



ANA LUIZA DE OLIVEIRA TIMBÓ

**DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA E
IDENTIFICAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA
UTILIZANDO CITOMETRIA DE FLUXO EM
*Brachiaria spp.***

LAVRAS - MG

2011

ANA LUIZA DE OLIVEIRA TIMBÓ

DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA E IDENTIFICAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA UTILIZANDO CITOMETRIA DE FLUXO EM *Brachiaria* spp.

Tese 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 Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora
Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS - MG
2010

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

Timbó, Ana Luiza de Oliveira.

Duplicação cromossômica e identificação do nível de ploidia utilizando citometria de fluxo em *Brachiaria* spp. / Ana Luiza de Oliveira Timbó. – Lavras : UFLA, 2011.

100 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. *Brachiaria ruziziensis*. 2. Conteúdo de DNA. 3. Cromossomos somáticos. 4. Genética. 5. Melhoramento genético. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.27

ANA LUIZA DE OLIVEIRA TIMBÓ

DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA E IDENTIFICAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA UTILIZANDO CITOMETRIA DE FLUXO EM *Brachiaria* spp.

Tese 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 Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 23 de novembro de 2010.

Dr. Fausto Souza Sobrinho	EMBRAPA/CNPGL
Dra. Giovana Augusta Torres	UFLA
Dr. José Marcello Salabert de Campos	UFJF
Dra. Vânia Helena Techio	UFLA

Dra. Lisete Chamma Davide
Orientadora

**LAVRAS – MG
2010**

*A DEUS, por ter me dado a VIDA,
Aos meus bisavós maternos, Biá e Luíza (in memoriam) pelos conselhos e exemplos.
Aos meus avós maternos e paternos, Raimundo Nonato (in memoriam) e Maria,
Luiz e Mariana (in memoriam) por acreditarem no meu sonho e potencial.
Aos meus pais, João Clécio e Luíza Alice, pelo carinho e amor.
Aos meus irmãos, João Lucas e João Paulo, por estarem ao meu lado.
Aos meus tios, Antônio Augusto, Clecineide, Clivoneide, Conceição e Mônica, pelo incentivo.
As minhas primas Fernanda, Silvana e Suzana, pelo apoio.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Minha imensa gratidão,

A minha orientadora Lisete Chamma Davide, pelos ensinamentos e orientação acompanhados de muita dedicação e ética. E meus co-orientadores Fausto Souza Sombrinho e José Eduardo Pereira Pinto Brasil, pelo incentivo e colaboração nesta tese.

A todos os professores do programa de Genética e Melhoramento de Plantas, pelos tão valiosos ensinamentos.

Aos técnicos Evaldo, Iara e a secretária Heloiza, pela colaboração e amizade.

A amiga Patrícia Nirlane da Costa e Vanderley Borges dos Santos pela colaboração e dedicação na execução dos experimentos.

Aos amigos Alex, Aline, Camila, Cristiane, Cristina, Deoclécio, Dheyne, Fernanda, Fernandinha, Fernando, Gabriellen, Graciele, Gustavo, Jeane, Juliane, Kátia, Leila, Marilena, Nilma, Patrícia Pierre, Quelén, Rose, pelos bons momentos vividos.

E a todos que contribuíram para a realização deste sonho que tanto possibilitou o meu crescimento.

RESUMO

No Brasil, as espécies de *Brachiaria* mais cultivadas são *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. A *Brachiaria ruziziensis* é diploide e sexual e as cultivares comerciais de *B. brizantha* e *B. decumbens*, que são as espécies mais difundidas no Brasil, são tetraploides e apomíticas. Uma das alternativas do melhoramento de *Brachiaria* é a realização de hibridações interespecíficas, sendo necessária a tetraploidização artificial da *B. ruziziensis*, bem como o conhecimento do nível de ploidia dos genótipos de interesse. Assim, neste trabalho objetivou-se a obtenção de genótipos duplicados de *B. ruziziensis*, a caracterização do nível de ploidia, por meio da citometria de fluxo e do número cromossômico somático, e a indicação de um protocolo de citometria de fluxo adequado para análise de genótipos de *Brachiaria* do programa de melhoramento da Embrapa Gado de Leite. No experimento de duplicação a taxa de sobrevivência das plântulas foi de 8% sendo obtidos 11 genótipos tetraploides e 16 mixoploides. Na América, este é o primeiro relato de duplicação cromossômica em *Brachiaria ruziziensis*. Na análise de 15 genótipos o conteúdo de DNA variou de acordo com o nível de ploidia (2x, 3x e 4x) e espécie e/ou taxon. A quantidade média de DNA de *B. ruziziensis* foi de 1,74 pg (2x), já para *B. decumbens* observou-se 3,74 pg (4x); na *B. brizantha* 3,52 pg (4x). Para o genótipo 86 obteve-se 2,52 pg de DNA, indicando tratar-se de um acesso triploide, com $2n=3x=27$, provavelmente um híbrido natural. São apresentados a quantidade de DNA pelos Valores C e Cx de todos os genótipos. A variação nas estimativas da quantidade de DNA total permitiu distinguir a *Brachiaria ruziziensis* das espécies tetraploides *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* e do provável híbrido triploide natural entre estas espécies. Para a contagem do número cromossômico somático, foram observados 18, 27 e 36 cromossomos para os diploides, triploide e tetraploides, respectivamente. Há concordância entre os resultados obtidos por citometria de fluxo e por contagem de cromossomos somático. Na avaliação de diferentes protocolos (3 tampões x 3 padrões) de preparo de amostra para análise em citômetro de quatro genótipos de *Brachiaria*, foram analisadas três variáveis: coeficiente de variação do pico G₁ da amostra no histograma, nota do histograma e estimativa do conteúdo de DNA. O protocolo mais adequado para o preparo da amostra foi o tampão MgSO₄, tendo o rabanete (*Raphanus sativus*) como padrão de referência para os genótipos *B. ruziziensis* (2x e 4x), *B. brizantha* e o híbrido triploide apesar da sobreposição do pico G₁ deste último com o pico G₂ do padrão rabanete. A nota do histograma foi eficiente na avaliação dos protocolos de preparo de amostra para a estimativa do conteúdo de DNA dos diferentes

genótipos de *Brachiaria*, sendo apropriada a utilização da metodologia com nota igual ou superior a 4.

Palavras-chave: *Brachiaria* spp. *Brachiaria ruziziensis*. Colchicina. Citometria de fluxo. Melhoramento genético. Indução de poliploidia. Nível de ploidia. Valor C. Conteúdo de DNA.

ABSTRACT

In Brazil, the most cultivated species of *Brachiaria* are *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. humidicola* and *B. ruziziensis*. *Brachiaria ruziziensis* is diploid and sexual and the commercial cultivars of *B. brizantha* and *B. decumbens*, which are the most widespread species in Brazil, are tetraploid and apomictic. One of the alternatives for breeding *Brachiaria* is interspecies hybridizations, by artificial tetraploidization of *B. ruziziensis* as well as the knowledge of the ploidy level of genotypes of interest. In this work, we aimed the production of duplicated genotypes of *B. ruziziensis*, the characterization of ploidy level by means of flow cytometry and somatic chromosome counting and the indication of a protocol of flow cytometry adequate for the analysis of *Brachiaria* genotypes from the breeding program of Embrapa Gado de Leite. In the experiment of duplication, the survival rate of seedlings was 8%, 11 tetraploid and 16 mixoploid genotypes were obtained. In America, this is the first report of chromosome duplication in *Brachiaria ruziziensis*. In the investigation of 15 genotypes, DNA content ranged according to the ploidy level (2x, 3x and 4x) and species and/or taxon. The average amount of DNA of *B. ruziziensis* was of 1.74 pg (2x), however for *B. decumbens*, 3.74 pg (4x) was found; in *B. brizantha* 3.52 pg (4x). For genotype 86, 2.52 pg of DNA was obtained, showing to be a triploid accession with $2n=3x=27$, probably a natural hybrid. The DNA content by the values C and Cx of all the genotypes is presented. The variation in the estimate of the amount of total DNA enabled to distinguish *Brachiaria ruziziensis* from the tetraploid species *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria brizantha* and from the likely triploid hybrid among these species. For number of somatic chromosome number, 18, 27 and 36 chromosomes were found for the diploids, triploid and tetraploids, respectively. There is an agreement among the results obtained by flow cytometry and by counting somatic chromosome. In the evaluation of different protocols (3 buffers x 3 standards) of sample preparation for the analysis in flow cytometry, the three variables were analyzed, namely, coefficient of variation of the G₁ peak of sample in the histogram, score of the histogram and estimate of DNA content. The protocol most adequate for sample preparation was the buffer MgSO₄, having the radish (*Raphanus sativus*) as the reference standard for the genotypes *B. ruziziensis* (2x and 4x), *B. brizantha* and the triploid hybrid, in spite of the overlap of the G₁ peak of this latter with the G₂ peak of the radish standard. The histogram score was efficient for the evaluation of protocols of sample preparation to estimate DNA content of

the different genotypes of *Brachiaria*. To use this methodology the score should be equal or superior to 4.

Key words: *Brachiaria* spp. *Brachiaria ruziziensis*. Colchicine. Flow cytometry. Genetic breeding. Polyploidy induction. Ploidy Level. C Value. DNA Content.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Melhoramento do gênero de <i>Brachiaria</i>	13
2.2	Citogenética do gênero <i>Brachiaria</i>	15
2.3	A importância da duplicação cromossômica para o melhoramento de <i>Brachiaria</i>	18
2.4	Avaliação do nível de ploidia	19
2.4.1	Contagem cromossômica	20
2.4.2	Citometria de fluxo	21
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	27
	REFERÊNCIAS	28
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	35
	ARTIGO 1 Caracterização do conteúdo de DNA e número cromossômico de genótipos de <i>Brachiaria</i> spp.	35
	ARTIGO 2 Obtenção de <i>Brachiaria ruziziensis</i> tetraploidizada	54
	ARTIGO 3 Protocolo de estimativa do conteúdo de DNA de <i>Brachiaria</i> spp. utilizando citometria de fluxo	71

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Brachiaria* é constituído de espécies tropicais de forrageiras nativas das savanas tropicais africanas (KELLER-GREIN; MAASS; HANSON, 1996). Estima-se que uma área de 172 milhões de hectares de pastagens é utilizada para alimentar um rebanho de, aproximadamente, 170 milhões de cabeças de gado (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2006). Na região do Cerrado, onde aproximadamente 35% do gado são criados estima-se uma área de aproximadamente 43 milhões de hectares de *Brachiaria* (KARIA et al., 2006).

Os programas de melhoramento de *Brachiaria* utilizam como uma das estratégias a realização de cruzamentos interespecíficos. Para possibilitar as hibridações entre *B. brizantha* (Hochst.) Stapf e *B. decumbens* Stapf, que são espécies tetraploides e apomíticas, é realizado a tetraploidização artificial da *B. ruziziensis* (ISHIGAKI et al., 2009; SWENNE et al., 1981), que naturalmente é diploide e sexual servindo como “ponte” nestes cruzamentos. Outra alternativa utilizada é a tetraploidização de alguns poucos acessos diploides sexuais de *B. brizantha* (PINHEIRO et al., 2000) ou *B. decumbens* encontrados na natureza (SIMIONI; VALLE, 2009).

Estas três espécies formam um complexo agâmico, pois pela superação da barreira de ploidia já foi possível gerar híbridos interespecíficos férteis no grupo (VALLE et al., 2008).

A *Brachiaria ruziziensis* é fonte de variabilidade genética para alta palatabilidade, alta produtividade de massa, apresenta boa tolerância ao sombreamento e baixadas úmidas entre outras características que podem

contribuir para o melhoramento genético de *B. brizantha* e *B. decumbens* (ARAUCÁRIA SEMENTES, 2010).

Tanto os experimentos de manipulação do nível de ploidia, bem como as atividades de coleta de plantas em pastagens e os cruzamentos interespecíficos em campo aberto, estas últimas, podem gerar dúvida quanto ao nível de ploidia dos genótipos trabalhados. Havendo a necessidade de confirmação do nível de ploidia.

A determinação do nível de ploidia pode ser conseguida através da contagem do número cromossômico ou pela estimativa do conteúdo de DNA por citometria de fluxo em estudos sobre caracterização de germoplasma e na verificação da eficiência de técnicas de manipulação do genoma como autopoliploidização e haploidização (CAMPOS et al., 2009; GOULART, 2008; ISHIGAKI et al., 2009; PENTEADO, 2000; PINHEIRO et al., 2000; SWENNE et al., 1981).

Neste contexto, os objetivos deste trabalho são: a obtenção de genótipos duplicados de *B. ruziziensis*, a caracterização do nível de ploidia, por meio da citometria de fluxo e do número cromossômico somático, e a indicação de um protocolo de citometria de fluxo adequado para análise de genótipos do Programa de Melhoramento de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Leite-Juiz de Fora – MG.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Melhoramento do gênero de *Brachiaria*

As principais espécies forrageiras de importância econômica nas Américas, originárias da África do leste, são: *B. arrecta* (= *B. radicans*); *B. brizantha*; *B. decumbens*; *B. dictyoneura*; *B. humidicola*; *B. mutica* e *B. ruziziensis* (VALLE et al., 2009).

Objetiva-se com os programas de melhoramento no gênero *Brachiaria* obter características como: resistência a cigarrinhas, alto valor nutritivo, adaptação a solos ácidos, alta produção de sementes, resistência a *Rhizoctonia* (MILES, 1999; MILLES; VALLE, 1996; PETERS; LASCANO, 2003; VALLE, 2001), bem como, melhorias nas características forrageiras importantes como: o perfilhamento, a capacidade de competição e ressemeadura natural, a rebrota, a persistência da planta e aspectos relacionados a eficiência na transformação da forrageira em produto animal para consumo humano (EUCLIDES; EUCLIDES, 1998).

As espécies mais utilizadas nos programas de melhoramento conduzidos na Embrapa Gado de Corte são *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. humidicola* e na Embrapa Gado de Leite é a *B. ruziziensis*.

A primeira importação da *Brachiaria decumbens* se deu por volta de 1970. Foi também a primeira brachiária que entrou no Brasil e é considerada a rainha das brachiárias por ter alavancado o sucesso da pecuária brasileira. Esta espécie está adaptada em todos os tipos de solo e regiões do Brasil. Apresenta alta resistência à seca e tolera terrenos cascalhados, com boa adaptação desde solos de cerrados até os litorâneos. A cultivar Basilisk foi coletada em pradarias do planalto de Great Lakes em Uganda. Foi utilizada na Austrália em 1930 e selecionada pela alta produtividade em testes de South Johnstone entre 1956 e

1966. Segundo o banco de dados Tropical Forages (2005) é cultivada por toda a América tropical, sudeste asiático e Pacífico e continua sendo a gramínea mais plantada na América do Sul. Apresenta uma boa capacidade de rebrota, chegando a produzir até 15t de MS/ha/ano e proteínas em torno de 8%. A *Brachiaria brizantha* cv. Marandú teve origem em regiões africanas onde o solo é mais fértil e por volta de 1977 a Embrapa iniciou sua avaliação no Brasil e em 1984 a lançou como cultivar (NUNES et al., 1984). Esta cultivar apresenta uma boa adaptação preferindo solo de média a alta fertilidade. Apresenta bom valor forrageiro e excelente produção de massa, podendo chegar a 20t MS/ha/ano com 9% de proteína bruta. É resistente às cigarrinhas, com boa tolerância ao frio e ao sombreamento. É atualmente a brachiaria mais plantada no Brasil. A *Brachiaria ruziziensis* possui alta palatabilidade, alta produtividade de massa, tem potencial produtivo de até 15t MS/ha/ano apresenta boa tolerância ao sombreamento e baixadas úmidas (ARAUCÁRIA SEMENTES, 2010).

Segundo Valle et al. (2008) alguns dos objetivos específicos atuais do programa de melhoramento de *B. brizantha* e *B. decumbens*, conduzido Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS) é viabilizar cruzamentos intra e interespecíficos via indução ao florescimento, conservação de pólen, e via poliploidização de novos acessos sexuais diploides, e selecionar genitores e híbridos com comportamento cromossômico próximo do normal visando à produção de sementes viáveis, adaptação a solos ácidos, alta produtividade, bom valor nutritivo e, principalmente, resistência a cigarrinhas-das-pastagens.

Para possibilitar as hibridações entre *B. brizantha* (Hochst.) Stapf e *B. decumbens* Stapf é realizado a tetraploidização artificial da *B. ruziziensis* (ISHIGAKI et al., 2009; SWENNE et al., 1981), que naturalmente é diploide e sexual servindo como “ponte” neste cruzamento. Uma alternativa é a tetraploidização de alguns poucos acessos diploides sexuais de *B. brizantha*

(PINHEIRO et al., 2000) ou *B. decumbens* encontrados na natureza (SIMIONI; VALLE, 2009).

No caso do melhoramento de *B. ruziziensis*, o que tem sido adotado pelo programa conduzido pela Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG), é a coleta de plantas em pastagens e a obtenção de populações melhoradas em campo aberto.

Tanto para estes genótipos poliploidizados, como aqueles oriundos de coleta e cruzamentos intraespecíficos (dentro da *B. ruziziensis*), que podem conter contaminação com pólen de genótipos tetraploides de outras espécies, há a necessidade de confirmação da ploidia dos materiais trabalhados, uma vez que as braquiárias estão amplamente difundidas em todo o Brasil e a *B. ruziziensis* é alógama. A confirmação do nível de ploidia pode ser realizada pelo uso de técnicas citogenéticas.

2.2 Citogenética do gênero *Brachiaria*

O gênero *Brachiaria* foi inicialmente descrito por Trinius (1834) como uma subdivisão de *Panicum* e depois elevado a gênero por Grisebach (1853). Esse gênero inclui aproximadamente 100 espécies de ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios, mas o centro de origem das primeiras espécies de valor agrônômico é a África Oriental (VALE et al., 2008).

Em geral no gênero *Brachiaria*, a microsporogênese precede a megagametogênese e se desenvolve de forma normal, tanto em plantas apomíticas como em sexuais: meiose da célula-mãe do micrósporo (2n cromossomos) seguida da formação de quatro gametas reduzidas (n cromossomos) (VALE et al., 2008).

