

**VARIAÇÕES CROMOSSÔMICAS
ASSOCIADAS À POLIPLOIDIZAÇÃO EM
HÍBRIDOS DE *Pennisetum* spp.: UM ESTUDO
TEMPORAL E TECIDO ESPECÍFICO**

FERNANDA DE OLIVEIRA BUSTAMANTE

2009

FERNANDA DE OLIVEIRA BUSTAMANTE

**VARIAÇÕES CROMOSSÔMICAS ASSOCIADAS À
POLIPLOIDIZAÇÃO EM HÍBRIDOS DE *Pennisetum* spp.: UM ESTUDO
TEMPORAL E TECIDO ESPECÍFICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Citogenética Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora
Profa. Lisete Chamma Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

Bustamante, Fernanda de Oliveira.

Variações cromossômicas associadas à poliploidização em híbridos de *Pennisetum* spp. : um estudo temporal e tecido específico / Fernanda de Oliveira Bustamante. – Lavras : UFLA, 2009.

53 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. Capim-elefante. 2. Milheto. 3. Híbrido interespecífico. 4. Número cromossômico. 5. Conteúdo de DNA. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.2083

FERNANDA DE OLIVEIRA BUSTAMANTE

**VARIAÇÕES CROMOSSÔMICAS ASSOCIADAS À
POLIPLOIDIZAÇÃO EM HÍBRIDOS DE *Pennisetum* spp.: UM ESTUDO
TEMPORAL E TECIDO ESPECÍFICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Citogenética Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 31 de julho de 2009

Prof. Sandro Barbosa

UNIFAL

Prof. José Marcello Salabert de Campos

UFJF

Profa. Lisete Chamma Davide
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Ao grande amigo Pe. Israel, pelos exemplos de dedicação e superação
e a todos os meus familiares,

OFEREÇO

Aos meus pais, Fernando e Vera
e ao irmão Frederico, por sempre acreditarem em mim.

Ao esposo Douglas, pelo apoio incondicional,

DEDICO

"Minha vida, minha história,
só fez sentido,
quando Te conheci.
Seus olhos, Sua Sagrada face,
me levam além do que pensei.
Se às vezes me escondo,
em Você me acho,
nem dá pra disfarçar...
Preciso dizer,
Você faz muita falta,
Não há como explicar...
Foi sem Você
que eu pude entender
Que não é fácil viver
sem Te ter
Meu coração me diz que não
Eu não consigo viver sem Você, sem Você...
Nunca sem Você
Meu Senhor, meu Senhor eu não sou nada,
Sem Você, sem Você..."

Sem Você
Rosa de Saron
Composição: Guilherme de Sá

AGRADEÇO

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela estrutura concedida para realização desse trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

A mãe e orientadora Lisete Chamma Davide, por todas as oportunidades, ensinamentos e, principalmente, pela confiança depositada em mim.

À Embrapa Gado de Leite, especialmente ao Pesquisador Dr. Antônio Vander Pereira, pela orientação e por ter concedido material genético para a realização deste trabalho.

Aos professores e amigos Dr. José Marcello Salabert de Campos e Sandro Barbosa, pelas valiosas contribuições.

A Ana Luísa e Juliane, pelo auxílio na preparação e análise das amostras para citometria de fluxo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos e, em especial, à amiga Giovana, por sua amizade.

Aos funcionários do Departamento de Biologia: Sr. Antônio, D. Irondina, Patrícia, Elaine, Heloíza, Zélia, Rafa e Du, pela ótima convivência.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética, em especial a Natália e a Iara, pelo auxílio prestado em vários momentos e a Rose e a Patrícia, pela leitura atenta deste trabalho.

Aos colegas de mestrado: Joyce, Thaís, André e Fernando, pelas horas incontáveis de estudo e de alegria.

Aos colegas de graduação, por todos os momentos especiais de minha vida. Não poderia deixar de agradecer especialmente a Karina, Luís e Júlia e Vivi e Marcelo, por tudo que fizeram por mim. Desejo toda a felicidade do mundo para vocês e, mesmo estando longe, vocês estarão sempre em meu coração.

Aos amigos de Lavras: D. Raimunda, Sr. Antônio, D. Eliane, Sr. Ailton, Márcio, Lourdes, Antônio (Nenê) e Tia Rosanita, pelos bons momentos.

A toda a Pastoral da Família e em especial ao grupo Phoenix, por estarmos vencendo juntos todos os obstáculos. Agradeço também a Soraya e ao

Zé Reinaldo, por me iniciarem na Pastoral e aos amigos Reginaldo e Raquel, e Lauro e Rosa, pelas risadas imprescindíveis.

Ao grande amigo Pe. Israel, por me mostrar o verdadeiro caminho da felicidade e pelos exemplos de superação e dedicação. Agradeço também a todos os meninos da Fazendinha, pela amizade.

Ao afilhado Miguel e à comadre Melina, por todo amor.

A todos os meus familiares: tios, tias, primos, primas, sogro, sogra, cunhados, cunhadas e sobrinhas. Vocês são o meu porto seguro.

Aos avós José Felix e Esmerinda, por serem meus exemplos de vida.

Ao irmão Frederico, por quem tento ser sempre melhor.

Aos pais Fernando e Vera, por todo o sacrifício para me dar um estudo de boa qualidade e por sempre acreditarem em mim, independente das falhas cometidas.

Aos filhinhos Teddy e Maggie, por serem a alegria da casa e meus grandes companheiros.

Ao esposo, Douglas, por toda dedicação, paciência, otimismo, companheirismo, alegria, amizade, amor... Não tenho palavras para agradecer tudo que você faz por mim. Obrigada por fazer os meus dias valerem a pena. Amo você!

Acima de tudo, a Deus pelo maior dos dons, a vida.

E a todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização de mais uma etapa de minha vida.

“Tudo posso Naquele que me fortalece.”

BIOGRAFIA

Fernanda de Oliveira Bustamante, filha de Fernando José Fonseca Bustamante e Vera Lúcia de Oliveira Bustamante, nasceu em 19 de agosto de 1984, em Itanhandu, Minas Gerais.

Iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Lavras, em agosto de 2003, bacharelando-se em julho de 2007.

Bolsista do Programa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), de agosto de 2005 a julho de 2007, desenvolveu sua iniciação científica na área de Citogenética Vegetal, com o projeto de pesquisa intitulado “Citogenética de Híbridos hexaploides de *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum glaucum*”, sob a orientação da Profa. Lisete Chamma Davide

Em agosto de 2007, iniciou o mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas na Universidade Federal de Lavras, concluindo-o em julho de 2009, sob orientação da Profa. Lisete Chamma Davide.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Gênero <i>Pennisetum</i>	3
2.2 Poliploidização: aplicações e consequências.....	5
2.3 Duplicação cromossômica em híbridos entre capim-elefante e milheto.....	8
2.4 Citometria de fluxo e suas aplicações.....	10
2.5 Uso da eliminação cromossômica no melhoramento de plantas.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Material genético	20
3.2 Análise Citogenética	20
3.3 Quantificação do teor de DNA	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Contagem cromossômica.....	24
4.2 Quantificação do teor de DNA em folhas e raízes.....	29
4.3 Ciclo celular.....	36
5 CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

RESUMO

BUSTAMANTE, Fernanda Oliveira. **Variações cromossômicas associadas à poliploidização em híbridos de *Pennisetum* spp.:** um estudo temporal e tecido específico. 2009. 53p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

O híbrido triploide ($2n=3x=21$), resultante do cruzamento entre capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, $2n=2x=28$) e milho (*P. glaucum*, $2n=2x=14$), é de grande interesse econômico por superar seus genitores em potencial forrageiro. Esse híbrido, embora seja estéril devido ao número de cromossomos não balanceados, pode ter sua fertilidade restaurada por meio da duplicação cromossômica, utilizando antimitóticos. Neste trabalho, foram analisados o número cromossômico, o teor de DNA em folhas e raízes e o ciclo celular de híbridos entre capim-elefante e milho que divergem quanto ao tempo de indução de duplicação cromossômica. Foram constatadas variações no número cromossômico para todos os híbridos avaliados, sendo o intervalo de 14 a 42 o mais frequente. O comportamento dos híbridos triploides duplicados há mais tempo (americanos) e mais recentemente (nacionais) foi semelhante quanto ao número cromossômico, isto é, todos apresentaram mixoploidia em células meristemáticas. Não houve variação no conteúdo de DNA entre os tecidos avaliados (folhas e raízes) de um mesmo híbrido, mas houve variação entre os híbridos. As taxas de irregularidades nas fases do ciclo celular foram muito baixas para todos os genótipos. Os resultados obtidos mostram a dificuldade em obterem-se plantas com todo o complemento duplicado. No entanto, a eliminação cromossômica ocorrida nos híbridos pode ser uma ferramenta utilizada nos programas de melhoramento do capim-elefante.

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

ABSTRACT

BUSTAMANTE, Fernanda Oliveira. **Chromosomic variations associated with polyploidy in hybrids of *Pennisetum* spp.:** temporal and tissue specific study. 2009. 53p. Dissertation (Master in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil*.

The triploid hybrid ($2n=3x=21$), resulting from crossing napiergrass (*Pennisetum purpureum*, $2n=2x=28$) and pearl millet (*P. glaucum*, $2n=2x=14$), is of great economic interest to overcome their genitors in forage potential. This hybrid, though is sterile due to irregular chromosomes pairing at meiosis, may have their fertility restored by chromosome doubling using antimitotics. In this work, we analyzed chromosome number, DNA content in leaves and roots and cell cycle of hybrids between napiergrass and pearl millet that differ in time to induce chromosome doubling. Variations were found in chromosome number for all hybrids, and the range of 14 to 42 was more frequent. The behavior of triploid hybrids duplicated earlier (americans) and more recently (national) was similar concerning chromosomes number, that is, all presented mixoploidy meristematic cells. There was no variation in DNA content among the tissues (leaves and roots) from the same genotype, but there was variation among hybrids. Abnormality rates in the cell cycle phases were very low for all genotypes. The results show the difficulty in obtaining plants with the full duplicated chromosome complement. However, chromosome elimination occurring in the hybrids can be a tool to be used in breeding programs for napiergrass.

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

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Pennisetum* é um dos mais importantes da família Poaceae, sendo o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) ($2n=4x=28$) e o milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] ($2n=2x=14$) as espécies cultivadas de maior importância econômica e forrageira deste gênero.

O híbrido ($2n=3x=21$) resultante do cruzamento entre o capim-elefante e o milheto é de grande interesse econômico, pois apresenta produção e qualidade forrageiras superiores aos de seus genitores. No entanto, a infertilidade do híbrido triploide, devido ao não pareamento correto dos cromossomos na meiose, tem sido apontada como um problema para os programas de melhoramento da espécie.

Na tentativa de obter a restauração da fertilidade desses híbridos, estudos envolvendo duplicação cromossômica, utilizando bloqueadores mitóticos, foram realizados por vários autores que relataram a dificuldade em se obter hexaploides com número estável de cromossomos e que a mixoploidia (indivíduos com células cujo número cromossômico varia de 14 a 42) ocorreu em maior frequência (Abreu et al., 2006; Barbosa et al., 2007; Campos et al., 2009).

As plantas hexaploides são genótipos promissores para integrarem os programas de melhoramento. Já a eliminação parcial ou total de um dos genomas parentais reunidos num híbrido interespecífico, a exemplo de outras espécies como o trigo, permitiria a obtenção de materiais denominados linhas de adição ou de substituição. Estes materiais poderiam ser utilizados no melhoramento genético de plantas, desde que características de interesse fossem

introduzidas no híbrido interespecífico que, sendo estabilizado, constituiria uma raça cromossômica.

Na Embrapa Gado de Leite existem populações de híbridos triploides que foram submetidos à duplicação cromossômica. Tais populações são provenientes dos Estados Unidos da América (Hanna, 1981) ou duplicadas mais recentemente no Brasil (Barbosa et al., 2007). Análises meióticas de tais híbridos relataram a ocorrência de altas porcentagens de alterações que geram eliminação cromossômica e a produção de certa porcentagem de polens viáveis (Paiva, 2006). Torna-se necessário, portanto, verificar se, com o passar do tempo, ocorrem mudanças no comportamento cromossômico desses híbridos que possam levar à estabilidade cromossômica.

Dessa forma, no intuito de encontrar híbridos hexaploides estáveis ou, mesmo, tecidos que apresentem estabilidade cromossômica, foram analisados, no presente trabalho, o número cromossômico somático, o teor de DNA em folhas e raízes e a ocorrência de alterações no ciclo celular de híbridos entre capim-elefante e milheto, que divergem quanto ao tempo de indução de duplicação cromossômica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Pennisetum*

O gênero *Pennisetum* Rich. é um dos mais importantes da família Poaceae, sendo amplamente distribuído pelos trópicos, reunindo cerca de 140 espécies. O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e o milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] são as espécies cultivadas de maior importância econômica e forrageira deste gênero (Brunken, 1977; Martel et al., 2004).

