genótipos 63 e 91 (Tabela 5 e Figura 2B). Embora não tenham sido observadas configurações em cruz e anel no paquíteno e diacinese, a disposição dos cromossomos observada nas diacineses pode ser explicada como um evento imediatamente visualizado após a quebra do anel devido à rápida terminalização dos quiasmas, característica dos cromossomos do capim-elefante. No capim-elefante, Olorade, citado por Jauhar (1981), mencionou a ocorrência ocasional de um tetravalente, como resultado de translocações que ocorreram em determinadas populações.

Outras anormalidades observadas no BAG 63 foram a presença de cromossomos pegajosos, núcleos assincrônicos, microcélulas e células anucleadas (Tabela 5 e Figura 3). Estas duas últimas são características de ocorrência de citomixia. A citomixia corresponde à transferência de material genético célula a célula, via conexões citoplasmáticas. Dentre suas causas destacam-se a formação anormal da parede celular, fatores físicos, químicos e genéticos, hibridação e poliploidia. Seu papel, de acordo com Pagliarini (2000), é considerado um mecanismo adicional de aneuploidia e poliploidia, refletindo na fertilidade do pólen.

O conjunto desses distúrbios refletiu em menor percentual de pólenes viáveis no BAG 63 (71,7%, Tabela 5) constatado por meio de coloração. Além disso, considerando as recomendações de Love (1951) para o emprego do índice meiótico como uma medida de instabilidade meiótica e sua aplicação na seleção de genótipos para cruzamentos, esse acesso apresentaria o índice-limite, abaixo

do qual as plantas não seriam recomendadas. Obviamente, tal como enfatiza Love (1951), é difícil estabelecer pontualmente, por exemplo, a diferença entre 92% e 88%, mas, em geral, plantas com índice inferior a 90%, provavelmente trarão problemas aos melhoristas. Se fosse empregado outro critério mais rigoroso, como a ocorrência de micronúcleos nos meiócitos citada por Jensen (1965), possivelmente essa planta não seria indicada para hibridação em um programa de melhoramento.

Os outros dois acessos, embora com menor frequência, também apresentaram irregularidades relacionadas à segregação (Tabela 5).

Dentre as referências consultadas, somente Sujatha et al. (1989) mencionaram anormalidades no capim-elefante associadas à migração dos cromossomos e formação de fuso tripolar.

As frequências de pólenes funcionais determinadas com a coloração para os genótipos 75 e 91 foram de, aproximadamente, 99% (Tabela 5). Sujatha et al. (1989) mencionaram 78% de fertilidade para o capim-elefante, enquanto que, nos trabalhos de Sethi, Kalia e Ghai (1970) e Sree Rangasamy (1972), essa taxa foi de 61,8% e 95%, respectivamente.

Para germinação do pólen *in vitro*, o capim-elefante exibiu um comportamento similar ao do milho, com uma frequência muito baixa de pólenes viáveis (Tabela 5 e Figura 2F). Aken'ova e Chheda (1970) descreveram, para o capim-elefante, uma taxa de 54,3% de viabilidade que manteve-se por mais um dia, sob diferentes temperaturas de armazenamento e umidade relativa de 90% a 100%.

De modo semelhante ao observado para o milho, a germinação *in vitro* não reproduz exatamente o crescimento do tubo polínico *in vivo*, pois as taxas de fertilidade obtidas pela coloração, a frequência de irregularidades e o índice meiótico (Tabela 5) confirmam que são genótipos apropriados para cruzamentos.

Nos três genótipos avaliados, dois bivalentes aparecem associados ao nucléolo (Figuras 2A), embora também tenham sido observados um e três bivalentes nucleolares em algumas diacineses do BAG 63 (Figura 2B).

Barbosa (2000), na avaliação mitótica destes acessos, observou que o maior cromossomo dos BAGs 75 e 91 apresentava satélite, enquanto que para o BAG 63, essa estrutura foi visualizada no 1º e 4º cromossomos do complemento. Pantulu e Venkateswarlu (1968) identificaram, no capim-elefante, os cromossomos 1 e 14 com organizadores do nucléolo. A presença de satélite no menor cromossomo do capim-elefante, segundo Jauhar (1981), é uma característica que se repete no milheto, em que o menor cromossomo também está envolvido na formação do nucléolo.

Quando da determinação do número de cromossomos envolvidos com a transcrição dos rRNAs e formação do nucléolo, é preciso considerar que, nas análises mitóticas, a possibilidade de erros na classificação dos pares cromossômicos e na identificação de constrições primárias e secundárias é maior. Em algumas metáfases, os efeitos de pré-tratamentos podem produzir cromossomos altamente condensados, constituindo uma fonte de erro no estudo da morfologia cromossômica. Guerra et al. (1997) enfatizaram que o número de constrições secundárias pode ser superestimado devido à presença de regiões fortemente coradas ou distendidas, associadas com grandes blocos de heterocromatina. Diante disso, as análises meióticas parecem ser mais recomendadas porque possibilitam a visualização direta dos cromossomos que estão ligados ao nucléolo, sem utilizar pré-tratamentos.

A observação de três bivalentes nucleolares no capim-elefante (Figura 2B) não havia sido relatada por outros autores. Jauhar (1981) mencionou que, ocasionalmente, material nucleolar adicional pode aparecer nos meiócitos, o que foi também constatado nos acessos BAG 91 e BAG 63 (Figura 3F).

Pelas observações feitas nos três acessos de capim-elefante fica evidenciado que existem variações em relação ao número e localização de satélites entre os genótipos. É preciso considerar que o capim-elefante reúne cromossomos pertencentes a dois genomas (A' e B), sendo o primeiro proveniente de um genitor comum ao do milho e o segundo de um parental desconhecido (Jauhar, 1981). Assim, ele pode manifestar dominância nucleolar ou anfiplastia, um fenômeno comum em algumas espécies (Flavell e O'Dell, 1979) e, especialmente, em híbridos pertencentes a diversos gêneros, como relatado em *Capsicum* (Pickersgill, 1991), *Hordeum* (Lange, 1969), *Triticum* (Vieira, 1992) *Solanum* e *Lycopersicon* (Hemleben, 2002).

Benett (1984) sugeriu que a anfiplastia ocorre quando os genomas das espécies parentais estão espacialmente separados no núcleo das células do híbrido. Nesse caso, o genoma que ocupa a posição central teria a RON ativa, enquanto que a RON do genoma periférico seria suprimida. Vieira (1992), estudando trigo e centeio, propôs que o controle da ativação-inativação das RONs é consequência da metilação-desmetilação dos reguladores da RON para a transcrição desses genes na interfase.

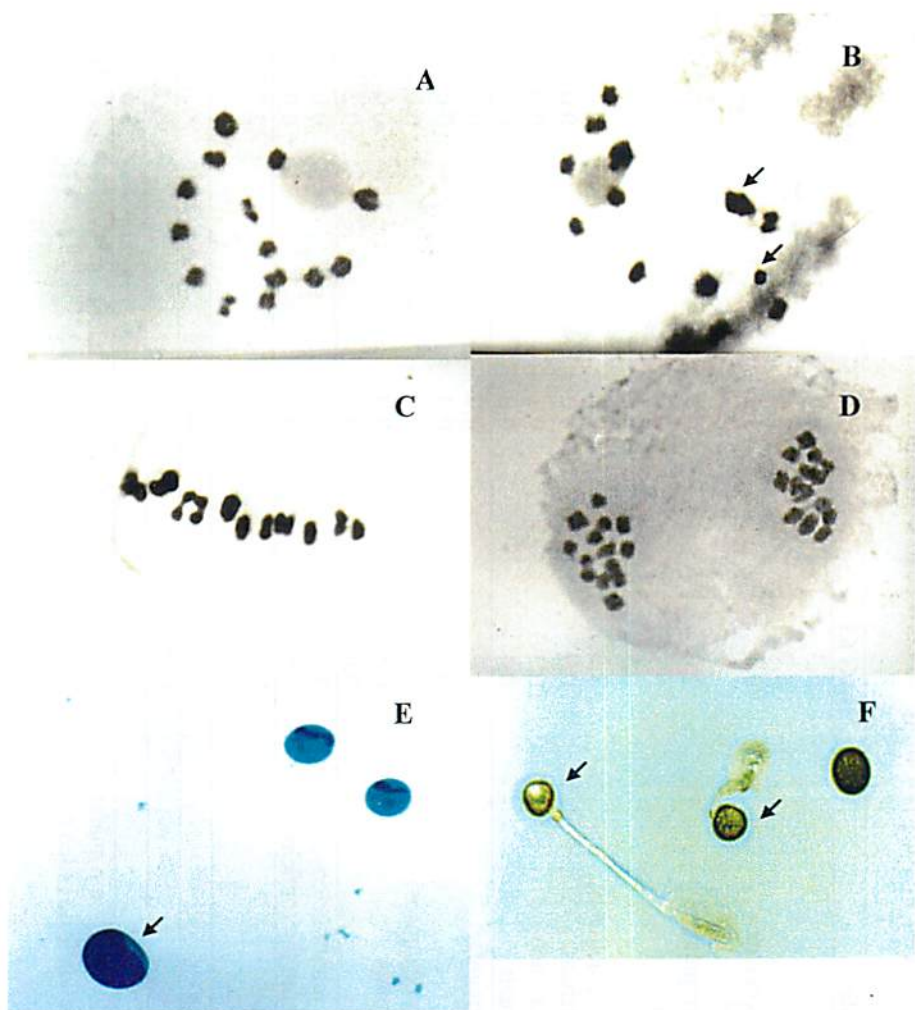
No capim-elefante, a anfiplastia foi sugerida por Techio (1998). Entretanto, não se dispõe de uma informação definitiva sobre qual (ou quais) a(s) RON(s) estariam sendo silenciadas ou manifestadas. Estudos com bandeamento NOR associados a cruzamentos poderiam auxiliar nesse sentido.

Embora na literatura (Pantulu, 1967) seja citada a ocorrência de knobs terminais nos braços longos de sete cromossomos do capim-elefante, no presente trabalho, eles não foram observados. Estudos complementares serão realizados com esta finalidade.

TABELA 5 Frequência observada (%) de células com anormalidades meióticas, índice meiótico e frequência de grãos de pólen viáveis (%) obtidos por meio de coloração e germinação *in vitro* para os acessos de capim-efefante

Fase	Anormalidade	BAG 63	BAG 75	BAG 91
Meiose I	Univalentes	0,3	0,0	0,2
	Multivalentes	0,7	0,0	0,2
	Ascensão precoce de cromossomos ¹	2,2	1,2	1,2
	Segregação irregular ²	2,0	0,3	0,0
	Micronúcleos	6,4	0,0	0,0
	Pontes ³	0,5	0,2	0,0
	Cromossomos pegajosos	2,2	0,2	0,0
	Células anucleadas	0,7	0,0	0,0
	Núcleo assincrônico	0,3	0,1	0,0
	Células desiguais	0,4	0,0	0,0
Meiose II	Segregação irregular ²	1,2	0,0	0,3
	Micronúcleo	0,6	0,0	0,0
	Cromossomos pegajosos	0,3	0,0	0,0
	Núcleos desiguais	0,5	0,0	0,0
	Pontes ⁴	0,0	0,0	0,2
Produtos Meióticos	Tétrades com micronúcleo	1,1	0,2	0,6
	Micrósporos com micronúcleo	1,5	0,0	0,0
Total de irregularidades		20,9	2,2	2,7
Índice meiótico		90,9	98,6	96,4
VPC ⁵		71,7	99,9	99,8
VPG ⁶		10,9	39,4	3,6

¹ em metáfases; ² em anáfases e telófases; ³ em anáfases e telófases; ⁴ em prófases, anáfases e telófases; ⁵ VPC= Viabilidade do pólen por coloração ⁶ VPG= Viabilidade do pólen por germinação



5 µm

FIGURA 2 Meiócitos e grãos de pólen dos acessos de capim-elefante (*P. purpureum*).