A apomixia em *Brachiaria* é do tipo *Panicum*, ou seja, uma via assexual, na qual o saco embriogênico apospórico do tipo *Panicum* se

desenvolve a partir de uma célula somática ($2n$) no nucelo. A meiose ocorre, mas as quatro células reduzidas resultantes se degeneram e células somáticas do nucelo sofrem mitoses sucessivas produzindo sacos embrionários de quatro núcleos: uma oosfera, duas sinérgidas e um núcleo polar. Apenas o núcleo polar é fecundado (pseudogamia) e a célula-ovo, não reduzida, dará origem ao embrião por partenogênese. Mais de uma célula pode iniciar o desenvolvimento e isso resulta em sacos múltiplos dentro do ovário. Nunca se observou mais do que uma semente por espiguetas em *Brachiaria*, portanto, supõe-se que algum mecanismo de seleção e eliminação se estabeleça para que apenas um embrião sobreviva (VALE et al., 2008).

A apomixia em *Brachiaria* é geralmente facultativa, isto é, algumas flores exibem ocasionalmente sacos meióticos passíveis de serem fecundados e originarem híbridos chamados *off-type*. Este fato torna possível o melhoramento das espécies (VALE et al., 2008).

A maioria das espécies do gênero *Brachiaria* é poliploide. Darlington e Wylie (1955) determinaram que os números básicos de cromossomos para o gênero são $x=7$, $x=8$ e predominância de $x=9$. No entanto, Riso-Pascotto, Pagliarini e Valle (2006) relataram um novo número básico de 6 em alguns acessos de *B. humidicola* e *B. dictyoneura* com 42 e 24 cromossomos, respectivamente. A única espécie cultivada comercialmente de nível diploide e sexual, com pareamento regular de cromossomos na meiose é a *Brachiaria ruziziensis*. As outras espécies são poliploides ($4X$ e $6X$) apomíticas facultativas e apresentam configurações meióticas irregulares. É citada na literatura a ocorrência de níveis de ploidia de até $10X$ nesse gênero (VALE; MILES, 1994).

Levando em consideração as espécies *B. ruziziensis* Germain et Evrard, *B. decumbens* Stapf e *B. brizantha* (Hochst.) Stapf, dados disponíveis na literatura relatam o número básico de cromossômico de $x=9$ sendo encontrados naturalmente acessos $2x$ para a *B. ruziziensis* (GOULART, 2008; PENTEADO

et al., 2000); acessos 2x, 4x e 5x para a *B. decumbens* (GOULART, 2008; PENTEADO et al., 2000) e acessos 2x, 4x, 5x e 6x para a *B. brizantha* (MENDES et al., 2006; PENTEADO et al., 2000).

O conhecimento do nível de ploidia e do modo de reprodução dessas espécies são informações importantes para determinar estratégias de cruzamentos e condução dos programas de melhoramento. A necessidade ficou evidenciada a partir da década de 70 quando as primeiras tentativas de cruzamentos interploidia realizados por Ferguson e Crowder (1974) foram fracassadas. Estes autores realizaram cruzamentos entre *B. ruziziensis* ($2n=2x=18$) e *B. decumbens* ($2n=4x=36$), e observaram que mesmo apresentando afinidade entre as espécies a barreira do nível de ploidia impediu a obtenção de híbridos.

Os cruzamentos interespecíficos são feitos em plantas sexuais polinizadas com o pólen de inflorescências de plantas apomíticas. As sementes obtidas são germinadas individualmente e, quando as plantas florescem, o modo de reprodução é determinado por meio de análises dos ovários clarificados e por microscopia com contraste de interferência (YOUNG et al., 1979) e o estudo do comportamento meiótico é realizado por meio da análise de microsporócitos para possibilitar a identificação e quantificação das anormalidades meióticas, auxiliando na seleção de genótipos híbridos com quantidades de pólen viáveis aceitáveis para realização de futuros cruzamentos sem que haja comprometimento na produção de sementes viáveis (FELISMINO; PAGLIARINI; VALLE, 2010; VALLE; SAVIDAN, 1996).

Híbridos interespecíficos exibem, normalmente, anormalidades meióticas, que afetam em graus variados a fertilidade e a obtenção de sementes viáveis (VALLE; PAGLIARINI, 2009). Este fato demonstra mais uma importância da citogenética no estudo básico do comportamento meiótico das espécies e híbridos do gênero *Brachiaria*.

2.3 A importância da duplicação cromossômica para o melhoramento de *Brachiaria*

Alguns programas de melhoramento de *Brachiaria* utilizam como uma das estratégias a duplicação cromossômica de *B. ruziziensis* ou alguns acessos sexuais diploides (*B. brizantha* e *B. decumbens*) para a realização de cruzamentos interespecíficos com genótipos tetraploides apomíticos, e assim, explorar a variabilidade genética do gênero (PINHEIRO et al., 2000; ISHIGAKI et al., 2009; SIMIONI; VALLE, 2009; SWENNE et al., 1981). O objetivo é obter híbridos persistentes, que reunissem características desejáveis de dois ou mais progenitores agronomicamente promissores, tais como adaptação a solos ácidos, alta produtividade, bom valor nutritivo e, principalmente, resistência a cigarrinhas-das-pastagens (VALLE et al., 2009).

As plantas tetraploides em espécies do gênero *Brachiaria* foram primeiramente induzidas de sementes germinadas *in vivo* por Swenne, Louant e Durjardin (1981) e recentemente, pelo cultivo *in vitro* de sementes germinadas, múltiplos brotos (ISHIGAKI et al., 2009) e segmentos basais (PINHEIRO et al., 2000; SIMIONI; VALLE, 2009) tratados com colchicina.

Pinheiro et al. (2000) conseguiram obter 44 plantas tetraploides de dois acessos de *B. brizantha* naturalmente diploides. Para cada acesso tratou-se 75 segmentos basais *in vitro* em meio suplementado com colchicina a 0,01% por 48 horas. Sendo observados 60% de sobrevivência para o acesso BRA 002747 e 88% de sobrevivência para o acesso BRA 003417 em uma obtenção de 40% de duplicados para ambos os genótipos. Segundo esta mesma metodologia, Simioni e Valle (2009) conseguiram a duplicação cromossômica de 5 plantas diploides de *B. decumbens* e de um híbrido diploide entre *B. decumbens* e *B. brizantha*. Os autores relatam a obtenção de 14 sementes oriundas de cruzamentos destas *B. decumbens* duplicadas com cultivares apomíticas.

Ishigaki et al. (2009) obtiveram a duplicação de 5 genótipos de *Brachiaria ruziziensis* através de 100 sementes germinadas *in vitro* tratadas em meio suplementado com colchicina a 0.1% por 3 horas e 23 genótipos duplicados foram obtidos no tratamento de 500 calos com múltiplos brotos tratados com diferentes concentrações de colchicina (0.0125-0.1%) por 12 horas e a 0.0125% a 48 horas.

Swenne, Louant e Durjardin (1981) conseguiram a duplicação cromossômica de 35 plantas diploides de *B. ruziziensis*. A poliploidização foi induzida em 600 sementes germinadas *in vivo* tratadas com cinco diferentes concentrações de colchicina (0.05-1%) em quatro diferentes tempos de exposição (1-8 h). Recentemente, Felismino, Pagliarini e Valle (2010) observaram que híbridos interespecíficos entre alguns destes tetraploides artificiais de *B. ruziziensis* (SWENNE; LOUANT; DURJARDIN, 1981) e tetraploides apomíticos de *B. brizantha* apresentaram frequência e tipos variados de anormalidades meióticas. Entre os híbridos estudados observou um híbrido sexual que apresentou menor frequência de anormalidades meióticas podendo ser utilizado como genitor feminino em futuros cruzamentos no programa de melhoramento.

2.4 Avaliação do nível de ploidia

Os programas de melhoramento de *Brachiaria* normalmente envolvem diferentes espécies, com números cromossômicos diferentes. Exige-se, portanto, a determinação do nível de ploidia dos genótipos no decorrer das etapas de condução do melhoramento genético. A avaliação do nível de ploidia pode ser realizada pela contagem cromossômica e por citometria de fluxo, as quais são descritas abaixo (CAMPOS et al., 2009; GOULART, 2008; ISHIGAKI et al., 2009; PENTEADO, 2000; PINHEIRO et al., 2000; SWENNE et al., 1981).

2.4.1 Contagem cromossômica

A avaliação da ploidia por meio da contagem do número cromossômico é feita em células mitóticas e meióticas (VILLA, 1995). Essa técnica é bastante confiável, no entanto, quando se trata da análise de um grande número de plantas torna-se inviável, pois o procedimento fica demorado (SARI; ABAK; PITRAT, 1999; VILLA, 1995), quando se está analisando células mitóticas. Já na análise do nível de ploidia por células meióticas, além de confiável é uma técnica mais simples e rápida, mas há a necessidade que as plantas estejam na fase reprodutiva para que haja a obtenção do grão de pólen. Por esta técnica ser bastante confiável ela é indicada para a confirmação de ploidia nos casos em que persistem as dúvidas quanto aos resultados de outras técnicas (SCHIFINO-WITTMANN, 2001).

Entre os trabalhos que usaram número cromossômico para confirmar a ploidia de genótipos de *Brachiaria* selecionados visualmente no campo tem-se o de Goulart (2008). A autora encontrou genótipos com $2n=2x=18$ e $2n=4x=36$ cromossomos. Esse resultado permitiu indentificar aqueles genótipos que deveriam entrar no programa de melhoramento de *B. ruziziensis*.

Campos (2009) também realizou a contagem do número cromossômico de plantas tetraploidizadas artificialmente e de seus parentais *Pennisetum purpurium* e *Pennisetum glaucum*.

Bernado et al. (2009) analisaram a meiose de um acesso de *Brachiaria brizantha* (B039) para determinar o nível de ploidia. A condição tetraploide ($2n=4x=36$) derivado do número básico $x=9$ foi confirmada pela presença de associações cromossômicas tetravalentes na diacinese. Com a análise meiótica pode-se observar muitas anormalidades como: ascensões precoces nas metáfases, cromossomos retardatários nas anáfases levando a formação de micronúcleos nas telófases e tétrades, micrósporos desbalanceados. Devido estas

e outras anormalidades meióticas, os autores afirmam que esse acesso não servirá como doador de pólen em cruzamentos interespecíficos entre acessos tetraploides no programa de melhoramento.

2.4.2 Citometria de fluxo

A determinação do nível de ploidia de uma planta por meio da técnica de citometria de fluxo é obtida pela comparação do conteúdo de DNA desta planta, com o conteúdo de DNA de outra planta da mesma espécie, cujo nível de ploidia é conhecido. Sendo que para ambos, a estimativa do conteúdo de DNA é calculada pela comparação das intensidades de fluorescência dos núcleos em G1 da planta que se deseja saber o conteúdo de DNA, com a da planta padrão de referência, cujo conteúdo de DNA já foi calibrado por outro método. Essa técnica permite a análise de um grande número de indivíduos de modo rápido e prático.

Uma desvantagem desta técnica é que fornece resultados de um grupo de células o que pode em alguns casos gerar dúvidas nos resultados, sendo necessária a confirmação do nível de ploidia por outras técnicas, como a da contagem do número cromossômico por ponta de raiz ou célula-mãe-do-grão de pólen (SCHIFINO-WITTMANN, 2001), onde pode se analisar células individualizadas, e assim, minimizar os resultados conflitantes entre autores.

Em plantas, é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucas gramas de tecido foliar em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (GALBRAITH et al., 1983). A coloração dessa amostra é feita com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) o que permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA (DOLEZEL; DOLEZELOVA; NOVAK, 1994). A quantidade de DNA é expressa em

picogramas (pg), 10^{-12} g, sendo que 1 pg corresponde a 978 Mpb (DOLEZEL et al., 2003) Como o conteúdo de DNA nuclear das células em G0/1 reflete a ploidia de uma planta, através de comparação com o pico G1 de uma planta padrão com uma ploidia conhecida a técnica pode ser utilizada para a rápida estimativa do nível de ploidia (DOLEZEL, 1997; DOLEZEL; DOLEZELOVA; NOVAK, 1994).

Para garantir que as estimativas do conteúdo de DNA sejam confiáveis, além dos cuidados instrumentais é necessário a padronização adequada da metodologia de preparo das amostras (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007). Os fatores que interferem no preparo adequado das amostras são: a) tampão de extração/ PH; b) padrão de referência; c) fluorocromo; d) qualidade da amostra (idade da planta, presença de injúrias, doenças); e) armazenamento e tempo até a análise f) inerentes à amostra (composição química como a presença de antocianina, compostos fenólicos inibindo a coloração do DNA).

Abaixo serão descritos os dois primeiros fatores que interferem no preparo adequado da amostra.

A solução tampão adequada é aquela que permite o isolamento e manutenção da integridade dos núcleos da amostra a ser analisada. Têm sido usados vários tampões no isolamento de núcleos de células vegetais (GALBRAITH et al., 1983). A sua composição é determinada pela necessidade de inibir a atividade das nucleases, de preservar a integridade dos núcleos e de fornecer condições ótimas para a coloração do DNA. Os tampões mais utilizados apresentam geralmente, cation Mg^{2+} (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991; GALBRAITH et al., 1983) ou poliaminas (DOLEZEL; BINAROVA; LUCRETTI, 1989; LAAT; GÖHDE; VOGELZANG, 1987), que tem a função de estabilizar a cromatina. O Triton X-100 é geralmente usado em todos os tampões como detergente não iônico. Por vezes, são adicionados ao tampão,

agentes redutores (mercaptoetanol, PVP, etc.) que têm como função inibir a ação de compostos fenólicos (ENDEMANN et al., 2002; GALBRAITH et al., 2002).

Na literatura há poucos relatos que comparam a eficiência dos diferentes tampões de extração nuclear. Não existe um tampão universal que funcione eficientemente para todos os tipos de tecidos e ou espécies vegetais. Assim, são recomendáveis estudos prévios comparando a eficiência dos diferentes tampões para cada espécie estudada. Com isso, é possível a escolha adequada do tampão colaborando para uma maior precisão experimental.

A escolha do padrão de referência a ser usado é outro fator importante para a estimativa do conteúdo de DNA nuclear. A estimativa do conteúdo de DNA de uma amostra é obtida por comparação com o conteúdo de DNA do padrão de referência.

Os padrões de referência podem ser preparados externa ou internamente. Os padrões externos são preparados separadamente da amostra em estudo e são verificados antes e depois de cada amostra. Este procedimento é trabalhoso e susceptível a erros provocados por variações relacionadas com o aparelho e com a coloração. Este erro pode ser minimizado pela utilização do padrão internamente, isto é, realizando a preparação conjunta da amostra e do padrão. Os glóbulos vermelhos de galinha e os leucócitos humanos são frequentemente usados como padrões de referência em análises por citometria de fluxo do conteúdo em DNA nuclear e nível de ploidia em células humanas. O conteúdo de DNA nuclear destes padrões está supostamente bem estabelecido sendo 7,0 pg para *Homo sapiens* (RASCH, 1985), e 2,5 pg para *Gallus domesticus* (TIERSCH et al., 1989) e por essa razão são muitas vezes utilizados em estimativas do conteúdo de DNA nuclear em plantas superiores.

No entanto, quando se utilizam estes padrões, tem de se ter em consideração que nestas espécies, tal como acontece em outras espécies que possuem cromossomas sexuais heteromórficos, os valores diferem entre machos

e fêmeas (VINDELØV et al., 1983). Jakobsen (1983) verificou que estas diferenças podem influenciar significativamente a obtenção das estimativas da quantidade de DNA. Quando se utiliza glóbulos vermelhos de galinha como padrão de referência tem de se ter igualmente em consideração que as diferentes variedades de galinha possuem variação para o conteúdo em DNA (NAKAMURA et al., 1990). Por estas razões, o uso de padrões de referência de origem vegetal tem sido cada vez mais utilizado por serem mais adequados para estimar o conteúdo de DNA em plantas (PRICE et al., 1980).

Johnston et al. (1999) consideraram que a escolha do padrão de referência deve ser criteriosa para garantir que as estimativas obtidas sejam confiáveis. Price e Johnston (1996) recomendam que a escolha do padrão vegetal de referência deve apresentar um conteúdo de DNA próximo, mas não sobreposto, aos picos 2C e 4C da planta a ser analisada. Desta forma, é importante que se tenha um conjunto de plantas com ampla variação do conteúdo de DNA para ser usada como padrão de referência permitindo assim uma avaliação mais precisa de diferentes genomas vegetais. Dolezel, Sgorbati e Lucretti (1992) calibraram o tamanho do genoma de cultivares selecionados de *Raphanus sativus* (2C = 1,11 pg), *Lycopersicon esculentum* (2C = 1,96 pg), *Glycine max* (2C = 2,50 pg), *Zea mays* (2C = 5,72 pg), *Pisum sativum* (2C = 9,09 pg), *Vicia faba* (2C = 26,90 pg), *Secale cereale* (2C = 16,19 pg) e *Allium cepa* (2C = 34,89 pg). Sementes destes padrões de referência são disponibilizadas pelo Prof. Dr. Jaroslav Dolezel do Laboratório de Citogenética Molecular e Citogenética, do Instituto Experimental de Botânica –Sokolovska-República Tcheca. Estas espécies são rotineiramente utilizadas como padrões internos de referência na estimativa do conteúdo de DNA de genomas vegetais em diferentes centros de pesquisa no mundo inteiro. Outras espécies vegetais que são frequentemente usadas como padrão de referência são: *Petunia hybrida*

($2C = 2,85$ pg) (MARIE; BROWN, 1993) e *Hordeum vulgare* ($2C = 11,12$ pg) (OBRIEN et al., 1996).

De acordo com Dolezel (1997), a citometria de fluxo pode ser útil no melhoramento de plantas para monitorar a estabilidade do nível de ploidia, identificar haploides e duplohaploides em culturas de anteras e ovários, verificar novos níveis de ploidia em resultados de cruzamentos, detecção de indivíduos aneuploides, no estudo da apomixia, identificação do sexo em plantas dióicas, identificação de híbridos, identificação de polissomatia, acompanhamento do desenvolvimento da semente, identificação do produto de fusão de protoplastos. Entretanto, atualmente, a aplicação mais comum da citometria de fluxo é para a análise do nível de ploidia tanto para os programas de melhoramento genético, como os de produção de sementes.

Nos programas de melhoramento vegetal, a citometria de fluxo pode auxiliar o melhorista na identificação das plantas oriundas por cruzamentos interespecíficos. A hibridação interespecífica é frequentemente utilizada como uma das estratégias dos programas de melhoramento para transferência de caracteres de interesse de uma espécie para outra. Se as espécies parentais apresentarem uma grande variação para a quantidade de DNA nuclear, a citometria de fluxo pode detectar híbridos interespecíficos de acordo com os seus valores intermediários do conteúdo de DNA (DOLEZEL, 1997).