As espécies pertencentes ao gênero *Pennisetum* constituem um grupo heterogêneo, dividido em três conjuntos gênicos. O milheto, juntamente com outras duas espécies diploides selvagens (*P. mollissimum* e *P. violaceum*), integra o conjunto gênico primário, com $2n=2x=14$. No segundo grupo, encontra-se o capim-elefante com $2n=4x=28$ e, no conjunto terciário, as demais espécies, com $x=5, 7, 8$ e 9 , sendo *P. schweinfurthii* a única com $2n=2x=14$ (Harlan & Wet, 1971).

O capim-elefante é uma espécie alotetraploide com $2n=4x=28$, genomas A'A'BB e comportamento diploide normal (Jauhar, 1981; Jauhar & Hanna, 1998; Krishnaswamy & Raman, 1954; Martel et al., 1996; Techio et al., 2006). É amplamente difundido pelo Brasil, sendo cultivado em condições ambientais divergentes. Contudo, a maioria das cultivares produz sementes minúsculas, deiscentes e de baixo vigor, limitando a expansão da área cultivada devido à necessidade de propagação vegetativa (Pereira et al., 2001).

O milheto é diploide, anual, com $2n=2x=14$ e genomas AA (Krishnaswamy et al., 1950; Rau, 1929; Techio et al., 2006). Seus grãos são utilizados como fonte de alimento humano e na produção de ração animal e suas

folhas e colmo, como forragem. É considerado o sexto cereal mais importante do mundo, depois de trigo, arroz, milho, cevada e sorgo (Jauhar & Hanna, 1998; Minocha et al., 1991; Pantulu & Rao, 1982).

Trabalhos utilizando a morfologia dos cromossomos metafásicos e ocorrência das configurações bivalentes e univalentes na meiose sugerem que os genomas A do milheto e A' do capim-elefante são homeólogos, ao passo que o genoma B ainda não tem sua origem definida (Barbosa et al., 2003; Jauhar, 1981; Techio et al., 2006).

Considerando a capacidade do capim-elefante de cruzar com outras espécies de *Pennisetum*, uma das estratégias dos programas de melhoramento é recorrer à hibridação entre o capim-elefante e o milheto. Busca-se reunir, no híbrido, algumas características desejáveis do milheto, como qualidade da forragem, resistência à seca, tolerância às doenças e boa produção de sementes não deiscentes, procurando associá-las à agressividade, rusticidade, perenidade e elevada produção de matéria seca do capim-elefante (Pereira et al., 2000).

O cruzamento entre capim-elefante e milheto produz um híbrido triploide denominado PMN (do inglês *pearl millet and napiergrass*), com os genomas AA'B, com $2n=3x=21$ cromossomos, dos quais sete são oriundos do milheto e 14 do capim-elefante. Esse híbrido é considerado o mais importante do gênero, por apresentar produção e qualidade forrageiras superiores aos de seus genitores (Jauhar & Hanna, 1998).

Esse híbrido pode ser produzido facilmente por polinização manual e propagado vegetativamente. No entanto, a infertilidade do híbrido triploide tem sido apontada como um problema, sendo o não pareamento correto dos cromossomos na meiose considerado como a principal causa da esterilidade. Tal fato limita o seu emprego nos programas de melhoramento, pois impede sua utilização em cruzamentos e sua propagação por sementes (Osgood et al., 1997).

Esse inconveniente pode ser contornado utilizando-se agentes antimitóticos que promovam a duplicação dos híbridos triploides, restaurando, assim, a fertilidade dos mesmos.

2.2 Poliploidização: aplicações e consequências

A poliploidia natural pode ocorrer devido a uma série de fatores, tais como: não disjunção na meiose, terminalização precoce dos quiasmas, genes assinápticos, ocorrência de regeneração gametofítica, fecundação de um óvulo por mais de um gameta e alterações na mitose e meiose. A poliploidia pode também ser induzida utilizando-se tratamentos químicos ou físicos e fusão de protoplastos (Guerra, 1989; Gustafsson, 1962; Jensen, 1974; Portillo, 1980; Randolph, 1932; Wright, 1976).

No melhoramento de plantas, a indução de poliploidia pode ser utilizada para conseguir plantas maiores, mais produtivas, restaurar a fertilidade de um híbrido estéril, sintetizar uma nova espécie ou como ponte para transferir genes de interesse entre níveis de ploidia diferentes, intra ou interespecíficos (Dewey, 1980).

O primeiro relato de indução de poliploidia pelo homem foi realizado por Karpechenko, em 1928. Após o cruzamento entre a couve (*Brassica oleracea*), com genomas CC e o rabanete (*Raphanus sativus*), com genomas RR, ambas as espécies com $2n=2x=18$, o autor restaurou a fertilidade do híbrido *Rafhanobrassica* ($2n=4x=36$ – RRCC) por meio de duplicação cromossômica. Contudo, o híbrido apresenta raiz de couve e folhas do rabanete, o contrário do esperado (Griffiths, 1998).

Um exemplo de espécie comercial produzida pelo homem é o tritcale (*Triticosecale* Wittmack) com genomas AABBDDRR e $2n=8x=56$, resultado de cruzamentos e poliploidização entre o trigo (*Triticum aestivum*), com genomas

AABBDD e $2n=6x=42$ e o centeio (*Triticum secale*), com genomas RR e $2n=2x=14$ (Singh, 1993).

A poliploidização produz uma série de mudanças nos organismos em que ocorre. O principal efeito conhecido em plantas é o efeito gigas, em que ocorre um aumento imediato no tamanho das células, devido ao volume nuclear maior. Este aumento ocorre comumente em órgãos de padrão de crescimento altamente determinado como flores e sementes (Roth, 1984).

Outro efeito atualmente detectado é a rápida reorganização intra e intergenômica nos poliploides. Por meio das técnicas de hibridização *in situ* como FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) e GISH (*Genomic in situ Hybridization*), sabe-se que os genomas presentes em um poliploide podem interagir e rearranjar-se entre si (Figura 1) (Soltis & Soltis, 1999).

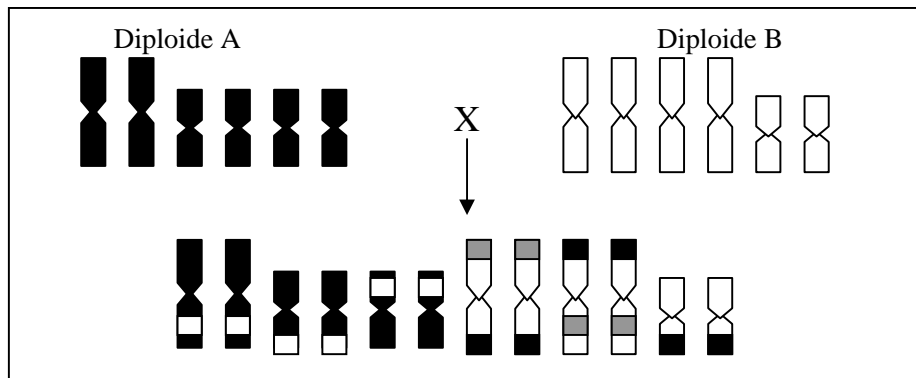


FIGURA 1 Interação genômica. As áreas em preto e branco correspondem a rearranjos intergenômicos e as áreas em cinza, a rearranjos intragenômicos. Adaptado de Soltis & Soltis (1999).

Na evolução de poliploides, os elementos transponíveis (transposons) têm um papel muito importante, uma vez que são agentes causais do silenciamento gênico em alguns casos e facilitam a rápida reestruturação gênica depois da diploidização (Matzke & Matzke, 1998).

Apesar de os valores C (quantidade de DNA no núcleo somático) serem maiores nos poliploides do que nos diploides, os poliploides apresentam uma diminuição nos valores de C. A perda de DNA seguinte à formação do poliploide é relatada para algumas espécies e deve ser um fenômeno mais comum que o relatado (Leitch & Bennett, 2004).

Para cinco híbridos triploides entre capim-elefante e milho, reduções de 0,08 até 0,16 pg em relação ao esperado para a média dos parentais foram encontradas. No entanto, o autor relata que as plantas dos parentais analisados não foram as mesmas utilizadas nos cruzamentos e diferenças na quantidade de DNA entre plantas podem ter sido responsáveis por essa variação entre o esperado e o observado, além de variações inerentes à própria técnica (Campos, 2007).

Em híbridos recém-produzidos entre *Aegilops* e *Triticum*, reduções de 1,67 até 2,57 pg, em relação ao esperado, foram encontradas para os alopoliploides, sugerindo, assim, a eliminação de sequências, tendo, neste trabalho, sido utilizados os verdadeiros genitores (Ozkan et al., 2003).

Assim, fica evidente que, após a poliploidização, uma série de modificações ocorre no organismo poliploidizado, de forma que este se estabilize novamente.

2.3 Duplicação cromossômica em híbridos entre capim-elefante e milheto

Em híbridos entre capim-elefante e milheto, a restauração da fertilidade pode ser conseguida pela duplicação cromossômica, utilizando-se bloqueadores mitóticos, produzindo, assim, um híbrido hexaploide com $2n=6x=42$ cromossomos e genomas AAA'A'BB (Dujardin & Hanna, 1985; Hanna, 1981; Hanna et al., 1984; Hanna & Dujardin, 1986). Esse procedimento possibilitaria a propagação desses híbridos via semente e viabilizaria a expansão das áreas cultivadas do capim-elefante, trazendo consideráveis contribuições para a pecuária leiteira (Schanck, 1999).

Hanna (1981) e Hanna et al. (1984) obtiveram sucesso na produção de hexaploides, derivados de *seedlings* triploides interespecíficos entre capim-elefante com milheto, tratados com solução de 0,2% e 0,05% de colchicina por 24 horas, respectivamente. A confirmação da duplicação cromossômica em ambos os trabalhos foi dada pela produção de pólen e posterior formação de sementes, não tendo sido realizadas análises citogenéticas.

Abreu et al. (2006), com o objetivo de restaurar a fertilidade de híbridos entre o capim-elefante e o milheto, avaliaram diferentes antimitóticos, concentrações e tempos de exposição de diferentes tecidos vegetais. Os tratamentos com colchicina mostraram melhor efeito sobre as plântulas enquanto o tratamento com ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína atuaram melhor sobre os perfilhos. De modo geral, nos diferentes experimentos, foram obtidas apenas plantas mixoploides, com números cromossômicos variando de 14 a 42, nas metáfases analisadas. Paralelamente, anormalidades relacionadas à ocorrência de eliminação cromossômica foram observadas, entre elas, anáfases com cromossomos atrasados, cromossomos não orientados na metáfase e formação de micronúcleos. Estes resultados indicam que houve tanto duplicação quanto eliminação cromossômica.

Barbosa et al. (2007) trabalharam para melhorar a eficiência dos tratamentos de indução de poliploidia em híbridos triploides de capim-elefante e milho. Neste trabalho, 38% das plantas sobreviventes apresentaram número cromossômico duplicado ($2n=6x=42$) e as demais eram mixoploides com variação cromossômica de 14 a 42. A presença de polens viáveis confirmou a fertilidade dos genótipos duplicados.

Segundo Abreu (2002), percebe-se que, na literatura, a indução de poliploidia em vegetais não é uma tarefa fácil. Em vários trabalhos, verifica-se que as metodologias variam muito e que, quando a poliploidização é conseguida, a frequência de plantas mixoploides é grande e as de poliploides estáveis é muito pequena. Na mitose e na meiose, a eliminação cromossômica pode ser observada por meio da variação no número cromossômico. O mesmo processo de eliminação pode também ser evidenciado por meio de alterações, como migração precoce nas metáfases, migração cromossômica tardia nas anáfases, que pode levar, conseqüentemente, à presença de micronúcleos nas telófases (Baptista-Giacomelli et al., 2000).

Pela avaliação da meiose de dez híbridos triploides duplicados, Paiva (2006) constatou que todos os híbridos apresentam meiose irregular. Pareamento irregular na diacinese, ascensão precoce de cromossomos na metáfase, segregação irregular na anáfase e formação de micronúcleos na telófase e em tétrades foram as anormalidades mais frequentes. Tais anormalidades, além de evidenciarem eliminação cromossômica, afetaram diretamente a fertilidade do pólen, o que foi observado por suas baixas taxas de viabilidade, tanto por coloração quanto por germinação *in vitro*. Contudo, certa percentagem de polens viáveis é produzida.

2.4 Citometria de fluxo e suas aplicações

A técnica de citometria de fluxo foi desenvolvida por volta da década de 1940 para a contagem e a análise de células sanguíneas, tendo a hematologia e a imunologia sido as duas áreas que impulsionaram seu desenvolvimento. No entanto, devido ao avanço da técnica e com o uso de novos marcadores fluorescentes, essa técnica generalizou-se para outras áreas (Côrte-Real et al., 2002).