A. Diacinese com 14 bivalentes sendo dois ligados ao nucléolo; B. Diacinese com 3 bivalentes nucleolares e configurações univalente e trivalente (setas); C e D . Metáfase I e Anáfase I, respectivamente; E e F. Pólenes viáveis (seta) e inviáveis - corante de Alexander e germinação *in vitro*, respectivamente.

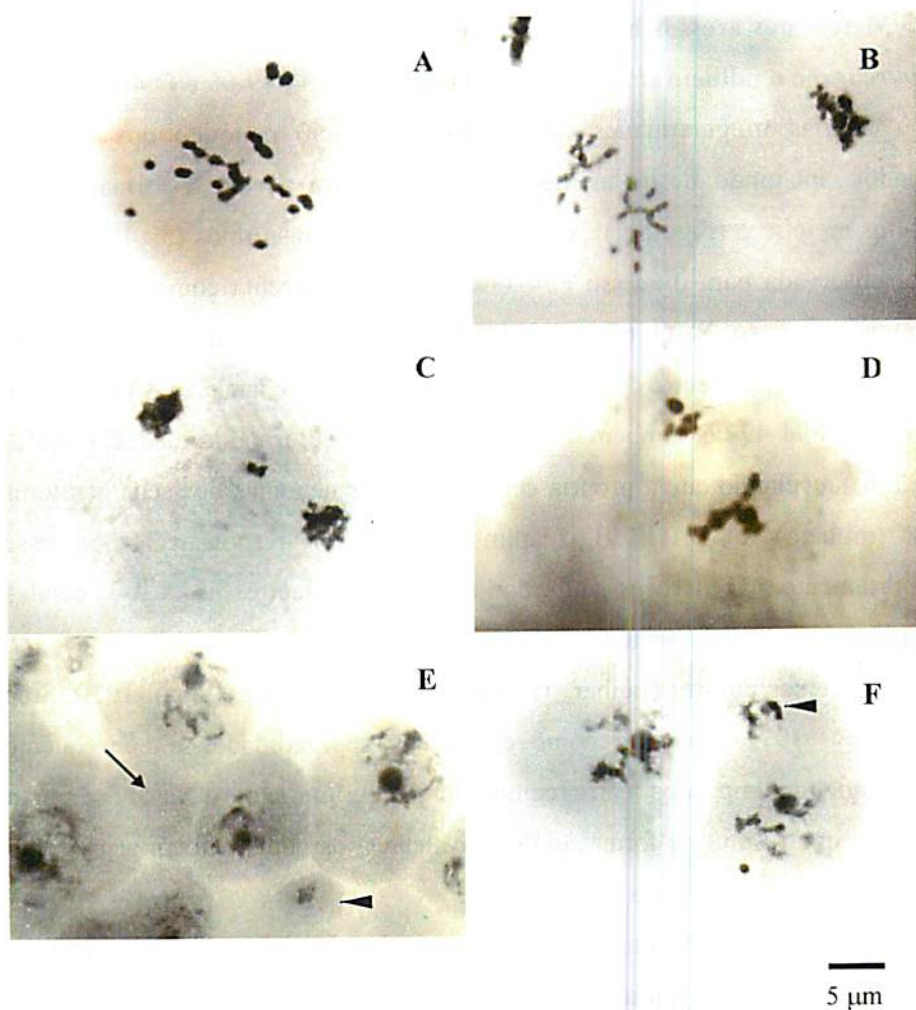


FIGURA 3 Meiócitos do acesso de capim-elefante BAG 63 (*P. purpureum*). A. Metáfase I com ascensão precoce de cromossomos; B. Anáfase I com cromossomos pegajosos; C. Telófase I com cromossomos retardatários; D. Telófase I com núcleos assincrônicos; E. Célula anucleada (seta) e microcélula em paquíteno (ponta de seta); F. Material nucleolar adicional em micronúcleo na prófase II (ponta de seta).

2.3.3 Meiose nos acessos híbridos interespecíficos entre o capim-elefante (*P. purpureum*) e o milheto (*P. glaucum*) - F94-44-03, F94-49-06 e F94-60-01

Várias irregularidades caracterizaram o ciclo meiótico dos híbridos avaliados, incluindo desde as fases iniciais (Figura 4) até a formação dos produtos meióticos (Figura 7). A maior frequência de distúrbios (52,4%, Tabela 6) foi observada para o acesso F94-44-03, o qual apresenta como um de seus parentais o acesso BAG 63, relatado anteriormente com maior número de meiócitos anormais dentre os genótipos de capim-elefante analisados (Tabela 5). O híbrido F94-49-06 também mostrou alta taxa de irregularidades (50,5%, Tabela 6), revelando que a própria combinação dos genomas dos seus genitores M38 (milheto) e BAG 91 (capim-elefante) foi responsável por esse comportamento. O terceiro híbrido apresentou, dentre as 1300 células analisadas, aproximadamente 45% de irregularidades (Tabela 6).

Diversos autores (Jauhar, 1968 e 1981; Sethi, Kalia e Ghai, 1970; Sree Rangasamy, 1972) apontam como causa das anormalidades e conseqüente infertilidade dos híbridos entre capim-elefante e milheto, o fato de serem triploídes, que resulta na formação de univalentes, os quais exibem segregação irregular e originam gametas aneuploídes.

A frequência de univalentes e multivalentes variou entre os acessos avaliados (Tabela 6 e Figura 4B), sendo mais abundantes no híbrido F94-60-01 (Tabela 6). Evidentemente, essa variação é influenciada pelos genótipos envolvidos na hibridação. Essa opinião é compartilhada com Baker et al. (1976) e Koduru e Rao (1981), ao explicarem que o comportamento dos univalentes varia de espécie para espécie e dentro da mesma espécie, devido a diferenças genéticas. Esse comportamento diferenciado pode ser também evidenciado pelas frequências de cromossomos com ascensão precoce e segregação irregular na meiose I que foram maiores no híbrido F94-49-06 (6,7 e 8,8, respectivamente) quando comparadas aos demais acessos (Tabela 6 e Figuras 4C e D).

Koduru e Rao (1981) e Sybenga (1992) descreveram com detalhes o comportamento dos univalentes. Na metáfase I, geralmente, os univalentes não permanecem alinhados na placa equatorial e tendem a migrar precocemente para os pólos. Na anáfase I, em alguns casos, eles podem segregar as duas cromátides e na telófase I, podem ou não serem incluídos nos núcleos, independente do padrão de segregação exibido na anáfase. Aqueles univalentes que apresentarem segregação tardia formarão micronúcleos. A meiose II tende a ser mais regular. Entretanto, se as anormalidades persistirem, há a formação de micrósporos anormais. Os micronúcleos observados nas fases iniciais da meiose (Figura 4A) podem ter se originado em mitoses pré-meióticas ou por citomixia.

Ainda em relação à segregação, a Figura 4E mostra a migração de sete cromossomos para um dos pólos da célula, indicando que um dos núcleos teria cromossomos de um dos genomas, enquanto que o outro núcleo incluiria 14 cromossomos. Nessa circunstância, grãos de pólen férteis e maiores contendo 14 cromossomos e menores com 7 cromossomos poderiam estar sendo formados. Medições realizadas por Assis et al. (2002) nesses acessos mostraram que o tamanho médio do grão de pólen é de 39,2 e 44,1 μm para o menor e maior diâmetros. Entretanto, foram observados grãos de pólen com até 81,8 e 85,7 μm e também com 8,3 e 13,2 μm (Figura 7D). Nas avaliações de fertilidade realizadas não foi constatada a presença de pólen férteis (Tabela 6 e Figuras 7D e E).

Observando as configurações bivalentes, univalentes e trivalentes nas diacineses e metáfases I é possível evidenciar o maior tamanho dos cromossomos do genoma A, originários do milho, em relação aos cromossomos dos genomas A' e B do capim-elefante (Figura 4B).

Similarmente ao descrito por Jahuar (1968), observando o tamanho dos cromossomos, verifica-se que a maioria dos bivalentes formados resultam do pareamento alossindético envolvendo cromossomos do genoma A e do A'.

Muitos destes bivalentes foram nitidamente heteromórficos (Figura 4B) confirmando que existem segmentos diferenciais entre estes cromossomos. Esse heteromorfismo corrobora com a identificação da homeologia dos genomas A e A', proposta por Jauhar (1968 e 1981) e contra-argumenta a homologia sugerida por Krishnaswamy e Raman (1956), Raman (1964) e Pantulu (1967).

A tendência para formação de bivalentes entre os genomas A e A' é referida como pareamento preferencial ou afinidade diferencial, expressões utilizadas por Jauhar (1975) e Jackson (1982), respectivamente.

Uma identificação acurada dos cromossomos e seus respectivos genomas poderia ser obtida aplicando técnicas de bandeamento cromossômico ou hibridação genômica *in situ* (GISH). Gill e Sears (1988) compararam metáfases I de *Triticum turgidum* ($2n=28$, AABB) e *T. timopheevii* ($2n=28$, A'A'GG) por meio de coloração convencional e bandeamento N. A coloração convencional identificou cinco tipos de configurações: univalentes, bivalentes em anel e bastão, trivalentes e tetravalentes. A coloração obtida com o bandeamento N mostrou 17 tipos de configurações baseadas na identificação individual dos cromossomos. Esse procedimento permitiu verificar que muitos univalentes e bivalentes em bastão envolviam os genomas B/G e a maioria dos bivalentes pareados pertencia aos genomas A/A'. Também foram identificadas translocações em vários genomas.

A hibridação genômica *in situ* do DNA dos parentais com os cromossomos do híbrido tem sido aplicada com sucesso em diversos gêneros de plantas (Benett, 1995; Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 1996 e 1998), possibilitando identificar a origem dos cromossomos e separá-los por genomas.

A não observação de mais do que sete bivalentes nos híbridos não confirmou a ocorrência de pareamento autossindético também sugerida por Jauhar (1968 e 1981). Entretanto, a formação de trivalentes no híbrido (Figura

4B) e as configurações tetravalentes observadas no parental milheto (Figura 1A) sugerem que existem homologias intragenômicas.

Com base na observação de até 9 bivalentes nas metáfases I, Jauhar (1968 e 1981) concluiu que o pareamento autossindético ocorria dentro do complemento do milheto e também do capim-elefante. Os bivalentes extras observados resultariam de pareamento intra-haplóide em um máximo de dois bivalentes, dentro de cada um dos três genomas (A, A' e B) do híbrido. Esses resultados contribuíram para fundamentar a teoria de Jahuar (1968) a respeito da origem dos genomas das espécies de *Pennisetum* a partir do número básico de cromossomos igual a cinco.

Baseado no exposto, parece razoável considerar que a formação de trivalentes no híbrido seja resultado de pareamento intragenômico e homeólogo entre cromossomos dos genomas A e A' ou ainda envolvendo cromossomos dos três genomas. Obviamente, quando estas configurações estão presentes, não se pode descartar a possibilidade de ocorrência de translocações. O tamanho de alguns bivalentes também podem ser indicativos de pareamento intragenômico.

Em relação às RONS, os três acessos exibiram dois bivalentes associados ao nucléolo. Barbosa (2000) relatou a ocorrência de satélite em dois cromossomos mitóticos do acesso F94-44-02 e em um cromossomo dos acessos F94-49-06 e F94-60-01.

A perda de material genético é um evento observado durante a microsporogênese dos híbridos analisados. A segregação irregular, como já mencionado, foi visualizada nos três acessos em uma frequência média de 7% na meiose I (Tabela 6 e Figuras 4C e D). Em várias anáfases e telófases I, observaram-se cromossomos metafásicos ainda alinhados na placa equatorial (Figura 5A). Na telófase I, de um a três micronúcleos foram observados (Figura 5B), mostrando que alguns cromossomos retardatários não foram incluídos nos núcleos. Na meiose II do acesso F94-44-03, por exemplo, nos estágios de

prófase e metáfase, foram visualizadas microcélulas adicionais (Figura 6A), que apresentaram segregação cromossômica (Figura 6B). Também foram observados micronúcleos nas tétrades (Figura 7A) e nos micrósporos (Figura 7C). Os micronúcleos, possivelmente, formaram micrócitos que originaram pequenos grãos de pólen inférteis (Figuras 7D).