A citometria de fluxo já foi aplicada para a identificação e caracterização de plantas híbridas nos programas de melhoramento de várias espécies, como por exemplo, em *Allium* spp. (KELLER et al., 1996), *Solanum* spp. (DOLNICAR; BOHANEK, 2000; SZCZERBAKOWA et al., 2003; TRABELSI et al., 2005) e *Citrus* spp. (KHAN; GROSSER, 2004; SCARANO, 2003) e *Pennisetum* spp (CAMPOS et al., 2009).

O emprego da citometria de fluxo para a determinação do nível de ploidia em muitos acessos de espécies cultivadas foi bem sucedido. Por meio

dessa técnica foi feito a caracterização do nível de ploidia de vários acessos do germoplasma de diversas espécies, como por exemplo, *Medicago sativa* (BRUMMER; CAZCARRO; LUTH, 1999), *Bromus* ssp. (TUNA et al., 2001), *Dioscorea alata* (EGESI et al., 2002) e *Musa* spp. (BARTOŠ et al., 2005; NSABIMANA; STADEN, 2006; PILLAY et al., 2006).

No gênero *Brachiaria*, a técnica de citometria de fluxo foi utilizada na identificação do nível de ploidia do banco de germoplasma e materiais de interesse no melhoramento (PENTEADO et al., 2000) e, na verificação da eficiência de técnicas de duplicação cromossômica (ISHIGAKI et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; PINHEIRO et al., 2000).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A citogenética pode ser empregada em várias etapas do programa de Melhoramento de *Brachiaria* tais como: identificação do material coletado, verificação da viabilidade e comportamento meiótico, verificação de ocorrência de hibridação, verificação da normalidade do comportamento mitótico e meiótico de genótipos de interesse e averiguação da ploidia após indução de poliploidia.

REFERÊNCIAS

- ARAUCÁRIA SEMENTES. *Brachiaria ruziziensis*: pastagens. Disponível em: <<http://www.sementesaraucaria.com.br/ruziziensis.php>>. Acesso em: 18 jun. 2010.
- ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 9, n. 3, p. 229-233, June 1991.
- BARTOŠ, J. et al. Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (Musaceae): taxonomic implications. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 109, n. 1/3, p. 50-57, June 2005.
- BRUMMER, E. C.; CAZCARRO, P. M.; LUTH, D. Ploidy determination of alfalfa germplasm accessions using flow cytometry. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 4, p. 1202-1207, July/Aug. 1999.
- CAMPOS, J. M. S. et al. 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, Feb. 2009.
- DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas of flowering plants**. London: Allen & Unwin, 1955. 519 p.
- DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 38, n. 3, p. 285-302, Apr. 1997.
- DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 113-112, Apr. 1989.
- DOLEZEL, J.; DOLEZELOVA, M.; NOVAK, F. J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa accuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, n. 3, p. 351-357, June 1994.
- DOLEZEL, J. et al. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry**, Malden, v. 51A, n. 2, p. 127-128, Feb. 2003.

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

DOLEZEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 4, p. 625-631, Aug. 1992.

DOLNICAR, P.; BOHANEK, B. Ploidy and morphological characteristics of *Solanum tuberosum* x *Solanum phureja* hybrids. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, Berlin, v. 439, n. 7, p. R9-R11, 2000. Supplement.

EGESI, C. N. et al. Ploidy analysis in water yam, *Dioscorea alata* L. germplasm. **Euphytica**, Wageningen, v. 128, n. 2, p. 225-230, Apr. 2002.

ENDEMANN, M. et al. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 44, n. 3, p. 339-345, Mar. 2002.

EUCLIDES, V. P. B.; EUCLIDES FILHO, K. **Uso de animais na avaliação de forrageiras**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1998. 59 p. (Documentos, 74).

FELISMINO, M. F.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic behavior of interspecific hybrids between artificially tetraploidized sexual *Brachiaria ruziziensis* and tetraploid apomictic *B. brizantha* (Poaceae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 2, p. 191-197, Mar./Apr. 2010.

FERGUSON, J. E.; CROWDER, L. V. Cytology and breeding behavior of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. **Crop Science**, Madison, v. 14, p. 893-895, 1974.

GALBRAITH, D. W. et al. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: ROBINSON, J.; AZMI, A.; TUTOIS, S. (Ed.). **Current protocols in cytometry**. New York: J. Wiley, 2002. p. 345-365.

_____. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, New York, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GARNATJE, T. et al. Genome size variation in the genus *Carthamus* (Asteraceae, Cardueae): systematic implications and additive changes during allopolyploidization. **Annals of Botany**, London, v. 97, n. 3, p. 461-467, July 2006.

GOULART, J. C. **Citogenética e anatomia foliar de acessos e progênies de *Brachiaria***. 2008. 71 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

GRISEBACH, A. **Gramineae**. [S.l.: s.n.], 1853. v. 4, 469 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário 2006: resultados preliminares**. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1064id_pagina=1>. Acesso em: 18 jun. 2010.

ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. **Japanese Society of Grassland Science**, Tokyo, v. 55, n. 3, p. 164-170, Sept. 2009.

JAKOBSEN, A. The use of trout erythrocytes and human-lymphocytes for standardization in flow-cytometry. **Cytometry**, Hoboken, v. 4, n. 2, p. 161-165, 1983.

JOHNSTON, J. et al. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 86, n. 5, p. 609-613, May 1999.

KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. **Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 2006. 57 p. (Documentos, 163).

KELLER, E. R. J. et al. Interspecific crosses of onion with distant *Allium* species and characterization of the presumed hybrids by means of flow cytometry, karyotype analysis and genomic *in situ* hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, n. 3/4, p. 417-424, Aug. 1996.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germoplasm collections. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Bogotá: CIAT, 1996. p. 16-42.

KHAN, I. A.; GROSSER, J. W. Regeneration and characterization of somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* (sweet orange) and *Citrus micrantha*, a progenitor species of lime. **Euphytica**, Wageningen, v. 137, n. 2, p. 271-278, May 2004.

LAAT, A.; GÖHDE, W.; VOGELZANG, M. Determination of ploidy of single plants and plant population by flow cytometry. **Plant Breeding**, Berlin, v. 99, n. 4, p. 303-307, 1987.

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

MENDES, D. V. et al. Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 150, n. 4, p. 441-446, Aug. 2006.

MILES, J. W. Nuevos híbridos de *Brachiaria*. **Pasturas Tropicales**, Cali, v. 21, n. 2, p. 78-80, 1999.

MILES, J. W.; VALLE, C. B. do. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Brasília: EMBRAPA Gado de Corte, 1996. p. 164-177. (CIAT Publication, 259).

NAKAMURA, D. et al. Rapid identification of sex in birds by flow cytometry. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 53, n. 4, p. 201-205, 1990.

NSABIMANA, A.; STADEN, J. van. Ploidy investigation of bananas (*Musa* spp.) from the National Banana Germplasm Collection at Rubona-Rwanda by flow cytometry. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 72, n. 2, p. 302-305, May 2006.

NUNES, S. G. et al. **Brachiaria brizantha** cv. **Marandú**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 1984. 31 p. (Documentos, 21).

OBRIEN, I. E. W. et al. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus*. **Plant Science**, Shannon, v. 115, n. 1, p. 91-99, Feb. 1996.

PENTEADO, M. I. de O. et al. **Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2000. 32 p. (EMBRAPA Gado de Corte. Boletim de Pesquisa, 11).

PETERS, M.; LASCANO, C. E. Forage technology adoption: linking on-station research with participatory methods. **Tropical Grasslands**, Melbourne, v. 37, n. 4, p. 197-203, 2003.

PILLAY, M. et al. Ploidy and genome composition of *Musa* germplasm at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA). **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 5, n. 13, p. 1224-1232, 2006.

PINHEIRO, A. A. et al. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicines. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 3, p. 274-278, Jan. 2000.

PRICE, H. E.; JOHNSTON, J. Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. In: JAUHAR, P. P. (Ed.). **Methods of genome analysis in plants**. Boca Raton: CRC, 1996. p. 115-132.

PRICE, H. J. et al. Detection of intraspecific variation in nuclear-DNA content in *Microseris douglasii*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 141, n. 2, p. 195-198, 1980.

RASCH, E. DNA “standards” and the range of accurate DNA estimates by Feulgen absorption microspectrophotometry. In: COWDEN, R. et al. (Ed.). **Advances in microscopy**. New York: A. R. Liss, 1985. p. 137-166.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae:Panicoideae:Paniceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 53, n. 1, p. 7-10, Jan. 2006.

SARI, N.; ABAK, K.; PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, n. 3/4, p. 265-277, Apr. 1999.

SCARANO, M. T. et al. Flow cytometry, SSR and modified AFLP markers for the identification of zygotic plantlets in backcrosses between 'Femminello' lemon cybrids (2n and 4n) and a diploid clone of 'Femminello' lemon (*Citrus limon* L. Burm. F.) tolerant to mal secco disease. **Plant Science**, Shannon, v. 164, n. 6, p. 1009-1017, June 2003.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 897-902, set./out. 2001.

SIMIONI, C.; VALLE, C. B. do. Chromosome duplication in *Brachiaria* (A. rich.) Stapf allows intraspecific crosses. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 9, n. 4, p. 328-334, 2009.

SWENNE, A.; LOUANT, B.; DURJARDIN, M. Induction par la colchicine de formes autotetraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). **Agronomie Tropicale**, Paris, v. 36, n. 2, p. 134-141, 1981.

SZCZERBAKOWA, A. et al. Somatic hybrids *Solanum nigrum* (+) *S. tuberosum*: morphological assessment and verification of hybridity. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 6, p. 577-584, Feb. 2003.

TIERSCH, T. R. et al. Reference-standards for flow-cytometry and application in comparative studies of nuclear-DNA content. **Cytometry**, Hoboken, v. 10, n. 6, p. 706-710, Dec. 1989.

TRABELSI, S. et al. Somatic hybrids between potato *Solanum tuberosum* and wild species *Solanum vernei* exhibit a recombination in the plastome. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, n. 1, p. 1-11, July 2005.

TRINUS, C. B. Panicearum genera. **Memoires of the Academy of Science Petersburg**, Petersburg, v. 3, n. 6, p. 194-196, 1834.

TUNA, M. et al. DNA content and ploidy determination of bromegrass germoplasm accessions by flow cytometry. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 5, p. 1629-1634, May 2001.

VALLE, C. B. do. Genetic resources for tropical areas: achievements and perspectives. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, Piracicaba. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 477-482.

VALLE, C. B. do et al. Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do; JANK, L. (Ed.). **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 2008. p. 13-53.

VALLE, C. B. do; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. *Ceres*, Viçosa, MG, v. 56, n. 4, p. 460-472, jul./ago. 2009.

VALLE, C. B. do; MILES, J. M. Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 11., 1994, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1994. p. 1-23.

VALLE, C. B. do; PAGLIARINI, M. S. Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*. In: SINGH, R. J. (Ed.). **Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement**. Boca Raton: CRC, 2009. p. 103-151.

VALLE, C. B. do; SAVIDAN, Y. H. Genetics, cytogenetic and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.). ***Brachiaria*: biology, agronomy and improvement**. Brasília: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 147-163. (CIAT Publication, 256).

VILLA, V. B. **Análise citomorfoanatômica e eletroférica de híbridos de *Solanum tuberosum* L. X. (*Solanum tuberosum* x *Solanum chacoense* Bitt)**. 1995. 76 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

VINDELØV, L. L. et al. Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. *Cytometry*, Hoboken, v. 3, n. 5, p. 328-331, Sept. 1983.

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

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

**CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA E NÚMERO
CROMOSSÔMICO DE GENÓTIPOS DE *Brachiaria spp.***

**Artigo redigido conforme norma da revista *Crop Breeding and Applied
Biotechnology***

Caracterização do conteúdo de DNA e número cromossômico de genótipos de *Brachiaria* spp.

RESUMO

Os programas de melhoramento de *Brachiaria* utilizam os cruzamentos intraespecíficos e interespecíficos entre plantas sexuais e apomíticas para obtenção de novas cultivares com características desejadas. Como existem diferentes níveis de ploidia dentro e entre as espécies deste gênero, a constatação do nível de ploidia é informação importante para a orientação dos melhoristas. Neste trabalho, foi feita a caracterização do nível de ploidia por meio da citometria de fluxo e contagem do número de cromossomos somáticos de genótipos de *Brachiaria* spp. do Programa de Melhoramento da Embrapa Gado de Leite. Na análise de 15 genótipos o conteúdo de DNA variou de acordo com o nível de ploidia (2x, 3x e 4x) e entre espécie e/ou taxon. A quantidade média de DNA de *B. ruziziensis* foi de 1,74 pg (2x), já na *B. decumbens* observou-se 3,74 pg (4x) e na *B. brizantha* 3.52 pg (4x). Para o genótipo 86 obteve-se 2,57 pg de DNA, indicando tratar-se de um acesso triploide, com $2n=3x=27$, provavelmente um híbrido natural. A variação no conteúdo de DNA total permitiu diferenciar *Brachiaria ruziziensis* das espécies tetraploides *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* e do provável híbrido triploide entre estas espécies, os quais apresentaram, respectivamente, 18, 36 e 27 cromossomos. Foram apresentados valores médios do Valor C e Valor Cx de todos os genótipos estudados a média para as espécies variaram entre 852,1-1829 Mpb e 852,1-914,5 Mpb.

Palavras-chave: Nível de ploidia. Número Cromossômico Somático. Forrageiras. Citômetro. *Brachiaria ruziziensis*. Valor C. Valor Cx.

**Characterization of DNA content and chromosome number of genotypes of
Brachiaria spp.**

ABSTRACT

The breeding programs of *Brachiaria* utilize both the intraspecies and interspecies crosses among sexual and apomictic plants for obtaining of new cultivars with desired characteristics. As there are different ploidy levels within and between the species of this genus, the finding of the ploidy level is an important piece of information to the guidance of the breeders. In this work, the characterization of the ploidy level by flow cytometry and count of the somatic chromosome of genotypes of *Brachiaria* spp. of the Breeding program of Embrapa Gado de Leite was done. In the study of 15 genotypes, the DNA content ranged according to the ploidy level (2x, 3x and 4x) and between species and/or taxon. The average amount of DNA of *B. ruziziensis* was of 1.74 pg (2x), but in *B. decumbens*, 3.74 pg (4x) and in *B. brizantha* 3.52 pg (4x) were found. For genotype 86, 2.57 pg of DNA were obtained, showing to be a triploid accession, with $2n=3x=27$, probably a natural hybrid. The variation in the total content allowed to distinguish *Brachiaria ruziziensis* from the tetraploid species *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria brizantha* and of the likely triploid hybrid between these species, which present, respectively, 18, 36 and 27 chromosomes. Average values of the C Value and Cx Value of all the studied genotypes were presented, the mean for the species varied between 852.1-1829 Mpb and 852.1-914.5 Mpb.

Key words: Ploidy level. Somatic Chromosome Number. Forages. Cytometer. *Brachiaria ruziziensis*. C Value. Cx Value.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, estima-se que uma área de 172 milhões de hectares de pastagens é utilizada para alimentar um rebanho de aproximadamente 170 milhões de cabeças de gado (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2006). Na região de Cerrado, onde aproximadamente 35% do gado é criado, estima-se uma área de aproximadamente 43 milhões de hectares de *Brachiaria* (KARIA et al., 2006).

Entre as espécies de *Brachiaria* mais cultivadas no Brasil estão a *B. decumbens* Stapf e *B. brizantha* (Hochst.) Stapf, que são tetraploides e apomíticas facultativas. A *B. ruziziensis* (GERMAIN et EVRARD) é utilizada como “ponte” por ser diploide e sexual. Para isso, é necessário a duplicação do número de cromossomos da *B. ruziziensis*, (SOUZA SOBRINHO et al., 2009) e assim, utiliza-la como genitor feminino no mesmo nível de ploidia das demais que apesar de serem apomíticas, apresentam uma microsporogênese normal e por isso, são utilizadas como doadores de pólen (VALE et al., 2008).

A *Brachiaria ruziziensis* apresenta alta palatabilidade, alta produtividade de massa, potencial produtivo de até 15t MS/ha/ano e boa tolerância ao sombreamento e baixadas úmidas (ARAUCÁRIA SEMENTES, 2010).

No caso do melhoramento de *B. ruziziensis*, uma das estratégias adotadas pelo programa conduzido pela Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG), é a coleta de plantas em pastagens e a obtenção de populações melhoradas em campo aberto. Nesse caso, há a necessidade de confirmação da ploidia dos materiais trabalhados, pois é possível que ocorram contaminações com pólen de outras espécies, uma vez que as espécies de *Brachiaris* estão amplamente difundidas em todo o Brasil e a *B. ruziziensis* é alógama.

O conhecimento do nível de ploidia pode auxiliar o melhorista na seleção de genitores com níveis de ploidia compatíveis, e assim, evitar a

produção de híbridos estéreis, bem como na verificação da eficiência de técnicas de manipulação do nível de ploidia. Para se determinar o nível de ploidia de um genótipo pode-se utilizar a contagem do número cromossômico ou a avaliação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo e comparação dos resultados com plantas da mesma espécie cujo nível de ploidia já foi estabelecido. Em *Brachiaria* Ishigaki et al. (2009) e Pinheiro et al. (2000) utilizaram os dois métodos para a constatação da eficiência de protocolos de indução de duplicação cromossômica, e Penteado et al. (2000) para a confirmação de alguns genótipos de um banco de germoplasma. Também para a avaliação do nível de ploidia, Goulart (2008) realizou a contagem do número cromossômico de pontas de raízes de acessos e progênies de duas espécies de *Brachiaria* e observou $2n=4x=36$ para a *Brachiaria decumbens* e $2n=2x=18$ para a *Brachiaria ruziziensis*.

Na literatura encontram-se vários exemplos do emprego da citometria de fluxo para determinação de ploidia em outros gêneros, incluindo *Medicago sativa* (BRUMMER; CAZCARRO; LUTH, 1999), *Bromus* ssp. (TUNA et al., 2001), *Brachiaria* spp. (PENTEADO et al., 2000), *Dioscorea alata* (EGESI et al., 2002) *Musa* spp. (BARTOŠ et al., 2005; NSABIMANA; STADEN, 2006; PILLAY et al., 2006) e *Pennisetum* spp. (CAMPO et al., 2009).

Objetivou-se com esse trabalho caracterizar o nível de ploidia por meio da citometria de fluxo e contagem cromossômica de genótipos do programa de melhoramento de *Brachiaria ruziziensis* da Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora - MG.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

A caracterização do nível de ploidia foi realizada em 15 genótipos do programa de melhoramento de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora-MG, sendo 13 genótipos de *B. ruziziensis*, duas cultivares comerciais, *B. brizantha* cv. Marandú e *B. decumbens* cv. Basilisk.