Em plantas, a técnica passou a ser utilizada na década de 1980, sendo acrescida da etapa de filtragem para eliminar materiais celulares maiores do que os núcleos. Entretanto, algumas contaminações ainda podem ocorrer, devido à presença de materiais subcelulares (mitocôndrias, cloroplastos e outras organelas) e a fungos ou bactérias presentes no tecido a ser avaliado. Além disso, a presença de pigmentos fluorescentes e de metabólitos secundários pode interferir nos valores obtidos (Dolezel et al., 2007).

A técnica de citometria de fluxo é baseada na análise de propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (núcleos, organelas, células, cromossomos) que fluem em uma suspensão líquida. As partículas em suspensão movem-se emergidas num fluido (tampão de extração) no interior de um capilar, dentro de um aparelho denominado citômetro de fluxo. Essas partículas intersectam uma a uma um feixe de laser, ocorrendo um processo de dispersão da luz e ou emissão de fluorescência. Dessa forma, podem-se verificar, simultaneamente, as distribuições dos valores da frequência e/ou densidade de cada parâmetro. Os sinais gerados pelas partículas são convertidos em valores digitais, armazenados e exibidos na forma de histogramas (Dolezel, 1997).

Por meio de citometria de fluxo é possível mensurar o conteúdo de DNA de núcleos, permitindo avaliar o nível de ploidia, fazer comparações intra e interespecíficas do tamanho nuclear, avaliar o teor de DNA de cada cromossomo

do complemento de uma espécie, realizar estudos do ciclo celular, análises de citogenotoxicidade e determinação do sexo (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2001). Assim, essa técnica pode ser empregada em estudos evolutivos e taxonômicos (Loureiro et al., 2007), programas de melhoramento para híbridos interespecíficos (Laere et al., 2009) e em projetos de sequenciamento gênico (Suda et al., 2003).

Nos eucariontes de forma geral, o crescimento e a divisão celular são processos cíclicos. O tempo entre cada mitose encontra-se dividido em três fases: G_1 , S e G_2 . Durante o período de crescimento celular (fase G_1), uma célula diploide apresenta um conteúdo 2C (C – conteúdo de um conjunto haploide de cromossomos), possuindo assim duas cópias de cada gene. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear e, na fase seguinte (fase G_2), ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo de DNA nuclear é mantido no nível 4C. Em seguida, ocorre a mitose (fase M), durante a qual a célula se divide, formando-se duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2C de DNA. O resultado da distribuição do conteúdo de DNA nuclear de uma população de células em crescimento assíncrônico é exemplificado na Figura 2A. Todavia, uma vez que as medições do conteúdo de DNA não são perfeitas, as distribuições obtidas experimentalmente apresentam sempre variações (Figura 2B) (Howard & Pelc, 1986).

Estas variações estão relacionadas com as metodologias de isolamento de núcleos, com a coloração com fluorocromos específicos para DNA nuclear e com a leitura no citômetro de fluxo. As variações observadas são expressas num coeficiente de variação (CV= desvio padrão/média), sendo valores entre 1%-2% considerados de alta qualidade e, próximos a 3%, como rotina (Marie & Brown, 1993). Em publicações internacionais, coeficientes de variação menores que 5% são aceitáveis (Galbraith et al., 1983).

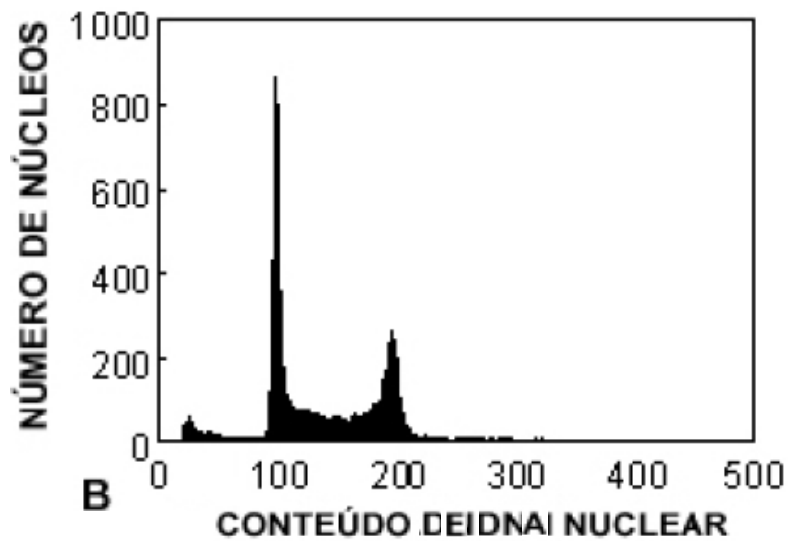
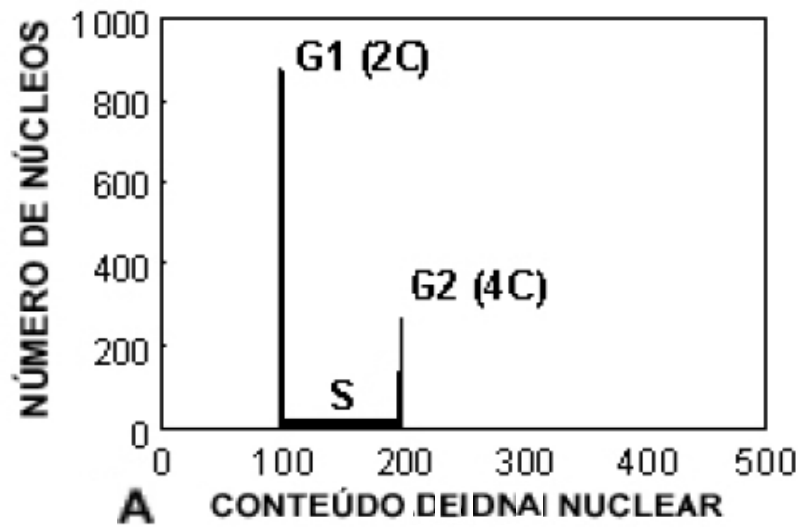


FIGURA 2 Distribuição do conteúdo de DNA nuclear (em unidades arbitrárias, expressas em número de canais) numa população de células em crescimento assíncrono. (A) Distribuição ideal; (B) Distribuição obtida após análise dos núcleos por citometria de fluxo. Fonte: Loureiro & Santos, 2004.

Para a detecção de aneuploidias, deve-se considerar a contribuição média de cada cromossomo para a quantidade total de DNA. Ao utilizarem-se picos G1 com coeficientes de variação maiores que a contribuição média de cada cromossomo, a perda de um único cromossomo não poderá ser detectada, uma vez que a redução na quantidade de DNA devido a esta perda cairá dentro do próprio coeficiente de variação do pico G1. Ao utilizarem-se picos G1 com a metade da contribuição média de cada cromossomo, a perda de um único cromossomo poderá ser detectada pela presença de dois picos justapostos, representando as duas subpopulações celulares com essas variações nas quantidades de DNA (Figura 3) (Dolezel, 1997).

Em experimentos com banana, foi possível detectar aneuploidias envolvendo um único cromossomo (monossomia ou trissomia). Esse fato demonstra que a citometria de fluxo pode ser útil em estudos de eliminação cromossômica (Roux et al., 2003).

Em casos em que a ocorrência de aneuploidia é experimentalmente programada, a técnica de citometria de fluxo foi capaz de detectar a presença ou a ausência de um único cromossomo em trigo e em banana (Pfosser et al., 1995; Roux et al., 2003). Contudo, nas situações em que a ocorrência de aneuploidia pode ou não ser verificada, é muito difícil a sua detecção por citometria de fluxo, o que torna necessário acompanhar o estudo da citometria de fluxo com técnicas convencionais de contagem cromossômica (Loureiro & Santos, 2004).

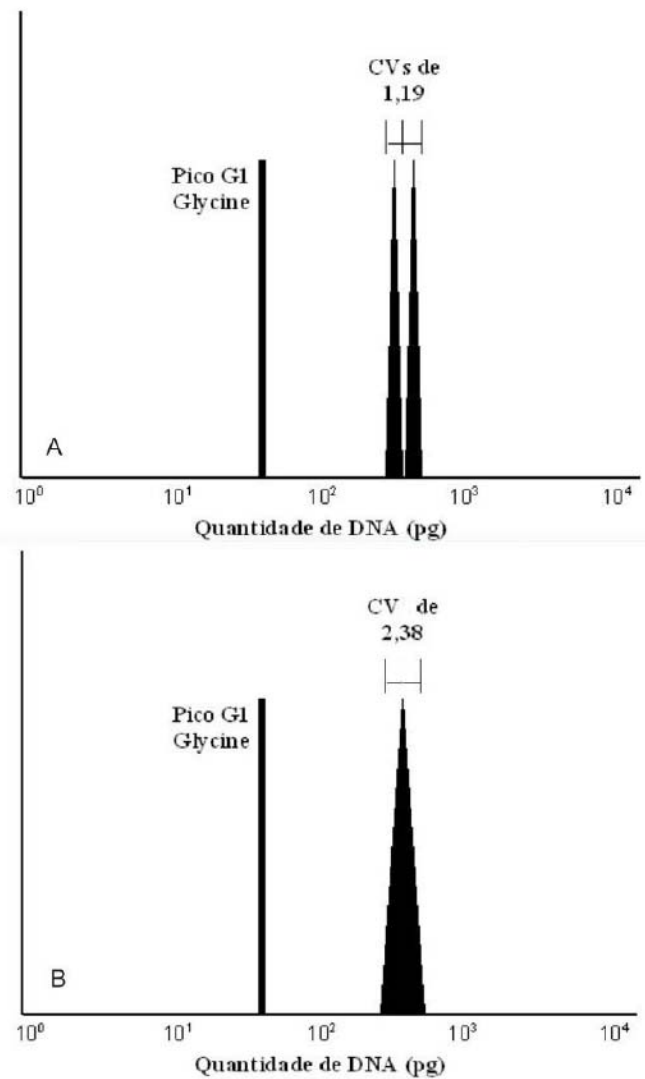


FIGURA 3 Coeficientes de variação em híbridos hexaploides. (A) A presença de dois picos com CVs de 1,19% permite a separação de duas subpopulações celulares com diferenças em apenas um cromossomo. (B) A presença de um pico com CV de 2,38% não permite a separação das duas subpopulações celulares com diferenças em apenas um cromossomo. Fonte: Campos (2007).

A obtenção de metáfases para contagem cromossômica é um trabalho laborioso e que limita a avaliação de ploidia apenas às células em divisão, dificultando, assim, a análise de um grande número de células por planta e a avaliação de ploidia de diferentes tecidos de uma mesma planta (Ochatt, 2008). Já a citometria de fluxo é uma técnica rápida (processamento de dezenas de amostras num único dia de trabalho, à velocidade de 10^2 - 10^3 partículas por segundo), não necessita de células em divisão, é uma metodologia não destrutiva (uma amostra pode ser preparada, por exemplo, a partir de 50 mg de tecido foliar) e é capaz de detectar aneuploidias (Dolezel, 1997).

Em *Dioscorea alata*, a contagem cromossômica é dificultada devido ao pequeno tamanho dos cromossomos, à tendência destes ficarem juntos e aos satélites que algumas vezes são confundidos com cromossomos. Com o uso da citometria de fluxo, foi possível classificar os genótipos de *D. alata* com $2n=40$, $2n=60$, $2n=80$ como diploides, triploides e tetraplóides, respectivamente e não tetraploides, hexaploides e octaploides, como se pensava, sendo este um fato essencial aos programas de melhoramento (Arnau et al., 2009).

A determinação da quantidade de DNA nuclear é uma das aplicações mais usuais da citometria de fluxo. Os núcleos previamente isolados são corados com fluorocromos adequados que se ligam ao DNA, emitindo uma fluorescência que é quantificada pelo citômetro de forma equitativa ao conteúdo de DNA nuclear (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2001). Para estimar o nível de ploidia, a posição do pico G1 de um histograma é comparada com o pico G1 de uma planta padrão com uma ploidia conhecida (Dolezel, 1997).

O nível de ploidia foi estimado para 103 plantas do gênero *Hemerocallis* por citometria de fluxo. As plantas foram classificadas em três grupos. O grupo diploide com $2n=22$ apresentou quantidades de DNA de 1,84-2,13 pg. Para os triploides com $2n=33$, essa variação foi de 2,94-3,10 pg e, para os tetraploides

com $2n=44$, a variação foi de 3,74-4,26 pg. O método de citometria de fluxo tem mostrado ser simples e rápido na estimação de níveis de ploidia de espécies e cultivares de *Hemerocallis* (Saito et al., 2003).