A eliminação cromossômica via micronúcleos é comum em híbridos interespecíficos e intergenéricos e já foi amplamente relatada em *Hordeum* (Davies, 1974), *Nicotiana* (Gupta, 1969) e *Solanum* (Pijnacker et al., 1989). A combinação de dois genomas nos híbridos gera mitoses e meioses aberrantes e, muitas vezes, leva à eliminação cromossômica (Baptista-Giacomelli, Pagliarini e Almeida, 2000a). Em *Brassicaceae* (Sundberg e Glimelius, 1991) foi mostrado que existe uma correlação entre a eliminação cromossômica e a distância genética entre as espécies.

Em *Pennisetum*, a eliminação cromossômica foi descrita em anfidiplóides originados de híbridos de milho x capim-elefante tratados com colchicina (Gildenhuys e Brix, 1961 e 1964), em híbridos de milho tetraplóide com capim-elefante (Raman e Krishnaswamy, citados por Jauhar, 1981) e, recentemente, por Abreu (2002) em híbridos de milho e capim-elefante submetidos a diferentes concentrações e tempos de exposição a substâncias antimitóticas.

As várias hipóteses mencionadas na literatura para explicar a eliminação cromossômica em híbridos interespecíficos incluem inativação dos cromossomos por nucleases (Davies, 1974), formação de fuso multipolar e assincronia na síntese de nucleoproteínas (Bennett, Finch e Barclay, 1976), proporções genômicas (Subrahmanyam e Kasha, 1973), separação espacial dos genomas, supressão da função dos centrômeros (Finch e Bennett, 1983) e assincronia no ciclo celular e ritmo mitótico (Stutz, 1962; Gupta, 1969 e Subrahmanyam e Kasha, 1973).

Raman e Krishnaswamy, citados por Jauhar (1981), sugeriram que nos híbridos de milheto e capim-elefante há uma eliminação seletiva dos cromossomos do genoma B, visando buscar a estabilidade e fertilidade pela homologia dos cromossomos dos genomas A e A'.

No trabalho conduzido por Abreu (2002), também em híbridos de capim-elefante e milheto, foi sugerida a eliminação tanto de um genoma completo, no caso o B, quanto de cromossomos individuais. O autor ponderou que essa eliminação cromossômica seria devido a proporções genômicas e controle de expressão gênica e descartou a hipótese de divisão assincrônica, relacionando ao fato dos genomas A, A' e B segregarem normalmente nos híbridos durante a mitose.

Os três acessos mostraram pontes únicas e múltiplas acompanhadas ou não de fragmentos na meiose I e II (Tabela 6 e Figuras 5C, D, E e F). Os fragmentos apresentavam tamanhos variáveis e foram observados também nas telófases, geralmente, na placa equatorial da célula (Figura 5C). Sree Ramulu (1968), Sethi, Kalia e Ghai (1970) e Sree Rangasamy (1972) já haviam mencionado a presença de pontes nesses híbridos, sugerindo que as inversões são a principal fonte para sua formação.

As pontes cromossômicas podem se originar de diferentes maneiras. Se aparecerem acompanhadas de fragmentos, a causa provável é a ocorrência de inversões paracêntricas (Sybenga, 1992). A ausência de fragmentos pode ser decorrente de eventos de "misdivision", ou seja quebras no centrômero de forma que os dois braços migram para pólos opostos, podendo originar novos cromossomos (como telocêntricos e isocromossomos) (Santos-Serejo, 1999).

Cromossomos pegajosos e atrasos na terminalização de quiasmas também são mecanismos que geram pontes (Baptista- Giacomelli, Pagliarini e Almeida, 2000b). Nos acessos avaliados, a frequência de cromossomos pegajosos e de pontes na meiose I e II foi maior no híbrido F94-49-06,

correspondendo a 2,5% e 10,2%, respectivamente (Tabela 6). Muitas pontes foram visualizadas na telófase I e demais fases da meiose II (Figuras 5D, E e F), indicando que os cromossomos pegajosos podem estar envolvidos na formação dessa irregularidade nesses genótipos. Na Figura 6C observa-se a fusão de dois núcleos na telófase II, provavelmente devido a aderências da cromatina.

Em *Pennisetum*, a presença de cromossomos pegajosos causados por fatores genéticos foi relatada por Rao, Ranganadham e Nirmala (1990), somente para o milho.

Citomixia (Figura 6D) e fusos tripolares (Figura 6E) foram também anormalidades encontradas no acesso F94-44-03 (Tabela 6).

A ocorrência de citomixia em *Pennisetum* não foi mencionada na literatura consultada. Certamente, esse fenômeno contribui para reduzir a viabilidade das plantas híbridas por ocasionar outras anormalidades como a mixoploidia e a fusão celular.

Como consequência da presença de fuso tripolar (Figura 6E), na segunda divisão foi observada a formação de tríades (Figura 7B). Golubovskaya (1989) descreveu alguns genes que podem afetar a formação do fuso, especialmente na meiose II. Em muitos casos, esses distúrbios nos fusos meióticos podem produzir gametas não reduzidos. Entretanto, em muitas espécies, tais como *Rubus* (Thompson, 1962), *Fuchsia* (Tilquin, Brouwer e Horvart, 1984) e *Thunbergia mysorensis* (Pagliarini, 1990), foi relatado que os fusos múltiplos e tripolares ocorrem esporadicamente, sem afetar todos os microsporócitos da antera, o que pode ter ocorrido também nos acessos híbridos avaliados, em função de a frequência de fuso irregular ter sido muito baixa (Tabela 6).

Todas as irregularidades mencionadas contribuíram para a formação de micrósporos anormais nos híbridos, variando de binucleado a multinucleado (Figura 7C). Como já mencionado, grãos de pólen estéreis e de diferentes

tamanhos foram observados (Figura 7D e Tabela 6). A completa esterilidade observada nos três acessos revela que a combinação dos genótipos parentais não refletiu em graus variáveis de fertilidade nesses híbridos, embora eles apresentem diferentes frequências de irregularidades.


Resultados de Sree Ramulu (1968), Sethi, Kalia e Ghai (1970) e Sree Rangasamy (1972) para viabilidade polínica obtida com corantes nucleares apontam de 2% a 5% de fertilidade para os híbridos entre o milho e o capim-elefante.

A infertilidade associada às altas taxas de irregularidades meióticas e aos baixos índices meióticos (Tabela 6) confirmam o comportamento meiótico instável das plantas híbridas avaliadas.

A divergência entre a frequência de tétrades normais (índice meiótico), ou mesmo entre a taxa de irregularidades, e a porcentagem de pólen estéril (Tabela 6) pode ser explicada de duas maneiras. Primeiro, e mais provável, é que nem todas as tétrades identificadas como normais podem efetivamente apresentar os quatro micrósporos com número balanceado de cromossomos. A outra possibilidade é a ocorrência de alterações pós-meióticas que podem afetar a fertilidade do pólen.

2.3.4 Correlações entre fertilidade-irregularidades meióticas e fertilidade-índice meiótico

A taxa de viabilidade, obtida por coloração e germinação, apresentou correlação alta e negativa ($r = -0,99$ e $r = -0,71$) com a frequência de irregularidades meióticas para os três taxa (parentais e híbridos). Isso indica que quanto maior o número de meiócitos anormais, menores valores de viabilidade são observados. Quando foi avaliado o grau de associação entre a fertilidade, obtida pela coloração e germinação, e o índice meiótico, as correlações também foram altas, mas positivas ($r = 0,98$ e $r = 0,55$), confirmando que a fertilidade



está associada à estabilidade meiótica, expressa pela frequência de tétrades normais nos híbridos e genitores (Tabelas 4, 5 e 6).

Em um trabalho conduzido por Sree Ramulu (1968) com o anfidiplóide do capim-elefante e do milheto ($2n=6x=42$), não foi observada correlação consistente entre os distúrbios meióticos e o grau de esterilidade do pólen.

Diante dos resultados, pode-se indicar, para *Pennisetum*, a utilização do índice meiótico e dos testes de fertilidade como estimativa dos distúrbios meióticos, com a vantagem de fornecerem uma avaliação rápida da situação de uma espécie quanto ao comportamento meiótico e sua estabilidade genética.

TABELA 6 Frequência observada (%) de células com anormalidades meióticas, índice meiótico e frequência de grãos de pólen viáveis (%) obtidos por meio de coloração e germinação *in vitro* para os acessos híbridos interespecíficos

Fase	Anormalidade	F94-44-03 (BAG 63 x M36)	F94-60-01 (BAG 75 x M24)	F94-49-06 (BAG 91 x M38)
Meiose I	Univalentes	5,6	6,3	5,6
	Multivalentes	0,6	1,2	0,9
	Ascensão precoce de cromossomos ¹	4,1	2,7	6,7
	Segregação irregular ²	8,5	4,0	8,8
	Micronúcleos	0,7	1,4	1,2
	Pontes ³	3,5	1,5	3,8
	Cromossomos pegajosos	1,7	1,8	2,0
	Núcleo assincrônico	0,8	0,6	0,1
	Células desiguais	0,0	0,1	0,0
	Citomixia	0,5	0,0	0,0
	Fuso anormal	0,1	0,0	0,0
	Binucleada	0,0	1,3	0,8
Meiose II	Ascensão precoce ¹	2,1	1,6	0,0
	Segregação irregular ²	4,8	0,3	3,0
	Micronúcleo	2,4	4,0	1,0
	Pontes ⁴	0,7	1,6	3,4
	Cromossomos pegajosos	0,0	0,0	0,5
	Fusos anormais	0,0	0,4	0,0
	Núcleos assincrônicos	0,6	0,3	0,0
	Núcleos desiguais	0,6	1,5	0,0
Microcélula adicional	1,4	0,0	0,0	

... continua...

Tab 6, Cont.

	Triade	0,7	1,2	0,1
	Poliade	0,4	0,2	0,2
Produtos meióticos	Tétrades com micronúcleo	8,0	9,0	8,2
	Tétrade com ponte	0,1	0,0	0,0
	Tétrade com micrósporo anucleado	0,2	0,0	0,1
	Micrósporos com micronúcleo	4,3	4,6	4,1
	Total de irregularidades	52,4	45,6	50,5
Índice meiótico	41,1	35,8	28,8	
VPC¹	0	0	0	
VPG²	0	0	0	

¹ em metáfases; ² em anáfases e telófases; ³ em anáfases e telófases; ⁴ em prófases, anáfases e telófases; ⁵ VPC= Viabilidade do pólen por coloração ⁶ VPG= Viabilidade do pólen por germinação