2.2 Análises de citometria de fluxo

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram conduzidos no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora-MG. Para cada planta, três amostras foram avaliadas, com o objetivo de estimar a quantidade de DNA e o nível de ploidia, e cada uma delas foi considerada como uma repetição (delineamento inteiramente ao acaso com três repetições). A análise estatística foi realizada e as médias do conteúdo de DNA foram comparadas pelo teste de média Scott-Knott ($p < 0,05$).

Para a determinação da quantidade de DNA, utilizou-se aproximadamente entre 20 e 30 mg de tecido foliar jovem para cada amostra, acrescida com a mesma quantidade de massa foliar de *Pisum sativum* cv. Ctirad (padrão de referência de quantidade de DNA $2C=9,09$ pg). Com auxílio de um bisturi, as folhas foram trituradas, em placa de Petri, contendo 1 mL do tampão de extração de núcleos $MgSO_4$ (DOLEZEL; BARTOS, 2005; DOLEZEL; BINAROVA; LUCRETTI, 1989). A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gases, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de náilon de 50 μm . Os núcleos foram corados com uma solução composta de iodeto de propídio de 1 mg/mL⁻¹ e 5 μL de RNase.

As amostras foram armazenadas em refrigerador, no escuro, e analisadas em até 1 hora após o preparo. Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados quanto à emissão de fluorescência utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), os histogramas foram obtidos no programa Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados no programa WinMDI 2.8 (TROTTER, 2000).

As quantidades de DNA nuclear (pg) das amostras foram estimadas por meio da equação:

$$DNA\ amostra = \left(\frac{G1\ amostra}{G1\ padrão} \right) \times DNA\ padrão, \text{ onde:}$$

DNA amostra = quantidade de DNA nuclear da amostra (pg);

G1 amostra = posição do pico G1 da amostra;

G1 padrão = posição do pico G1 de *Pisum sativum*

DNA padrão = conteúdo de DNA de *Pisum sativum* = 9,09 pg/2C.

Em seguida, com base na estimativa de DNA da amostra também foi calculado o Valor C (quantidade de DNA gamético – com número cromossômico n) e o Valor Cx (quantidade de DNA de cada genoma- com número cromossômico básico x) e transformado para a unidade mega pares de bases (Mpb) onde, 1pg de DNA é igual a 978 Mpb (DOLEZEL, et al., 2003; GREILHUBER et al., 2005).

3.4 Análise do número cromossômico

Para a análise citogenética foram coletadas pontas de raízes de estacas cultivadas em vasos de plástico de 5L contendo substrato comercial à base de

casca de *Pinus*. As coletas foram feitas de 4 em 4 dias, entre 8 e 10 horas da manhã. Para a obtenção de cromossomos metafásicos as pontas de raízes coletadas foram submetidas ao pré-tratamento com ciclohexamida 25 mg.L^{-1} e hidroxiquinoleína 300 mg.L^{-1} (1:1) por 2 horas e 45 minutos em geladeira conforme descrito por Techio et al. (2002) com modificações. Após o pré-tratamento, as raízes foram lavadas em água destilada, por 5 minutos (3x), secas e fixadas em solução de Carnoy (etanol:ácido acético-3:1) por, no mínimo, 24 horas e armazenadas em freezer até o momento da utilização. Para o preparo das lâminas as raízes foram submetidas à maceração enzimática em solução de pectinase com 100u e celulase com 50u, por 6 horas. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e a coloração feita com Giemsa 5% por 10 minutos.

Foram avaliadas 20 metáfases de cada um dos genótipos analisados. As lâminas foram avaliadas em microscópio Leica-DMLS com câmera de imagens, utilizando a objetiva de 100X (objetiva de imersão).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância evidenciaram diferenças no conteúdo de DNA dos genótipos avaliados (Tabela 1).

Conforme a Tabela 1 o teste de média realizado para a variável conteúdo de DNA possibilitou classificar os 15 genótipos em 3 grupos demonstrando uma coerência com o nível de ploidia e número cromossômico.

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que é possível diferenciar a *B. ruziziensis* (2x) das espécies *B. brizantha* e *B. decumbens* e de híbridos triploides naturais (Tabela 1 e Figura 1b, 1c e 1d). Este resultado é de grande importância para o programa de melhoramento de *Brachiaria ruziziensis* uma vez que de um modo rápido e eficiente, torna possível a confirmação se o material pertence a esta espécie e que nível de ploidia possuem os genótipos oriundos de coletas em pastagens ou em populações melhoradas em campo aberto, bem como, na verificação da eficiência de técnicas de manipulação do nível de ploidia.

Tabela 1 Estimativa da quantidade de DNA, Valor C, Valor C_x, número cromossômico e nível de ploidia de espécies de *Brachiaria* spp.

Genótipos	Médias Conteúdo de DNA (pg)*	Valor C (**Mbp C ⁻¹)	Valor C _x (Mbp C _x ⁻¹)	Número Cromossômico (2n)	Nível de ploidia	Espécie
Marandú	3,52 ± 0,07 c	1720	860	36	4x	<i>B. brizantha</i>
Basilisk	3,79 ± 0,06 c	1855	927	36	4x	<i>B. decumbens</i>
R10	3,77 ± 0,04 c	1843	922	36	4x	<i>B. decumbens</i>
R02	3,67 ± 0,15 c	1794	897	36	4x	<i>B. decumbens</i>
Média	3,74 ± 0,06	1829	914,5			
04	1,70 ± 0,03 a	831	831	18	2x	<i>B. ruziziensis</i>
09	1,70 ± 0,02 a	831	831	18	2x	<i>B. ruziziensis</i>
10	1,68 ± 0,01 a	821	821	18	2x	<i>B. ruziziensis</i>
11	1,69 ± 0,03 a	826	826	18	2x	<i>B. ruziziensis</i>
30	1,77 ± 0,02 a	865	865	18	2x	<i>B. ruziziensis</i>
37	1,71 ± 0,02 a	836	836	18	2x	<i>B. ruziziensis</i>
43	1,84 ± 0,08 a	900	900	18	2x	<i>B. ruziziensis</i>
69	1,80 ± 0,04 a	880	880	18	2x	<i>B. ruziziensis</i>
84	1,69 ± 0,03 a	826	826	18	2x	<i>B. ruziziensis</i>
329	1,85 ± 0,03 a	905	905	18	2x	<i>B. ruziziensis</i>
Média	1,74 ± 0,06	852,1	852,1			
86	2,57 ± 0,23 b	1257	838	27	3x	Híbrido natural

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente aos 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. ** Mpb= Mega pares de bases

A quantidade média de DNA nos acessos de *B. ruziziensis* foi de 1,74 pg para os genótipos 2x (Figura 1b e Tabela 1). Ishigaki et al. (2009) obtiveram valores para o conteúdo de DNA de *B. ruziziensis* sendo: 1,41 pg para as plantas diploides e 2,77 pg para as plantas tetraploidizadas. Esta diferença de valores nas estimativas do conteúdo de DNA se deve a vários fatores como, por exemplo: calibração do aparelho, padrão de referência, material vegetativo, tampão de extração dos núcleos e fluorocromo utilizados. Os autores utilizaram o tampão contendo Tris-HCl e o padrão de referência *Oriza sativus*. Neste trabalho foi utilizado o tampão MgSO₄ e o padrão de referência *P. sativum*.

Recentemente, Ishigaki et al. (2010) estimaram o tamanho do genoma de cinco cultivares de quatro espécies de *Brachiaria* pela citometria de fluxo. O tamanho dos genomas foi expresso pelo valor C (quantidade de DNA gamético) e valor Cx (quantidade de DNA por genoma). Ishigaki et al. (2010) observaram que o tamanho do genoma (valor C) entre as cultivares aumentando com o aumento do nível de ploidia, este resultado também foi observado neste trabalho uma vez que o valor C médio dos genótipos 2x foi de 852,1 Mpb do 3x foi de 1257 Mpb e dos 4x de 1829 Mpb. Estes autores observaram que os Valores Cx eram maiores em poliploides apomíticos do que na cultivar Kennedy de *B. ruziziensis* diploide sexual.

Neste trabalho, onde foram analisados dez genótipos diploides sexuais de *B. ruziziensis* houve genótipos com Valores Cx maiores e outros menores aos observados nos poliploides apomíticos (*B. brizantha*, *B. decumbens*) conforme Tabela 1. Houve uma diferença média variando de 222 a 316 Mpb nas estimativas do valor C médio entre este trabalho e o do Ishigaki et al. (2010). Isso, provavelmente se deve a diferença nos genótipos dentro das espécies, na metodologia empregada tanto no preparo da amostra como na conversão de pg para Mpb.

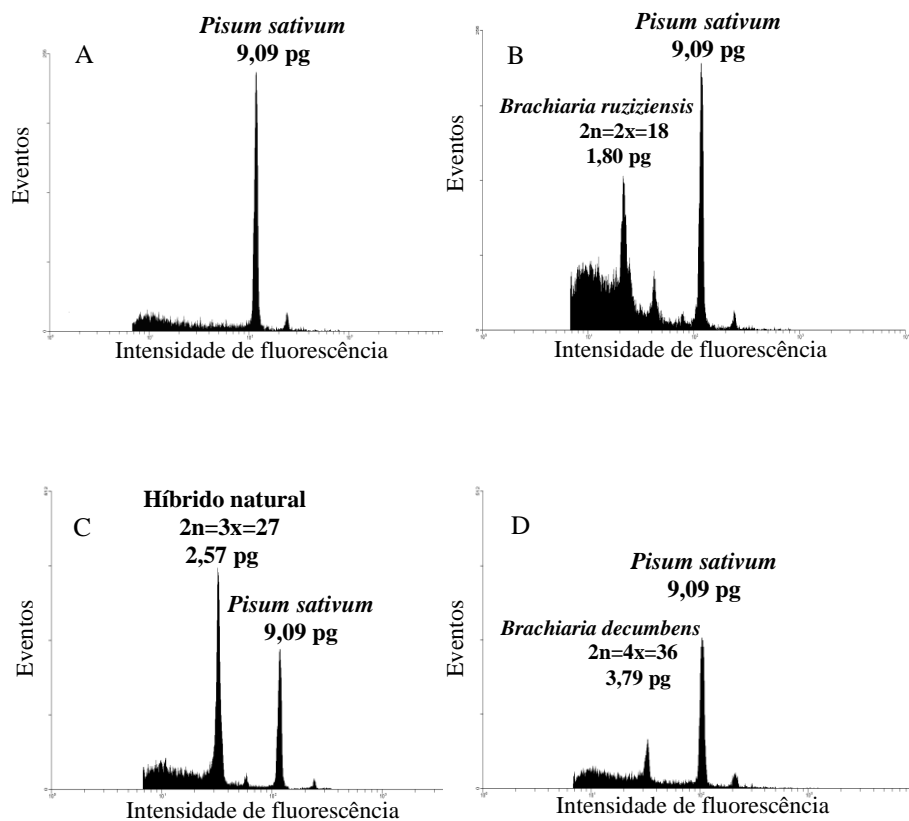


Figura 1 Histogramas de citometria de fluxo para quantificação de DNA. A) *Pisum sativum* L. – O pico G1 é um padrão de referência de quantidade de DNA de 9.09 pg. B) planta diploide – *B. ruziziensis* (Genótipo 69). C) planta triploide (Genótipo 86). D) planta tetraploide – *B. decumbens* (cultivar Basilisk)

No gênero *Brachiaria*, Penteado et al. (2000) estimou o nível de ploidia por citometria de fluxo para uma coleção de germoplasma de 435 acessos da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande - MS, pertencentes a 13 espécies. Neste trabalho, para a quantificação do DNA os índices observados para os acessos diploides de cada espécie, e as inferências sobre os níveis de ploidia foram feitas com base nos índices relativos ao padrão diploide. Quando não havia acessos diploides, considerou-se como se cada complemento cromossômico (x) da

espécie contribuisse com um índice de 0,5 como no caso do padrão (i.e., $2x=18$ =índice 1,00). Por esse critério, foram determinados vários níveis de ploidia entre acessos e dentro das espécies estudadas. Como foram relatados somente índices de citometria, os autores não informaram o conteúdo de DNA e por isso não foi possível realizar a comparação dos conteúdos de DNA aqui apresentados com aqueles obtidos pelos autores.

A confirmação dos resultados da estimativa do conteúdo de DNA, obtida por meio da citometria de fluxo (Tabela 1), foi feita pela contagem do número cromossômico, sendo observados 18, 27 e 36 cromossomos para os diploides, triploide e tetraploides, respectivamente (Figura 2).



Figura 2 Metáfases mitóticas de diferentes genótipos de *Brachiaria* spp. A) *B. ruziziensis* (84) com $2n=2x=18$; B) híbrido natural (86) com $2n=3x=27$ e C) *B. ruziziensis* (Iracema) com $2n=4x=36$. Barra= 15 μ m

Para o genótipo 86, o conteúdo de DNA (2,57 pg) e número somático de cromossomos (27) comprovam que se trata de um indivíduo triploide. Provavelmente este genótipo seja proveniente de um cruzamento natural entre *B. ruziziensis* (2x) e *B. decumbens* (4x) ou *B. brizantha* (4x). Isto porque a quantidade de DNA para este genótipo corresponde à média da somatória das estimativas do conteúdo de DNA dos gametas destes prováveis parentais, sendo: 0,87 pg para a *B. ruziziensis* que somado a 1,77 pg de *B. brizantha* origina um híbrido com 2,64 pg ou do cruzamento entre *B. ruziziensis* (0,87 pg) com *B. decumbens* (1,87 pg) formando um híbrido com 2,74 pg de DNA. Estes dois valores estão dentro da amplitude estimada neste trabalho para o conteúdo de

DNA do híbrido triploide, que foi de 2,34 a 2,80 pg de DNA (Tabela 1). Híbridos triploides naturais no gênero *Brachiaria*, já foram relatados na literatura por Mendes et al. (2006) e Risso-Pascotto, Pagliarini e Valle (2005).

4 CONCLUSÕES

A variação na quantidade de DNA total permite distinguir a *Brachiaria ruziziensis* das espécies tetraploides *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* e híbridos triploides entre estas espécies.

REFERÊNCIAS

ARAUCÁRIA SEMENTES. *Brachiaria ruziziensis*: pastagens. Disponível em: <<http://www.sementesaraucaria.com.br/ruziziensis.php>>. Acesso em: 18 jun. 2010.

BARTOŠ, J. et al. Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (Musaceae): taxonomic implications. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 109, n. 1/3, p. 50-57, Apr. 2005.

BRUMMER, E. C.; CAZCARRO, P. M.; LUTH, D. Ploidy determination of alfalfa germplasm accessions using flow cytometry. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 4, p. 1202-1207, Apr. 1999.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.

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

DOLEZEL, J. et al. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry**, Malden, v. 51A, n. 2, p. 127-128, Feb. 2003.

EGESI, C. N. et al. Ploidy analysis in water yam, *Dioscorea alata* L. germplasm. **Euphytica**, Wageningen, v. 128, n. 2, p. 225-230, Nov. 2002.

GOULART, J. C. **Citogenética e anatomia foliar de acessos e progênies de *Brachiaria***. 2008. 71 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

GREILHUBER, J. et al. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 255-260, Jan. 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário 2006**: resultados preliminares. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1064id_pagina=1>. Acesso em: 18 jun. 2010.

ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. **Japanese Society of Grassland Science**, Tokyo, v. 55 n. 3, p. 164-170, Sept. 2009.

ISHIGAKI, G. et al. Estimation of genome size in *Brachiaria* species. **Japanese Society of Grassland Science**, Tokyo, v. 56, n. 4, p. 240-242, Dec. 2010.

KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. **Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 2006. 57 p. (Documentos, 163).

MENDES, D. V. et al. Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 150, n. 4, p. 441-446, Aug. 2006.

NSABIMANA, A.; STADEN, J. van. Ploidy investigation of bananas (*Musa* spp.) from the National Banana Germplasm Collection at Rubona-Rwanda by flow cytometry. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 72, n. 2, p. 302-305, May 2006.

PENTEADO, M. I. de O. et al. **Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2000. 32 p. (EMBRAPA Gado de Corte. Boletim de Pesquisa, 11).

PILLAY, M. et al. Ploidy and genome composition of *Musa* germplasm at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA). **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 5, n. 13, p. 1224-1232, June 2006.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. Meiotic behavior in interspecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, Wageningen, v. 145, n. 1/2, p. 155-159, Feb. 2005.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 897-902, set./out. 2001.

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

SOUZA SOBRINHO, F. de et al. Melhoramento de gramíneas forrageiras na EMBRAPA Gado de Leite. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 7., 2009, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2009. p. 98-111.

TECHIO, V. H. et al. 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, 2002.

TROTTER, J. **WinMDI**[®]. Version 2.8. La Jolla: The Scripps Research Institute, 2000. Disponível em: <<http://facs.scripps.edu/software.html>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

TUNA, M. et al. DNA content and ploidy determination of bromegrass germoplasm accessions by flow cytometry. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 5, p. 1629-1634, May 2001.

VALLE, C. do et al. Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do; JANK, L. (Ed.). **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 2008. p. 13-53.

Esta é uma versão preliminar do artigo.

ANEXO

Tabela 1A Análise de variância de diferentes genótipos de *Brachiaria* para a estimativa do conteúdo de DNA obtida por citometria de fluxo. UFLA, Lavras, MG, 2010

	FV	GL	QM
Genótipo		14	2.368810**
Erro		30	0.006484
Total		44	
CV (%) =		3.47	

*Significativo, com probabilidade de $p < 0.05$ pelo teste F;

**Significativo, com probabilidade de $p < 0.001$ pelo teste F; ^{ns}: não significativo com probabilidade $P > 0.05$

ARTIGO 2

OBTENÇÃO DE *Brachiaria ruziziensis* TETRAPLOIDIZADA

Artigo redigido conforme norma da Breeding

Obtenção de *Brachiaria ruziziensis* tetraploidizada

RESUMO

No Brasil, as espécies de *Brachiaria* mais cultivadas são *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. A *Brachiaria ruziziensis* é diploide e sexual e as cultivares comerciais de *B. brizantha* e *B. decumbens*, que são as espécies mais difundidas no Brasil, são tetraploides e apomíticas facultativas. Para possibilitar as hibridações interespecíficas é necessário a tetraploidização artificial da *B. ruziziensis*. Assim, objetivou-se com este trabalho a obtenção de genótipos duplicados de *B. ruziziensis*. Para isso, sementes germinadas de *Brachiaria ruziziensis*, oriundas do programa de melhoramento da Embrapa Gado de Leite, foram imersas em 10 mL de solução de colchicina a 0,1% por um período de exposição de 2 e 3 horas. Foram avaliadas 4 repetições por tratamento e 150 sementes/repetição. Após os tratamentos de indução de poliploidia, as sementes foram transferidas para tubetes contendo terra: areia: esterco (1:1:1). Os tubetes foram mantidos em casa de vegetação, com sistema de nebulização, para o controle da umidade do ar e irrigação. A porcentagem de sobrevivência de plântulas submetidas aos tratamentos com colchicina e a avaliação da sua ploidia foi realizada após cinco meses da implantação do experimento. A determinação do nível de ploidia foi realizada pela citometria de fluxo. Não houve diferença estatística na sobrevivência das plântulas e no número de plântulas duplicadas entre os tratamentos. Houve a sobrevivência de 8% (96) das plântulas tratadas, sendo obtidos 11,45% (11) genótipos tetraploides e 16,66% (16) mixoploides.