O teor de DNA tem sido estudado em vários gêneros de importância econômica e forrageira de Poacea, como *Zea* (Rayburn et al., 1989), *Hordeum* (Vogel et al., 1999), *Oryza* (Buso et al., 2000), *Brachiaria* (Pinheiro et al., 2000) e *Triticum* (Kubalakova et al., 2002).

Diferenças no teor de DNA foram utilizadas por Passos, Lambert & Galbraith (1994), para distinguir 14 citótipos entre 21 acessos de *Pennisetum purpureum* do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite. Segundo os autores, o conteúdo genômico dos citótipos selecionados variou de 4,18 pg, para o citótipo Cuba 115 a 4,99 pg, para o citótipo Mole Volta Grande.

O tamanho do genoma nuclear foi determinado para 15 espécies pertencentes aos três conjuntos gênicos de *Pennisetum*, caracterizando a sua variabilidade para todos os números básicos ($x = 5, 7, 8$ e 9) e para diferentes níveis de ploídias. Ainda neste trabalho, as espécies cultivadas *P. purpureum* e *P. glaucum* apresentaram genomas praticamente iguais em termos de tamanho (4,59 e 4,71 pg, respectivamente) embora apresentem números cromossômicos e morfometria cariotípicas diferentes (Martel et al., 1997).

A técnica de citometria de fluxo também foi utilizada para a determinação de ploidia de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milho da Embrapa Gado de Leite (Campos et al., 2009). Das 200 plântulas tratadas com colchicina, 115 foram caracterizadas como mixoploides (57,5%), 68 como triploides (34%) e 17 como hexaploides (8,5%). A posterior confirmação da condição hexaploide foi feita por meio da morfologia estomática e contagem cromossômica.

A análise do nível de ploidia por meio da citometria de fluxo tem sido frequentemente relatada para indivíduos obtidos por experimentos de haploidização ou de duplicação cromossômica (Liu et al., 2007; Viehmannova et al., 2009; Wu e Mooney, 2002).

Em *Rodophiala Montana*, a técnica de citometria de fluxo mostrou-se 100% eficiente para a detecção rápida de indivíduos autotetraploides e os números cromossômicos avaliados corresponderam à ploidia detectada por citometria (Muñoz et al., 2006).

Diante do exposto, fica evidente que a citometria de fluxo é uma técnica que vem sendo cada vez mais utilizada, devido à sua grande aplicação nas mais diversas áreas.

2.5 Uso da eliminação cromossômica no melhoramento de plantas

Após a fertilização interespecífica, os dois diferentes genomas parentais são combinados dentro de um núcleo. Essa nova constituição genômica pode resultar em conflitos intergenômicos, conduzindo a rearranjos genéticos (Riddle & Birchler, 2003). Frequentemente, uma eliminação específica de sequências de DNA acontece nos primeiros estágios após a hibridação (Feldman et al., 1997; Liu et al., 1996).

Na família Poaceae, a eliminação somática parcial ou total de cromossomos de uma das espécies parentais tem sido descrita para os híbridos de *Avena*, *Brassica*, *Triticum*, *Zea* e *Pennisetum* (Barclay, 1975; Gernand et al., 2005; Linde-Laursen & Bothmer, 1999; Riera-Lizarazu et al., 1996).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a eliminação cromossômica em híbridos, entre elas, assincronia no tempo da divisão celular (Gupta, 1969), assincronia na síntese de nucleoproteínas levando à perda de cromossomos com segregação tardia (Bennett et al., 1976; Laurie & Bennett,

1989), formação de fusos multipolares (Subrahmanyam & Kasha, 1973), separação espacial dos genomas durante a intérfase (Finch & Bennett, 1983, Linde-Laursen & Bothmer, 1999) e na metáfase (Schwarzacher-Robinson et al., 1987), inativação parental específica de centrômeros (Finch, 1983; Jin et al., 2004; Kim et al., 2002; Mochida et al., 2004) e degradação de cromossomos por atividade de nucleases hospedeiro-específico (Davies, 1974).

Na mitose e na meiose, a eliminação cromossômica pode ser observada por meio da variação no número cromossômico, caracterizando a mixoploidia. O mesmo processo de eliminação pode também ser evidenciado por meio de alterações, como migração precoce nas metáfases, migração cromossômica tardia nas anáfases, que pode levar, conseqüentemente, à presença de micronúcleos nas telófases, prófases (Baptista-Giacomelli et al., 2000)

Linde-Laursen & Bothmer (1999) afirmam que o mecanismo de eliminação cromossômica é bastante sensível e influenciado tanto por fatores genéticos quanto por fatores ambientais. Pickering (1985) sugere a influência da temperatura na velocidade da eliminação cromossômica, indicando que as condições ambientais podem influenciar na estabilidade do híbrido.

No híbrido entre trigo (*Triticum aestivum*) e milho (*Zea mays*), observou-se também que os cromossomos de milho foram eliminados, evidenciando-se o potencial desse sistema para a produção de trigo haploide (Laurie & Bennet, 1986).

Em híbridos entre milheto e trigo, foi observada a eliminação cromossômica uniparental dos cromossomos do milheto via formação de micronúcleos. Os cromossomos do milheto ocuparam posição periférica no núcleo interfásico, o que, provavelmente, está ligado à eliminação da cromatina também durante a intérfase. Observou-se também intensa fragmentação dos

cromossomos do milho, devido à assincronia no processo de replicação do DNA (Gernand et al., 2005).

Para os cruzamentos envolvendo capim-elefante e milho, não há relatos sobre quais genomas estariam envolvidos com a eliminação cromossômica, embora este tipo de hibridação seja uma estratégia comum no melhoramento dessas espécies. Entretanto, os estudos de avaliação do número cromossômico de híbridos triploides duplicados demonstram a ocorrência de mixoploidia (Abreu et al., 2006; Barbosa et al., 2007; Campos et al., 2009) e estudos meióticos desses híbridos evidenciaram algumas alterações, como presença de micronúcleos em tétrades, cromossomos com ascensão precoce nas metáfases I e II, pontes em anáfases, cromossomos com segregação tardia nas anáfases I e II, que estão associadas ao fenômeno de eliminação cromossômica (Hanna, 1981; Jauhar, 1981; Paiva, 2006). Também foi relatada a baixa viabilidade do pólen (Paiva, 2006).

A eliminação de cromossomos de um dos genomas parentais reunidos no híbrido interespecífico duplicado abre a perspectiva de obtenção de linhas de adição ou substituição, que são grupos de indivíduos ou células contendo cromossomos ou parte de cromossomos adicionais de outras espécies ou, ainda, a substituição de cromossomos entre espécies diferentes. Tais genótipos são de grande utilidade para a localização e a manipulação de genes de interesse e a obtenção de haploides, úteis ao melhoramento de plantas (Baptista-Giacomelli et al., 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

Para a avaliação do número cromossômico somático, foram analisados dez híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milho duplicados. Quatro genótipos (denominados HCM-6X-2, HCM-6X-3, HCM-6X-4 e HCM-6X-20) foram selecionados de uma população obtida pela Embrapa Gado de Leite a partir de híbridos hexaploides introduzidos, em 1995, da Universidade da Flórida, Estados Unidos; um genótipo selecionado da cultivar comercial Paraíso e os demais (denominados HCM-6x-5, HCM-6X-32, HCM-6X-35, HCM-6X-46 e HCM-6X-89), obtidos por indução de poliploidia de híbridos triploides, na Universidade Federal de Lavras (Barbosa et al., 2007).

A avaliação da quantidade de DNA em folhas e raízes por citometria de fluxo foi realizada em todos os híbridos triploides duplicados, exceto o híbrido HCM-6x-5.

Para avaliação do ciclo celular, foram utilizados, além dos dez híbridos duplicados, o milho M-36, o capim-elefante BAG-63 e o híbrido triploide CNPGL 94-44-3.

3.2 Análise citogenética

A análise citogenética foi realizada no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram quantificados os números cromossômicos em metáfases mitóticas para cada híbrido triploide duplicado e avaliado o ciclo celular de todos os genótipos citados anteriormente.

Para a obtenção das raízes do milheto, sementes foram colocadas para germinar em Gerbox contendo papel de filtro umedecido e mantidas em germinador, a 28°C. Para os demais genótipos, raízes de 1 a 2 cm foram coletadas de estacas imersas em água. As raízes obtidas foram separadas em dois grupos. Para a contagem cromossômica, as raízes dos híbridos triploides duplicados foram pré-tratadas em solução de ciclohexamida 25 mg.L⁻¹ e hidroxiquinoleína 300 mg.L⁻¹ (1:1) por 2h45min (Techio et al., 2002). Para a análise do ciclo celular, não foram realizados pré-tratamentos nas raízes dos genótipos avaliados.

Posteriormente, as raízes dos dois grupos foram fixadas em solução de Carnoy (3 partes de álcool:1 parte de ácido acético glacial) e submetidas à maceração enzimática em solução de pectinase/celulase (40%/4%) (SigmaTM), por 6 horas, para os híbridos e capim-elefante e por 3 horas, para o milheto. As lâminas foram montadas pela técnica de esmagamento e coradas com Giemsa 10% por 3 minutos, sendo avaliadas em microscópio de campo claro (Leica DMLS), equipado com microcâmera (Nikon Digital Sight DS-Fi1) para digitalização das imagens.

Para cada híbrido triploide duplicado foram analisadas, no mínimo, 5 lâminas e avaliadas entre 31 e 65 metáfases para contagem cromossômica. Para avaliação do ciclo celular, foram analisadas 6 lâminas por genótipo e aproximadamente 600 células por lâmina, totalizando, aproximadamente, 3.600 células avaliadas. A ocorrência de anomalias foi quantificada, sendo estas submetidas à análise de variância e ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3.3 Quantificação do teor de DNA

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) de Juiz de Fora.

Para cada híbrido duplicado foram avaliadas três amostras, para a determinação do conteúdo de DNA nuclear em folhas e em raízes. Para cada amostra, utilizaram-se, aproximadamente, 20-30 mg de folhas jovens ou raízes obtidas pelo enraizamento de estacas dos híbridos triploides duplicados. Para ambas as análises, 20-30 mg de folhas jovens de *Glycine max* foram utilizadas como padrão interno de referência. As amostras foram trituradas em uma placa de Petri contendo 1mL de tampão LB01 gelado, para a obtenção da suspensão nuclear (Dolezel, 1997). O tecido triturado foi aspirado por meio de duas camadas de gaze com uma pipeta plástica, filtrado em uma malha de náilon de 50µm e armazenado em um tubo de polietileno. A suspensão nuclear foi corada com 25µL de iodeto de propídeo (1mg/mL) e 2,5µL de RNase foram adicionados a cada amostra. Para cada amostra foram analisados, pelo menos, dez mil núcleos.

A análise foi realizada no citômetro FacsCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA); os histogramas foram obtidos no software Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados no software WinMDI 2.8 (2009).

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das amostras foi estimado por meio de comparação com a posição do pico G1 do padrão interno de referência (*Glycine max*), o qual foi previamente obtido (2,50 pg/2C). Os cálculos foram feitos de acordo com a fórmula: $Q = (E/S) \times R$, em que Q é a quantidade de DNA da amostra (pg/2C), E é a posição do pico G1 da amostra, S é a posição do pico G1 do padrão de referência e R é o conteúdo de DNA do padrão (2,50 pg).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem cromossômica

Considerando o número básico de cromossomos $n=7$ para os taxa analisados, o número cromossômico somático esperado, após a duplicação dos híbridos triploides de capim-elefante e milho, seria $2n=6x=42$. No entanto, os híbridos avaliados apresentaram números cromossômicos que variaram entre 14 a 42 cromossomos em células do meristema radicular (Tabela 1 e Figura 1). Dois híbridos americanos não apresentaram células com 42 cromossomos (HCM-6x-4 e HCM-6x-20). Quanto aos híbridos nacionais, houve maior variação entre os genótipos no que diz respeito ao número cromossômico mínimo e máximo encontrados. Três híbridos nacionais apresentaram células com 42 cromossomos (HCM-6x-5, HCM-6x-35 e HCM-6x-46). O híbrido HCM-6x-32 foi o único com células $2n=14$ e também aquele que apresentou o menor número máximo de cromossomos ($2n=24$).

A presença de células com números cromossômicos acima de 21 indica que houve duplicação, uma vez que esses híbridos são oriundos da duplicação cromossômica de híbridos triploides ($2n=3x=21$). A evidente perda de cromossomos caracteriza a ocorrência de mixoploidia.

A ocorrência de mixoploidia é um fenômeno bastante comum em híbridos interespecíficos e intergenéricos e já foi descrita para híbridos de *Pennisetum* (Abreu et al., 2006; Barbosa et al., 2007; Gildenhuis & Brix, 1961, 1964).

Os trabalhos sobre indução de poliploidia em híbridos triploides de capim-elefante e milho relatam sempre a variação no número cromossômico de 14 a 42 (Abreu et al., 2006; Barbosa et al., 2007; Campos et al., 2009).