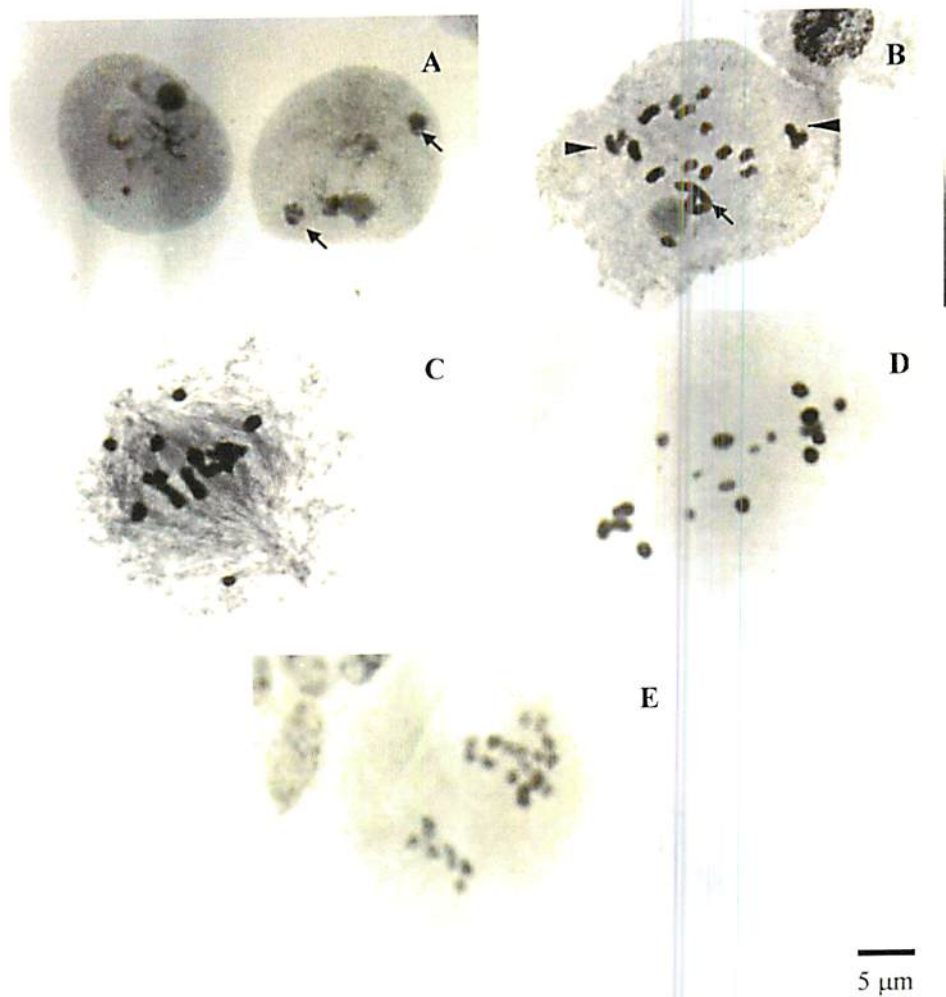


FIGURA 4 Meiócitos dos acessos híbridos entre capim-elefante x milho - *P. purpureum* x *P. glaucum*). A. Paquíteno com micronúcleos (setas); B. Diacinese com configurações univalentes, multivalente (seta) e bivalente heteromórfico (ponta de seta); C. Metáfase I com ascensão precoce de cromossomos; D. Anáfase I com cromossomos retardatários; E. Anáfase I mostrando 7 cromossomos em um pólo da célula

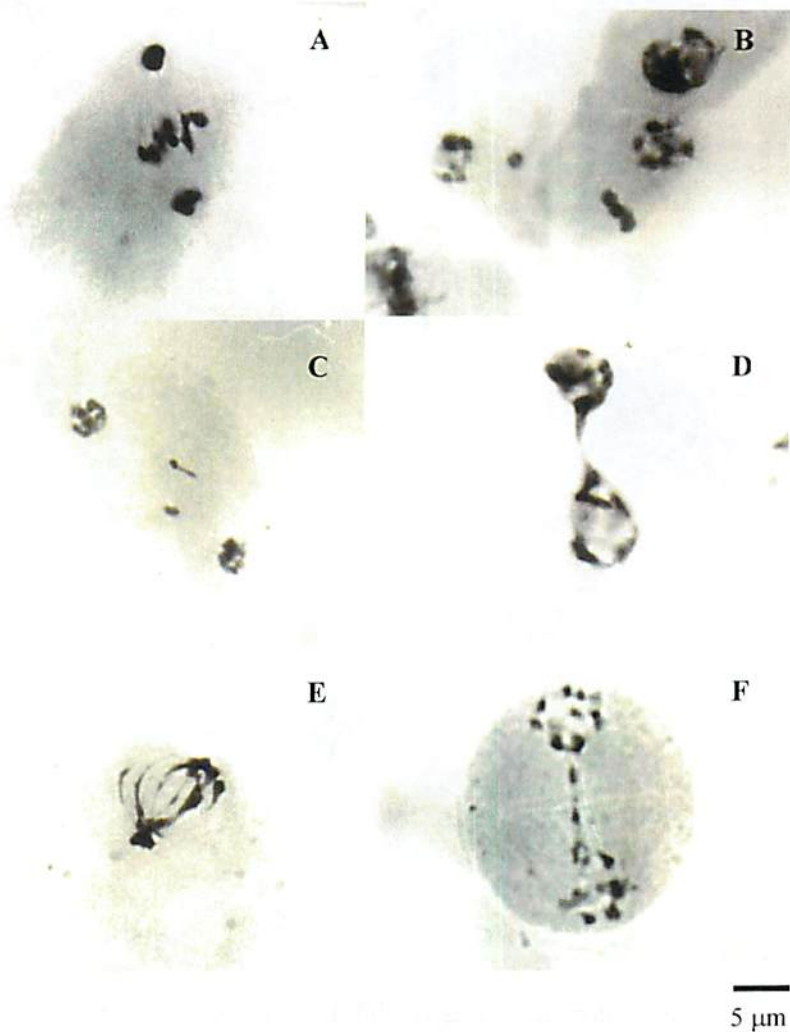


FIGURA 5 Meiócitos dos acessos híbridos entre capim-elefante x milheto (*P. purpureum* x *P. glaucum*). A. Telófase I com cromossomos em metáfase I; B. Telófase I com micronúcleo e cromossomos atrasados; C. Telófase com cromossomos atrasados e fragmentos; D. Telófase I com ponte; E. Telófase I com pontes múltiplas; F. Prófase II com ponte

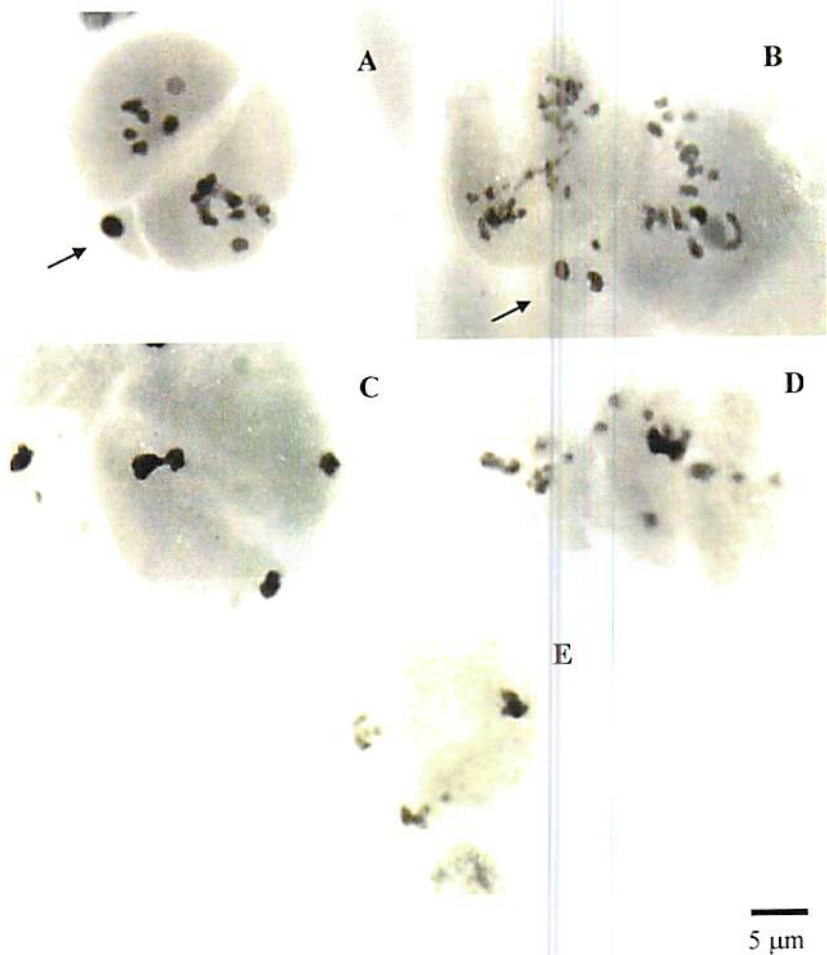


FIGURA 6 Meiócitos dos acessos híbridos entre capim-elefante x milho - *P. purpureum* x *P. glaucum*. A. Metáfase II com microcélula adicional (seta); B. Microcélula em telófase (seta); C. Telófase II com fusão de núcleos; D. Citomixia; E. Fuso tripolar.

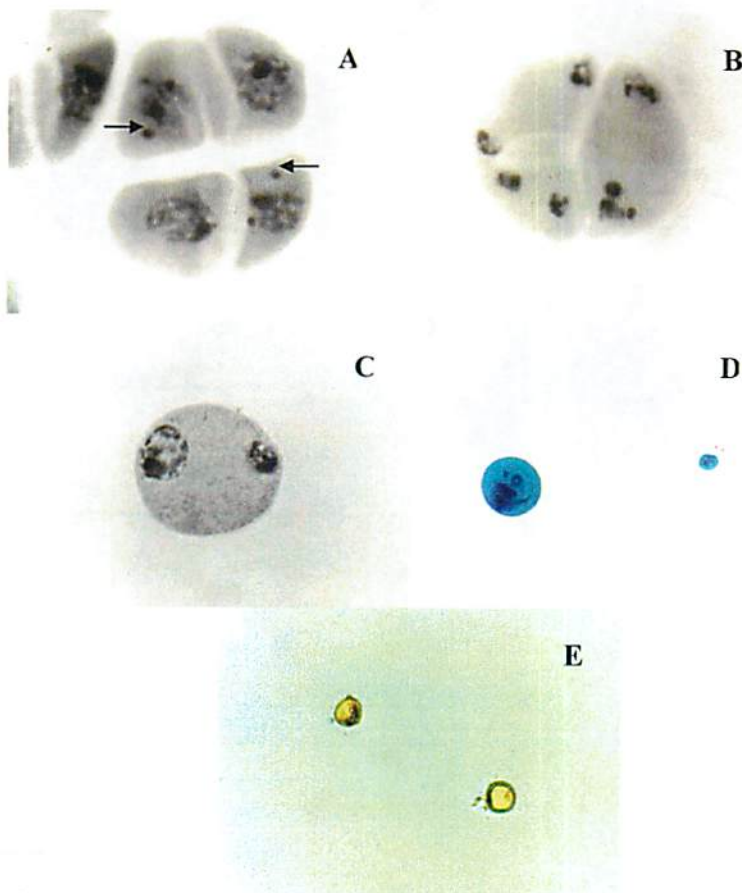


FIGURA 7 Produtos meióticos dos híbridos entre capim-elefante x milheto (*P. purpureum* x *P. glaucum*). A. Tétrade com micronúcleos (setas); B. Tríade com micrósporos binucleados; C. Micrósporo com micronúcleo; D e E. Grãos de pólen inviáveis de tamanhos diferentes corados com corante de Alexander e em meio de cultura para indução da germinação.

2.4 CONCLUSÕES

Os acessos de milheto apresentaram meiose regular com 7 bivalentes e alta viabilidade do pólen, demonstrada por meio de coloração. Para os acessos de capim-elefante observaram-se 14 bivalentes nas diacineses e metáfases I. Entretanto, os acessos BAG 63 e BAG 91 também apresentaram univalentes e trivalentes. O acesso BAG 63, oriundo de cultura de tecidos, apresentou maior frequência de anormalidades meióticas.

Em relação à germinação *in vitro*, o milheto e o capim-elefante exibiram uma frequência reduzida de pólen funcionais, mostrando inabilidade para emitir o tubo polínico nas condições artificiais do meio de cultura.

Os três acessos híbridos de capim-elefante e milheto apresentaram alta taxa de anormalidades, caracterizada pela segregação irregular dos cromossomos que resultaram na formação de grãos de pólen com número não balanceado de cromossomos e inférteis.