Palavras-chave: *Brachiaria*. Colchicina. Citometria de fluxo. Melhoramento de forrageiras. Indução de poliploidia.

Production of tetraploidized *Brachiaria ruziziensis*

ABSTRACT

In Brazil, the most cultivated *Brachiaria* species are *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. humidicola* and *B. ruziziensis*. *Brachiaria ruziziensis* is diploid and sexual and the commercial cultivars of *B. brizantha* and *B. decumbens*, which are the most widespread in Brazil, are tetraploids and facultative apomictics. To enable the interspecific hybridizations, the artificial tetraploidization of *B. ruziziensis* is necessary. The objective of this work was to obtain duplicated genotypes of *B. ruziziensis*. For this purpose, germinated seeds of *Brachiaria ruziziensis*, coming from the Breeding Program of Embrapa Gado de Leite, were immersed in 10 mL of 0.1% colchicine solution for an exposition period of 2 and 3 hours. Four replicates per treatment and 150 seeds/replicate were evaluated. After the treatments of polyploidy induction, the seeds were transferred into tubes containing soil: sand: manure (1:1:1). The tubes were kept in greenhouse, with misting system for the control of air humidity and irrigation. The survival percentage of seedlings submitted to the treatments with colchicine and the evaluation of their ploidy was conducted after five months from the establishment of the experiment. The determination of the ploidy level was carried out by flow cytometry. There were no statistical differences in the survival of seedlings and in the number of duplicated seedlings among the treatments. There was the 8% survival (96) of the treated seedlings, 11.45% (11) of tetraploid genotypes and 16.66% (16) of mixoploid genotypes being obtained.

Key words: *Brachiaria*. Colchicine. Flow Cytometry. Forage Breeding. Polyploidy Induction.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, estima-se que uma área de 172 milhões de hectares de pastagens é utilizada para alimentar um rebanho de aproximadamente 170 milhões de cabeças de gado (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2006). Na região do Cerrado, espécies de *Brachiaria* são cultivadas em aproximadamente 43 milhões de hectares, onde aproximadamente 35% do gado é criado (KARIA et al., 2006).

Alguns programas de melhoramento de *Brachiaria* utilizam como uma das estratégias a duplicação cromossômica de *B. ruziziensis* ou de alguns acessos sexuais diploides (*B. brizantha* e *B. decumbens*) para a realização de cruzamentos interespecíficos com genótipos tetraploides apomíticos, e assim, explorar a variabilidade genética do gênero (ISHIGAKI et al., 2009; SIMIONI e VALLE, 2009; PINHEIRO, et al., 2000 e SWENNE, et. al., 1981). Os materiais tetraploides apomíticos servem como genitores doadores de pólen, isso é possível devido à microsporogênese em *Brachiaria* ocorrer de forma normal tanto para genótipos apomíticos como sexuais. O objetivo é obter híbridos persistentes, que reunissem características desejáveis de dois ou mais genitores agronomicamente promissores, tais como adaptação a solos ácidos, alta produtividade, bom valor nutritivo e, principalmente, resistência a cigarrinhas-das-pastagens (VALE et al., 2008).

As plantas tetraploides em espécies do gênero *Brachiaria* foram primeiramente obtidas a partir de sementes germinadas *in vivo* de *B. ruziziensis* por Swenne, Louant e Durjardin (1981) e, recentemente, pelo cultivo *in vitro* de sementes germinadas, múltiplos brotos (ISHIGAKI et al., 2009) e segmentos basais de alguns acessos diploides sexuais de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens* (PINHEIRO et al., 2000; SIMIONI; VALLE, 2009), tratados com colchicina.

Swenne, Louant e Durjardin (1981) conseguiram a duplicação cromossômica de 35 plantas diploides de *B. ruziziensis*. A poliploidização foi induzida em 600 sementes germinadas *in vivo*, tratadas com cinco diferentes concentrações de solução de colchicina (0,05-1%) com quatro diferentes tempos (1-8 h). Ishigaki et al. (2009) obtiveram a duplicação de 5 genótipos de *B. ruziziensis* de 100 sementes germinadas *in vitro* tratadas em meio suplementado com colchicina a 0,1% por 3 horas. Os mesmos autores obtiveram 23 genótipos duplicados quando 500 calos com múltiplos brotos foram tratados com diferentes concentrações de colchicina (0,0125-0,1%) por 12 horas e a 0,0125% em 48 horas.

Objetivou-se com esse trabalho induzir a duplicação cromossômica de *Brachiaria ruziziensis* visando obter plantas tetraploides que possam ser utilizadas em cruzamentos interespecíficos com genótipos tetraploides, para serem utilizadas no Programa de Melhoramento de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora - MG.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram utilizadas sementes de população C₀ de *Brachiaria ruziziensis* do Programa de Melhoramento da Embrapa Gado de Leite – MG. Inicialmente as sementes foram submetidas ao tratamento com ácido sulfúrico concentrado por 15 minutos para promover a quebra da dormência e em seguida foram enxaguadas três vezes com água destilada.

As sementes foram colocadas para germinar em gerbox contendo papel filtro umedecido com água destilada e mantidos em B.O.D (20-35 °C) alternada com fotoperíodo de 8 horas. Após três dias as plântulas que apresentavam radícula de aproximadamente 0,5 cm de comprimento foram submetidas aos tratamentos de duplicação.

2.2 Experimento de duplicação cromossômica

No Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura - Universidade Federal de Lavras- MG, as plântulas de *Brachiaria ruziziensis*, foram imersas em 10 mL de solução de colchicina a 0,1% por um período de exposição de 2 e 3 horas. A escolha destes tratamentos foi baseada nos resultados obtidos em um pré-teste (dados não apresentados) no qual resultou na “Iracema”, primeira planta de *B. ruziziensis* duplicada na América (obtida do tratamento de plântulas imersas em solução de colchicina a 0,1% por 2 horas). Foram levadas em consideração as metodologias propostas por Ishigaki et al. (2009) e Swenne, Louant e Durjardin (1981). Foram avaliadas 4 repetições por tratamento, cada uma delas com 150 plântulas.

Após os tratamentos de indução de poliploidia, as plântulas foram transferidas para tubetes contendo terra: areia: esterco (1:1:1). Os tubetes foram mantidos em casa de vegetação, com sistema de nebulização, para o controle da umidade do ar e irrigação.

A porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Brachiaria ruziziensis* submetidas aos tratamentos com colchicina e a avaliação da sua ploidia foram realizadas após cinco meses da implantação do experimento.

2.3 Avaliação da ploidia das plantas

A avaliação da ploidia das plantas submetidas à indução de poliploidia, por meio de tratamento com colchicina, foi realizada utilizando-se a citometria de fluxo. O preparo das amostras e a análises por citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Para cada tubete que continha uma única planta sem perfilhos, foram avaliadas três amostras e para aquelas plantas com perfilhos, foram avaliados uma amostra de cada perfilho, sendo avaliado pelo menos 3 amostras de cada tubete, com o objetivo de estimar a quantidade de DNA e o nível de ploidia em diferentes setores da planta. Cada amostra foi considerada como uma repetição (delineamento inteiramente ao acaso).

Para a determinação da quantidade de DNA e o nível de ploidia, utilizou-se aproximadamente entre 20 e 30 mg de tecido foliar jovem para cada amostra, acrescida com a mesma quantidade de massa foliar de *Raphanus sativus* cv. Saxa (padrão de referência de quantidade de DNA – 1,11 pg) foram triturados em placa de Petri, contendo 1 mL de tampão de extração de núcleos MgSO₄ (DOLEZEL; BARTOS, 2005; DOLEZEL, BINAROVA e LUCRETTI, 1989). Com auxílio de uma pipeta o tecido triturado foi aspirado através de duas

camadas de gaze e a suspensão nuclear posteriormente filtrada em malha de náilon de 50 μm . A suspensão nuclear foi corada com uma solução composta de iodeto de propídio a 1 mg/mL^{-1} e 5 μL de RNase.

As amostras foram armazenadas em refrigerador, no escuro, e analisadas em até 1 hora após o preparo. Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados quanto à emissão de fluorescência utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), os histogramas foram obtidos no programa Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e as análises dos histogramas foram realizadas pelo programa WinMDI 2.8 (TROTTER, 2000).

O conteúdo de DNA nuclear em (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a fórmula: $DNA \text{ amostra} = \left(\frac{G1 \text{ amostra}}{G1 \text{ padrão}} \right) \times DNA \text{ padrão}$, onde:

DNA amostra = quantidade de DNA nuclear da amostra (pg);

G1 amostra = posição do pico G1 da amostra;

G1 padrão = posição do pico G1 de espécie padrão de referência;

DNA padrão = quantidade de DNA nuclear de *Raphanus sativus* = 1.11 pg

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos (tempo de exposição de 2h e 3h) sendo observadas as variáveis porcentagem de sobrevivência de cada tratamento e depois verificado o nível de ploidia de cada uma das plantas obtidas. Os dados do número de plântulas sobreviventes e do nível de ploidia das plântulas foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$ (GOMES, 2009), e as médias comparadas pelo teste de Skott e Knott (1974), com 5% de probabilidade. A análise de variância do ensaio no delineamento inteiramente casualizado seguiu as recomendações de Ramalho, Ferreira e Oliveira (2005) utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a porcentagem de sobrevivência de plântulas de *B. ruziziensis* submetidas aos diferentes tempos de exposição em 0,1% de colchicina. Verifica-se que não houve diferença estatística pelo teste de média de Scott-Knott aos 5% para nenhuma característica avaliada (Tabela 1 e Tabela 1A). Para o tratamento com tempo de exposição de 2 horas foi obtida uma porcentagem de sobrevivência de 9,3% e para o tempo de 3 horas 6,6%. A porcentagem média de sobrevivência das plântulas tratadas com colchicina foi de aproximadamente 8% (96). Ishigaki et al. (2009) conseguiu uma taxa de sobrevivência de 16% no tratamento *in vitro* de plântulas germinadas em meio de cultura contendo colchicina a 0,1% por 3 horas. Isso provavelmente se deve ao fato de as plântulas permanecerem em contato com o meio de cultura nutritivo durante o tratamento diminuindo, assim, o stress.

Tabela 1 Efeito de diferentes tempos de exposição em solução de colchicina sobre a sobrevivência e nível de ploidia de plântulas de *Brachiaria ruziziensis*. UFLA, Lavras, MG, 2010

Tempo horas (h)	Conc.*** (%)	Nº de plântulas Tratadas	Nº de* plântulas Sobreviventes	Nível de Ploidia **					
				2x	2x/Mix	2x/4x *****	Mix/4x	Mix ***	4x
2	0,1	600	56 (9,3%)	43	2	1	1	5	4
3	0,1	600	40 (6,6%)	27	5	1	0	3	4
Total		1200	96 (8%)	70	7	2	1	8	8

*Os tratamentos não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-Knott

**Nível de ploidia estimado por citometria de fluxo

***Concentração de colchicina

****Mix=mixoploide

*****2x/4x= genótipo que possui alguns perfis 4x e outros perfis 2x

A citometria de fluxo foi utilizada para estimar o conteúdo de DNA das 96 plantas sobreviventes e inferir o nível de ploidia das mesmas. A Figura 1 mostra o histograma da citometria de fluxo para os três picos relativos à

intensidade de fluorescência: rabanete – *Raphanus sativus* cv. Saxa (Pico 1), planta diploide (Pico 2) e planta tetraploide (Pico 3). A estimativa do conteúdo de DNA da planta diploide (não tratada) e das plantas tetraploides foi de 1,48 e 2,92 pg/2C, respectivamente. Esses resultados indicam que o conteúdo de DNA das plantas sobreviventes foi duplicado gerando genomas tetraploides e confirmando a duplicação. Estas plantas tetraploidizadas não exibiram pico diploide, reduzindo as possibilidades de se tratarem de mixoploides (Figura 1C). Na Figura 1B observa-se que a estimativa média da quantidade de DNA das plantas utilizadas de *B. ruziziensis* foi de 1,48 pg. Ishigaki et al. (2009) também encontraram valores próximos a esses para o conteúdo de DNA de *B. ruziziensis* sendo: 1,41 pg/2C para as plantas diploides e 2,77 pg/2C para as plantas tetraploidizadas.

Entre as plantas sobreviventes foram classificadas como mixoploides aquelas cujas amostras geraram histogramas com pico diploide (células diploides) e pico tetraploide (células tetraploides) conforme Figura 1D. As plantas que apresentaram diferentes níveis de ploidia (2x, 4x ou Mix) nas diferentes amostras foram classificadas conforme os níveis de ploidia observados sendo: 2x/Mix; 2x/4x e Mix/4x.

De um total de 96 plantas sobreviventes foram obtidos: 70 genótipos diploides, sete 2x/mixoploides, dois 2x/4x, um mixoploide/4x, oito mixoploides e oito genótipos 4x. Para aquelas três plantas que continam alguns perfilhos 4x na touceira, estes setores foram cuidadosamente isolados gerando assim mais três plantas 4x. Este procedimento mostra a importância de se analisar e marcar cada perfilho de uma planta submetida à duplicação. Deste modo, foi obtido um total de 11 plantas duplicados e 16 plantas mixoploides.

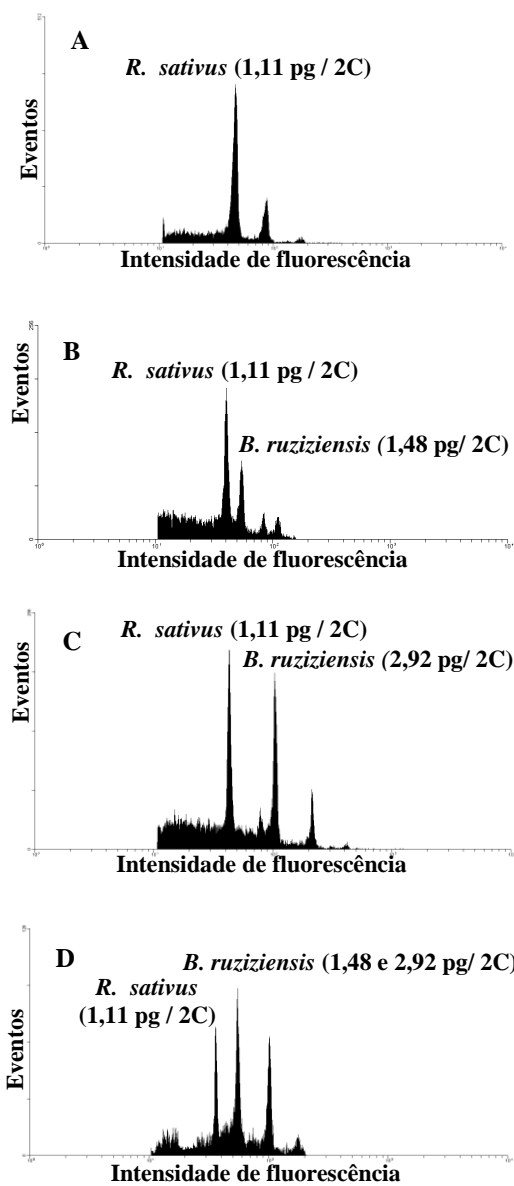


Figura 1 Histogramas de citometria de fluxo para quantificação do conteúdo de DNA. A) *Raphanus sativus*. O pico G1 é um padrão de referência de quantidade de DNA de 1,11 pg/2C. B) Planta diploide de *B. ruzizensis* C) planta tetraploidizada de *B. ruzizensis*. D) Planta mixoploide de *B. ruzizensis*

Swenne, Louant e Durjardin (1981) conseguiram a duplicação cromossômica de 35 plantas de *B. ruzizensis* que corresponde a 18,51% das 189 plantas sobreviventes. A poliploidização foi induzida em 600 sementes germinadas *in vivo* tratadas com cinco diferentes concentrações de solução de colchicina (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1%) com quatro diferentes tempos de tratamento (1, 2, 4 e 8 h). Os autores apresentaram os resultados por meio de um gráfico de modo a não informar o número exato de plantas tetraploides obtidas por cada tratamento. Mas observando o gráfico podemos perceber que foi obtido plantas tetraploides em todos os tratamentos, sendo os melhores tratamentos: 1 hora (0,1; 0,2 e 1%), 2 horas (0,2 e 0,5%), 4 horas (0,05%) e 8 horas (0,2%). Ishigaki et al. (2009) utilizando o procedimento de duplicação cromossômica de sementes germinadas *in vitro* e tratadas em meio de cultura suplementado com colchicina a 0,1% por 3 horas obtiveram tanto a taxa de sobrevivência (16%) como a porcentagem de duplicação (31,3%) mais elevadas que os apresentados neste trabalho que foram de 6,6% e 12,5%.

Pode-se observar que ainda não existe uma metodologia eficiente para a duplicação de *Brachiaria ruzizensis*, mas apesar disso, estes protocolos geram genótipos tetraploidizados que podem ser úteis para o melhoramento genético do gênero. No continente Americano, este é o primeiro relato de obtenção de genótipos tetraploidizados em *Brachiaria ruzizensis*, os quais fazem parte do material de trabalho do programa de melhoramento de *Brachiaria ruzizensis* da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora- MG.

4 CONCLUSÃO

A obtenção de plantas tetraploides de *Brachiaria ruziziensis* é possível por meio de exposição de plântulas a solução de colchicina 0.1% por 2 e 3 horas.

REFERÊNCIAS

- DOLEZEL, J.; BASTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.
- DOLEZEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 113-120, Apr. 1989.
- DOLEZEL, J.; DOLEZELOVA, M.; NOVAK, F. J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa accuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, n. 3, p. 351-357, June 1994.
- FELISMINO, M. F.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic behavior of interspecific hybrids between artificially tetraploidized sexual *Brachiaria ruziziensis* and tetraploid apomictic *B. brizantha* (Poaceae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 2, p. 191-197, 2010.
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIAO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. Piracicada: FEALQ, 2009. 451 p.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário 2006: resultados preliminares**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1064id_pagina=1>. Acesso em: 18 jun. 2010.
- ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. **Japanese Society of Grassland Science**, Tokyo, v. 55, n. 3, p. 164-170, Sept. 2009.
- KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. **Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 2006. 57 p. (Documentos, 163).

