

**CITOGENÉTICA E POTENCIAL  
FORRAGEIRO DE COMBINAÇÕES  
GENÔMICAS DE CAPIM-ELEFANTE E  
MILHETO**

**FERNANDO FERREIRA LEÃO**

**2009**

**FERNANDO FERREIRA LEÃO**

**CITOGENÉTICA E POTENCIAL FORRAGEIRO DE  
COMBINAÇÕES GENÔMICAS DE CAPIM-ELEFANTE E  
MILHETO**

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

Orientadora

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

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

Leão, Fernando Ferreira.

Citogenética e potencial forrageiro de combinações genômicas de capim-  
elefante e milheto. / Fernando Ferreira Leão. – Lavras : UFLA, 2009.  
112p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Lisete Chamma Davide

Bibliografia.

1. Combinações genômicas. 2. Citogenética. 3. Anatomia de  
estômatos. 4. Citometria de fluxo. 5. Características agronômicas e  
bromatológicas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.322

**FERNANDO FERREIRA LEÃO**

**CITOGÉNÉTICA E POTENCIAL FORRAGEIRO DE  
COMBINAÇÕES GENÔMICAS DE CAPIM-ELEFANTE E  
MILHETO**

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

Aprovada em 18 de agosto de 2009

Dr. Antonio Vander Pereira Embrapa CNPGL

Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos UFJF

Profa. Dra. Vânia Helena Techio UFLA

Dr. Francisco José da Silva Ledo Embrapa CNPGL

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

A minha esposa, Luzia, pelo apoio incondicional, carinho e incentivo,

**DEDICO**

Aos meus filhos, Aline, Mariana, Fernando e Tamie;

aos meus familiares,

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Tocantins (UFT), em especial à Congregação do curso de Agronomia, pelo incentivo e oportunidade concedida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Biologia, pelos ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo auxílio financeiro para as pesquisas com o capim-elefante.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

A minha esposa, Luzia, que me deu o suporte psicológico, amizade, carinho e compreensão incondicionais, sem os quais este desafio jamais seria enfrentado.

A minha filha Aline, pelo incentivo e amor; ao meu filho Fernando, pela companhia constante; a minha filha Mariana, pela felicidade imensurável que me proporciona e a minha filha Tamie, pela oportunidade de ser pai mais uma vez.

A minha mãe, pelas orações e incentivo

À professora Dra. Lisete Chamma Davide, pela orientação, amizade, incentivo e paciência demonstrada no mestrado e 14 anos depois, no doutorado.

À professora Dra. Giovana Augusta Torres, pelos conhecimentos transmitidos, excelentes aulas e palavras amigas.

À Embrapa Gado de Leite e ao Dr. Antônio Vander Pereira, pela concessão do material genético e disponibilidade.

Ao técnico especializado da Estação Experimental da Embrapa Gado de Leite, Vicente de Paula Freitas, pelo excelente atendimento, valiosas informações fornecidas e envio das estacas (material genético) de Coronel Pacheco para Lavras.

Ao meu grande amigo Gustavo Barnabé Biudes, por me socorrer nos estudos em Genética Quantitativa, pela valiosa contribuição nas análises estatísticas do capítulo 2 e pela companhia nas andanças na Serra da Bocaina. Mais que tudo isso, obrigado por ser meu amigo.

Aos meus queridos Djogo e Aline, pela ajuda na confecção dos abstracts, mas, muito mais que isso, pelos grandes momentos que temos partilhado.

À minha querida amiga Fernanda Costa Santos Motta, pelo auxílio nas contagens cromossômicas e pela amizade e à colega Fabíola Carvalho Santos, por me apresentar a “técnica do super bonder” para a anatomia de estômatos.

À Dra. Rosângela Maria Simeão Resende, da Embrapa Gado de Corte, pelo auxílio na confecção do projeto de qualificação e à amiga Patrícia Pierre, pela leitura do projeto de qualificação, por me auxiliar com o photoshop, pelos ensinamentos no laboratório e pela amizade.

Ao companheiro Zé Marcello, que por várias vezes cedeu um quarto da sua casa sempre que precisei ir para Juiz de Fora, pelas dicas científicas e pelos bons momentos conversando sobre aviões, nossa paixão comum.

Ao Dr. Francisco José da Silva Ledo, da Embrapa Gado de Leite, pela paciência e boa vontade em me auxiliar na confecção das tabelas e análises estatísticas do capítulo 3 desta tese.

À minha querida amiga Juliane El Ottra, pelo envio de material de exobiologia para o meu seminário de tema livre.

Às amigas Cristiane Fajardo, pelo companheirismo, boas risadas, longas conversas e caminhadas e Fernanda Bustamante, pelas palavras de incentivo e amizade.

À Kátia Ferreira, pelo auxílio na disciplina Análise de Experimentos e pela empolgante discussão sobre filogenia de angiospermas.

A minha grande amiga Vivian Dagnesi Timpani, sempre presente, companheira e parceira dos filmes de Star Trek.

A minha querida amiga, eterna orientada/orientadora, Mara Elisa, por ser o meu canal de comunicação com o Tocantins.

Aos colegas do Tocantins, Flávio, Lucimara, Jacinto, Joenes e Bel, que aguardam calorosamente o nosso retorno, literalmente.

À Bethinha, companheira leal e inseparável. Você realmente tornou mais suportável todos os momentos difíceis que passei.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas do Departamento de Biologia da UFLA.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética, Juliane Dornelas, Soraya, Iara, Letícia, Jeane, Fabíola, Cris, Larissa, Marcel, Fernanda, Patrícia Pierre, Rose e Ana Luiza.