Existe uma alta correlação negativa entre a fertilidade do pólen e as irregularidades meióticas e uma correlação alta e positiva entre fertilidade-estabilidade meiótica, expressa pelo índice meiótico

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. C. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. 2002. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; BATISTA, L. A. R. Chromosome elimination in *Paspalum subciliatum* (Notata group). *Sexual Plant Reproduction*, New York, v. 11, p. 272-276, 1998.
- AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; PAGLIARINI, M. S.; VILLAMIZAR, N. R. Aspectos do controle genotípico da frequência de quiasmas em milho. In: AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; MARTINS, P. S.; BANDEL, G. (Eds.). *Tópicos de citogenética e evolução vegetal*. Ribeirão Preto: SBG, 1985. p. 111-123.
- AKEN'OVA, M. E.; CHHEDA, H. R. Effects of storage on viability of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pollen. *The Nigerian Agricultural Journal*, Ibadan, v. 7, n.1, p. 111-114, 1970.
- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology*, Baltimore, v. 55, n.1, p. 13-18, 1980.
- ASSIS, J. C.; PEDROZO, C. A.; BARBOSA, S.; TECHIO, V. H.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A. V. Determinação do nível de ploidia em *Pennisetum* spp.: área nuclear, tamanho da placa metafásica e diâmetro do pólen. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., 2002, Águas de Lindóia. Programa e Resumos... Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2002. 1 CD-ROM.
- AVDULOV, N. P. Karyosystematicshe Untersuchung der Familie Graamineen. *Bulletin Applied Botany of Genetics and Plant Breeding*, Leningrad, Suppl. 4, p. 1 – 428, 1931.
- AYYANGAR, G. N. R.; RAO, V. P. Pollen dummy. *Current Science*, Bangalore, p. 315, nov. 1935.
- BAKER, B. S.; CARPENTER, A. T. C.; ESPOSITO, M. S.; ESPOSITO, R. E.; SANDLER, L. The genetic control of meiosis. *Annual Review Genetics*, Palo Alto, v. 10, p. 53-134, 1976.

BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. Elimination of micronuclei from microspore in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.23, n.2, p. 681-684, 2000a.

BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. Multiple anaphase bridges on meiosis in Brazilian oats (*Avena sativa* L.) *Nucleus*, Lahore, v.43, n.1, p. 58-63, 2000b.

BARBOSA, S. Citogenética de híbridos entre *Pennisetum purpureum* Schumach. e *Pennisetum glaucum* L. e seus genitores. 2000. 48 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BAYLISS, M. W. Chromosomal variation in plant tissues in culture. *International Review of Cytology*, New York, Suppl., v. 11, p. 113-144, 1980.

BENNETT, M. D.; FINCH, R. A.; BARCLAY, I. R. The time rate and mechanism of chromosomal clination in *Hordeum*. *Chromosoma*, New York, v. 54, n.2, p. 175-200, 1976.

BENNETT, M. D. Nuclear architecture and its manipulation. In: GUSTAFSON, J. P. (Ed.) *Gene manipulation in plant improvement*. New York: Plenum Press, 1984. p. 469-502.

BENETT, M. B. The development and use of genomic *in situ* hybridization (GISH) as a new tool in plant cytogenetics. In: BRANDHAN, P. E.; BENETT, M. (Eds.). *Kew chromosome conference: IV*. Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. p. 167-183.

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

BURTON, G. W.; POWELL, J. B. Pearl millet breeding and cytogenetics. *Advances in Agronomy*, New York, v.20, p. 49-89, 1968.

CHAUDHURY, R.; SHIVANNA, K. R. Studies on pollen storage of *Pennisetum typhoides*. *Phytomorphology*, New Dehli, v. 36, p. 211-218, 1986.

DAVIES, D. R. Chromosome elimination in inter-specific hybrids. *Heredity*, Oxford, v. 32, n.4, p. 267-270, 1974.

- DRISCOLL, C. J.; BARBER, H. N.; Effect of colchicine on meiosis of hexaploid wheat. *Nature*, London, v. 216, n.5116, p. 687-688, 1967.
- DUJARDIN, M.; HANNA, W. W. Crossability of pearl millet with *Pennisetum* species. *Crop Science*, Madison, v. 29, n.1, p. 77-80, 1989.
- FINCH, R. A.; BENNETT, M. D. The mechanism of somatic chromosome elimination in *Hordeum*. In: BRANDHAM, P. E.; BENNETT, M. D. (eds.). *Kew Chromosome Conference II: proceedings of the 2nd chromosome conference*. London: Jodrell Laboratory; Royal Botanic Gardens, 1983. p. 147-154.
- FLAVELL, R. B.; O' DELL, M. The genetic control of nucleolus formation in wheat. *Chromosoma*, New York, v. 71, n.2, p. 135-152, 1979.
- GILDENHUYS, P.; BRIX, K. Genetic control of aneuploids in *Pennisetum*. *Heredity*, Oxford, v. 16, n.3, p. 358-363, 1961.
- GILDENHUYS, P.; BRIX, K. Genetically controlled variability of chromosome number in *Pennisetum*. *Heredity*, Oxford, v. 19, n.4, p. 533-542, 1964.
- GILLIES, C. B. The synaptonemal complex in higher plants. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v. 2, n.1, p. 81-116, 1984.
- GILL, B. S.; SHARMA, H. L.; DHESI, J. S. Cytomorphological studies of haploid pearl millet. *Cytologia*, Tokyo, v. 38, n.2, p. 411-416, 1973.
- GILL, B.; SEARS, R. G. The current status of chromosome analysis in wheat. In: GUSTAFSON, P.; APPELS, R. *Chromosome structure and function: impacts of new concepts*. New York: Plenum Press, 1988. p. 305-308.
- GOLUBOVSKAYA, I. N. Meiosis in maize: *mei* genes and conception of genetic control of meiosis. *Advances in Genetics*, New York, v. 26, p. 149, 1989.
- GUERRA, M.; PEDROSA, A. ; BARROS e SILVA, A. E.; CORNÉLIO, M. T. M.; SANTOS, K.; SOARES FILHO, W. S. F. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 acessions of a citrus germplasm bank. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v. 20, n. 3, p. 489-496, 1997.
- GUPTA, S. B. Duration of mitotic cycle and regulation of DNA replication in *Nicotiana plumbaginifolia* an a hybrid derivative of *N. tabacum* showing

chromosome instability. *Canadian Journal Genetics and Cytology*, Ottawa, v. 11, n.1, p. 133-142, 1969.

HANNA, W. W.; TOWILL, L. E. Long-term pollen storage. *Plant Breeding Reviews*, New York, v. 13, p. 179-207, 1995.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, Utrecht, v. 20, p. 509-517, 1971.

HASENKAMPF, C. A. Synaptonemal complex formation in pollen mother cells of *Tradescantia*. *Chromosoma*, New York, v. 90, n.4, p. 275-284, 1984.

HEMLEBEM, V. *Genome organization and molecular evolution in higher plants*. Tubingen: Universitat Tubingen, 2002. Disponível em: <<http://www.uni-tuebingen.de/ZMBP/research/gghemleben.html>>. Acesso em: 02 jul. 2002.

HILLEL, J.; FELDMAN, N. W.; SIMCHEM, G. Mating systems and population structure in two closely related species of the wheat groups III. Chiasma frequency and population structure. *Heredity*, Oxford, v. 31, n.1, p. 1-9, 1973.

HOBOLTH, P. Chromosome pairing in allohexaploid wheat var. Chinese Spring. Transformation of multivalents into bivalents a mechanism for exclusive bivalent formation, *Carlsberg Research Communications*, Copenhagen, v. 46, n.3, p. 129-173, 1981.

JACKSON, R. C. Polyploidy and diploidy: new perspectives on chromosome pairing and its evolutionary implications. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 69, n.4, p. 1512-1523, 1982.

JACKSON, R. C.; CASEY, J. Cytogenetic analyses of autopolyploids: models and methods for triploids to octoploids. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 69, n.4, p. 487-501, 1982.

JACKSON, R.C. ; MURRAY, B. G. Colchicine-induced quadriavalent formation in *Helianthus*: evidence of ancient polyploidy. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 64, n.3, p. 219-222, 1983.

JACKSON, R. C. Cytogenetics of polyploids and their diploid progenitors. In: GUPTA, P. K.; TSUCHIYA. *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. New York: Elsevier, 1991. Part A, p. 159-180.

- JAUHAR, P. P.** Inter- and intra-genomal chromosome pairing in an interspecific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. *Genetica*, Dordrecht, v. 39, n.3/4, p. 360-370, 1968.
- JAUHAR, P. P.** Genetic control of diploid-like meiosis in hexaploid tall fescue. *Nature*, London, v. 254, n.5501, p. 595-597, 1975.
- JAUHAR, P. P.** Cytogenetics of pearl millet. *Advances in Agronomy*, New York, v. 34, p. 407-479, 1981.
- JAUHAR, P. P.; HANNA, W. W.** Cytogenetics and genetics of pearl millet. *Advances in Agronomy*, New York, v. 64, p. 1-26, 1998.
- JENSEN, N. F.** Population variability in small grains. *Agronomy Journal*, Madison, v. 57, p. 153-162, 1965.
- JONES, G. H.; TEASE, C.** Analysis of exchanges in differentially stained meiotic chromosomes of *Locusta migratoria* after BrDU – substitution and FPG staining IV. The nature terminal associations. *Chromosoma*, New York, v. 89, n.1, p. 33-36, 1984.
- KIHARA, H.** Wheat studies – retrospects e prospects. *Developments in Crop Science*, Amsterdam, v. 3, n.1, p. 1-86, 1982.
- KNOTT, D. R.** The chromosome location for four recombinants between Agropyron chromosome 7e12 and a wheat chromosome. *Genome*, Ottawa, v. 30, n.1, p. 97-98, 1988.
- KODURU, P. R. K.; RAO, M. K.** Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 59, p. 197-214, 1981.
- KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V. S.** Studies on the interspecific hybrid of *Pennisetum typhoides* x *P. purpureum* IV. Cytogenetics of the allotetraploids. *Genetica*, Dordrecht, v. 28, n.3/4, p. 345-360, 1956.
- LANGE, W.** Cytogenetisch en embryologisch onderzoek aan kruisingen tussen *Hordeum vulgare* en *H. bulbosum*. Wageningen: WAU, 1969. Disponível em: <<http://www.agralin.nl/wda/abstracts/ab439.html>>. Acesso em: 02 jul. 2002.

LEE, M.; PHILIPS, R. L. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 39, p. 413-437, 1988.

LOVE, R. M. Varietal differences in meiotic chromosome behavior of brazilian wheats. *Agronomy Journal*, Madison, v. 43, n.1, p. 2-6, 1951.

LIU, C. J.; WITCOMBE, J. R.; PITTAWAY, T. S.; NASH, M.; HASH, C. T.; BUSSO, C. S.; GALE, M. D. An RFLP-based genetic map of pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 89, p. 481-487, 1994.

MANGA, V.; PANTULU, J. V. The meiotic behaviour of haploid pearl millet. *Genetica*, Dordrecht, v. 42, n.3, p. 319-318, 1971.

MARTEL, E.; RICHROCH, A.; SARR, A. Assessment of genome organization among diploid species ($2n=2x=14$) belonging to primary and tertiary gene pools of pearl millet using fluorescent in situ hybridization with rDNA probes. *Genome*, Ottawa, v. 39, n.4, p. 680-687, 1996.

MARTINEZ, R. O.; HERRERA, R.; MONZOTE, M.; CRUZ, R. El cultivo de tejidos y la obtención y selección de mutantes. *Los pastos en Cuba. Tomo I. Producción*. La Habana: Edica - Instituto de Ciencia Animal, 1986.

MARTINEZ, R. O.; HERRERA, R.; MONZOTE, M.; CRUZ, R. Obtención de mutantes utilizando el cultivo de tejidos y otras técnicas. In: HERRERA, R. S. (Ed.) *King grass plantación establecimiento y manejo en Cuba*. La Habana: Edica - Instituto de Ciencia Animal, 1990. p. 11-42.

McGUIRE, P. E.; DVORAK, J. Genetics regulation of heterogenetic chromosome pairing in polyploid species of the genus *Triticum*. *Canadian Journal Genetics Cytology*, Ottawa, v. 23, p. 57-82, 1982.

MERCADO-RUARO, P.; DELGADO-SALINAS, A. Karyological studies in several Mexican species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi (Phaseolinae, Fabaceae). In: PICKERSGILL, B.; LOCK, J. M. (Eds.). *Advances in Legume Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 83-87. 1996.