PINHEIRO, A. A. et al. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicines. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 3, p. 274-278, Jan. 2000.

RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 326 p.

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

SIMIONI, C.; VALLE, C. B. do. Chromosome duplication in *Brachiaria* (A. rich.) Stapf allows intraspecific crosses. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 9, n. 4, p. 328-334, 2009.

SWENNE, A.; LOUANT, B.; DURJARDIN, M. Induction par la colchicine de formes autotetraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). **Agronomie Tropicale**, Paris, v. 36, n. 2, p. 134-114, 1981.

TROTTER, J. **WinMDI**®. Version 2.8. La Jolla: The Scripps Research Institute, 2000. Disponível em: <<http://facs.scripps.edu/software.html>>. Acesso em: 15 mar. 2010.

VALLE, C. B. do; SAVIDAN, Y. H. Genetics, cytogenetic and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; Brasília: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 147-163. (CIAT Publication, 256).

Esta é uma versão preliminar do artigo.

ANEXO

Tabela 1A Análise da variância do efeito dos diferentes tempos de exposição à colchicina na sobrevivência e nível de ploidia de plântulas de *Brachiaria ruziziensis*. UFLA, Lavras, MG, 2010

FV	GL	% de Sobr QM	2x QM	2x/Mix QM	2x/4x QM	Mix/4x QM	Mix QM	4x QM
Tratamento	1	0.072930 ^{ns}	0.057532*	0,002000 ^{ns}	6,18710472 E-0010 ^{ns}	0,000223 ^{ns}	0,003582 ^{ns}	9,8992875 6E-0009 ^{ns}
Erro	1199	0.019678	0.014684	0,001554	0,000446	0,000223	0,001773	0,001776
Total	1200							
CV (%)		18,74	16,44	5,55	2,98	2,11	5,93	

*Significativo, com probabilidade de $p < 0.05$ pelo teste F; **Significativo, com probabilidade de $p < 0.001$ pelo teste F; ^{ns}: não significativo com probabilidade $P > 0.05$ ***Dados transformados para $\sqrt{x+0,5}$ (GOMES, 2009)

ARTIGO 3

**PROTOCOLO DE ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE DNA DE
Brachiaria spp. UTILIZANDO CITOMETRIA DE FLUXO**

Artigo redigido conforme norma da revista *Current Protocols in Cytometry*

Protocolo de estimativa do conteúdo de DNA de *Brachiaria* spp. utilizando citometria de fluxo

RESUMO

Por meio da técnica de citometria de fluxo pode-se estimar o conteúdo de DNA de uma planta. O objetivo deste trabalho foi propor um protocolo eficiente para a estimativa do conteúdo de DNA de táxons de *Brachiaria* com diferentes níveis de ploidia utilizando a citometria de fluxo. Foram avaliados 4 genótipos de *Brachiaria* (*B. ruziziensis*, diploide e tetraploide, *B. brizantha* tetraploide e um híbrido natural triploide), 3 soluções tampões ($MgSO_4$, Galbraith e Tris-HCl) e 3 espécies como padrões de referência interno: rabanete (*Raphanus sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e ervilha (*Pisum sativum*). Utilizou-se o DIC no esquema fatorial $4 \times 3 \times 3$ com três repetições. As variáveis mensuradas foram: nota do histograma (1 a 5), coeficiente de variação e conteúdo de DNA. Pela análise de variância, a interação tripla (genótipo x tampão x padrão) e as interações duplas (genótipo x padrão) e (genótipo x tampão) mostraram-se altamente significativas a qual foi desdobrada para a escolha do melhor tampão e padrão. O grau de associação entre as variáveis foi realizado pela correlação de Spearman. O tampão Galbraith de modo geral não é adequado, pois gera histogramas com notas inferiores e dependendo do padrão e genótipo utilizados, gera erros na estimativa do conteúdo de DNA mesmo com CVs de apenas 2,60 %. O mesmo ocorreu quando se utilizou o tampão $MgSO_4$ com o padrão ervilha que com um CV de apenas 1,60% proporcionou uma superestimativa na quantidade de DNA da *B. brizantha* (Marandú). O tampão $MgSO_4$ com a planta padrão rabanete apresentou os melhores resultados para a estimativa do conteúdo de DNA em todos os genótipos. Para os quatro genótipos são apresentados a estimativa do tamanho dos genomas sendo expresso pelo valor C (quantidade de DNA gamético) e valor Cx (quantidade de DNA por genoma). Houve uma correlação negativa (-0,57) significativa entre a nota do histograma e o CV, evidenciando que esta nota pode ser usada para avaliação da confiabilidade dos resultados, considerando-se confiáveis aqueles obtidos por histogramas com nota igual ou superior a 4.

Palavras chaves: *Brachiaria ruziziensis*. Conteúdo de DNA Nuclear. Tampões de Isolamento Nuclear. Padrões de Referência. *Brachiaria brizantha*.

Protocol to estimate the DNA content of *Brachiaria* spp utilizing flow cytometry

ABSTRACT

By means of flow cytometry technique, one can estimate the DNA content of a plant. The purpose of this work was to propose an efficient protocol for the estimation of DNA content of the *Brachiaria* taxa with different ploidy levels utilizing flow cytometry. Four genotypes of *Brachiaria* (*B. ruziziensis*, diploid and tetraploid, *B. brizantha* tetraploid and one natural triploid hybrid), 3 buffer solutions ($MgSO_4$, Galbraith and Tris-HCl) and three species as internal reference standards were evaluated: radish (*Raphanus sativus*), tomato (*Solanum lycopersicum*) and pea (*Pisum sativum*). The completely randomized design (CRD) in a 4x3x3 factorial scheme with three replications was used. The measured variables were: score of the histogram (1 to 5), coefficient of variation and DNA content. Through analysis of variance, the triple interaction (genotype x buffer x standards) and the double interactions (genotype x standards) and (genotype x buffer) proved highly significant which was unfolded for the choice of the best buffer and standard. The association degree among the variables was undertaken by the Spearman's correlation. The Galbraith buffer in general is not adequate, for it generates histograms with inferior scores and depending upon the standard and genotypes utilized, on the DNA content even with the VCs of only 2.60 %. The same occurred when the buffer $MgSO_4$ was used with the standard pea with a VC of only 1.60% providing an overestimation of the amount of DNA for *B. brizantha* (Marandú). The $MgSO_4$ buffer with the standard plant radish presented the best results for the estimation of DNA content for all genotypes. Genomes sizes estimation expressed by the C value (amount of gametic DNA) and Cx value (amount of DNA per genome) are presented for all four genotypes. There was a significant negative correlation (-0.57) between the score of the histogram and the coefficient of variation, stressing that this score can be used for evaluation of the reliability of the results, deeming reliable those obtained by histograms with score equal or superior to 4.

Key words: *Brachiaria ruziziensis*. Nuclear DNA Content. Nuclear Isoaltion Buffers. Internal Reference Standards. *Brachiaria brizantha*.

1 INTRODUÇÃO

A braquiária é utilizada para alimentação do gado de corte, e muito contribui para a produção de leite no Brasil. Em 2006, as espécies do gênero *Brachiaria* representavam 85% dos 120 milhões de hectares de pastagens brasileiras cultivadas (MACEDO, 2006). Esse gênero inclui aproximadamente 100 espécies de ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios, mas o centro de origem das primeiras espécies de valor agrônômico é a África Oriental (VALE et al., 2008).

A maioria das espécies de *Brachiaria* é poliplóide (4x-10x) e apomítica facultativa (VALE; MILES, 1994). Os programas de melhoramento têm necessidade de identificação de genótipos oriundos de coleta em pastagens ou em populações melhoradas em campo aberto, bem como, na verificação da eficiência de técnicas de poliploidização e haploidização.

A citometria de fluxo pode auxiliar na identificação dos genótipos através da determinação do conteúdo de DNA, por se tratar de análises relativamente simples e rápidas, possibilitando a avaliação de grande número de plantas. No entanto, para garantir que as estimativas do conteúdo de DNA sejam confiáveis, é necessário o manuseio adequado do citômetro e a padronização da metodologia de preparo das amostras. Os principais fatores que interferem no preparo das amostras são: tampão de extração, padrão de referência e fluorocromos (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007).

Na literatura há poucos relatos comparando a eficiência dos diferentes tampões de extração de núcleo (LOUREIRO et al., 2006). O tampão tem a função de ajudar na liberação e manutenção da integridade dos núcleos e facilitar na coloração do DNA. Não existe um tampão universal que funcione eficazmente para todos os tipos de tecidos e ou espécies vegetais, sendo necessários estudos prévios para identificar o tampão mais adequado para cada

espécie. Em estudos com *Brachiaria*, Penteado et al. (2000) e Pinheiro et al. (2000) utilizaram o tampão Galbraith (GALBRAITH et al., 1983) com modificações e Ishigaki et al. (2010) propuseram a utilização de um outro tampão contendo Tris-HCl para a identificação de genótipos duplicados de *Brachiaria ruziziensis*. Esses exemplos motivam a avaliação de diferentes tampões para contribuir para uma maior precisão experimental em *Brachiaria* spp.

Outro aspecto importante na análise de citometria de fluxo é a escolha do padrão de referência. Esse termo significa um material biológico incluído em uma experiência para servir como uma referência (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007), permitindo a comparação entre a planta padrão e a planta que se deseja estimar o conteúdo de DNA. Johnston et al. (1999) consideram que a escolha do padrão de referência deve ser criteriosa para garantir que as estimativas obtidas sejam confiáveis.

Já nas interpretações dos gráficos gerados, os coeficientes de variação (CVs) dos picos G1 dos histogramas são um indicativo de qualidade dos resultados, pois quanto menores os CVs mais confiáveis são as estimativas geradas por esses gráficos. No entanto, na literatura, enquanto Galbraith et al. (1983) consideram aceitáveis valores de até 5% para o CV, Marie e Brown (1993) admitem apenas valores próximos aos 3% para resultado de rotina, e Ulrich e Ulrich (1991) consideram que o ideal são estimativas de CV abaixo de 1,5%.

Considerando os diferentes tampões utilizados por diferentes autores para espécies de *Brachiaria*, a importância dos padrões de referência nas estimativas do conteúdo de DNA e as diferentes propostas para os valores de CV a serem adotados, objetivou-se com esse trabalho propor um protocolo eficiente para a estimativa do conteúdo de DNA de táxons de *Brachiaria* com diferentes níveis de ploidia utilizando a citometria de fluxo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora- MG.

2.1 Material vegetal

Foram avaliados quatro genótipos de braquiária: *B. ruziziensis* diploide; *B. ruziziensis* tetraploide – Iracema (poliploidizada artificialmente pela UFLA - Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG); um híbrido natural triploide e uma cultivar comercial tetraploide de *B. brizantha* – Marandú, sendo os três primeiros pertencentes ao Programa de Melhoramento de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG e o último adquirido no comércio local. O número cromossômico dos quatro genótipos foi estabelecido previamente por meio da contagem do número de cromossomos de células somáticas (Tabela 1), sendo estes selecionados com a finalidade de abranger três níveis de ploidia de táxons de *Brachiaria*.

Esses genótipos foram plantados em vasos de 8L contendo substrato à base de terra, areia e esterco, na proporção de 1:1:1 e mantidos em casa de vegetação na Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Foram utilizados três padrões internos de referência calibrados por Dolezel, Binarová e Lucretti (1989) e Dolezel, Sgorbati e Lucretti (1992) conforme Tabela 1. Sementes destas três espécies foram doadas pelo Prof. Dr. Jaroslav Dolezel, do Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria, do Instituto Experimental de Botânica –Sokolovska- República Tcheca. As sementes foram plantadas em vasos e mantidas em casa de vegetação na Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Tabela 1 Número cromossômico dos genótipos de *Brachiaria* spp. e conteúdo de DNA dos padrões de referência utilizados. UFLA, Lavras, MG, 2010

	<i>Descrição</i>	Conteúdo de DNA(pg)	Nível de Ploidia	Referência
1	<i>Brachiaria ruziziensis</i>		2n=2x=18	Capítulo 1
2	<i>Híbrido natural</i>		2n=3x=27	Capítulo 1
3	<i>B. brizantha</i> cv. Marandú		2n=4x=36	Capítulo 1
4	<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema"		2n=4x=36*	Capítulo 2
1	<i>Raphanus sativus</i> cv. Saxa	1,11	-	Doležel, Sgorbati e Lucretti (1992)
2	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Stupické	1,96	-	Doležel, Sgorbati e Lucretti (1992)
3	<i>Pisum sativum</i> cv. Ctirad	9,09	-	Doležel, Binarová e Lucretti (1989)

*Primeiro material de *B. ruziziensis* tetraploidizado artificialmente pela UFLA - Universidade Federal de Lavras

2.2 Preparo da suspensão de núcleos

No preparo de cada amostra foi utilizado aproximadamente entre 20 e 30 mg de tecido da folha jovem apical, completamente expandida, com a mesma quantidade de tecido foliar da planta do padrão de referência interno. Em seguida, com auxílio de um bisturi, as folhas foram trituradas, em placa de Petri, contendo 1 mL do tampão de um dos três tampões de extração de núcleos (MgSO₄, Galbraith e Tris-HCl) cujas composições encontram-se na Tabela 2. A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de náilon com 50 µm. Os núcleos foram corados com uma solução composta de iodeto de propídio de 1 mg/mL⁻¹ e em seguida adicionado a suspensão de 25µL de RNase, com intuito de degradar os RNAs e assim evitar a sua coloração com iodeto de propídio. As

amostras foram armazenadas em refrigerador, no escuro, e analisadas em até 1 hora após o preparo.

Tabela 2 Composição dos três tampões de isolamento de núcleos utilizados para a análise de citometria de fluxo em *Brachiaria* spp. UFLA, Lavras, MG, 2010

Tampão	Composição	Referência
1 MgSO ₄	9,53 mM MgSO ₄ .7H ₂ O, 47,6 mM KCl, 4,77 mM HEPES, 6,48 mM DTT, 0,25% Triton X-100, pH 8,0	Dolezel, Binarová e Lucretti (1989)
2 Galbraith	45 mM MgCl ₂ , 30 mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , 20 mM MOPS, 0,1% (v/v) Triton X-100, pH 7,0	Galbraith et al. (1983)
3 Tris-HCl*	50 m mol/L Tris-HCl, 0,5% PVP, 0,01% Triton - X, 0,63 % Na ₂ SO ₄ , pH 7,5	Ishigaki et al. (2009)

DTT = Ditioneitol; HEPES = Ácido Etanosulfônico 4-2-Hidroxietyl piperazina-1; MOPS = Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico; Tris = (hidroximetil) aminometano e PVP = polivinilpirrolidona

*Composição confirmada pelo autor por comunicação pessoal, pois no artigo está 50 mol/L e é 50 m mol/L de Tris-HCl

2.3 Análises por citometria de fluxo

Para cada amostra foram analisados pelo menos 10 mil núcleos e utilizada escala logarítmica na medição da emissão de fluorescência. As análises foram realizadas no citômetro FacsCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), os histogramas foram gerados pelo programa Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados pelo programa WinMDI 2.8 (TROTTER, 2000).

No histograma o eixo (x) representa a intensidade de fluorescência do DNA nuclear marcado com o iodeto de propídio e, o eixo (y), o número de eventos, ou seja, o número de núcleos analisados.

Para cada amostra foi gerado um histograma do qual foram mensuradas três variáveis: a) nota do histograma; b) coeficiente de variação e c) estimativa da quantidade de DNA.

O histograma foi classificado por meio de um sistema de notas variando entre 1 e 5 conforme Figura 1. Quanto maior a nota do histograma maior a definição dos picos G1 da amostra e do padrão, e menor a quantidade de partículas Sub G1, que são geradas devido o rompimento dos núcleos e, portanto, melhor a qualidade da amostra.

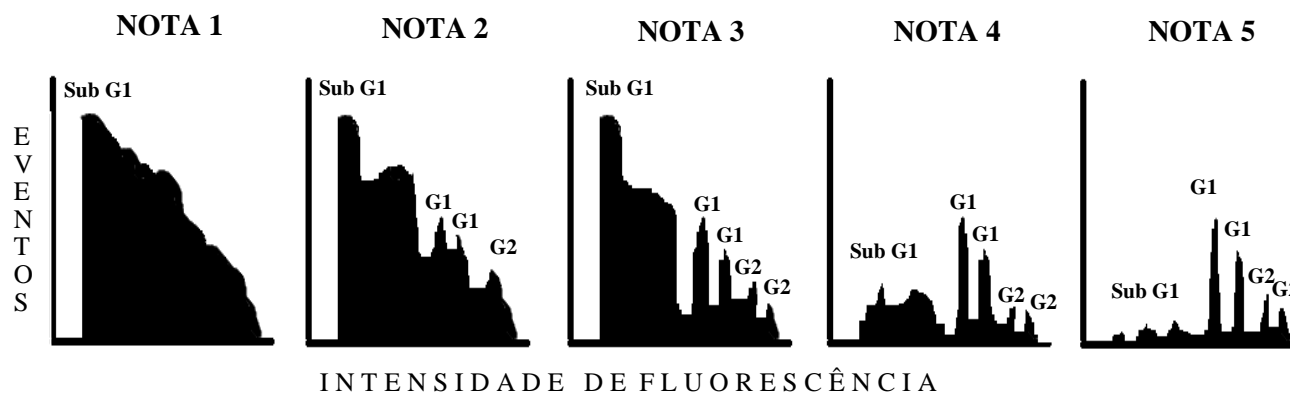


Figura 1 Representação do sistema de notas adotado para a avaliação do histograma

Nota 1: Alta quantidade de partículas antes do pico G1 (Sub G1) e não ocorrência dos picos G1 da amostra e do padrão.

Nota 2: Alta quantidade de partículas Sub G1 com ocorrência inicial dos picos G1 da amostra e do padrão.

Nota 3: Alta quantidade de partículas Sub G1 com ocorrência dos picos G1 da amostra e do padrão mais definidos que em 2.

Nota 4: Baixa quantidade de partículas Sub G1 com ocorrência dos picos G1 da amostra e do padrão mais definidos que em 3.

Nota 5: Baixa quantidade de partículas Sub G1 com ocorrência dos picos G1 da amostra e do padrão com mais alta definição.