TABELA 1 Variação no número cromossômico somático de híbridos de capim-elefante e milho submetidos a tratamentos com antimitóticos.

Híbridos americanos	Nº metáfases avaliadas	Variação cromossômica somática (2n)	Moda (%)
HCM-6x-2	41	14-42	28 (19,5)
HCM-6x-3	51	14-42	32; 38 (15,7)
HCM-6x-4	34	14-40	36 (20,6)
HCM-6x-20	45	14-40	36 (15,6)
Paraíso	59	14-42	36; 38 (13,6)
Híbridos nacionais	Nº metáfases avaliadas	Variação cromossômica somática (2n)	Moda (%)
HCM-6x-5	34	16-42	34 (17,7)
HCM-6x-32	44	14-24	18; 20 (29,6)
HCM-6x-35	42	16-42	42 (23,8)
HCM-6x-46	31	18-42	28; 34; 38 (16,1)
HCM-6x-89	65	15-40	21 (32,3)

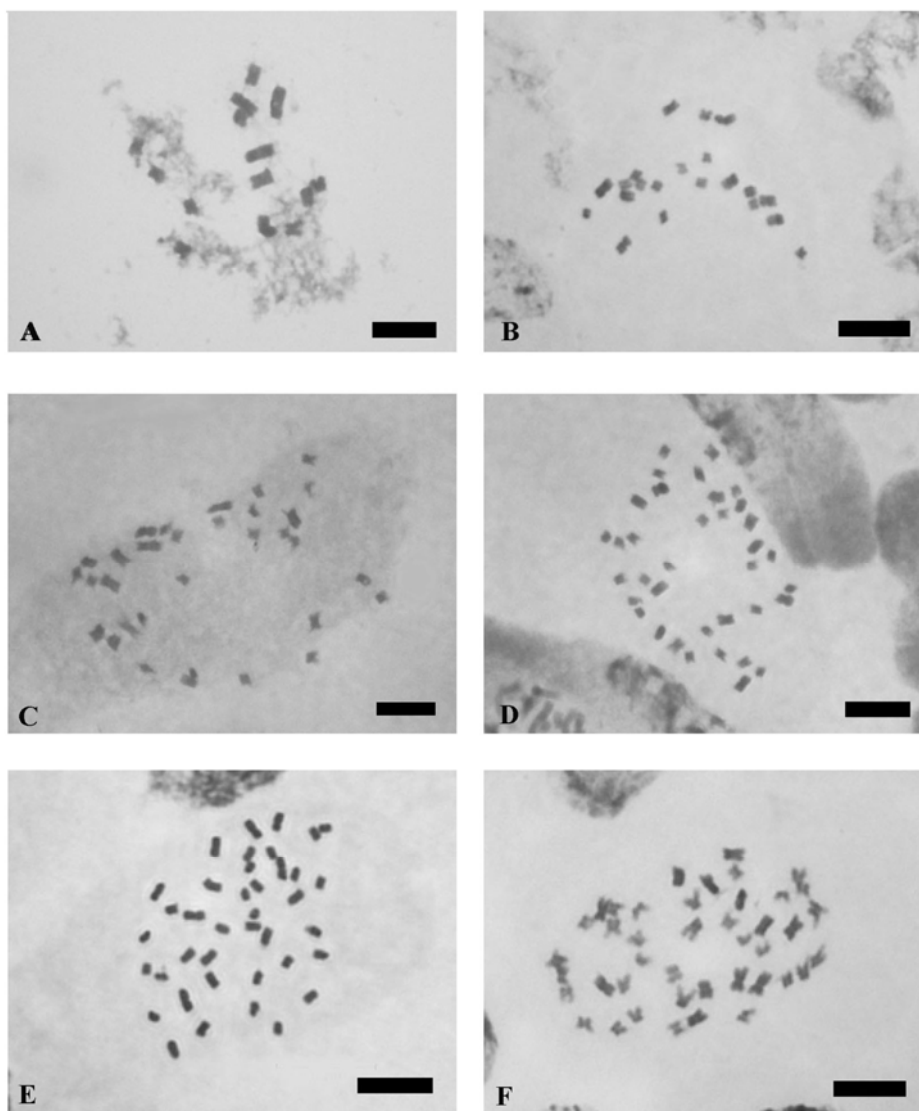


FIGURA 4 Número cromossômico somático de híbridos entre capim-elefante e milho submetidos a tratamento com antimitótico (A) $2n=14$. (B) $2n=21$. (C) $2n=32$. (D) $2n=36$. (E) $2n=39$. (F) $2n=42$ cromossomos. Barras = 10 μm .

Abreu et al. (2006) sugerem que houve eliminação tanto de genomas completos como também de cromossomos individuais em função da não observação de cromossomos maiores que seriam provavelmente do milheto. Apesar da alta frequência de mixoploidia, já foram obtidos hexaploides, que produzem polens viáveis. Barbosa et al. (2007), por exemplo, obtiveram 38% das plantas sobreviventes com 42 cromossomos e no trabalho de Campos et al. (2009), 8,5% das plantas foram descritas como hexaploides.

Os primeiros trabalhos sobre duplicação dos triploides foram realizados por Hanna (1981) e Hanna et al. (1984) que relatam ter obtido sucesso na produção de híbridos hexaploides. Contudo, a confirmação da duplicação cromossômica em ambos os trabalhos foi dada pela produção de polens e posterior formação de sementes, não tendo sido realizadas contagens cromossômicas.

Os híbridos resultantes de cruzamentos entre outras espécies de *Pennisetum* também apresentaram o mesmo comportamento com relação à mixoploidia e perdas cromossômicas. No híbrido entre *Pennisetum typhoides* x *P. dubium* ($2n=21$), observou-se uma variação de $2n=14$ a 42 cromossomos, sendo que $2n=21$ foi o número mais frequente, ocorrendo em 32% das 47 células analisadas. Um ano após a duplicação, a variação foi de $2n=15$ a 25 e a grande maioria das células (88%) apresentou 21 cromossomos (Gildenhuis & Brix, 1961). Segundo os autores, o comportamento irregular do híbrido após a poliploidização pode ser devido à ação de genes herdados de *P. dubium*, os quais só se expressam em dupla dosagem.

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a eliminação cromossômica em híbridos. Dentre elas estão: assincronia no tempo da divisão celular (Gupta, 1969), assincronia na síntese de nucleoproteínas levando à perda de cromossomos com segregação tardia (Bennett et al., 1976; Laurie & Bennett,

1989), formação de fusos multipolares (Subrahmanyam & Kasha, 1973), separação espacial dos genomas durante a intérfase (Finch & Bennett, 1983, Linde-Laursen & Bothmer, 1999) e na metáfase (Schwarzacher-Robinson et al., 1987), inativação parental específica de centrômeros (Finch, 1983; Jin et al., 2004; Kim et al., 2002; Mochida et al., 2004), degradação de cromossomos por atividade de nucleases hospedeiro-específicas (Davies, 1974).

Com relação aos híbridos avaliados neste trabalho, esperava-se maior frequência de células com 42 cromossomos para os de origem americana, pois estes foram submetidos à duplicação há mais tempo que os genótipos nacionais. No entanto, o que se observa é que quatro dos cinco híbridos americanos apresentaram entre 32 e 38 como números cromossômicos mais frequentes (Tabela 1). Já entre os híbridos nacionais houve maior variação com relação aos números cromossômicos mais frequentes (Tabela 1). Em um extremo estão os híbridos HCM-6x-32, com 18 e 20 e o HCM-6x-89, com 21 cromossomos, sendo que o híbrido HCM-6x-32 mostra uma tendência em manter-se abaixo do nível triploide. Essa hipótese é reforçada pelos números mínimo e máximo observados (14 e 24, respectivamente). Em outro extremo está o HCM-6x-35, com 42 cromossomos. Os outros dois híbridos nacionais comportaram-se da mesma forma que os americanos (HCM-6x-5 e HCM-6x 46).

Portanto, a estabilidade cromossômica desejada, plantas com $2n=6x=42$ e genomas AAA´A´BB, não foi detectada nem mesmo nos híbridos duplicados há mais tempo. No entanto, a maioria dos genótipos avaliados apresenta, com maior frequência números mais altos de cromossomos, isto é, igual ou superior a 28 (Tabela 1), o que aumenta a chance de ocorrência de cromossomos dos três genomas nas células. Espera-se, com o decorrer do tempo, a exemplo dos poliploides naturais, o comportamento meiotico regular (diploidização) dessas plantas. E, a partir dos processos de seleção requeridos nos programas de

melhoramento, a obtenção de plantas com meiose suficientemente regular com produção de polens e sementes viáveis.

4. 2 Quantificação do teor de DNA em folhas e raízes

Para verificar se as variações no número cromossômico ocorrem da mesma maneira nos diferentes tecidos da mesma planta, foi avaliado o conteúdo de DNA em células de raízes e de folhas de nove híbridos duplicados (HCM-6x-2, HCM-6x-3, HCM-6x-4, HCM-6x-20, cultivar Paraíso, HCM-6x-32, HCM-6x-35, HCM-6x-46 e HCM-6x-89).

Apesar de não ter sido observada variação no conteúdo de DNA entre os dois tecidos em uma mesma planta, observou-se variação entre os híbridos em ambos os tecidos, a 5% de probabilidade (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2 Resumo das análises de variância para teor de DNA em folhas (F) e em raízes (R) de nove híbridos entre capim-elefante e milho submetidos à duplicação cromossômica.

FV	GL	QM	
		F	R
Híbridos	8	7,94**	10,33**
Erro	16	0,03	0,21
Média		8,00	8,49
CV%		2,22	5,42

** - significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 3 Médias das quantidades de DNA e coeficientes de variação (CV%) para folhas e raízes de nove híbridos entre capim-elefante e milho submetidos à duplicação cromossômica.

Híbridos americanos	Folhas (pg) ¹	CV (%)	Raízes (pg) ¹	CV (%)
HCM-6x-2	7,93 c	0,65	9,25 d	1,00
HCM-6x-3	8,27 d	0,63	8,86 d	0,92
HCM-6x-4	8,25 d	0,77	8,11 c	0,82
HCM-6x-20	6,33 b	0,94	6,00 b	1,08
Paraíso	8,86 e	0,71	10,98 e	1,12
Híbridos nacionais	Folhas (pg) ¹	CV (%)	Raízes (pg) ¹	CV (%)
HCM-6x-32	4,48 a	0,62	5,06 a	1,37
HCM-6x-35	9,44 f	0,57	9,55 d	0,91
HCM-6x-46	9,27 f	0,62	9,06 d	0,71
HCM-6x-89	9,18 f	0,69	9,52 d	0,72
Média geral	8,00	0,69	8,49	0,96

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A média dos coeficientes de variação (CV), neste trabalho, para as amostras foliares, foi de 0,69% e, para raízes, foi de 0,96%. Esses valores demonstram a qualidade dos resultados e a confiabilidade nas estimativas de quantidade de DNA e ploidia para os híbridos duplicados, uma vez que valores entre 1%-2% são considerados de alta qualidade e, próximos a 3%, como rotina (Marie & Brown, 1993).

Martel et al. (1997), ao estimarem a quantidade de DNA para o capim-elefante e milho, obtiveram 4,59 pg para o capim-elefante e 4,71 pg para o milho. Campos (2007) relatou quantidades de DNA muito semelhantes, sendo 4,54 pg para o capim-elefante e 4,75 pg para o milho. Assim sendo, o híbrido

triploide deveria ter 4,65 pg, que é a média entre os parentais e o híbrido hexaploide teria 9,30 pg, que corresponde ao dobro da quantidade de DNA do triploide.

Três dos quatro híbridos nacionais avaliados, HCM-6x-35, HCM-6x-46 e HCM-6x-89, apresentaram conteúdos de DNA para folhas e raízes muito próximos ao esperado para o híbrido hexaploide. Já o híbrido nacional HCM-6x-32 apresentou o menor teor de DNA relatado para todos os híbridos, aproximando-se do valor esperado para o híbrido triploide (Tabela 3).

Nos híbridos americanos, houve maior variação com relação às quantidades de DNA. O híbrido HCM-6x-20 apresentou a menor quantidade de DNA entre os híbridos americanos, sendo essa quantidade um pouco superior a esperada para o híbrido triploide. Os híbridos HCM-6x-3 e HCM-6x-4 apresentaram teores de DNA inferiores à do hexaploide. Nos demais híbridos americanos (HCM-6x-2 e cultivar Paraíso) não foram constatadas diferenças significativas entre as análises de folhas e raízes, apesar de terem sido obtidos valores muito diferentes para teores de DNA entre esses dois tecidos (Tabela 3). Para esses dois genótipos, a quantidade de DNA em folhas foi inferior à esperada para hexaploides e, em raízes, esse valor foi próximo ao do hexaploide para o híbrido HCM-6x-2 e superior no caso da cultivar Paraíso.