MERCADO-RUARO, P.; DELGADO-SALINAS, A. Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae-Phaseolinae). *American Journal of Botany*, Columbus, v. 85, n.1, p. 1-9, 1998.

- MINOCHA, J. L. Pearl millet cytogenetics. In: GUPTA, P. K.; TSUCHIYA. **Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution.** New York: Elsevier, 1991. Part A, p. 599-611.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n.3, p. 473-497, 1962.
- PAGLIARINI, M. S. Avaliação da frequência de quiasmas em milho (*Zea mays* L.) e suas implicações com a capacidade de combinação para a produção de grãos. 1989. 190 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- PAGLIARINI, M. S. Instabilidade meiótica em *Thunbergia mysorensis* (Acanthaceae). *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 42, n.1, p. 83-87, 1990.
- PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 23, n.4, p. 997-1002, 2000.
- PANTULU, J. V. Accessory chromosomes in *Pennisetum typhoides*. *Current Science*, Bangalore, v. 29, n.1, p. 28-29, 1960.
- PANTULU, J. V. Pachytene pairing and meiosis in the F1 hybrid of *Pennisetum typhoides* and *P. purpureum*. *Cytologia*, Tokyo, v. 32, n.3/4, p.532-541, 1967.
- PANTULU, J. V. Meiosis in an autotriploid pearl millet. *Caryologia*, Firenze, v. 21, n.1, p. 11-15, 1968.
- PANTULU, J. V.; VENKATESWARLU, J. Morphology of the pachytene chromosomes of *Pennisetum purpureum* Schum. *Genetica*, Dordrecht, v 39, n.1, p. 41-44, 1968.
- PANTULU, J. V.; MANGA, V. Meiosis in a haploid pearl millet. *Current Science*, Bangalore, v. 38, p. 143-144, 1969.
- PANTULU, J. V.; RAO, K. Cytogenetics of pearl millet. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 61, n.1, p. 1-17, 1982.
- PESCHKE, V. M.; PHILLIPS, R. L. Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics*, New York, v. 30, p. 41-75, 1992.

PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M.; PESCHKE, V.M. Do we understand somaclonal variation? In: NIJKAMP, H. J. J.; VAN DER PLAS, L. H. W.; VAN AASTRIJK, J. *Progress in plant cellular and molecular biology*. 1990. p. 131-141.

PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue culture: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 91, n.12, p. 5222-5226, 1994.

PICKERSGILL, B. Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: GUPTA, P. K.; TSUCHIYA, T. ed. *Chromosome engineering plants: genetics, breeding, evolution*. New York: Elsever, 1991. Part A, p. 139-160.

PIJNACKER, L. P.; FERWERDA, M. A.; PUIITE, K. J.; SCHAART, J. G. Chromosome elimination and mutation in tetraploid somatic hybrids of *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Cell Report*, New York, v. 8, n.2, p. 82-85, 1989.

POGGIO, L.; MOLINA, M. C.; NARANJO, C. A. Cytogenetics studies in the genus *Zea* 2. Colchicine-induced multivalents. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 79, n.5, p. 461-464, 1990.

POWELL, J. B.; BURTON, G. W. Nucleolus-organizing accessory chromosomes in pearl millet, *Pennisetum typhoides*. *Crop Science*, Madison, v. 6, n.2, p. 131-134, 1966.

POWELL, J. B.; BURTON, G. W. Chromosome interchanges of spontaneous origin in pearl millet, *Pennisetum typhoides*. *Crop Science*, Madison, v. 9, n.3, p. 252-253, 1969.

POWELL, J. B.; HANNA, W. W.; BURTON, G. W. Origin, cytology and reproductive behaviour of haploids in pearl millet. *Crop Science*, Madison, v.15, n.2, p.389-392, 1975.

RAMAN, V. S. Progress of cytogenetic research in Madras State. In: *Advances in agricultural Sciences*. The Madras Agric. Jour. Coimbatore, India, 1964.p. 122-143.

RAO, P. N.; RANGANADHAM, P.; NIRMALA, A. Behaviour of a sticky desynaptic mutant in pearl millet. *Genetica*, Dordrecht, v. 81, n.3, p. 221-227, 1990.

- RAU, N. S. On the chromosome numbers of some cultivated plants of south India. *Journal of the Indian Botanical Science*, Madras, v. 8, n. 2, p. 126-128, 1929.
- READER, S. M.; MILLER, T. E.; PURDIE, K. A. Cytological analysis of plant chromosomes using rapid *in situ* hybridization. *Euphytica*, Dordrecht, v. 89, n. 3, p. 121-124, 1996.
- RILEY, R.; CHAPMAN, V. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature*, London, v. 182, n.4715, p. 713-715, 1958.
- RILEY, R.; CHAPMAN, V.; JOHNSON, R. Introduction of yellow rust resistance of *Ae. comosa* in wheat by genetically induced homoelogenous recombination. *Nature*, London, v. 217, n.5126, p. 383-387, 1968.
- RONCHI, V. N. Mitosis and meiosis in cultured plant cells and their relationship to variant cell types arising in culture. *International Review Cytology*, San Diego, v. 158, p. 65-140, 1995.
- RUFAS, J. S.; GIMÉNEZ-ABIAN, J.; GARCIA DE LA VEJA, C.; GONSALVEZ, J. Recombination within extra segments: evidence from the grasshopper *Chorthippus jucundus*. *Chromosoma*, New York, v. 96, n.2, p. 91-101, 1988.
- SANTOS-SEREJO, J. A. Análise da transmissão e comportamento meiótico de cromossomos alterados em plantas de milho regeneradas *in vitro* e seleção de genótipos para cultura de calos com alta capacidade de regeneração. 1999. 131 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- SEARS, E. R. Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Annual Review in Genetics*, Palo Alto, v. 10, p. 31-51 1976.
- SETHI, G. S.; KALIA, H. R.; GHAL, B. S. Cytogenetical studies of three interspecific hybrids between *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. and *P. purpureum* Schumach. *Cytologia*, Tokyo, v. 35, n.1, p. 96-101, 1970.
- SHIVANNA, K.R.; RANGASWAMY, N.S. *Pollen Biology. A laboratory manual*. Berlin: Springer Verlag, 1992. 119 p.

SREE RAMULU, K. Meiosis and fertility in derivatives of amphiploid *Pennisetum*. *Caryologia*, Firenze, v. 21, n.2, p. 147-156, 1968.

SREE RANGASWAMY, S. R. Cytological studies on diploid and polyploid taxa of the genus *Pennisetum* Rich. *Genetica*, v. 43, p. 257-273, 1972.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. Pollen biology biochemistry management. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307 p.

STUTZ, H. C. Asynchronous meiosis chromosome rhythm as a cause of sterility in Triticale. *Genetics*, Baltimore, v. 47, n.8, p. 988, 1962.

SUBRAHMANYAN, N. C.; KASHA, K. J. Selective chromosomal elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization. *Chromosoma*, New York, v. 42, n.2, p. 111-125, 1973.

SUJATHA, D. M.; MANGA, V.; SUBBA RAO, M. V.; MURTY, J. S. R. Meiotic studies in some species of *Pennisetum* (L.) Rich. (Poaceae). *Cytologia*, Tokyo, v. 54, n.6, p. 641-652. 1989.

SUNDBERG, E.; GLIMELIUS, K. Effects of parental ploidy and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within Brassicaceae. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 83, n.1, p. 81-88, 1991.

SYBENGA, J. General cytogenetics. Amsterdam: North Holland. 1972. 359 p.

SYBENGA, J. Cytogenetics in plant breeding. Berlin: Springer-Verlag. 1992. 469 p.

SWANSON, C. P.; MERZER, T.; YOUNG, W. J. Cytogenetics. The chromosome in division, inheritance and evolution. Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliffs, 1981. 577 p.

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

THOMPSON, M. M. Cytogenetics of *Rubus*. 3. Meiotic instability in some higher polyploids. *American Journal Botany*, Columbus, v. 49, n.6, p. 575-582, 1962.

TILQUIN, J. P.; BROUWER, K.; HORVART, F. Unusual cytological patterns in microsporogenesis in a cultivar of *Fuchsia*. 1. Multiple spindle. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 67, n. 5, p. 413-417, 1984.

VEYRET, Y. Les chromosomes somatiques chez quelques espèces de *Pennisetum* (Somatic chromosomes in some species of *Pennisetum*). *Agronomia Tropical*, Maracay, v. 12, p. 595-598, 1957.

VIEIRA, M. R. A. M. C. M. Interação genómica em alopoliplóides da tribo Triticeae. Coimbra: ed. aut., 1992. Disponível em: <<http://www.uc.pt/Teses/Gbio.vieira.html>>. Acesso em: 02 jul. 2002.

ZARCHI, I.; SIMCHEN, G.; HILLEL, J.; SCHAAP, T. Chiasmata and the breeding system in wild populations of diploids wheat. *Chromosoma*, New York, v. 38, n.1, p. 77-94, 1972.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE GENÔMICA EM HÍBRIDOS DE *Pennisetum purpureum* e *P. glaucum*

RESUMO

TECHIO, Vânia Helena. Análise genômica em híbridos de *Pennisetum purpureum* e *P. glaucum*. In: _____ Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp. 2002. Cap. 3, p. 85- 104. Tese (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Com o objetivo de estimar o pareamento cromossômico e o grau de relacionamento genético entre o capim-elefante (*P. purpureum*) e o milheto (*P. glaucum*), parentais de três híbridos triploides interespecíficos, aplicou-se o modelo matemático de Alonso e Kimber (1981) revisado por Chapman e Kimber (1992). A afinidade relativa dos genomas foi calculada baseando-se nas avaliações do pareamento cromossômico de 50 células em diacinese, em que foram quantificadas as figuras univalentes, bivalentes em anel e em bastão e trivalentes. As estimativas das relações de pareamento nos três híbridos entre o capim-elefante e o milheto mostraram que os acessos M24 e BAG75, genitores do F94-60-01, apresentam uma maior proximidade genética entre os seus complementos cromossômicos.

* Comitê orientador: Lisete Chamma Davide - UFLA (Orientadora) e Antônio Vander Pereira - Embrapa Gado de Leite.

ABSTRACT

TECHIO, Vânia Helena. Genomic analysis in *Pennisetum purpureum* and *P. glaucum* hybrids. In: _____. *Meiose e análise genômica em Pennisetum spp.* 2002. Cap 3, p. 85- 104. Thesis (Doctorate in Genetics and Plant Breeding)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The objective of this study was to evaluate chromosome pairing and the degree of genetic relationship between elephantgrass (*P. purpureum*) and pearl millet (*P. glaucum*). Alonso and Kimber's mathematical model (1981) revised by Chapman and Kimber (1992) was applied to three triploid interspecific hybrids. The genomic relative affinities were calculated based on the evaluations of chromosome pairing of 50 cells in diakinesis, in which univalent, ring and rod bivalent and trivalent figures were quantified. The pairing relationships estimate showed that M24 and BAG 75 accessions, progenitors of F94-60-01, present the major genetic proximity among their chromosome complement.

* Guidance Committee: Lisete Chamma Davide – UFLA (Major Professor) and Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite

3.1 INTRODUÇÃO

A análise genômica clássica envolve a avaliação do comportamento cromossômico na metáfase I em híbridos interespecíficos, com o propósito de estabelecer relacionamentos filogenéticos em grupos de diferentes espécies (Dewey, 1982; Seberg e Petersen, 1998).

Além de ser empregada na definição de posicionamentos taxonômicos e evolutivos, a análise genômica tem sua maior aplicabilidade no melhoramento genético, pois a estimativa da afinidade genética fornece um indicativo da melhor combinação para troca de alelos entre as espécies.

Com o objetivo de estimar o pareamento cromossômico e o grau de relacionamento genético entre parentais de híbridos poliplóides, vários modelos matemáticos foram propostos a partir da década de 1980 (Driscoll, Gordon e Kimber, 1980; Alonso e Kimber, 1981; Jackson e Casey, 1982; Jackson e Hauber, 1982; Sybenga, 1988; Crane e Sleper, 1989; Chapman e Kimber, 1992; Sybenga, 1994).