Em seguida, a variável coeficiente de variação (CV=desvio padrão/média de núcleos no pico G1) foi aferida para cada amostra pela análise do histograma no programa WinMDI 2.8 (TROTTER, 2000). Este coeficiente de variação é representado no histograma pela largura, na posição mediana, do pico G1 da planta analisada. Sendo assim, quanto menor for a largura do pico G1, menor é o CV e os resultados obtidos destes dados serão mais precisos.

As quantidades de DNA nuclear (pg) das amostras foram estimadas por meio da equação:

$$DNA \text{ amostra} = \left(\frac{G1 \text{ amostra}}{G1 \text{ padrão}} \right) \times DNA \text{ padrão}, \text{ onde:}$$

DNA amostra= quantidade de DNA nuclear da amostra (pg);

G1 amostra= posição do pico G1 da amostra;

G1 padrão= posição do pico G1 de espécie padrão de referência utilizada;

DNA padrão = conteúdo de DNA da espécie padrão de referência utilizada.

Em seguida, com base na estimativa de DNA da amostra do melhor tratamento (tampão x padrão) foi calculado o Valor C (quantidade de DNA gamético – com número cromossômico n) e o Valor Cx (quantidade de DNA de cada genoma- com número cromossômico básico x) e transformado para a unidade mega pares de bases (Mpb) onde, 1pg de DNA é igual a 978 Mpb (DOLEZEL, et al., 2003; GREILHUBER et al., 2005).

2.3 Análises estatísticas

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 3 x 3 (quatro genótipos, três tampões e três padrões) com três repetições. Foi realizado o desdobramento do efeito do tampão dentro de cada nível de genótipo e padrão e o efeito de padrão dentro de cada nível de genótipo

e tampão, bem como o efeito de genótipo dentro de cada nível de tampão e o efeito de genótipo dentro de cada nível de tampão. As variáveis analisadas foram: nota do histograma, coeficiente de variação do pico G1 e quantidade de DNA. As médias foram comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974) a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com o uso do aplicativo computacional SISVAR (FERREIRA, 2000). Realizou-se correlação de Spearman entre as variáveis por meio do aplicativo Genes (CRUZ, 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de variância a interação tripla (padrão x tampão x genótipo) mostrou-se altamente significativa ($P < 0.01$), e assim, realizou-se o desdobramento dessa interação para verificar o efeito do tampão dentro de cada nível de genótipo e padrão e o efeito de padrão dentro de cada nível de genótipo e tampão (Tabela 1A a Tabela 3A). Também se desdobrou as interações duplas (genótipo x tampão) e (genótipo x padrão), que se mostraram significativas, para verificar o efeito do genótipo dentro de cada nível de tampão e o efeito de genótipo dentro de cada nível de padrão (Tabela 1A, 4A e 5A).

De modo geral, para os quatro genótipos avaliados os tampões $MgSO_4$ e Tris-HCl apresentaram médias mais altas para a variável nota do histograma, independente do padrão utilizado (Tabela 3). Quanto maior a nota do histograma, maior é a definição dos picos G1 da amostra e do padrão, e menor é a quantidade de partículas Sub G1, que são geradas devido ao rompimento dos núcleos. Isto indica que esses tampões foram eficientes em manter a integridade dos núcleos da amostra.

Com relação ao tampão Galbraith, a média mais elevada para a variável nota do histograma foi 3, observada para o genótipo *B. ruziziensis* “Iracema” com o padrão ervilha (*Pisum sativum*).

Tabela 3 Média de nota do histograma, coeficiente de variação e conteúdo de DNA de quatro genótipos de *Brachiaria* spp. obtidos a partir do uso de diferentes tampões combinados com diferentes padrões de referência. UFLA, Lavras, MG, 2010

TAMPÃO***	MgSO ₄ **	Galbraith	Tris-HCl	MgSO ₄	Galbraith	Tris-HCl	MgSO ₄	Galbraith	Tris-HCl
PADRÃO	Rabanete			Tomate			Ervilha		
GENÓTIPO									
Nota do Histograma									
<i>Brachiaria ruziziensis</i> *	4,00±1,00 aA	1,67±0,58 aB	4,00±1,00 aA	3,67±0,58 bA	1,67±0,58 aB	4,33±0,58 aA	3,00±0,00 bA	1,00±0,00 bB	3,00±0,00 aA
Híbrido natural	5,00±0,00 aA	1,67±0,58 aB	4,30±1,15 aA	5,00±0,00 aA	2,33±0,58 aC	3,66±1,15 aB	4,00±1,00 aA	1,00±0,00 bB	3,00±0,00 aA
<i>B. brizantha</i> (Marandú)	5,00±0,00 aA	1,00±0,00 aC	3,33±0,58 bB	3,33±0,58 bA	1,00±0,00 bB	3,33±0,58 aA	3,67±1,15 aA	2,00±0,00 aB	3,00±0,00 aA
<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema" ****	5,00±0,00 aA	1,33±0,58 aC	3,00±0,00 bB	4,33±1,15 aA	1,00±0,00 bC	2,33±1,15 bB	2,67±0,58 bA	3,00±0,00 aA	3,00±0,00 aA
Coeficiente de Variação (%)									
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	1,34±0,13 aA	3,19±0,05 aB	1,59±0,11 aA	2,84±0,15 aA	4,24±2,19 bB	2,31±0,73 aA	1,60±0,03 aA	4,97±0,74 bB	1,52±0,72 aA
Híbrido natural	1,71±0,27 aA	3,39±0,60 aB	2,07±0,73 aA	1,41±0,11 aA	2,57±0,61 aA	1,73±0,18 aA	2,16±1,25 aA	5,66±1,21 bC	3,37±0,78 aB
<i>B. brizantha</i> (Marandú)	1,51±0,25 aA	2,12±0,35 aA	1,52±0,14 aA	1,40±0,35 aA	2,65±0,28 bB	1,40±0,36 aA	1,60±0,47 aA	2,65±0,28 bA	1,92±0,11 aA
<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema"	0,95±0,21 aA	2,46±0,29 bB	1,61±0,22 aA	1,31±0,12 aA	1,88±0,44 bA	2,60±1,27 bA	3,79±1,96 aB	1,94±0,12 aA	1,97±0,20 aA
Conteúdo de DNA (pg)									
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	1,51±0,02 aA	1,31±0,28 aA	1,50±0,03 aA	1,49±0,04 aA	2,50±1,15 aB	1,46±0,02 aA	1,71±0,10 aA	1,44±0,09 aA	1,53±0,02 aA
Híbrido natural	2,58±0,03 bA	2,48±0,07 bA	2,48±0,08 bA	2,44±0,00 bA	2,50±0,04 aA	2,40±0,03 bA	2,57±0,16 bA	2,40±0,08 bA	2,64±0,03 bA
<i>B. brizantha</i> (Marandú)	3,48±0,07 cA	3,52±0,19 cA	3,56±0,03 cA	3,43±0,03 cA	3,54±0,17 cA	3,36±0,06 dA	3,91±0,05 dA	4,18±0,58 dB	3,64±0,02 dA
<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema"	2,89±0,06 bA	2,75±0,05 bA	2,93±0,02 dA	2,96±0,10 dA	3,02±0,09 bA	2,81±0,12 cA	3,10±0,06 cA	2,99±0,11 cA	3,10±0,05 cA

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas dentro de cada genótipo e padrão não diferem estatisticamente aos 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-Knott.** Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente aos 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-knott. *** Foram apresentados os valores dos desvios padrões para cada média apresentada. **** Primeiro material tetraploidizado artificialmente na UFLA - Universidade Federal de Lavras

Os tratamentos que receberam as maiores médias de notas no histograma (4-5) apresentaram baixos coeficientes de variação de 0,95 a 2,31 (Tabela 3). Este fato era esperado, uma vez que o CV representa a largura dos picos G1 (amostra e padrão) e que histogramas com notas altas possuem picos G1 da amostra e padrão estreitos e, portanto, possuem CVs baixos.

Galbraith et al. (1983) afirmaram que coeficientes de variação menores que 5% são aceitáveis em publicações internacionais. Dolezel e Bastos (2005) também aceitaram como admissíveis esses valores de CV, uma vez que tal precisão é difícil de ser conseguida em algumas plantas. No entanto, no presente trabalho observou-se que CVs a partir de 2,65 % gerou erros nas estimativas do conteúdo de DNA para alguns genótipos de *Brachiaria* (Tabela 3).

Este fato foi observado em alguns tratamentos no qual o tampão Galbraith proporcionou uma super estimativa no valor do conteúdo de DNA quando utilizado com o padrão ervilha para o genótipo Marandú (4,18 pg) com CV de apenas 2,65% e utilizando o padrão tomate para o genótipo Iracema (2,50 pg) com CV de 4,24%, quando comparados com os demais tratamentos. Um fato importante a ser observado é que para estes dois casos a nota do histograma foi baixa, isto é, igual ou inferior a 2,00, evidenciando a importância de se obter metodologias que proporcionem histogramas de boa qualidade e que a interpretação não deve ser baseada somente nos valores de CV.

Outra super estimativa da quantidade de DNA para o genótipo *B. brizantha* cv. Marandú (3,91 pg) foi observada no tratamento com o tampão $MgSO_4$ e o padrão de referência ervilha (Tabela 6A), onde foi observado um C.V de apenas 1,60% e uma nota de 3,66.

No presente estudo, os tampões $MgSO_4$ e o Tris-HCl, quando utilizados com o padrão rabanete, foram as únicas combinações capazes de gerar valores médios de CV igual ou abaixo de 2,08% para todos os genótipos. Sendo que para o tampão $MgSO_4$ observaram-se média de valor de CV , variando de 0,95-

1,71% e nota do histograma igual ou superior a 4 para os quatro genótipos estudados, proporcionando estimativas do conteúdo de DNA de alta confiabilidade (Tabela 3 e Figura 2). Ulrich e Ulrich (1991) também propõem que para que haja uma análise de alta resolução, o histograma gerado deve apresentar coeficientes de variação inferiores a 1,5%. Marie e Brown (1993) consideram o CV um critério essencial nas avaliações dos métodos citométricos. Eles estabeleceram uma linha de referência na qual consideram coeficientes de variação variando entre 1 e 2% para análises de qualidade em células vegetais e iguais a 3% para análises de rotina.

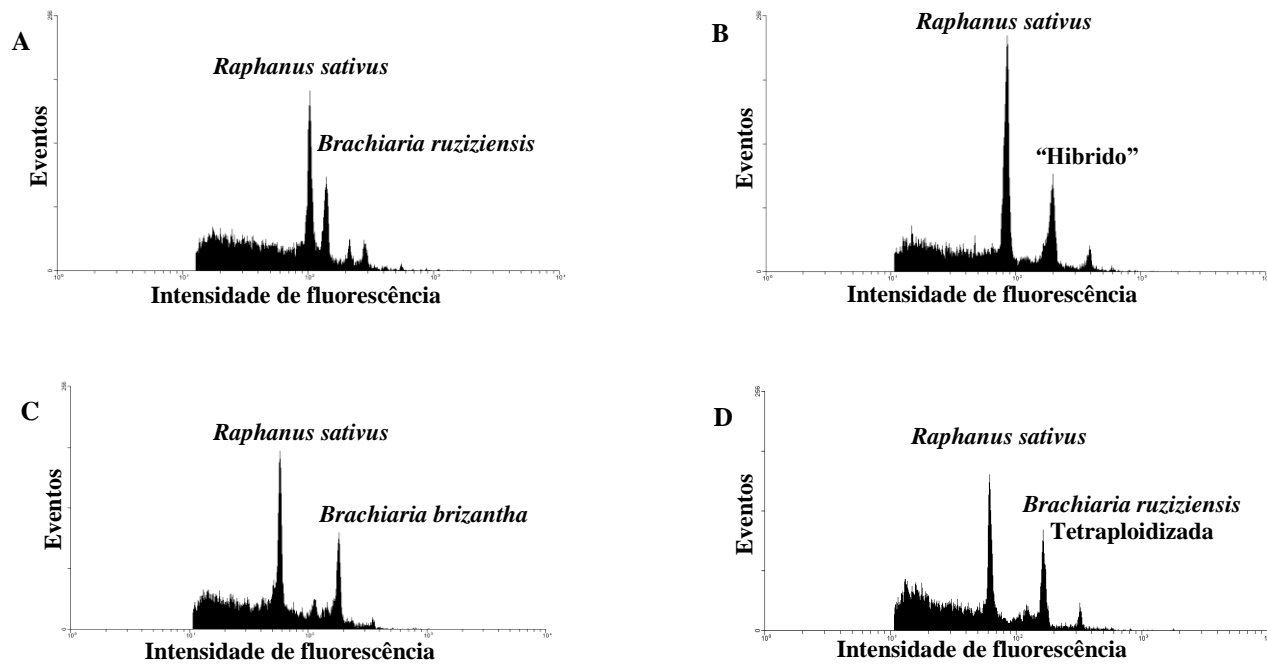


Figura 2 Histogramas de citometria de fluxo na quantificação do conteúdo de DNA de *Brachiaria* obtido com o tampão MgSO₄. O primeiro pico G1 é do rabanete (*Raphanus sativus*) que é padrão de referência e o segundo pico: A) *B. ruziziensis* diploide B) Híbrido natural C) *B. brizantha* D) *B. ruziziensis* tetraploidizada. UFLA, Lavras, MG, 2010

As estimativas do conteúdo de DNA estão de acordo com Ishigaki et al. (2009) que trabalhou com duplicação cromossômica em *B. ruziziensis*. Esses autores obtiveram uma média de quantidade de DNA de 1,41 para os genótipos diploides e de 2,77 pg para o tetraploidizado, respectivamente, quando utilizou o tampão Tris-HCl e a espécie padrão *Oryza sativa*. As estimativas dos conteúdos de DNA dos genótipos diploide e tetraploidizados de *Brachiaria ruziziensis* mostraram-se coerentes, uma vez que o genótipo tetraploizado apresentou o dobro do conteúdo de DNA do genótipo diploide para todas as combinações de padrões e tampões testadas, com exceção, do tratamento tampão Galbraith com o padrão tomate para o genótipo *B. ruziziensis*, pois teve sua estimativa super estimada como já discutido anteriormente.

Resultados de alta precisão do conteúdo de DNA para os quatro genótipos de *Brachiaria* foram obtidos nos tratamentos em que se utilizou o tampão MgSO₄ com o padrão de referência rabanete (Tabela 3).

Apesar de o padrão rabanete apresentar os melhores resultados para o híbrido natural, independente do tampão utilizado, foram observados histogramas (Figura 2b) com sobreposição dos picos G2 do padrão rabanete com os picos G1 da amostra. Considerando a proposta de Price e Johnston (1996) para não utilização de padrão de referência cujo pico G2 sobreponha o pico G1 da amostra, não seria recomendado a utilização do rabanete para análises de híbridos triplóides de *Brachiaria*. No entanto, vale ressaltar que a análise de desdobramento de padrão dentro de genótipo e tampão e do desdobramento de genótipo x padrão (Anexo tabela 7A a Tabela 9A) não mostrou diferenças significativas para nenhuma das características avaliadas para o tampão MgSO₄. Independentes do padrão utilizado para o híbrido foram observadas altas médias para as notas do histograma, baixos CVs e as estimativas do conteúdo de DNA foram coerentes (Tabela 3). Além disso, em todos os histogramas do triploide

(Figura 2b) houve um aumento do pico G2 do padrão rabanete em função do aumento no número de núcleos (híbrido + rabanete).

Na Tabela 3, observa-se que a combinação entre o tampão $MgSO_4$ e o padrão rabanete permitiu a diferenciação da *Brachiaria ruziziensis* diploide dos demais genótipos. Este fato é de grande importância para o programa de melhoramento de *Brachiaria ruziziensis* uma vez que de um modo rápido e eficiente torna possível a confirmação de materiais oriundos de coletas em pastagens ou em populações melhoradas em campo aberto se o material é *B. ruziziensis* diploide, bem como, na verificação da eficiência de técnicas de manipulação do nível de ploidia.

A quantidade média de DNA para o tratamento tampão $MgSO_4$ e rabanete a *B. ruziziensis* foi de 1,51 pg para o genótipo 2x e 2,89 pg para o genótipo tetraploidizado (Figura 2a e 2d e Tabela 3). Estes valores estão em concordância com Ishigaki et al. (2009) que obtiveram para a *B. ruziziensis* 1,41 pg para as plantas diploides e 2,77 pg para as plantas tetraploides. Os autores utilizaram o tampão contendo Tris-HCl e o padrão de referência *Oriza sativus*.

Recentemente, Ishigaki et al. (2010) estimaram o tamanho do genoma de cinco cultivares de quatro espécies de *Brachiaria* pela citometria de fluxo. O tamanho dos genomas foi expresso pelo Valor C (quantidade de DNA gamético) e Valor Cx (quantidade de DNA por genoma). Estes autores observaram o Valor C e o Valor Cx, respectivamente, de 615 Mpb e 615 Mpb para a *B. ruziziensis* “Kennedy”, 1404 Mpb e 702 Mpb para a *B. brizantha* cv. Marandú, valores próximos a estes foram observados neste trabalho, sendo que se consideramos as estimativas de DNA geradas pelo tratamento tampão $MgSO_4$ e rabanete, o Valor C e o Valor Cx, respectivamente, para a *B. ruziziensis* será de 738 Mpb e 738 Mpb, para o híbrido natural será de 1.262 Mpb e 841 Mpb, *B. brizantha* (Marandú) de 1.702 Mpb e 851 Mpb e para *Brachiaria ruziziensis* tetraploidizada (Iracema) de 1.413 Mpb e 707 Mpb.

Houve uma diferença média variando (222 - 316 Mpb) nas estimativas do valor C médio entre os dois trabalhos. Isso provavelmente se deve à diferença nos genótipos dentro das espécies, à metodologia empregada tanto no preparo da amostra como na conversão de pg para Mpb.

As variáveis nota do histograma e CV apresentaram correlação negativa significativa de -0,57 (Tabela 4). Isso era esperado, já que quanto maior é a nota do histograma, menor é a largura dos picos G1, ou seja, menor é o CV do pico G1 (Tabela 3 e Figura 1). É importante ressaltar que a nota do histograma também considera a quantidade de partículas Sub G1 (ruído) e esta dependente da eficiência do tampão de extração em manter a integridade dos núcleos da amostra. Deste modo a escala de notas avalia tanto a qualidade dos picos G1(CV) como a integridade dos núcleos.