Aos colegas Gracieli, Quélen, Manoel, Zé Wilson, Aliny, Bruno e Matheus, pelo bom convívio.

A todos aqueles que contribuíram de algum modo para o êxito deste trabalho.

## BIOGRAFIA

Fernando Ferreira Leão, filho de Tiberany Ferreira Leão e Margarida Silva Leão, nasceu em 26 de fevereiro de 1961, no Rio de Janeiro, RJ.

Iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina em agosto de 1983, concluindo a licenciatura e o bacharelado em 1987.

Em 1988, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e orientação do Dr. José Francisco Ferraz de Toledo, realizou estágio na área de Genética e Melhoramento de Plantas, promovido pelo Centro Nacional de Pesquisa de Soja – Embrapa.

Em 1989, foi o primeiro biólogo a ser aceito para o curso de mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas da então Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL). A dissertação, defendida em 1992 e intitulada “Posição Taxonômica do *Pinus* de Tecun Uman: Análise das Características de Acículas”, teve a orientação da Profa. Dra. Lisete Chamma Davide.

Em 1992, foi para recém-criada Universidade Estadual do Tocantins (Unitins), lecionando nas áreas de Genética e Botânica. Em 2003, a instituição foi federalizada e todo o seu corpo docente submetido a concurso público. Aprovado no concurso, após o período de estágio probatório, iniciou o doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas da UFLA em agosto de 2006, concluindo-o em agosto de 2009, novamente sob a orientação da Profa. Dra. Lisete Chamma Davide.



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução .....	02
2 Referencial Teórico.....	04
2.1 O gênero <i>Pennisetum</i> Schum, o capim-elefante, milheto e híbridos.....	04
2.2 A importância do melhoramento genético do capim-elefante.....	10
2.3 Histórico da cooperação entre a UFLA e a Embrapa Gado de Leite no melhoramento do capim-elefante.....	20
2.4 Citogenética do capim-elefante, milheto e híbridos.....	27
2.5 Alterações genômicas em hibridações interespecíficas.....	34
2.6 Aplicações da citometria de fluxo.....	37
2.7 Anatomia de estômatos e sua aplicação no melhoramento.....	41
3 Referências Bibliográficas.....	46
CAPÍTULO 2: Caracterização citogenética e estomática de combinações genômicas de capim-elefante e milheto.....	57
1 Resumo.....	58
2 Abstract.....	59
3 Introdução.....	60
4 Material e Métodos.....	62
4.1 Material genético .....	62
4.2 Análise citogenética .....	64
4.3 Citometria de fluxo .....	65
4.4 Análise estomática .....	66
4.4.1 Confecção das lâminas.....	66
4.4.2 Técnica da impressão da epiderme .....	66

4.4.3 Análise de densidade e diâmetro estomático .....	67
5 Resultados e Discussão.....	68
6 Conclusões.....	85
7 Referências Bibliográficas.....	86
CAPÍTULO 3. Produção forrageira e composição bromatológica de	
combinações genômicas de capim-elefante e milheto.....	89
1 Resumo.....	90
2 Abstract.....	91
3 Introdução.....	92
4 Material e Métodos.....	94
5 Resultados e Discussão.....	98
6 Conclusões.....	110
7 Referências Bibliográficas.....	111

## RESUMO

LEÃO, Fernando Ferreira. **Citogenética e potencial forrageiro de combinações genômicas de capim-elefante e milho.** 2009. 112p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*.

Visando contribuir com o programa de melhoramento do capim-elefante da Embrapa Gado de Leite, combinações genômicas resultantes do retrocruzamento do híbrido hexaploide com seus parentais capim-elefante e milho foram avaliadas para características citogenéticas, anatômicas e agrônomicas/bromatológicas. *Pennisetum purpureum* ( $2n=4x=28$ , genomas A'A'BB) e *Pennisetum glaucum* ( $2n=2x=14$ , genomas AA) produzem o híbrido triploide de constituição genômica AA'B, que reúne características forrageiras superiores de ambos os progenitores, porém, é estéril devido ao pareamento irregular dos cromossomos na meiose. Submetido à duplicação cromossômica com utilização de antimitóticos, obtém-se o hexaploide de constituição genômica AAA'A'BB. As combinações genômicas AA'A'BB e AAA'B, resultantes do retrocruzamento do hexaploide com o capim-elefante e hexaploide com milho, respectivamente, apresentaram elevado grau de mixoploidia, com o número cromossômico dos pentaploides variando entre 20 e 34, sendo 28 o mais frequente e os tetraploides com número cromossômico entre 16 e 28, sendo 21 o mais frequente. A variação do número cromossômico foi maior nas combinações genômicas pentaploides do que nas tetraploides. A citometria de fluxo demonstrou que ocorreu perda de DNA nas combinações genômicas, variando de 14,71% a 19,00%, nas tetraploides e de 9,25% a 14,45% nas pentaploides. Os estômatos das combinações genômicas tetraploides tenderam a ser menores e mais numerosos que o das pentaploides. A utilização da contagem cromossômica e da citometria de fluxo foi mais eficaz que a anatomia de estômatos para a caracterização das combinações genômicas. A combinação genômica HCM-5x-2 destacou-se entre os pentaploides quanto à produção de matéria seca de forragem e a combinação genômica HCM-4x-2 destacou-se, entre os tetraploides, para a mesma característica. A melhoria da qualidade forrageira em *Pennisetum* por meio da introgressão de características favoráveis do milho foi evidenciada pelo melhor desempenho das combinações genômicas pentaploides para características bromatológicas, mostrando o potencial das mesmas para inclusão em programas de melhoramento genético.