De maneira geral, os modelos utilizam as mesmas pressuposições e definições (Kimber, Alonso e Sallee, 1981; Chapman e Kimber, 1992), embora em alguns casos, modificações e adaptações são propostas e refletem nas estimativas obtidas.

As afinidades entre os três genomas reunidos em um híbrido triplóide geralmente são representadas separadamente, considerando as três combinações possíveis entre três cromossomos. Tanto no modelo de Sybenga (1988) como no de Crane e Sleper (1989) utilizam-se muitas variáveis envolvendo todas as possibilidades de pareamento entre os três cromossomos dos três genomas. Como consequência, obtêm-se vários parâmetros de afinidade ou, de acordo com Sybenga (1988), pareamento preferencial, em vez de um único resultado.

Assumindo que a afinidade entre dois genomas aumenta às custas do decréscimo das outras combinações e considerando não ser possível identificar os cromossomos em relação aos seus respectivos genomas, a estimativa de dois parâmetros, e a partir desses a derivação de um terceiro, parece ser suficiente para observar qual combinação de pareamento aumentou ou quais as diferenças entre os três genomas (Sybenga, 1992).

O modelo de Alonso e Kimber (1981), revisado por Chapman e Kimber (1992), contempla essa proposta. Isso é possível porque considera-se que há uma relação simétrica entre os genomas, em que os genomas 1 e 2 são mais relacionados (não necessariamente homólogos) com uma afinidade relativa de x e ambos são distantemente relacionados ao genoma 3, com uma afinidade relativa y , de forma que $x > y$. Para relacionar as duas variáveis, considera-se $x + y = 1$, em que x varia de 0,5 a 1,0.

Em *Pennisetum*, Krishnaswamy e Raman (1954), Pantulu (1967) e Jauhar (1968 e 1981) descreveram as relações de homologia entre os genomas do capim-elefante ($2n=4x=28$, $A'A'BB$) e do milheto ($2n=2x=14$, AA), baseados em observações do pareamento cromossômico dos híbridos interespecíficos ($2n=3x=21$, $AA'B$). Os autores concluíram que os genomas A e A' são homólogos/homeólogos, resultando na formação de 7 bivalentes e que os cromossomos do genoma B permanecem como univalentes nas metáfases I e diacineses dos híbridos.

Neste trabalho, o objetivo foi determinar quantitativamente a afinidade relativa dos genomas A , A' e B do milheto e capim-elefante, reunidos em três híbridos triploides interespecíficos, aplicando o modelo proposto por Alonso e Kimber (1981) e revisado por Chapman e Kimber (1992).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material genético

O material biológico utilizado neste estudo (Tabela 1) foi coletado nos meses de abril a julho, de 1999 a 2002, no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Forrageiras da Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco, MG.

TABELA 1 Híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milho avaliados do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG.

Acesso	Denominação comum	Identificação
CNPGL F94-44-03	BAG 63 x M 36	Híbrido interespecífico
CNPGL F94-60-01	BAG 75 x M 24	Híbrido interespecífico
CNPGL F94-49-06	BAG 91 x M 38	Híbrido interespecífico

3.2.2 Análise genômica

As inflorescências dos três acessos híbridos foram coletadas em vários estádios de desenvolvimento entre 8h30 e 10 horas, fixadas em álcool etílico: ácido propiônico (3:1) e armazenadas a -4°C até o momento de serem utilizadas.

As lâminas foram preparadas de acordo com o protocolo convencional para estudos meióticos por meio de esmagamento e coloração com carmin propiônico 0,5%.

As fotomicrografias dos meiócitos foram feitas com fotomicroscópio Olympus BX60, utilizando-se filtro verde e filmes preto e branco Kodak asa 100, revelados com D-76 (Kodak) e copiados em papel Kodabrome Print RCF3.

O pareamento cromossômico foi analisado em 50 células em diacinese, registrando-se o número de univalentes, bivalentes em anel, bivalentes em bastão ou abertos e trivalentes. Estes dados foram empregados para avaliação da afinidade relativa dos genomas, de acordo com o modelo proposto por Alonso e

Kimber (1981) e revisado por Chapman e Kimber (1992). Foram empregados os conceitos de análise genômica, conforme Driscoll, Bielig e Darvey (1979) e Alonso, Kimber e Sallee (1981). O conceito de figura meiótica refere-se a qualquer cromossomo ou grupo de cromossomos ligados por quiasmas (univalente, bivalentes ou trivalentes). Configuração meiótica é usada para o conjunto de figuras meióticas gerado de um único grupo homeólogo de cromossomos dentro de uma célula.

Neste modelo, a afinidade relativa entre os dois genomas mais relacionados (A e A') é referida como x, podendo tratar-se de uma medida de homologia ou homeologia, enquanto que a afinidade relativa com o terceiro genoma (B) é y. Os valores de x e y estão relacionados à equação $x + y = 1$, portanto, $1 > x > 0,5$. Se a afinidade relativa dos dois genomas mais relacionados é tão alta que não se formam quiasmas entre os genomas A e B, o valor de x é 1 e y é zero.

O valor de x obtido pela substituição com os dados observados é dado pela equação:

$$x = \frac{2 - 2w \pm \sqrt{6w - 2}}{3 - w}$$

em que: $w = \frac{8c^2 + 4c - 3 - 9t + 4g + u}{14c^2}$

b= número básico de cromossomos

u= univalentes observados/ b

g= bivalentes em anel observados/ b

t= trivalentes observados/ b

A obtenção dos valores de afinidade genômica implica na estimativa de outros parâmetros, tais como a frequência média com que dois braços cromossômicos pareiam, definida como c. O valor numérico de c pode ser

obtido, utilizando os dados observados da seguinte maneira: [bivalentes em bastão + 2.(bivalentes em anel + trivalentes)]/ (2.número básico de cromossomos).

Considerando que a afinidade relativa reflete na proporção do pareamento cromossômico, a frequência de pareamento entre os genomas 1 e 2 é expressa por $cx/(x + 2y)$ e entre os genomas 1 e 3 ou 2 e 3 é $cy/(x + 2y)$. A proporção de braços homeólogos sem pareamento é dada por $(1 - c)$. A partir dessas considerações, obtêm-se as frequências das quatro possíveis configurações e das figuras meióticas para um grupo de três cromossomos, em que dois têm maior afinidade entre si e estão distantemente relacionados com o terceiro (Tabelas 2 e 3).

Para obter a frequência das figuras meióticas por célula multiplicou-se a frequência obtida para um grupo de três cromossomos pelo número básico de cromossomos, quando se tratava de bivalentes e, por duas vezes o número básico de cromossomos, quando se tratava de univalentes.

TABELA 2 Freqüências das configurações em um grupo de três cromossomos, em que dois têm maior afinidade entre si e ambos estão distantemente relacionados com o terceiro (Chapman e Kimber, 1992)

Configurações de braços e freqüências	Braço Longo		
	(1 - 2, 3)	(1 - 3, 2)	(2 - 3, 1)
	(cx/ (x + 2y)	(cy/ x + 2y)	(cy/ x + 2y)
Braço curto	IIa + I*	III	III
(1 - 2, 3)	$c^2x^2/(x + 2y)^2$	$c^2xy/(x + 2y)^2$	$c^2xy/(x + 2y)^2$
cx/ (x + 2y)	IIb + I	III	III
(1 - 3, 2)	III	IIa + I	IIb + I
cy (x + 2y)	$c^2xy/(x + 2y)^2$	$c^2y^2/(x + 2y)^2$	$c^2y^2/(x + 2y)^2$
(2 - 3, 1)	III	III	IIa + I
cx/ (x + 2y)	$c^2xy/(x + 2y)^2$	$c^2y^2/(x + 2y)^2$	$c^2y^2/(x + 2y)^2$
(1, 2, 3)	IIb + I	IIb + I	3 I
(1 - c)	c (1-c) x/ (x + 2y)	c (1-c) y/ (x + 2y)	c (1-c) y/ (x + 2y)
			(1 - c) ²

* I = univalente; IIa = bivalente em anel; IIb = bivalente em bastão e III = trivalente

TABELA 3 Freqüências das figuras meióticas em um grupo de três cromossomos, em que dois têm maior afinidade entre si e ambos estão distantemente relacionados com o terceiro (Chapman e Kimber, 1992)

Figuras meióticas*	Freqüências
I	$c^2 (x^2 + 2y^2) / (x + 2y)^2 + c^2 - 4c + 3$
II b	$2c (1 - c)$
II a	$c^2 (x^2 + 2y^2) / (x + 2y)^2$
III	$c^2 (4xy + 2y^2) / (x + 2y)^2$

* I = univalente; IIa = bivalente em anel; IIb = bivalente em bastão e III = trivalente

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam as frequências observadas e calculadas das figuras meióticas e as frequências das configurações de braços para cada acesso híbrido avaliado. Na Tabela 7 encontram-se os valores de afinidade relativa dos genomas (x e y), a frequência média com que dois braços cromossômicos pareiam e as frequências das quatro possíveis configurações de braços para os três acessos avaliados.

Considerando que a formação de bivalentes é utilizada como indicador do grau de parentesco entre as espécies e da maior probabilidade de transferência de alelos, verifica-se que os acessos M24 e BAG75, genitores do híbrido F94-60-01, representam a melhor combinação genética entre os taxa avaliados. Isso pode ser constatado, comparando-se as estimativas obtidas para os três híbridos, pelas frequências de bivalentes em anel (Tabelas 4, 5 e 6) e de pareamento entre os cromossomos dos genomas $1 - 2 = A - A'$ (0,847) que refletiram em uma maior afinidade relativa ($x=0,994$) entre estes dois genomas (Tabela 7).

O valor de $x=0,955$ obtido para o híbrido F94-44-03 (Tabela 7) sugere uma variação na afinidade relativa entre os complementos cromossômicos dos genitores. A variação na correspondência genômica fica também evidenciada na estimativa do pareamento cromossômico. Os dois genomas mais relacionados ($1 - 2 = A - A'$) apresentam uma taxa de pareamento de 0,610, enquanto que esse valor foi de 0,847 e 0,799 para os acessos F94-60-01 e F94-49-06, respectivamente (Tabela 7). Em contrapartida, verifica-se um aumento na taxa de pareamento entre os cromossomos dos genomas $1 - 3 (A - B)$ e $2 - 3 (A' - B)$ (Tabela 7). Isso ocorre tanto quando formam-se bivalente em anel + univalente na configuração de braços $2 - 3, 1$ com $2 - 3, 1$, como também quando formam-se trivalentes na configuração $1, 2, 3$ com $1, 2, 3$ (Tabelas 4 e

7). Esses eventos contribuíram para aumentar a afinidade relativa entre os genomas 1 - 3 (A - B) e 2 - 3 (A' - B), expresso pelo y (Tabela 7), se avaliado analogamente com os valores dos outros dois híbridos.

Essa constatação vem ao encontro de informações da literatura. Sybenga (1992) relatou que, quando há decréscimo na afinidade entre dois genomas, possivelmente a afinidade entre os outros dois genomas pode aumentar, assim como a frequência de bivalentes com um univalente aumenta às custas da frequência de trivalentes.

A diferença do F94-44-03 em relação aos demais no que se refere à afinidade relativa (x) encontra sustentação na maior taxa de irregularidades observadas nos seus meiócitos e de seu genitor capim-elefante (BAG 63), conforme apresentado no capítulo 2.

Quando comparadas as frequências das figuras meióticas observadas e calculadas para os três híbridos (Tabelas 4, 5 e 6), constata-se que o acesso F94-44-03 apresentou maior diferença. Apesar disso, ele pode ser classificado junto com os outros dois acessos como híbridos interespecíficos do tipo 2:1, pois a afinidade relativa (x) foi superior a 0,8 e o número de trivalentes não excedeu ao de bivalentes em anel. Híbridos 2:1, de acordo com Alonso e Kimber (1981), são aqueles que apresentam dois genomas mais relacionados, não necessariamente homólogos, e ambos são mais distantemente relacionados de um terceiro genoma. Essa constatação para os genomas dos híbridos entre o milho e o capim-elefante, como já mencionado, tem sido amplamente relatada na literatura.