Assim, de modo geral, os híbridos triploides nacionais submetidos à duplicação cromossômica há menos tempo apresentaram teores de DNA esperados para o hexaploide. Além disso, o híbrido HCM-6x-35 apresentou, como número cromossômico mais frequente, 42 (Tabela 3). A única exceção foi o híbrido HCM-6x-32, que apresentou quantidades de DNA próximas a do triploide, o que está de acordo com o que foi encontrado com relação ao número cromossômico. Este híbrido apresentou 18 e 20 cromossomos como número mais frequente e nele não foram encontradas células com mais de 24

cromossomos. Já os híbridos americanos submetidos à duplicação cromossômica há mais tempo apresentaram teores de DNA entre o esperado para triploides e hexaploides, tendo os números cromossômicos entre 32 e 38 sido os mais frequentes (Tabela 1).

Alguns dos histogramas obtidos para as quantidades de DNA nos híbridos avaliados são mostrados nas Figuras 5, 6 e 7.

Considerando-se que o valor esperado para o híbrido hexaploide seja 9,30 pg, como relatado anteriormente, observou-se uma redução na quantidade de DNA de folhas e raízes, para a maioria dos genótipos. A maior redução ocorreu para o híbrido HCM-6x-32, tanto em folhas (4,48 pg) como em raízes (5,06 pg). Já para a Cultivar Paraíso, em raízes, houve aumento na quantidade de DNA (10,98 pg). Esse fato também foi observado para o híbrido HCM-6x-35 em folhas (9,44 pg) e em raízes (9,55 pg) (Tabela 3).

Em estudos de indução de poliploidia em híbridos entre capim-elefante e milho, Campos (2007) classificou como hexaploide os híbridos que apresentaram conteúdos de DNA entre 9,09-9,66 pg. Posteriormente, foi feita a confirmação da condição hexaploide por meio da avaliação da morfologia estomática e contagem cromossômica. Além disso, das 200 plantas avaliadas por citometria, 115 foram caracterizadas como mixoploides (57,5%), 68 como triploides (34%) e 17 como hexaploides (8,5%).

Tem sido demonstrado, por meio de citometria de fluxo, que, em alopoliploides, ocorre redução na quantidade de DNA em relação à quantidade de DNA esperada para a média dos parentais. Em cinco híbridos triploides entre capim-elefante e milho foram observadas reduções de 0,08 até 0,16 pg, em relação ao esperado (Campos, 2007). No entanto, o autor relata que as plantas dos parentais analisados não foram as mesmas utilizadas nos cruzamentos e diferenças na quantidade de DNA entre plantas podem ter sido responsáveis por

essa diferença entre o esperado e o observado, além de variações inerentes à própria técnica.

Em híbridos recém-produzidos entre *Aegilops* e *Triticum*, reduções de 1,67 até 2,57 pg em relação ao esperado foram encontradas para os aloploidos, sugerindo, assim, eliminação de sequências, tendo, neste trabalho, sido utilizados os verdadeiros genitores (Ozkan et al., 2003).

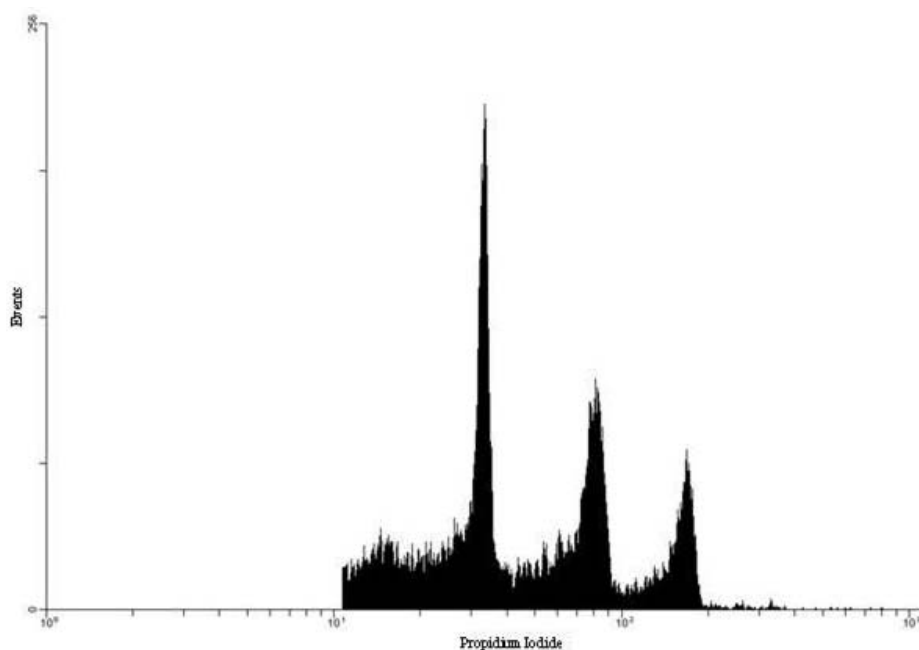


FIGURA 5 Histograma de citometria de fluxo em raiz do híbrido HCM-6x-20. O primeiro pico é referente ao pico G₁ da amostra de referência (*Glycine max*). O segundo pico é o Pico G₁ do híbrido e está localizado no canal 81,31, com uma estimativa de quantidade de DNA de 6,09 pg, valor um pouco superior ao esperado para um híbrido triploide (coeficiente de variação = 1,32%). O terceiro pico é o pico G₂/M do híbrido.

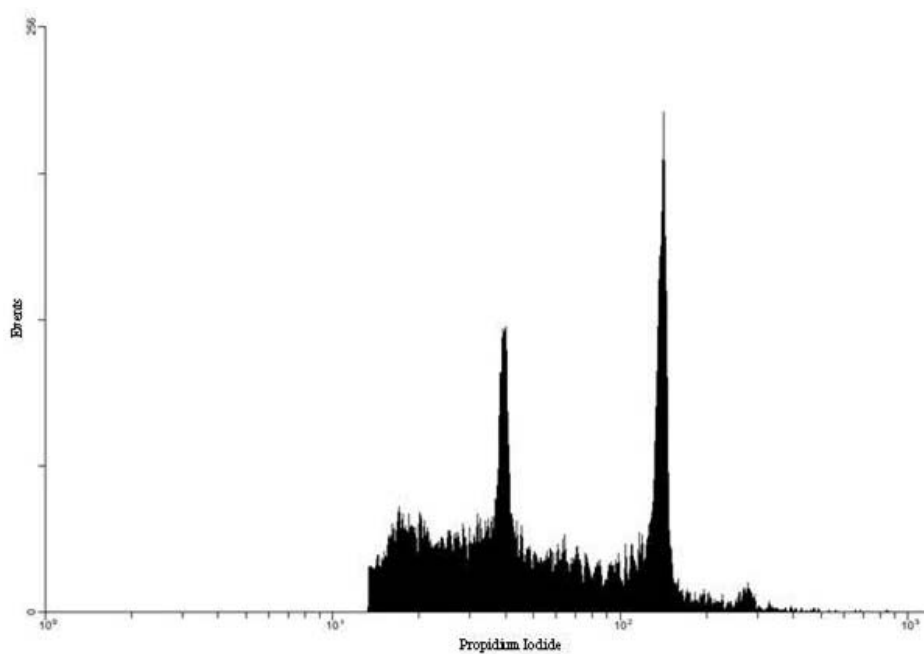


FIGURA 6 Histograma de citometria de fluxo em folha da cultivar Paraíso. O primeiro pico é referente ao pico G₁ da amostra de referência (*Glycine max*). O segundo pico é o Pico G₁ do híbrido e está localizado no canal 142,02, com uma estimativa de quantidade de DNA de 8,89 pg, valor um pouco inferior ao esperado para um híbrido hexaploide (coeficiente de variação = 0,62%). O terceiro pico é o pico G₂/M do híbrido.

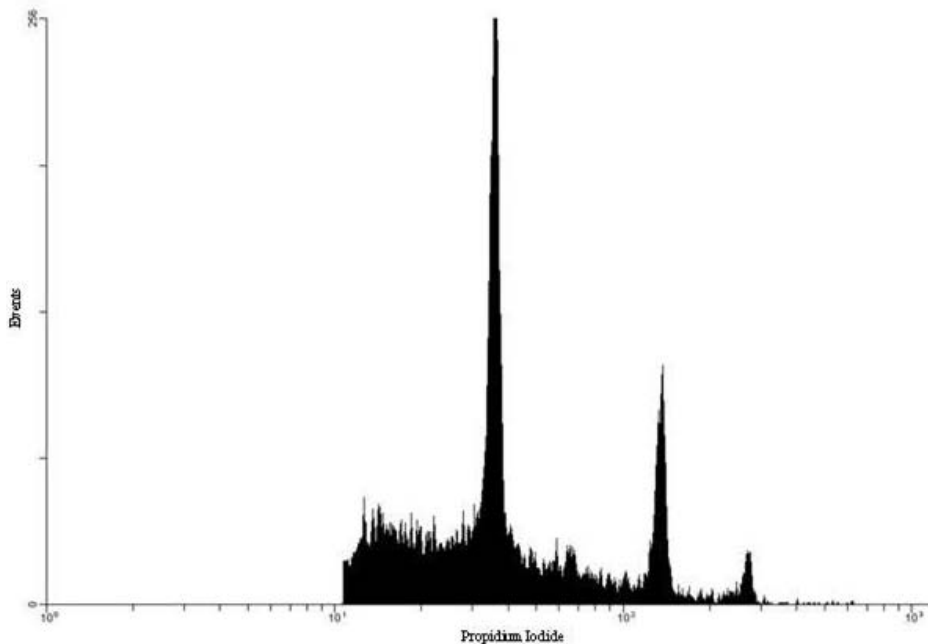


FIGURA 7 Histograma de citometria de fluxo em raiz do híbrido HCM-6x-35. O primeiro pico é referente ao pico G₁ da amostra de referência (*Glycine max*). O segundo pico é o Pico G₁ do híbrido e está localizado no canal 137,00, com uma estimativa de quantidade de DNA de 9,55 pg, valor dentro da faixa do esperado para um híbrido hexaploide (coeficiente de variação = 0,59%). O terceiro pico é o pico G₂/M do híbrido.

Há vários indícios de que a eliminação de sequências de DNA e a alteração dos padrões de metilação podem permitir a restauração da fertilidade. Essa restauração da fertilidade seria consequência, ao menos em parte, da regularização do pareamento cromossômico e essa regularização seria devido à eliminação de sequências de DNA, de tal forma que apenas cromossomos realmente homólogos poderiam parear (Ozkan et al., 2001).

A hibridação interespecífica pode também ativar elementos genéticos móveis e estes podem causar alterações cromossômicas estruturais (McClintock, 1984) e ser agentes causais do silenciamento gênico em alguns casos, além de facilitar a rápida reestruturação gênica depois da diploidização (Matzke & Matzke, 1998). Dessa forma, no caso da Cultivar Paraíso, transposons podem ter promovido a amplificação do teor de DNA, facilitando a reestruturação gênica.

Assim, fica evidente que, após os processos de hibridação e poliploidização, uma série de modificações ocorrem no híbrido poliploidizado, de forma que este se estabilize novamente.

4.4 Ciclo celular

Para explicar as perdas cromossômicas ocorridas nos híbridos interespecíficos duplicados, foi avaliada a ocorrência de anormalidades no ciclo celular dos dez híbridos estudados, comparando-os com os genótipos estáveis como o capim-elefante (BAG-63), milho (M-36) e triploide (CNPGL 94-44-3), com números cromossômicos constatados como $2n=4x=28$, $2n=2x=14$ e $2n=3x=21$, respectivamente (Barbosa et al., 2003; Techio et al., 2002). Foi observada variação entre os genótipos, a 5% de probabilidade (Tabela 4), com taxas de irregularidades nas fases do ciclo celular muito baixas para todos os genótipos analisados (Tabela 5).

Como esperado, foram baixas as frequências de anomalias nos parentais BAG-63 (0,25%), M-36 (0,21%) e no híbrido triploide CNPGL-94-44-3 (0,64%). Techio et al. (2006) avaliaram a meiose desses mesmos genótipos e observaram 20,9%, 0,3% e 52,4% de anormalidades, respectivamente. Os autores relatam que, para o capim-elefante, as percentagens de anormalidades devem ter sido superiores ao esperado, em virtude de esse material ser oriundo de cultura de tecidos, uma vez que, para outros dois genótipos de capim-

elefante, a média de anomalias foi de 2,5%. Das anormalidades encontradas para o milho, ascensão precoce de cromossomos foi a mais frequente. Apesar disso, as fases subsequentes da meiose não foram afetadas, revelando que esses cromossomos foram incluídos nos núcleos em formação. No presente trabalho, esse fato também pode ter ocorrido, uma vez que não foram observadas anormalidades em anáfase e telófase do M-36 (Tabela 5). Techio et al. (2006) relatam, ainda, que entre as anormalidades encontradas no capim-elefante e no híbrido triploide estão ascensão precoce de cromossomos, micronúcleos, cromossomos pegajosos e pontes. Essas mesmas anormalidades também foram encontradas no presente estudo.