---

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

## ABSTRACT

LEÃO, Fernando Ferreira. **Cytogenetics and forage potential of genomic combinations in elephant grass and pearl millet.** 2009. 112p. Thesis (Doctor Genetics and Plant Breeding) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG \*.

Aiming at contributing to the elephant grass improvement program of the Embrapa Gado de Leite, genomic combinations resulting from the backcrossing of hybrids with its parental hexaploid elephant grass and pearl millet were evaluated for cytogenetic, anatomical and agronomic/bromatological characteristics. *Pennisetum purpureum* ( $2n = 4x = 28$ , genomes A'A'BB) and *Pennisetum glaucum* ( $2n = 2x = 14$ , genome AA) produce the triploid hybrid with genomic formation AA'B, gathering superior fodder characteristics from both parents. However it is sterile due to irregular pairing of chromosomes in meiosis. When antimitotic agents were used in order to double the chromosomes number, the hexaploid of genomic constitution AAA'A'BB is obtained. The AA'A'BB and AAA'B genomic combinations resulting from the backcrossing of hexaploid with elephant grass and hexaploid with pearl millet, respectively, showed a high degree of mixoploidy. The pentaploids chromosomes number ranged from 20 to 34, and the most frequent ones numbered 28. The tetraploids chromosomes number ranged from 16 to 28, and the most common ones numbered 21. More variation was noticed in the chromosomes number of the pentaploids genomic combinations than in those of tetraploids. Flow cytometry showed DNA loss in genomic combinations which ranged from 14.71 to 19.00% in tetraploids and from 9.25 to 14.45% in pentaploids. As to stomata anatomy, tetraploid genomic combinations showed smaller and more numerous stomata, as opposed to what was observed in pentaploids. The use of chromosome counting and flow cytometry was more effective than the anatomy of stomata for the characterization of genomic combinations. As to forage dry matter production, the HCM-5x-2 genomic combination outstood the pentaploids while the HCM-4x-2 outstood the tetraploids. The improvement of forage quality in *Pennisetum* through the introgression of favorable traits from millet was enhanced by the improvement of genomic pentaploids combinations performance for bromatologic traits, showing their potential for being included in genetic breeding programs.

---

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

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO

O potencial produtivo do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), associado a outras características forrageiras favoráveis, tais como boa qualidade, palatabilidade, vigor e persistência, tem estimulado não só o cultivo dessa espécie como também o seu melhoramento genético, visando o desenvolvimento de cultivares para utilização sob pastejo e para capineiras (Souza Sobrinho et al., 2005).

O capim-elefante é uma espécie alotetraploide com  $2n = 4x = 28$  cromossomos (genomas A'A'BB) e o milheto, uma espécie diploide com  $2n = 2x = 14$  cromossomos (genomas AA). Por serem estreitamente relacionados, o capim-elefante e o milheto apresentam boa capacidade de combinação genética e o cruzamento entre essas espécies resulta na obtenção de híbridos triploides estéreis com  $2n = 3x = 21$  cromossomos (genomas AA'B), propagados vegetativamente, porém, de grande potencial forrageiro, tendo em vista serem tão produtivos e mais palatáveis que o próprio capim-elefante (Hanna, 1999).

A fertilidade do híbrido pode ser resgatada por meio da duplicação cromossômica para a obtenção de hexaploides férteis com  $2n = 6x = 42$  cromossomos (genomas AAA'A'BB) e espera-se que esses materiais apresentem meiose regular, com produção de gametas e sementes viáveis.

Novas combinações genômicas ou raças cromossômicas podem ser obtidas com o retrocruzamento dos híbridos hexaploides com seus parentais tetraploide (capim-elefante) e diploide (milheto). Espera-se que o hexaploide, quando cruzado com o capim-elefante, produza um híbrido pentaploide com  $2n = 5x = 35$  cromossomos (genomas AA'A'BB) e que, quando cruzado com o milheto, produza um híbrido tetraploide com  $2n = 4x = 28$  cromossomos (genomas AAA'B).

Segundo Hanna (1999), os genomas A contribuem para as características

de qualidade da forragem e, de acordo com Gonzalez & Hanna (1984), o genoma B tem um efeito dominante sobre o genoma A em capim-elefante com relação ao tamanho da semente, juvenilidade e características de inflorescência e folha e, por isso, os híbridos se assemelham mais ao capim-elefante. Com a estratégia de retrocruzamentos, espera-se que as novas combinações genômicas apresentem maior possibilidade de introgressão do genoma A, aumentando seu número, porém, mantendo o genoma B também presente, reunindo no híbrido as qualidades de ambos os genomas.