A ocorrência de trivalentes nos três acessos está também de acordo com a definição para híbridos 2:1, pois, conforme Alonso e Kimber (1981), essas configurações são sempre esperadas quando $x < 1$.

Aplicando-se o princípio da relação simétrica dos genomas proposto por Alonso e Kimber (1981) aos valores obtidos para os acessos (Tabela 7), observa-

se que a diferença estrutural e genética entre os genomas A e A' é pequena, enquanto que entre estes e o genoma B é maior, pois a afinidade relativa média (x) foi 0,978 e $y= 0,022$, confirmando numericamente a maior correspondência dos genomas A e A' mencionada. Para os híbridos entre *Secale cereale* x (*Triticum aegilopoides* x *T. tauschii*) e entre *Hordeum jubatum* x *Secale cereale*, resultados semelhantes foram obtidos (Alonso e Kimber, 1981).

Os valores observados para y sugerem que existe homeologia, mesmo que em um grau reduzido, entre os genomas A e A' com o B. Essa proposição encontra sustentação na origem híbrida do parental capim-elefante que reuniu os genomas A' e B. É provável que as espécies parentais doadoras desses dois genomas apresentavam alguma homologia cromossômica para permitir a formação de um híbrido estável e viável como é o capim-elefante. O maior valor de y para o acesso F94-44-03 (Tabela 7), entretanto, pode ser resultado de translocações que refletiram também no aumento da frequência de trivalentes (Tabela 4), já que um de seus parentais (BAG 63) é oriundo de cultura de tecidos e esta pode aumentar a taxa de irregularidades em um genótipo, como já relatado para esse acesso no capítulo 2.

O emprego do modelo matemático de Alonso e Kimber (1981), revisado por Chapman e Kimber (1992), demonstrou quantitativamente a proximidade genética nas três diferentes combinações híbridas envolvendo acessos de milheto e capim-elefante. Estes dados associados às informações de fertilidade, irregularidades e estabilidade meióticas (capítulo 2) fornecem subsídios úteis quando o objetivo é a transferência de alelos. Para inferências evolutivas, recomenda-se a avaliação de um maior número de famílias e a conciliação destes resultados com estudos de genética e citogenética molecular e bandeamento cromossômico.

TABELA 4 Frequências das configurações e figuras meióticas em um grupo de três cromossomos e frequências calculada e observada das figuras meióticas por célula para o acesso F94-44-03 (híbrido entre *P. purpureum* x *P. glaucum*)

Configurações de braços e frequências	Braço longo		
	(1 - 2, 3)	(1 - 3, 2)	(2 - 3, 1)
Braço curto			
(1 - 2, 3)	IIa + I* = 0,406	III = 0,019	III = 0,019
(1 - 3, 2)	III = 0,019	IIa + I = 0,0008	III = 0,0008
(2 - 3, 1)	III = 0,019	III = 0,0008	IIa + I = 0,0008
(1, 2, 3)	IIb + I = 0,192	IIb + I = 0,009	IIb + I = 0,009
			3 I = 0,091
Figura meiótica*	Frequência em um grupo de 3 cromossomos	Frequência em uma célula	Frequência observada
I	0,24	3,3	6,4
II b	0,42	2,9	4,5
II a	0,40	2,8	2,4
III	0,07	0,07	0,1

* I = univalente; IIa = bivalente em anel; IIb = bivalente em bastão e III = trivalente

TABELA 5 Frequências das configurações e figuras meióticas em um grupo de três cromossomos e frequências calculada e observada das figuras meióticas por célula para o acesso F94-60-01 (híbrido entre *P. purpureum* x *P. glaucum*)

Configurações de braços e frequências	Braço longo			
	(1 - 2, 3)	(1 - 3, 2)	(2 - 3, 1)	(1, 2, 3)
Braço curto				
(1 - 2, 3)	IIa + I* = 0,718	III= 0,004	III= 0,007	IIb + I= 0,087
(1 - 3, 2)	III= 0,004	IIa + I= 0,00002	III= 0,00007	IIb + I = 0,0007
(2 - 3, 1)	III= 0,004	III= 0,00002	IIa + I= 0,00002	IIb + I= 0,0007
(1, 2, 3)	IIb + I= 0,120	IIb + I= 0,0007	IIb + I=0,0007	3 I= 0,020
Figura meiótica*	Frequência em um grupo de 3 cromossomos	Frequência em uma célula	Frequência observada	
I	0,55	7,7	6,8	
II b	0,24	1,7	2,0	
II a	0,71	5,0	5,0	
III	0,016	0,01	0,06	

* I = univalente; IIa= bivalente em anel; IIb= bivalente em bastão e III= trivalente

TABELA 6. Frequências das configurações e figuras meióticas em um grupo de 3 cromossomos e frequências calculadas e observadas das figuras meióticas por célula para o acesso F94-49-06 (híbrido entre *P. purpureum* x *P. glaucum*)

Configurações de braços e frequências	Braço longo			Frequência observada
	(1 - 2, 3)	(1 - 3, 2)	(2 - 3, 1)	
Braço curto				
(1 - 2, 3)	IIa + I* = 0,638	III = 0,009	III = 0,009	IIb + I = 0,139
(1 - 3, 2)	III = 0,009	IIa + I = 0,0001	III = 0,0001	IIb + I = 0,0021
(2 - 3, 1)	III = 0,009	III = 0,0001	IIa + I = 0,0001	IIb + I = 0,0021
(1, 2, 3)	IIb + I = 0,139	IIb + I = 0,0021	IIb + I = 0,0021	3 I = 0,030
Figura meiótica*	Frequência em um grupo de 3 cromossomos	Frequência em uma célula		
I	0,46	6,4	6,9	
II b	0,29	2,0	2,4	
II a	0,63	4,4	4,4	
III	0,03	0,03	0,08	

* I = univalente; IIa = bivalente em anel; IIb = bivalente em bastão e III = trivalente

TABELA 7 Afinidade relativa dos genomas (x e y), frequência média com que dois braços cromossômicos pareiam (c) e frequências das quatro possíveis configurações de braços para os acessos F94-44-03; F94-60-01 e F94-49-06 (híbridos entre *P. purpureum* x *P. glaucum*)

Acessos e genomas	x e y ¹	c ²	Frequência de pareamento	Configurações dos braços	Frequência
F94-44-03					
1 - 2	x= 0,955	0,698	cx/ (x + 2y)	(1 - 2, 3)	0,610
1 - 3	y= 0,045	0,698	cy/ (x + 2y)	(1 - 3, 2)	0,028
2 - 3	y= 0,045	0,698	cy/ (x + 2y)	(2 - 3, 1)	0,020
				(1, 2, 3)	0,302
F94-60-01					
1 - 2	x= 0,994	0,858	cx/ (x + 2y)	(1 - 2, 3)	0,847
1 - 3	y= 0,006	0,858	cy/ (x + 2y)	(1 - 3, 2)	0,005
2 - 3	y= 0,006	0,858	cy/ (x + 2y)	(2 - 3, 1)	0,005
				(1, 2, 3)	0,142
F94-49-06					
1 - 2	x= 0,985	0,824	cx/ (x + 2y)	(1 - 2, 3)	0,799
1 - 3	y= 0,015	0,824	cy/ (x + 2y)	(1 - 3, 2)	0,012
2 - 3	y= 0,015	0,824	cy/ (x + 2y)	(2 - 3, 1)	0,012
				(1, 2, 3)	0,176

¹Afinidade relativa dos genomas; ² Frequência média com que dois braços cromossômicos pareiam

3.4 CONCLUSÕES

As estimativas das relações de pareamento nos três híbridos entre o capim-elefante e o milheto mostraram que os acessos M24 e BAG75, genitores do F94-60-01, apresentam uma maior proximidade genética entre os seus complementos cromossômicos.

A variação na afinidade relativa entre os complementos cromossômicos dos genitores foi evidenciada pela estimativa da afinidade relativa dos genomas e confirmada pela frequência de pareamento cromossômico.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, L. C.; KIMBER, G. The analysis of meiosis in hybrids. II. Triploid hybrids. *Canadian Journal of Genetics Cytology*, Ottawa, v. 23, n.2, p. 221-234, 1981.

BENETT, M. B. The development and use of genomic *in situ* hybridization (GISH) as a new tool in plant cytogenetics. In: BRANDHAM, P. E.; BENETT, M. (eds.) *Kew chromosome conference, IV*. Kew: Royal Botanic Garden, 1995. p. 167-183.

BOTHMER, R. von, FLINK, N.; LANDSTROM, T. Meiosis in interspecific *Hordeum* hybrids. VI. Hexaploid hybrids. *Evolution Trends Plants*, Svalof, v.3, n.1, p. 53-58, 1989a.

CHAPMAN, C. G. D.; KIMBER, G. Developments in the meiotic analysis of hybrids. I. Review of theory and optimization in triploids. *Heredity*, Oxford, v. 68, n.2, p. 97-103, 1992.

CRANE, C. F.; SLEPER, D. A. A model of meiotic chromosome association in triploids. *Genome*, Ottawa, v. 32, n.1, p. 82-98, 1989.

DEWEY, D. R. Genomic and phylogenetic relationships among North American perennial Triticeae. In: ESTES et al. (Eds.) *Grasses and grasslands*. Oklahoma, University of Oklahoma Press, 1982. p. 51-81.

DRISCOLL, C. J.; BIELIG, L. M.; DARVEY, N. L. An analysis of frequencies of chromosome configurations in wheat and wheat hybrids. *Genetics*, Baltimore, v. 91, n. 4, p. 755-767, 1979.

DRISCOLL, C. J.; GORDON, G. H.; KIMBER, G. Mathematics of chromosome pairing. *Genetics*, Baltimore, v. 95, n.1, p. 159-169, 1980.

JACKSON, R. C.; CASEY, J. Cytogenetic analyses of autopolyploids: models and methods for triploids to octoploids. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 69, n.4, p. 487-501, 1982.

- JACKSON, R. C.; HAUBER, D. P. Autotriploid and autotetraploid analyses: correction coefficients for proposed binomial models. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 69, n.4, p. 644-646, 1982.
- JAUHAR, P. P. Inter- and intra-genomal chromosome pairing in an interspecific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. *Genetica*, Dordrecht, v. 39, n.3/4, p. 360-370, 1968.
- JAUHAR, P. P. Cytogenetics of pearl millet. *Advances in Agronomy*, New York, v. 34, p. 407-479, 1981.
- KIMBER, G.; ALONSO, L. C.; SALLEE, P. J. The analysis of meiosis in hybrids. I. Aneuploid hybrids. *Canadian Journal of Genetics Cytology*, Ottawa, v. 23, n.2, p. 209-219, 1981.
- KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V. S. Studies on the interspecific hybrid of *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. x *P. purpureum* Schumach. III. The cytogenetics of the colchicine-induced amphidiploid. *Genetica*, Dordrecht, v. 27, n.1/2, p. 253-272, 1954.
- PANTULU, J. V. Pachytene pairing and meiosis in the F1 hybrid of *Pennisetum typhoides* and *P. purpureum*. *Cytologia*, Tokyo, v. 32, n. 3/4, p.532-541, 1967.
- SEBERG, O.; PETERSEN, G. A critical review of concepts and methods used in classical genome analysis. *The Botanical Review*, Bronx, v. 64, n. 4, p. 372-417, 1998.
- SYBENGA, J. Mathematical models for estimating preferential pairing and recombination in triploid hybrids. *Genome*, Ottawa, v. 30, n.5, p. 745-757, 1988.
- SYBENGA, J. *Cytogenetics in plant breeding*. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 469 p.
- SYBENGA, J. Preferential pairing estimates from multivalent frequencies in tetraploids. *Genome*, Ottawa, v. 37, n.6, p. 1045-1055, 1994.