A cultivar Paraíso (0,65%) foi o único híbrido submetido à duplicação que apresentou frequências de anomalias tão baixas quanto os parentais e o híbrido triploide. (Tabela 5) Essa cultivar, quando avaliada por Paiva (2006), apresentou comportamento meiótico irregular (68,03%). No entanto, a frequência de polens viáveis, observada por teste de coloração (49,96%) e de germinação (86,17%), foi relativamente alta.

TABELA 4 Resumo da análise de variância para porcentagem (%) de anomalias para os genótipos avaliados (HCM-6x-2, HCM-6x-3, HCM-6x-4, HCM-6x-20, cultivar Paraíso, HCM-6x-32, HCM-6x-35, HCM-6x-46, HCM-6x-89, BAG-63, M-36 e CNPGL-94-44-3).

FV	GL	QM
Genótipos	12	0,000341**
Erro	60	0,000038
Média	0,0115	
CV%	53,24	

** - significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 5 Total de células avaliadas no ciclo celular, frequência observada (%) de células com anormalidades e média de anomalias (%) para os genótipos avaliados (HCM-6x-2, HCM-6x-3, HCM-6x-4, HCM-6x-20, cultivar Paraíso, HCM-6x-32, HCM-6x-35, HCM-6x-46, HCM-6x-8, BAG-63, M-36 e CNPGL-94-44-3).

Genótipos	Total células avaliadas	% Anormalidades					Média de anomalias (%) ⁶
		Pro ¹	Prom ²	Met ³	Ana ⁴	Tel ⁵	
HCM-6x-2	4134	0,00	0,00	0,46	0,27	0,12	0,83 b
HCM-6x-3	3844	0,31	0,05	0,44	0,18	0,10	1,10 b
HCM-6x-4	4409	0,54	0,18	0,86	0,34	0,36	2,30 c
HCM-6x-20	4089	0,66	0,34	0,88	0,54	0,32	2,78 c
Paraíso	3966	0,15	0,08	0,25	0,13	0,05	0,65 a
HCM-6x-5	3880	0,18	0,00	1,03	0,21	0,26	1,64 b
HCM-6x-32	4402	0,48	0,02	0,34	0,09	0,07	1,00 b
HCM-6x-35	4559	0,37	0,24	0,20	0,22	0,15	1,19 b
HCM-6x-46	3945	0,00	0,00	1,04	0,43	0,05	1,56 b
HCM-6x-89	4018	0,03	0,00	0,70	0,05	0,08	0,86 b
BAG 63	4255	0,02	0,05	0,02	0,07	0,07	0,25 a
M 36	3906	0,05	0,00	0,15	0,00	0,00	0,21 a
CNPGL-94-44-3	3963	0,18	0,03	0,20	0,10	0,13	0,64 a

¹ Pro = prófase; ² Prom = prometáfase; ³ Met = metáfase; ⁴ Ana = anáfase; ⁵ Tel = telófase; ⁶ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Apesar de terem sido observadas baixas frequências de anormalidades para todos híbridos triploides duplicados analisados (Tabela 5), Paiva (2006), trabalhando com os mesmos genótipos, relatou frequências de anomalias variando de 59,46%, para o híbrido HCM-6x-2 a 74,72%, para HCM-6x-32. Assim, no presente trabalho, as frequências de anormalidades encontradas nas células somáticas são menores que aquelas encontradas para os mesmos genótipos na meiose (Paiva, 2006).

Com relação aos tipos de anormalidades, observa-se que a maior frequência ocorreu em metáfase e a menor, em prometáfase (Tabela 6). As anormalidades mais frequentes foram cromossomos perdidos (34,25%) e pegajosos (32,96%), seguidas por morte celular (13,64%) e micronúcleos (12,19%). Ocorrências de pontes (3,57%) e de duas anormalidades simultaneamente (3,42%) foram as menos frequentes. Algumas dessas anormalidades são mostradas na Figura 8.

Na mitose e na meiose, o processo de eliminação pode ser evidenciado por meio de alterações, como migração precoce nas metáfases e migração cromossômica tardia nas anáfases, que podem levar, conseqüentemente, à presença de micronúcleos nas telófases. A ocorrência de pontes e de cromossomos pegajosos também pode resultar em eliminação cromossômica, uma vez que podem comprometer a segregação cromatídica (Baptista-Giacomelli et al., 2000).

Abreu et al. (2006) induziram poliploidia em diferentes tecidos vegetais de híbridos triploides entre capim-elefante e milho, utilizando colchicina. Os autores observaram anormalidades na mitose, como metáfases com cromossomos perdidos, micronúcleos, anáfases com pontes e anáfases com cromossomos atrasados, evidenciando, assim, a eliminação cromossômica.

TABELA 6 Frequência (%) de todos os tipos de anormalidades nas fases do ciclo celular e frequência (%) de anormalidades por fase, para os genótipos avaliados.

Fase	Anormalidade	%	%/Fase
Prófase	MC ¹	13,64	20,30
Prófase	MIC ²	6,66	
Prometáfase	MIC ²	1,14	6,82
Prometáfase	PEG ³	5,52	
Prometáfase	MIC ² + PEG ³	0,16	
Metáfase	MIC ²	1,79	43,52
Metáfase	PEG ³	27,44	
Metáfase	PERD ⁴	12,01	
Metáfase	MIC ² + PEG ³	0,33	
Metáfase	PEG ³ + PERD ⁴	1,95	
Anáfase	MIC ²	0,16	17,53
Anáfase	PERD ⁴	15,42	
Anáfase	PTE ⁵	1,46	
Anáfase	MIC ² + PEG ³	0,16	
Anáfase	PERD ⁴ + PTE ⁵	0,33	
Telófase	MIC ²	2,44	11,86
Telófase	PERD ⁴	6,82	
Telófase	PTE ⁵	2,11	
Telófase	MIC ² + PERD ⁴	0,33	
Telófase	MIC ² + PTE ⁵	0,16	

¹ MC = morte celular; ² MIC = micronúcleo; ³ PEG = pegajosos; ⁴ PERD = cromossomo perdido; ⁵ PTE = Ponte.

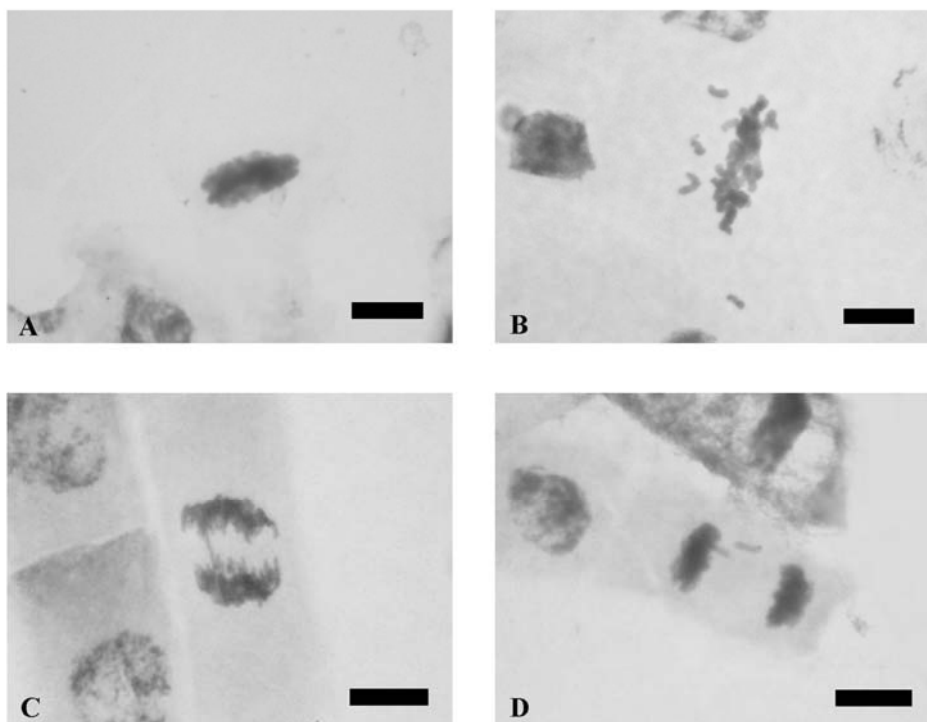


FIGURA 8 Anormalidades observadas em híbridos entre capim-elefante e milho submetidos a tratamento com antimitótico. (A) Metáfase com cromossomos pegajosos. (B) Metáfase com eliminação cromossômica. (C) Anáfase com ponte. (D) Telófase com cromossomo perdido. Barras = 10 μ m.

Paiva (2006) constatou que as anormalidades meióticas mais frequentes nos híbridos triploides submetidos à duplicação cromossômica foram ascensão precoce de cromossomos, segregação irregular e formação de pontes e micronúcleos. Tais anormalidades afetaram diretamente a fertilidade do pólen, pela produção de gametas aneuploides, o que foi observado pelas baixas taxas de

viabilidade do pólen, tanto por coloração quanto por germinação *in vitro*. Contudo, certa percentagem de polens viáveis é produzida.

Os resultados mostram a dificuldade em obterem-se plantas com todo o complemento duplicado. No entanto, a eliminação cromossômica em híbridos interespecíficos pode ser uma ferramenta utilizada em programas de melhoramento genético, uma vez que, com a eliminação parcial de cromossomos, podem-se gerar novas variedades híbridas, enquanto a eliminação total de um genoma do híbrido de capim-elefante e milho pode, ocasionalmente, formar variedades diploides férteis, que poderão servir de pontes nos cruzamentos e, assim, introduzir características desejáveis no capim-elefante (Abreu et al., 2006; Baptista-Giacomelli et al., 2000).

Neste aspecto, torna-se interessante realizar estudos envolvendo, principalmente, a cultivar Paraíso, por apresentar bom desempenho em plantios comerciais, produzir sementes viáveis e ter apresentado taxas de anormalidades tão baixas quanto os parentais e o híbrido triploide; o híbrido HCM-6x-35, por apresentar, com maior frequência células, 42 cromossomos e teores de DNA esperados para o híbrido hexaploide e o híbrido HCM-6x-32, que apresenta tendência a estabilizar-se como triploide. Estudos com citogenética molecular, principalmente com hibridização genômica *in situ* (GISH), estão sendo conduzidos para averiguar o grau de introgressão ocorrido nestes híbridos.

5 CONCLUSÕES

O comportamento dos híbridos triploides duplicados há mais tempo (americanos) e mais recentemente (nacionais) foi semelhante quanto ao número cromossômico, isto é, todos apresentam mixoploidia em células meristemáticas.

Não há variação no conteúdo de DNA entre os tecidos (folhas e raízes) de um mesmo híbrido, mas há variação entre os híbridos avaliados.

As irregularidades nas fases do ciclo celular são muito baixas, para todos os genótipos avaliados e não explicam a variação observada com relação ao número cromossômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. C. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos**. 2002. 72p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ABREU, J. C.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; BARBOSA, S. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, nov. 2006.

ARNAU, G.; NEMORIN, A.; MALEDON, E.; ABRAHAM, K. Revision of ploidy status of *Dioscorea alata* L. (Dioscoreaceae) by cytogenetic and microsatellite segregation analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 118, n. 7, p. 1239-1249, May 2009.

BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. de. Elimination of micronuclei from microspores in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 3, p. 681-684, set. 2000.

BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Cytogenetic of *Pennisetum purpureum* Schumach. x *Pennisetum glaucum* L. Hybrids and their parents. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 26-35, jan./fev. 2003.

BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; ABREU, J. C. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milho. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 365-372, set. 2007.

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

BENNETT, M. D.; FINCH, R. A.; BARCLAY, I. R. The time rate and mechanism of chromosome elimination in *Hordeum* hybrids. **Chromosoma**, Berlin, v. 54, n. 2, p. 175-200, June 1976.

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

BUSO, G. S. C.; PENTEADO, M. I. O.; POZZOBON, M. T.; PENALOZA, A.; DEL, P. S.; RANGEL, P. H.; FERREIRA, M. E. **Citometria de fluxo, contagem cromossômica e RAPD na identificação de genomas e espécies de Oryza**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos, 2000, 44p. (Boletim de Pesquisa, 10).

CAMPOS, J. M. S. **Obtenção de híbridos hexaplóides e análise genômica de *Pennisetum* sp. por citometria de fluxo**. 2007. 115p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAMPOS, J. M. S.; DAVIDIE, L. C.; SALGADO, C. C.; SANTOS, F. C.; COSTA, P. N.; SILVA, P. S.; ALVES, C. C. S.; VICCINI, L. F.; PEREIRA, A. V. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 101-104, Jan. 2009.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.; SILVA, M.; LEÃO, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 71, p. 19-33, abr. 2002.