Com o objetivo de integrar ciência básica realizada pelo Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Lavras a um contexto aplicado diretamente ao programa de melhoramento da Embrapa Gado de Leite, foram utilizadas, neste trabalho, citogenética convencional, citometria de fluxo, análise anatômica dos estômatos e avaliações agronômicas/bromatológicas para caracterizar combinações genômicas oriundas do cruzamento entre capim-elefante e milheto. Os genótipos promissores poderão ser incluídos no programa de melhoramento genético do capim-elefante da Embrapa Gado de Leite e lançados como novas cultivares de propagação vegetativa.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Gênero *Pennisetum* Schum, capim-elefante, milheto e híbridos

O gênero *Pennisetum* Schum. é um dos mais importantes da família Poaceae, tribo Paniceae. Encontra-se distribuído por toda a faixa tropical do planeta e caracteriza-se por sua alta complexidade e heterogeneidade, devido aos inúmeros arranjos taxonômicos propostos e à ampla variabilidade genética descrita em, aproximadamente, 140 espécies (Brunken, 1977; Kativu & Mithen, 1987; Xavier et al., 1995; Schmelzer, 1997; Jauhar & Hanna, 1998). Diversas espécies desse gênero são utilizadas como forrageiras, mas, as espécies *Pennisetum purpureum* Shum. (capim-elefante) e *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (milheto) são as mais importantes, do ponto de vista agrônômico e as mais conhecidas.

O nome do gênero *Pennisetum* é oriundo da forma plumosa das cerdas (Hrishi, 1953), que ocorrem nas inflorescências. Essa característica é muito distintiva no gênero e permite diferenciá-lo de espécies de gêneros mais próximos, como *Setaria* e *Cenchrus*. Diz (1994) aponta que, nesses três gêneros ocorrem cerdas, mas, em *Pennisetum*, as cerdas das panículas formam uma estrutura denominada involúcro. Quando as sementes estão maduras, o involúcro cai, deixando a raquis com nenhuma cerda (Kativu & Mithen, 1987). Ao contrário, no gênero *Setaria*, as cerdas permanecem presas à raquis até as espiguetas caírem e, em *Cenchrus*, elas são fusionadas na base, adquirindo um aspecto de cálice (Schmelzer, 1997).

Atualmente, baseado em caracteres morfológicos, tem sido mais aceita a classificação feita por Stapf & Hubbard (1934) citados por (Schmelzer, 1997; Martel et al., 2004), na qual foram estabelecidas cinco seções: *Penicillaria*, *Eupennisetum*, *Heterostachya*, *Brevivalvula* e *Gymnothrix*. Brunken (1977) classificou as duas espécies da seção *Penicillaria* (*Pennisetum purpureum* e



*Pennisetum glaucum*) em uma nova seção que ele denominou *Pennisetum*.

Outras espécies de *Pennisetum* são também utilizadas como forrageiras, como é o caso de *Pennisetum ramosum*, ou são usadas como plantas ornamentais, como *Pennisetum villosum* e *Pennisetum setaceum* (Martel et al., 1997). O capim-quicuío (*Pennisetum clandestinum* Hochst. ex Chiov) tem sido muito utilizado para a pecuária de leite e em menor escala para a pecuária de corte, podendo ser utilizado diretamente como pasto ou como matéria-prima para a elaboração de feno de excelente qualidade (Alcântara & Bufarah, 1988).

A África tropical tem sido apontada como centro de origem e diversidade do capim-elefante, onde ocorre naturalmente em vários países, desde a Guiné, no oeste, até Moçambique e Quênia, no leste (Brunken, 1977).

A espécie *Pennisetum purpureum* Schum. é uma gramínea tropical perene de grande importância forrageira, cujas características morfológicas apresentam amplas variações fenotípicas. A literatura indica um grande número de atributos utilizados na caracterização de cultivares de capim-elefante (Brunken, 1977; Tcacenco, 1988; Tcacenco & Lance, 1992; Xavier et al., 1995; Pereira et al., 2000, 2002; Techio et al., 2002), em que é possível verificar as principais diferenças existentes.

De forma resumida, a espécie pode ser caracterizada como ereta, cespitosa, de porte elevado (mais de 5 m), apresentando folhas invaginantes, largas e compridas (30 a 120 cm), inflorescência tipo panícula e abundante lançamento de perfilhos aéreos e basais (Bogdan, 1977; Xavier et al., 1995; Pereira et al., 2001).

As panículas apresentam formato cilíndrico, com 13 a 30 cm de comprimento, densamente florida por espiguetas isoladas ou em grupos e as flores podem ser unissexuais masculinas ou hermafroditas. O intervalo entre o aparecimento dos estigmas e das anteras varia de sete a nove dias, o que dificulta a autofecundação e facilita a realização de cruzamentos controlados. As

sementes, ou cariopses, são muito pequenas e, após o amadurecimento, desprendem-se com facilidade da panícula (Bogdan, 1977; Alcântara & Bufarah, 1988).

A época de florescimento pode variar de acordo com as condições ambientais e com a cultivar. Na região sudeste do Brasil, o florescimento, normalmente, ocorre entre março e julho e, assim, de acordo com Xavier et al. (1993), as cultivares podem ser classificadas, quanto à época de florescimento, como precoces (março e abril), intermediárias (abril e maio) e tardias (junho e julho).

O capim-elefante é propagado vegetativamente por meio de estacas, apesar de produzir sementes viáveis. Esse tipo de propagação é muito útil ao melhoramento de plantas, por permitir a perpetuação de genótipos superiores após sua identificação. Contudo, dificulta a expansão da área cultivada, devido ao maior custo de transporte e implantação (Pereira et al., 2003). Dessa forma, o emprego de sementes em escala poderá contribuir não só para redução no custo de implantação, como para facilitar o manejo e permitir a substituição mais frequente das áreas com forrageiras depauperadas.