Tabela 4 Correlação entre as variáveis: nota do histograma e coeficiente de variação de *Brachiaria* spp. obtidos de diferentes tampões combinados com diferentes padrões. UFLA, Lavras, MG, 2010

GENÓTIPOS	<i>Brachiaria</i> spp.
VARIÁVEIS	Nota
CV	-0,57 *

*: significativo ($p < 0,05$)

Considerando que na literatura há variação de relatos para o valor dos CVs dos picos G1, capazes de gerar resultados confiáveis (GALBRAITH et al., 1983; ULRICH; ULRICH, 1991), este trabalho propõe uma forma mais adequada para garantir a confiabilidade dos resultados, utilizando uma escala de notas para o histograma. Nesta escala de notas, além do CV (definição do pico G1 da amostra e do padrão) é também considerada a quantidade de partículas Sub G1 (ruído). Assim, recomenda-se que sejam considerados como valores adequados para as estimativas de conteúdo de DNA os tratamentos que gerarem histogramas com notas iguais ou maiores que 4.

4 CONCLUSÃO

Propõe-se um sistema de notas do histograma para avaliar a definição do pico G1 da amostra e do padrão e a quantidade de partículas sub G1 geradas pela metodologia utilizada. Os histogramas com notas 4 ou maiores geram estimativas confiáveis do conteúdo de DNA.

A combinação do tampão $MgSO_4$ com o padrão rabanete proporciona estimativas precisas do conteúdo de DNA utilizando citometria de fluxo para os táxons de *Brachiaria*.

CVs a partir de 1,60% já são suficientes para gerar erros nas estimativas do conteúdo de DNA para alguns genótipos de *Brachiaria*.

REFERÊNCIAS

- CRUZ, C. D. **Programa Genes: biometria**. Viçosa, MG: UFV, 2006. v. 1, 382 p.
- DOLEZEL, J. et al. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry**, Malden, v. 51A, n. 2, p. 127-128, Feb. 2003.
- DOLEZEL, J.; BASTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.
- DOLEZEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 113-120, Apr. 1989.
- DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: _____. **Flow cytometry with plant cells**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag, 2007. p. 41-65.
- DOLEZEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 4, p. 625-631, Aug. 1992.
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIAO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, New York, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.
- GREILHUBER, J. et al. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 255-260, Jan. 2005.
- ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. **Japanese Society of Grassland Science**, Tokyo, v. 55, n. 3, p. 164-170, Sept. 2009.

JOHNSTON, J. et al. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 86, n. 5, p. 609-613, May 1999.

LOUREIRO, J. et al. Comparison of four nuclear isolation buffer for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 3, p. 679-689, Sept. 2006.

MACEDO, M. C. M. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandú. In: BARBOSA, R. A. (Ed.). **Morte de pastos de braquiárias**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2006. p. 35-65.

MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Colchester, v. 79, n. 1/2, p. 41-51, 1993.

PENTEADO, M. I. de O. et al. **Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2000. 32 p. (EMBRAPA Gado de Corte. Boletim de Pesquisa, 11).

PEREIRA, R. C. et al. Duplicação cromossômica em *Brachiaria ruziziensis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 56., 2010, Guarujá. **Anais...** Guarujá: SBG, 2010. 1 CD-ROM.

PINHEIRO, A. A. et al. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicines. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 3, p. 274-278, Jan. 2000.

PRICE, H. E.; JOHNSTON, J. Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. In: JAUHAR, P. P. (Ed.). **Methods of genome analysis in plants**. Boca Raton: CRC, 1996. p. 115-132.

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

TROTTER, J. **WinMDI**[®]. Version 2.8. La Jolla: The Scripps Research Institute, 2000. Disponível em: <<http://facs.scripps.edu/software.html>>. Acesso em: 10 maio 2010.

ULRICH, I.; ULRICH, W. High-resolution flow cytometry of nuclear DNA in higher plants. **Protoplasma**, New York, v. 165, n. 1/3, p. 212-215, June 1991.

VALLE, C. B. do; MILES, J. M. Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 11., 1994, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1994. p. 1-23.

Esta é uma versão preliminar do artigo.

ANEXOS

Tabela 1A Análise da variância do efeito de três padrões (rabanete, tomate e ervilha) e três tampões (MgSO₄, Gal e Tris-HCl) na determinação do conteúdo de DNA de quatro genótipos de *Brachiaria* spp, avaliado por meio de escala de nota (1, 2, 3, 4 e 5)^{1/} do histograma de citometria de fluxo, estimativa do conteúdo do DNA e coeficiente de variação do pico G₁ da amostra. UFLA, Lavras, MG, 2010

FV	GL	Nota	Conteúdo	Coeficiente
		do Histograma	de DNA	de Variação
		QM	QM	QM
Genótipo	3	1,441*	19,44**	4,451**
Padrão	2	3,065**	0,313*	6,182**
Tampão	2	59,954**	0,081 ^{ns}	19,247**
Genótipo*Padrão	6	1,237**	0,239**	2,250**
Genótipo*Tampão	6	1,348**	0,079 ^{ns}	3,108**
Padrão*Tampão	4	2,343**	0,206**	0,515 ^{ns}
Genótipo*Padrão*Tampão	12	1,089**	0,133*	1,675**
Erro	72	0,370	0,053	0,505
Total	107			
CV (%) =		20,35	8,70	30,85

^{1/}: **Nota 1:** Alta quantidade de partículas antes do pico G1 (Sub G1) e não ocorrência dos picos G1 da amostra e do padrão. **Nota 2:** Alta quantidade de partículas Sub G1 com ocorrência inicial dos picos G1 da amostra e do padrão. **Nota 3:** Alta quantidade de partículas Sub G1 com ocorrência dos picos G1 da amostra e do padrão mais definidos que em 2. **Nota 4:** Baixa quantidade de partículas Sub G1 com ocorrência dos picos G1 da amostra e do padrão mais definidos que em 3. **Nota 5:** Baixa quantidade de partículas Sub G1 com ocorrência dos picos G1 da amostra e do padrão com mais alta definição. *Significativo, com probabilidade de $p < 0,05$ pelo teste F; **Significativo, com probabilidade de $p < 0,001$ pelo teste F. ^{ns}: não significativo com probabilidade $P > 0,05$

Tabela 2A Análise de variância do desdobramento do efeito do tampão dentro de cada nível da interação genótipo x padrão para as variáveis nota do histograma, estimativa do conteúdo do DNA e coeficiente de variação do pico G₁ da amostra. UFLA, Lavras, MG, 2010

FV	GL	Nota	Conteúdo	Coeficiente
		do Histograma	de DNA	de Variação
		QM	QM	QM
Tampão /1	2	5,444**	0,037 ^{ns}	3,015*
Tampão /2	2	9,333**	0,009 ^{ns}	2,347*
Tampão /3	2	12,111**	0,004 ^{ns}	0,366 ^{ns}
Tampão /4	2	10,111**	0,028 ^{ns}	1,719*
Tampão /5	2	5,777**	1,051**	2,983*
Tampão /6	2	5,333**	0,002 ^{ns}	1,076 ^{ns}
Tampão /7	2	5,444**	0,024 ^{ns}	1,554 ^{ns}
Tampão /8	2	8,444**	0,037 ^{ns}	1,253 ^{ns}
Tampão /9	2	4,000**	0,055 ^{ns}	11,633**
Tampão /10	2	7,000**	0,046 ^{ns}	9,479**
Tampão /11	2	2,111*	0,226*	0,863 ^{ns}
Tampão /12	2	0,111 ^{ns}	0,011 ^{ns}	3,367*
Erro	72	0,370	0,053	0,505

*Significativo, com probabilidade de $p < 0,05$ pelo teste F; **Significativo, com probabilidade de $p < 0,001$ pelo teste F; ^{ns}: não significativo com probabilidade $P > 0,05$

1= padrão MgSO₄ genótipo *B. ruziziensis* (2x); 2= padrão MgSO₄ genótipo híbrido natural (3x); 3= padrão MgSO₄ genótipo *B. brizantha* (4x); 4= padrão MgSO₄ genótipo *B. ruziziensis* (4x).; 5= padrão Galbraith genótipo *B. ruziziensis* (2x); 6= padrão Galbraith genótipo híbrido natural (3x); 7= padrão Galbraith; genótipo *B. brizantha* (4x); 8= padrão Galbraith genótipo *B. ruziziensis* (4x); 9= padrão Tris-HCl genótipo *B. ruziziensis* (2x); 10= padrão Tris-HCl genótipo híbrido natural (3x); 11= padrão Tris-HCl genótipo *B. brizantha* (4x); 12= padrão Tris-HCl genótipo *B. ruziziensis* (4x)

Tabela 3A Análise da variância do desdobramento do efeito do padrão dentro de cada nível da interação genótipo x tampão para as variáveis nota do histograma, estimativa do conteúdo do DNA e coeficiente de variação do pico G₁ da amostra. UFLA, Lavras, MG, 2010

FV	GL	Nota	Conteúdo	Coeficiente
		do Histograma	de DNA	de Variação
		QM	QM	QM
Padrão /1	2	0,777 ^{ns}	0,043 ^{ns}	1,921*
Padrão /2	2	1,000 ^{ns}	0,018 ^{ns}	0,427 ^{ns}
Padrão /3	2	2,333*	0,207*	0,030 ^{ns}
Padrão /4	2	4,333**	0,036 ^{ns}	7,172**
Padrão /5	2	0,444 ^{ns}	1,270**	2,401*
Padrão /6	2	1,333*	0,008 ^{ns}	7,686**
Padrão /7	2	1,000 ^{ns}	0,424**	0,277 ^{ns}
Padrão /8	2	3,444**	0,068 ^{ns}	0,303 ^{ns}
Padrão /9	2	1,444*	0,003 ^{ns}	0,573 ^{ns}
Padrão /10	2	1,333*	0,044 ^{ns}	2,247*
Padrão /11	2	0,111 ^{ns}	0,059 ^{ns}	0,440 ^{ns}
Padrão /12	2	0,444 ^{ns}	0,061 ^{ns}	1,490 ^{ns}
Erro	72	0,370	0,053	0,505

*Significativo, com probabilidade de $p < 0,05$ pelo teste F; **Significativo, com probabilidade de $p < 0,001$ pelo teste F; ^{ns}: não significativo com probabilidade $P > 0,05$
 1= tampão MgSO₄ genótipo *B. ruziziensis* (2x); 2= tampão MgSO₄ genótipo híbrido natural (3x); 3= tampão MgSO₄ genótipo *B. brizantha* (4x); 4= tampão MgSO₄ genótipo *B. ruziziensis* (4x); 5= tampão Galbraith genótipo *B. ruziziensis* (2x); 6= tampão Galbraith genótipo híbrido natural (3x); 7= tampão Galbraith genótipo *B. ruziziensis* (4x); 8= tampão Galbraith genótipo *B. ruziziensis* (4x); 9= tampão Tris-HCl genótipo *B. ruziziensis* (2x); 10= tampão Tris-HCl genótipo híbrido natural (3x); 11= tampão Tris-HCl genótipo *B. brizantha* (4x) e 12=tampão Tris-HCl genótipo *B. ruziziensis* (4x)

Tabela 4A Análise de variância do desdobramento do efeito de genótipo dentro de cada nível de tampão para as variáveis nota do histograma, estimativa do conteúdo do DNA e coeficiente de variação do pico G₁ da amostra. UFLA, Lavras, MG, 2010

FV		GL	Notado Histograma QM	Conteúdo de DNA QM	Coeficiente de Variação QM
Genótipo	/1	3	1,888*	6,620**	0,458 ^{ns}
Genótipo	/2	3	0,379 ^{ns}	6,397**	9,195**
Genótipo	/3	3	1,879*	6,583**	1,015 ^{ns}
Erro		72	0,370	0,053	0,505

*Significativo, com probabilidade de $p < 0,05$ pelo teste F; **Significativo, com probabilidade de $p < 0,001$ pelo teste F; ^{ns}: não significativo com probabilidade $P > 0,05$
1= tampão MgSO₄; 2= tampão Galbraith; 3= tampão Tris-HCl

Tabela 5A Análise da variância do desdobramento do efeito d e genótipo dentro de cada nível de padrão de referência para as variáveis nota do histograma, estimativa do conteúdo do DNA e coeficiente de variação do pico G₁ da amostra. UFLA, Lavras, MG, 2010

FV		GL	Nota do Histograma QM	Conteúdo de DNA QM	Coeficiente de Variação QM
Genótipo	/1	3	0,629 ^{ns}	6,799**	0,998 ^{ns}
Genótipo	/2	3	2,666**	4,398**	3,518**
Genótipo	/3	3	0,620 ^{ns}	8,722**	4,435**
Erro		72	0,370	0,053	0,505

*Significativo, com probabilidade de $p < 0,05$ pelo teste F; **Significativo, com probabilidade de $p < 0,001$ pelo teste F; ^{ns}: não significativo com probabilidade $P > 0,05$
1= padrão de referência rabanete; 2= padrão de referência tomate; 3= padrão de referência ervilha

Tabela 6A Média de nota do histograma, coeficiente de variação e conteúdo de DNA obtidos a partir do uso de diferentes padrões de referência combinados com diferentes tampões. UFLA, Lavras, MG, 2010

PADRÃO TAMPÃO GENÓTIPO	Rabanete	Tomate	Ervilha	Rabanete	Tomate	Ervilha	Rabanete	Tomate	Ervilha
	MgSO ₄			Galbraith			Tris-HCl		
Nota do Histograma									
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	4,00 aA	3,66 bA	3,00 bA	1,66 aA	1,66 aA	1,00 bA	4,00 aA	4,30 aA	3,00 aB
Híbrido natural	5,00 aA	5,00 aA	4,00 aB	1,66 aA	2,33 aA	1,00 bA	4,33 aA	3,66 aA	3,00 aA
<i>B. brizantha</i> (Marandú)	5,00 aA	3,33 bB	3,66 bB	1,00 aB	1,00 bB	2,00 aA	3,33 bA	3,33 aA	3,00 aA
<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema"	5,00 aA	4,33 aA	2,66 bB	1,33 aB	1,00 bB	3,00 aA	3,00 bA	2,33 bA	3,00 aA
Coeficiente de Variação									
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	1,34aA	2,84 bB	1,60 aA	3,19 aA	4,24 bB	4,97 bB	1,59 aA	2,31 aA	1,52 aA
Híbrido natural	1,71 aA	1,41 aA	2,16 aA	3,39 aA	2,57 aA	5,66 bB	2,07 aA	1,73 aA	3,37 bB
<i>B. brizantha</i> (Marandú)	1,51 aA	1,40 aA	1,60 aA	2,12 aA	2,65 aA	2,65 aA	1,52 aA	1,40 aA	1,92 aA
<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema"	0,95 aA	1,31 aA	3,79 bB	2,46 aA	1,88 aA	1,94 aA	1,61 aA	2,60 aA	1,97 aA
Estimativa do Conteúdo de DNA									
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	1,51 aA	1,49 aA	1,71 aA	1,31 aA	2,50 aB	1,44 aA	1,50 aA	1,46 aA	1,52 aA
Híbrido natural	2,57 bA	2,44 bA	2,57 bA	2,48 bA	2,38 aA	2,40 aA	2,48 bA	2,40 bA	2,65 bA
<i>B. brizantha</i> (Marandú)	3,48 cA	3,43 dA	3,91 dB	3,53 cA	3,53 cA	4,18 aB	3,56 dA	3,36 dA	3,64 dA
<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema"	2,89 bA	2,96 cA	3,11 cA	2,75 bA	3,03 bA	2,99 aA	2,93 cA	2,81 cA	3,09 cA

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas dentro de cada genótipo e tampão não diferem estatisticamente aos 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-Knott. ** Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente aos 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-knott. *** Material tetraploidizado artificialmente na UFLA - Universidade Federal de Lavras

Tabela 7A Média de nota do histograma, coeficiente de variação e conteúdo de DNA de quatro genótipos de *Brachiaria* spp. obtidos do desdobramento de padrão dentro de cada nível de tampão e genótipo. UFLA, Lavras, MG, 2010

GENÓTIPO	TAMPÃO	MgSO ₄ **	Galbraith	Tris-HCl
Nota do Histograma				
<i>Brachiaria ruziziensis</i> *		3,55 b A	1,44 a B	3,77 a A
Híbrido natural		4,66 a A	1,67 a C	3,66 a B
<i>B. brizantha</i> (Marandú)		4,00 b A	1,33 a C	3,22 b B
<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema" ***		4,00 b A	1,77 a C	2,77 b B
Coeficiente de Variação (%)				
<i>Brachiaria ruziziensis</i>		1,93 a A	4,13 b B	1,80 a A
Híbrido natural		1,76 a A	3,87 b B	2,39 a A
<i>B. brizantha</i> (Marandú)		1,50 a A	2,47 a B	1,61 a A
<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema"		2,02 a A	2,09 a A	2,06 a A
Conteúdo de DNA (pg)				
<i>Brachiaria ruziziensis</i>		1,57 a A	1,75 a A	1,50 a A
Híbrido natural		2,53 b A	2,42 b A	2,51 b A
<i>B. brizantha</i> (Marandú)		3,61 d A	3,75 d A	3,52 d A
<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema"		2,98 c A	2,92 c A	2,95 c A

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente aos 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-Knott. ** Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente aos 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-knott. *** Primeiro material tetraploidizado artificialmente na UFLA - Universidade Federal de Lavras

Tabela 8A Média de nota do histograma, coeficiente de variação e conteúdo de DNA de quatro genótipos de *Brachiaria* spp. obtidos a partir do uso de diferentes tampões. UFLA, Lavras, MG, 2010

GENÓTIPO	TAMPÃO	MgSO ₄ **	Galbraith	Tris-HCl
Nota do Histograma				
<i>Brachiaria ruziziensis</i> *		3,55 b A	1,44 a B	3,77 a A
Híbrido natural		4,66 a A	1,67 a C	3,66 a B
<i>B. brizantha</i> (Marandú)		4,00 b A	1,33 a C	3,22 b B
<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema" ***		4,00 b A	1,77 a C	2,77 b B
Coeficiente de Variação (%)				
<i>Brachiaria ruziziensis</i>		1,93 a A	4,13 b B	1,80 a A
Híbrido natural		1,76 a A	3,87 b B	2,39 a A
<i>B. brizantha</i> (Marandú)		1,50 a A	2,47 a B	1,61 a A
<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema"		2,02 a A	2,09 a A	2,06 a A
Conteúdo de DNA (pg)				
<i>Brachiaria ruziziensis</i>		1,57 a A	1,75 a A	1,50 a A
Híbrido natural		2,53 b A	2,42 b A	2,51 b A
<i>B. brizantha</i> (Marandú)		3,61 d A	3,75 d A	3,52 d A
<i>Brachiaria ruziziensis</i> "Iracema"		2,98 c A	2,92 c A	2,95 c A

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente aos 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-Knott. ** Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente aos 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-knott. *** Primeiro material tetraploidizado artificialmente na UFLA - Universidade Federal de Lavras