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

DEWEY, D. R. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: LEWIS, W. H. **Polyploidy: biological relevance**. New York: Plenum, 1980. p. 445-469.

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plants genomes. **Journal of Applied Genetics**, Olomouc, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. **Flow cytometry with plant cells**. Weinheim: J. Wiley/VCH Verlag GMBH, 2007. p. 41-65.

DUJARDIN, M.; HANNA, W. W. Cytology and reproductive behavior of pearl millet-napiergrass hexaploids x *Pennisetum squamulatum* trispecific hybrids. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 76, n. 5, p. 382-384, Sept. 1985.

FELDMAN, M.; LIU, B.; SEGAL, G.; ABBO, S.; LEVY, A. A.; VEGA, J. M. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: A possible mechanism for differentiation of homeologous chromosomes. **Genetics**, Austin, v. 147, n. 3, p. 1381-1387, Nov. 1997.

FINCH, R. A. Tissue-specific elimination of alternative whole parental genomes in one barley hybrid. **Chromosoma**, Berlin, v. 88, n. 5, p. 386-393, Nov. 1983.

FINCH, R. A.; BENNETT, M. D. The mechanism of somatic chromosome elimination in *Hordeum*. In: KEW CHROMOSOME CONFERENCE, 2., 1983, London. **Proceedings...** London: Allen & Unwin, 1983. p. 146-153.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDON, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, Washington, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GERNAND, D.; RUTTEN, T.; VARSHNEY, A.; RUBTSOVA, M.; PRODANOVIC, S.; BRÜB, C.; KUMLEHN, J.; MATZK, F.; HOUBEN, A. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 9, p. 2431-2438, Sept. 2005.

GILDENHUYS, P.; BRIX, K. Genic control of aneuploidy in *Pennisetum*. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 16, n. 3, p. 358-363, Aug. 1961.

GILDENHUYS, P.; BRIX, K. Genetically controlled variability of chromosome number in *Pennisetum*. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 19, n. 4, p. 533-542, Nov. 1964.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

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

GUPTA, S. B. Duration of mitotic cycle and regulation of DNA replication in *Nicotiana plumbaginifolia* and hybrid derivative of *N. tabacum* showing chromosome instability. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 11, n. 1, p. 133-142, May 1969.

GUSTAFSSON, A. Reproduction mode and crop improvement. **Theoretical and applied Genetics**, Berlin, v. 38, n. 3, p. 793-805, Mar. 1962.

HANNA, W. W. Method of reproduction in napier grass and in the 3x and 6x allopolyploid hybrids with pearl millet. **Crop Science**, Madison, v. 21, n. 1, p. 123-126, Jan./Feb. 1981.

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

HANNA, W. W.; GAINES, T. P.; GONZALEZ, B.; MONSON, W. G. Effect of ploidy on yield and quality of pearl millet x napier grass hybrids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 76, n. 6, p. 969-971, Nov./Dec. 1984.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, Utrecht, v. 20, n. 3, p. 509-517, 1971.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZER, T. Flow cytometry and chromosome sorting. In: Houben, A; Field, B.L.; Saunders, V. Microdissection and chromosome painting of plant B chromosomes. **Methods in Cell Science**, Norwell, v. 23, n. 1/3, p. 115-124, Mar. 2001.

HOWARD, A.; PELC, S. R. Synthesis of deoxyribonucleic-acid in normal and irradiated-cells and its relation to chromosome breakage. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 49, n. 2, p. 207-218, June 1986.

JAUHAR, P. P. **Cytogenetics and breeding of pearl millet and related species**. New York: Alan R. Liss, 1981.

JAUHAR, P. P.; HANNA, W. W. Cytogenetics and genetics of pearl millet. **Advances in Agronomy**, New York, v. 64, v. 2/9, p. 1-26, Jan./Dec.1998.

JENSEN, C. J. Chromosome doubling techniques in haploids. In: KASHA, K. J. (Ed.). **Haploids in Higher plants: advances and potentials**. Guelph: Guelph University, 1974. p. 153-192.

JIN, W. W.; MELO, J. R.; NAGAKI, K.; TALBERT, P. B.; HENIKOFF, S.; DAWE, R. K.; JIANG, J. M. Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic background of oat. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 3, p. 571-581, Mar. 2004.

KIM, N. S.; ARMSTRONG, K. C.; FEDAK, G.; HO, K.; PARK, N. I. A microsatellite sequence from the rice blast fungus (*Megnaporthe grisea*) distinguishes between the centromeres of *Hordeum vulgare* and *Hordeum bulbosum* in hybrid plants. **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 1, p. 165-174, Feb. 2002.

KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V. S. Studies on the interespecific hybrid of *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. x *P. purpureum* Schumach. III. The cytogenetics of the colchicine-induced amphidiploid. **Genetica**, Dordrecht, v. 27, n. 2/3, p. 253-272, 1954.

KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V. S.; NAIR, N. H. An autotetraploid in pearl millet. **Current Science**, Bangalore, v. 19, n. 8, p. 252-253, Aug. 1950.

KUBALAKOVA, M.; VRANA, J.; CIHALIKOVA, J.; SIMKOVA, H.; DOLEZEL, J. Flow karyotyping and chromosome sorting in bread wheat (*Triticum aestivum*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 8, p. 1362-1372, June 2002.

LAERE, K. van; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J. van; BOCKSTAELE, E. van. Interespecific hybridisation and genome size analysis in *Buddleja*. **Euphytica**, Berlin, v. 166, n. 3, p. 445-456, Apr. 2009.

LAURIE, D. A.; BENNETT, M. D. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat x maize crosses. **Genome**, Ottawa, v. 32, n. 6, p. 953-961, Dec. 1989.

LAURIE, D.A.; BENNETT, M.D. Wheat x Maize hybridization. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 28, n. 2, p. 313-316, Apr. 1986.

LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. Genome downsizing in polyploid plants. **Biological Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 82, n. 2, p. 651-663, Aug. 2004.

LINDE-LAURSEN, I.; BOTHMER, R. von. Orderly arrangement of the chromosomes within barley genomes of chromosome-elimination *Hordeum lechleri* x barley hybrids. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 2, p. 225-236, Apr. 1999.

LIU, G.; LI, Z.; BAO, M. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. **Euphytica**, Wageningen, v. 157, n. 1/2, p. 145-154, Sept. 2007.

LIU, S. C.; KOWALSKI, S. P.; LAN, T. H.; FELDMANN, K. A.; PATERSON, A. H. Genome-wide high-resolution mapping by recurrent intermating using *Arabidopsis thaliana* as a model. **Genetics**, Berlin, v. 142, n. 1, p. 247-258, Jan. 1996.

LOUREIRO, J.; KOPECKY, D.; CASTRO, S.; SANTOS, C.; SILVEIRA, P. Flow cytometric and cytogenetic analyses of Iberian Peninsula *Festuca* spp. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 269, n. 1/2, p. 89-105, Nov. 2007.

LOUREIRO, J. ; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 77, p. 18-29, Abr. 2004.

MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, n. 1/2, p. 41-51, 1993.

MARTEL, E.; DE NAY, D.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S.; SARR, A. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 88, n. 2, p. 139-143, Mar. 1997.

MARTEL, E.; PONCET, V.; LANY, F.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; LEJUME, B.; SARR, A. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 249, n. 3/4, p. 139-149, Nov. 2004.

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, Aug. 1996.

MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. Polyploidy and transposons. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 13, n. 6, p. 241, June 1998.

MCCLINTOCK, B. The significance of responses of the genomes to challenge. **Science**, Washington, v. 226, n. 4676, p. 792-810, Nov. 1984.

MINOCHA, J. L. Pearl millet cytogenetics. In: GUPTA, P. K.; TSUCHIY A. **Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution**. New York: Elsevier, 1991. pt. A, p. 599-611.

MOCHIDA, K.; TSUJIMOTO, H.; SASAKUMA, T. Confocal analysis of chromosome behaviour in wheat x maize zygotes. **Genome**, Ottawa, v. 47, n. 11, p. 199-205, Jan. 2004.

MUÑOZ, M.; RIEGEL, R.; SEEMANN, P. Use of image cytometry for the early screening of induced autopolyploids. **Plant Breeding**, Berlin, v. 125, n. 4, p. 414-416, Aug. 2006.

OCHATT, S. J. Flow cytometry in plant breeding. **Cytometry**, Hoboken, v. 73A, n. 7, p. 581-598, Apr. 2008.

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, May 1997.

OZKAN, H.; LEVY, A. A.; FELDMAN, M. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 8, p. 1735-1747, Aug. 2001.

OZKAN, H.; TUNA, M.; ARUMUGANATHAN, K. Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. **Journal of Heredity**, Washington, v. 94, n. 3, p. 260-264, May 2003.

PAIVA, E. A. A. **Meiose em híbridos hexaplóides de capim-elefante e milheto**. 2006. 63p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

PASSOS, L.; LAMBERT, G.; GALBRAITH, D. Separação de acessos de capim-elefante com no teor de DNA genômico medido por citometria de fluxo. In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM ELEFANTE, 2., 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1994. p. 211.

PEREIRA, A. V.; FERREIRA, R. P.; PASSOS, L. P.; FREITAS, V. P.; VERNEQUE, R. S.; BARRA, R. B.; SILVA, C. H. P. Variação da qualidade de folhas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e híbridos de capim-elefante x milheto (*P. purpureum* x *P. glaucum*), em função da idade da planta. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 490-499, abr./jun. 2000.

PEREIRA, A. V.; VALLE, C. B.; FERREIRA, R. P.; MILES, J. W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.

PFOSSER, M.; AMON, A.; LELLEY, T.; HERERLE-BORS, E. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and detelosomic wheat-rye addition lines. **Cytometry**, Hoboken, v. 21, n. 4, p. 387-393, Dec. 1995.

PICKERING, R. A. Partial control of chromosome elimination by temperature in immature embryos of *Hordeum vulgare* L. x *H. bulbosum* L. **Euphytica**, Wageningen, v. 34, n. 3, p. 869-874, Nov. 1985.

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

PORTILLO, R. B. **Variação numérica de cromossomos em milho autopoliplóide (*Zea mays* L.)**. 1980. 88p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

RANDOLPH, L. F. Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 18, n. 3, p. 222-229, Mar. 1932.

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

RAYBURN, A. L.; AUGER, J. A.; BENZINGER, E. A.; HEPBURN, A. G. Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 40, p. 1179-1183, Nov. 1989.

RIDDLE, N.C.; BIRCHLER, J. A. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 19, n. 11, p. 597-600, Nov. 2003.

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

ROTH, P.S. **Introdução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake**. 1984. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba.

ROUX, N.; TOLOZA, A.; RADECKI, Z.; ZAPATA-ARIAS, F. J.; DOLEZEL, J. Rapid detection of aneuploid in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 5, p. 483-490, Jan. 2003.

SAITO, H.; MIZUNASHI, K.; TANAKA, S.; ADACHI, Y.; NAKANO, M. Ploidy estimation in *Hemerocallis* species and cultivars by flow cytometry. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 97, n. 2, p. 185-192, Jan. 2003.

SCHANCK, S. C. Propagação vegetativa e sexual do capim-elefante. In: PASSOS, L. P.; CARVALHO, L. A.; MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A. V. (Ed.). **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 1-16.

SCHWARZACHER-ROBINSON, T.; FINCH, R. A.; SMITH, J. B.; BENNETT, M. D. Genotypic control of centromere positions of parental genomes in *Hordeum X Secale* hybrid metaphases. **Journal of Cell Science**, London, v. 87, n. 2, p. 291-304, Mar. 1987.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Aug. 1974.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC, 1993. 391p.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 14, n. 91, p. 348-352, Sept. 1999.

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

SUDA, J.; KYNCL, T.; FREIOVA, R. Nuclear DNA amounts in Macaronesian angiosperms. **Annals of Botany**, London, v. 92, n. 1, p. 153-164, July 2003.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 353-362, June 2006.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; BEARZOTI, E. Cytotaxonomy of some species and of interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 203-209, June 2002.

VIEHMANNOVA, I.; CUSIMAMANI, E. F.; BECHYNE, M.; VYVADILOVA, M.; GREPLOVA, M. *In vitro* induction of polyploidy in yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, n. 1, p. 21-25, July 2009.

VOGEL, K. P.; ARUMUGANATHAN, K.; JENSEN, K. B. Nuclear DNA content of perennial grasses of the Triticeae. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 3, p. 661-667, May 1999.

WRIGHT, J.W. **Introduction to forest genetics**. New York: Academic, 1976.

WU, J. H.; MOONEY, P. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Madison, v. 70, n. 1, p. 99-104, July 2002.