Entre as características que restringem o emprego de sementes estão a presença de aristas, dificultando o manuseio e a identificação das mesmas e a irregularidade temporal da maturação, desfavorecendo a produção comercial de sementes (Humphreys & Riveros, 1986). Essas características são frequentes em espécies não totalmente domesticadas, como é o caso do capim-elefante.

Na alimentação de bovinos, o capim-elefante tem sido amplamente utilizado, mas há restrições, do ponto de vista de qualidade, já que sua produção é estacional e o valor nutricional se reduz drasticamente com a maturação (Salerno et al., 1990). Em geral, o envelhecimento da planta é acompanhado pelo espessamento e a lignificação das paredes celulares, estando ambas relacionadas com a redução na digestibilidade (Wilson, 1997; Alves de Brito et

al., 1999), de forma que a caracterização anatômica do capim-elefante e híbridos pode contribuir para a melhor compreensão dos fatores que envolvem a digestão dos tecidos da forrageira pelos ruminantes.

O milheto é o sexto cereal mais consumido no mundo, sendo considerado como base da alimentação de diversas populações da África e da Índia. Apresenta variedades de rápido crescimento e florescimento precoce, permitindo seu cultivo em locais áridos, com precipitação média anual de 250 a 300 mm. É considerado de duplo propósito, uma vez que seus grãos são utilizados na alimentação humana e a planta inteira é utilizada como forragem. Apresenta valores nutricionais semelhantes aos do trigo, milho e arroz, com superioridade em relação ao conteúdo mineral, principalmente de ferro e cálcio (Pantulu & Rao, 1982).

Apresenta ciclo vegetativo anual e caule único, podendo apresentar perfilhamento, medindo de 1 a 3 m de altura e folhas com 20 a 100 cm de comprimento por 5 a 50 mm de largura. É uma espécie alógama, provavelmente devido ao seu hábito de floração protogínica e, por ser fotoperiódica facultativa de dias curtos, apresenta variação na época de florescimento, dependendo do genótipo e da temperatura. O estigma aparece de dois a três dias depois do desenvolvimento da espiguetas, gradualmente, do ápice para a base da panícula. Em torno de dois dias depois, quando os estigmas começam perder sua viabilidade, as anteras das flores hermafroditas aparecem na mesma ordem e, dois dias mais tarde, o mesmo ocorre com as anteras das flores masculinas. Essa sequência de florescimento praticamente exclui a polinização dentro da mesma espiguetas, mas pode ocorrer polinização entre espiguetas diferentes da mesma planta, permitindo, assim, a prática da autofecundação (Bogdan, 1977). A inflorescência é uma panícula densa, cilíndrica e terminal, com 10 a 50 cm de comprimento, apresentando, em média, 1.500 espiguetas que podem ocorrer individualmente ou em grupo, permanecendo na planta após o amadurecimento.

Os frutos são cariopses, variando de globosos a subcilíndricos e as sementes medem de 3 a 4 mm (Alcântara & Bufarah, 1988).

O centro de diversidade morfológica do milheto envolve uma região abrangendo do oeste do Sudão até o Senegal e essa forrageira foi domesticada, inicialmente, como cereal, no sul do Saara (Harlan & Wet, 1971). Como a seleção foi efetuada por diferentes comunidades na sua domesticação, isso contribuiu para a obtenção de populações com ampla variação. Sua expansão para o oriente chegou até a Índia há 2000 anos, alcançando a Europa no século XVI, sempre cultivada como grão. No século XVIII, a espécie chegou aos Estados Unidos e à Austrália, utilizada como forrageira, mas ainda com menor importância que o sorgo. A partir dos anos 1970, houve grande interesse por seu valor nutricional, elevada produção de sementes e capacidade de rebrota após corte ou pastejo, tendo sido desenvolvidas novas cultivares produtivas, principalmente na Índia, nos Estados Unidos e na Austrália (Bogdan, 1977).

Apresentando um germoplasma com ampla variabilidade, a utilização do milheto no melhoramento do capim-elefante pode permitir maiores avanços na obtenção de cultivares e híbridos resistentes à seca e à salinidade, com boa produção de sementes não deiscentes e de melhor qualidade forrageira.

O híbrido originado do cruzamento entre o capim-elefante e o milheto é denominado PMN (do inglês *pearl millet and napiergrass*) e foi descrito, pela primeira vez, por Burton (1944).

O interesse pelo potencial forrageiro do híbrido interespecífico promoveu a realização de uma série de trabalhos iniciados em 1980. A maioria dos trabalhos relata que os híbridos PMN apresentam produção similar ou superior à dos melhores híbridos de milheto e clones selecionados de capim-elefante de porte alto ou anão (Hanna & Monson, 1980), no entanto, são estéreis, o que é um fator limitante para qualquer método de melhoramento que necessite de avanço de geração por meio de sementes.

A obtenção de cultivares melhoradas é uma necessidade comum de produtores de leite de todo o país e a procura por novas variedades de forrageiras adaptadas aos diferentes ecossistemas é intensa. Entre os atributos desejados, buscaram-se cultivares com propagação por meio de sementes, resistência à cigarrinha-das-pastagens, maior velocidade de crescimento, maior produtividade, melhor qualidade nutricional, tolerância a solos de baixa fertilidade e distribuição mais equitativa da produção de matéria seca durante o ano (Pereira et al., 2003). A produção de híbridos é uma estratégia que também contribui para programas de melhoramento que visam à produção dessas cultivares.

Os híbridos interespecíficos, morfologicamente, se assemelham ao capim-elefante e apresentam elevada produção e qualidade forrageira superiores aos de seus genitores, revelando ser uma alternativa para a obtenção de cultivares superiores e incrementar a produção e rentabilidade da pecuária leiteira (Osgood et al., 1997; Jauhar & Hanna, 1998).

Os triploides podem ser obtidos por polinização manual e propagados vegetativamente. Embora apresentem grande variabilidade, as flores produzidas por estes híbridos são fêmeas e machos estéreis, o que impede a sua utilização em cruzamentos. Não obstante, a variabilidade morfológica permite selecionar clones superiores (Barbosa, 2004).

A restauração da fertilidade do híbrido pode ser conseguida pela duplicação do complemento cromossômico pelo uso da colchicina (Krishnaswamy & Raman, 1954; Hanna, 1981; Hanna et al., 1984; Dujardin & Hanna, 1985; Hanna & Dujardin, 1986; Jauhar & Hanna, 1998).

De forma geral, os híbridos triploides e hexaploides assemelham-se ao capim-elefante. Resumidamente, esses híbridos caracterizam-se por apresentar plantas com 1,5 a 5 m de altura, produzir de 15 a 20 perfilhos por planta e serem não-rizomatosos. As inflorescências podem variar de 20 a 40 cm em

comprimento e 1 a 1,5 cm em diâmetro. Os estigmas, geralmente, estão receptivos, entretanto, as anteras são atrofiadas e raramente se desenvolvem (Hanna, 1981; Diz, 1994).

## **2.2 A importância do melhoramento genético do capim-elefante**

A maior parte da produção brasileira de leite e carne baseia-se no uso de pastagens que, geralmente, são formadas por espécies tropicais exóticas ou “naturalizadas”. Quando da introdução dessas forrageiras, as instituições ou produtores tinham o objetivo básico de abastecer-se unicamente de cultivares melhoradas que pudessem ter utilização imediata. Como consequência, muitas espécies podem apresentar vulnerabilidade ao aparecimento de problemas fitossanitários ou de estrangulamento no seu processo de melhoramento para produtividade, qualidade e adaptação pela falta de variabilidade genética (Pereira, 1999).

Entre as forrageiras introduzidas no Brasil, destaca-se o capim-elefante, que possui características favoráveis, tais como elevado potencial produtivo, boa palatabilidade, vigor e persistência, que têm estimulado não só o cultivo dessa espécie como também seu melhoramento genético, visando o desenvolvimento de cultivares para utilização sob pastejo e capineiras (Souza Sobrinho et al., 2005).

O capim-elefante foi introduzido no Brasil em 1920 (Granato, 1924), sendo, inicialmente, utilizado como capineira para fornecimento como verde picado ou como forragem conservada sob a forma de silagem ou feno. Devido ao seu elevado potencial de produção e adaptação aos ecossistemas brasileiros, disseminou-se rapidamente e, atualmente, tem sido utilizado como pastejo, sendo uma das forrageiras de mais alto potencial para a intensificação da produção de leite e carne a pasto (Pereira, 1999).

O capim-elefante, mesmo sendo cultivado por todo o território nacional,

carece de cultivares adaptadas para as diferentes condições edafoclimáticas e sistemas de utilização. Esta situação é consequência da existência de poucos programas de melhoramento da espécie. O programa de melhoramento da Embrapa Gado de Leite tem dado ênfase na avaliação e na combinação genética intensiva dos acessos mantidos no Banco Ativo de Germoplasma (Pereira et al., 2001).

Uma das limitações à expansão da área cultivada de capim-elefante é a necessidade do uso de propagação vegetativa, visto que a maioria das cultivares produz sementes de baixo vigor (Pereira et al., 2001). Considerando que grande parte das cultivares obtidas é de clones e que esta forrageira é quase sempre cultivada sob condições de manejo deficiente, a expressão do potencial da espécie é comprometida pela dificuldade de adaptação da planta aos diferentes ambientes. Uma solução econômica para este problema é o desenvolvimento de cultivares superiores, adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas e propagadas via sementes. Desprezando-se as diferenças genotípicas para produção e qualidade de forragem, a propagação por meio de sementes apresenta como vantagens maior facilidade de armazenamento e transporte, maior rapidez e facilidade no plantio e menor gasto de mão-de-obra, resultando em menor custo de implantação das pastagens (Pereira et al., 2003).

O melhoramento da maioria das características de importância forrageira do capim-elefante pode ser obtido por meio da exploração da variabilidade existente na própria espécie (melhoramento intervarietal), em que a transferência genética ocorre mais facilmente. Porém, considerando a capacidade de cruzamento do capim-elefante com outras espécies de *Pennisetum*, o programa de melhoramento pode recorrer à utilização de espécies pertencentes a conjuntos gênicos próximos, tais como o milheto e o híbrido triespecífico entre milheto, capim-elefante e *Pennisetum squamulatum* (Pereira et al., 2002).

O híbrido resultante do cruzamento entre capim-elefante e milheto é

triploide ( $2n = 3x = 21$ ), estéril e, morfológicamente, assemelha-se ao capim-elefante, apresentando algumas características intermediárias entre as duas espécies parentais (Hanna, 1999). Na formação dos híbridos, o milheto ( $2n = 2x = 14$ ) contribui com caracteres como vigor, resistência à seca, tolerância às doenças, qualidade forrageira e tamanho das sementes, enquanto rusticidade, agressividade, perenidade e elevada produção de matéria seca são conferidas pelo capim-elefante ( $2n = 4x = 28$ ) (Diz, 1994; Jauhar & Hanna, 1998).

Segundo Pereira et al. (1999), híbridos triploides têm apresentado grande variabilidade para caracteres de importância forrageira, já tendo sido selecionadas forrageiras com 23% de proteína bruta nas folhas, valor este superior à média de 16% encontrada para o capim-elefante. Entretanto, a maior limitação em relação à utilização do híbrido triploide é a infertilidade, o que constitui uma barreira para o programa de melhoramento genético. O não pareamento correto de cromossomos na meiose número é apontado como a principal causa da esterilidade, pois o híbrido reúne 21 cromossomos pertencentes aos genomas A, oriundos do milheto e A' e B do capim-elefante. A restauração da fertilidade desses híbridos permitiria que os mesmos voltassem ao programa de melhoramento genético, transferindo alelos de características desejadas ao capim-elefante, o que pode ser conseguida pela duplicação cromossômica, resultando na produção de híbridos hexaploides com  $2n = 6x = 42$  com meiose regular, que apresenta sementes maiores e vigorosas, quando comparadas com as minúsculas sementes de baixo vigor do capim-elefante (Hanna, 1981; Hanna et al., 1984).

Souza Sobrinho et al. (2008) verificaram o potencial de germinação de sementes em diferentes progênies de capim-elefante hexaploide para confirmação da viabilidade de propagação dessa forrageira, por meio de sementes. Observaram-se diferenças significativas entre os tratamentos, evidenciando a existência de variabilidade no potencial de multiplicação por



sementes das progênies de meio-irmãos de híbridos hexaploides de capim-elefante. A amplitude de variação para a porcentagem de germinação das sementes foi de 48,67%, com as progênies de melhor desempenho apresentando germinação das sementes superior a 35%.

De acordo com Hanna (1999), um genótipo interespecífico vigoroso e com elevada produção de folhas pode ser produzido pelo retrocruzamento do híbrido hexaploide com o milheto, para produzir plantas  $2n = 4x = 28$  (genomas AAA'B), que são completamente estéreis, podendo haver a produção de tipos morfológicos diversos. Os derivados de retrocruzamentos merecem mais esforço de pesquisa, devido à contribuição para as características de qualidade da forragem de três conjuntos do genoma A (Hanna, 1999).

Reis et al. (2008) avaliaram o potencial para programa de seleção recorrente em uma população alohexaploide de milheto x capim-elefante (HGL), por meio de progênies de polinização aberta. Setenta e oito progênies, uma testemunha representativa da população e duas cultivares comerciais, a 'Pioneiro' e a 'Paraíso', foram avaliadas no delineamento látice triplo 9x9, em dois locais. Os caracteres altura de plantas e produtividade de matéria seca foram avaliados por três e quatro cortes, respectivamente. Quanto à altura de plantas, a média das 17 melhores progênies foi similar à das testemunhas comerciais e, quanto à produtividade de matéria seca, foi maior do que a da 'Paraíso' e menor do que a da 'Pioneiro'. A correlação entre progênies e colheitas mostrou que a quarta colheita representa a média de todas as colheitas e a possibilidade de seleção precoce. As estimativas de herdabilidade na média das colheitas e locais foram de 56,9%, quanto à altura de plantas e de 58,8% para produtividade de matéria seca e a resposta esperada com a seleção foi de 23,4% para produtividade de matéria seca e 18,1% para altura de plantas. Esses resultados demonstram o potencial promissor da população HGL para programa de seleção recorrente.

Não há relatos, na literatura científica, sobre o retrocruzamento do hexaploide com o capim-elefante. A obtenção de novas combinações genômicas ou raças cromossômicas a partir do retrocruzamento do hexaploide com o milho e do hexaploide com o capim-elefante é interessante para os programas de melhoramento genético do capim-elefante. Ainda que estéreis, as novas combinações obtidas devem ser verificadas quanto à sua variabilidade e possibilidade de obtenção de características agronômicas de interesse forrageiro, visando seu aproveitamento no programa de melhoramento genético do capim-elefante e possibilitando a obtenção de novas cultivares propagadas vegetativamente.

Características agronômicas e bromatológicas, como produção e percentagem de matéria seca, altura de plantas, relação folha/colmo, percentagem de proteína bruta, percentagem de fibra em detergente neutro (FDN), percentagem de fibra em detergente ácido (FDA), teor de proteína bruta e digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica, são recorrentemente avaliadas em experimentos que visam o melhoramento de forrageiras.

Com o objetivo de avaliar o comportamento de novos clones selecionados de capim-elefante, Botrel et al. (2000) realizaram um experimento na Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG, por um período de dois anos. Foi avaliado o potencial forrageiro de 20 clones de capim-elefante, obtidos pelo programa de melhoramento, e mais duas cultivares tradicionais ('Cameroon' e 'Taiwan A-146') utilizadas como testemunhas. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. As adubações para estabelecimento e manutenção foram realizadas de acordo com a análise do solo, visando suprir as exigências nutricionais do capim-elefante. Observaram-se diferenças significativas entre os clones quanto ao potencial para produção de forragem, à relação folha/colmo e ao perfilhamento aéreo e basal. A maioria dos clones avaliados apresentou maior produção de matéria seca que as cultivares

tradicionais Cameroon e Taiwan A-146, durante o período seco e chuvoso. Não houve diferença significativa no teor de proteína bruta da matéria seca das cultivares controles ('Cameroon' e 'Taiwan A-146') e dos clones avaliados, em ambas as estações (águas e seca). O clone F 27-01, lançado pela Embrapa Gado de Leite com o nome de cultivar Pioneiro, destacou-se para quase todas as características agronômicas estudadas.

De acordo com Pereira et al. (2000), a qualidade de uma forragem pode ser considerada como resultante da sua digestibilidade, composição química e consumo. Em plantas forrageiras, o aumento da idade da planta, normalmente, é acompanhado pela elevação da percentagem de matéria seca (MS) e pela queda da digestibilidade e valor nutritivo. Assim, a idade considerada ideal para utilização de uma planta forrageira, ou seja, o momento em que as características de importância forrageira, tais como digestibilidade e teor de MS, proteína bruta (PB) e minerais, se encontram no ponto mais favorável para consumo, pode variar entre espécies e cultivares, em função dos efeitos genéticos, ambientais e da interação desses fatores. O conhecimento da variabilidade para características de importância forrageira e o acompanhamento das alterações da qualidade, com o avanço da idade da planta, podem orientar na escolha da cultivar, de acordo com o interesse de utilização.

A variação da qualidade de folhas de capim-elefante em função da idade da planta foi avaliada por Pereira et al. (2000). Utilizaram-se 11 cultivares de capim-elefante e híbridos de capim-elefante x milho para avaliar a variação dos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), em folhas de plantas com idades de 30, 45, 60, 75 e 90 dias. Observou-se diferença significativa entre as cultivares para todos os caracteres avaliados. Os valores de MS, FDN e FDA aumentaram com a idade da planta, enquanto a percentagem de PB sofreu redução. O híbrido interespecífico Merker x 23 A destacou-se por ter apresentado elevado teor de

PB e menor concentração de FDN e FDA, demonstrando o potencial do híbrido triploide para o melhoramento da qualidade forrageira do capim-elefante.

Barreto et al. (2001) conduziram um trabalho com o objetivo de avaliar características morfológicas de três cultivares de capim-elefante ('Cameroon', 'Roxo de Botucatu' e 'Mott') e de um híbrido de capim-elefante com o milheto (Híbrido HV-241), submetidos a dois regimes de umidade (com e sem estresse hídrico). As plantas submetidas a estresse hídrico apresentaram menor altura e nenhuma delas apresentou internódios acima da altura de corte (10 cm). A redução na altura das plantas, como consequência do estresse, foi de 42,7% ('Cameroon'), 35,05% ('Roxo de Botucatu'), 28,54% (híbrido HV-241) e 27,43% ('Mott'). O comprimento da lâmina foliar foi reduzido de 69,9 cm, nas plantas irrigadas, para 50,0 cm nas submetidas a estresse, enquanto a largura da lâmina foliar das plantas sob estresse correspondeu a menos da metade das plantas irrigadas. O estresse hídrico não influenciou o perfilhamento dos cultivares, mas, no híbrido HV-241, reduziu o número de perfilhos axilares/planta e o número total de perfilhos/planta. Em ambos os regimes de umidade, o híbrido HV-241 foi o material que apresentou o maior perfilhamento. Observou-se que, com exceção do perfilhamento nas cultivares, o estresse hídrico promoveu redução nos demais parâmetros morfológicos estudados.

O comportamento agrônomo de híbridos entre capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e milheto (*P. glaucum* (E.) Leek) foi avaliado por Souza Sobrinho et al. (2005), com o objetivo de determinar o potencial para o melhoramento da forragem dos híbridos, bem como a possibilidade de seleção desses híbridos para futuras avaliações. Foram avaliadas 12 cultivares de milheto e 11 clones de capim-elefante, cruzados em esquema de dialelo parcial. As 132 combinações híbridas, além de duas testemunhas, foram avaliadas em experimentos em blocos casualizados, com três repetições. Anotaram-se dados

de produção de matéria seca, altura de plantas, porcentagem de matéria seca, relação entre folha e caule e de qualidade da forragem (porcentagem de proteína bruta, porcentagem de fibra em detergente neutro e ácido e digestibilidade in vitro da matéria orgânica). Foi verificada existência de variabilidade entre os híbridos interespecíficos de capim-elefante e milho, na maioria das características. A superioridade de alguns híbridos, em relação às testemunhas, demonstra o potencial do cruzamento entre *P. purpureum* e *P. glaucum* para a obtenção de cultivares melhoradas. Considerando-se tanto características de produção como de qualidade da forragem, os melhores híbridos avaliados foram 108 (F91-2-5 x M-60), 53 (F93-4-2 x M-27), 35 (F94-28-3 x M-42), 36 (F94-28-3 x M-60) e 4 (F92-101-2 x M-35).

Ainda quanto ao trabalho de Souza Sobrinho et al. (2005), foram selecionados diferentes genótipos de milho e de capim-elefante para a realização dos cruzamentos interespecíficos. Quanto ao capim-elefante, foram selecionados materiais já cultivados e os mais promissores no programa de melhoramento de forrageiras da Embrapa Gado de Leite. No caso do milho, a prioridade foi para os genótipos que apresentavam sementes grandes, florescimento tardio e também boas características forrageiras, tais como porcentagem de proteína e produção de matéria seca.

Lima et al. (2007) avaliaram a produção de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria seca digestível (MSD) e relação folha/colmo de genótipos de capim-elefante, na região norte-fluminense. Doze genótipos de capim-elefante foram avaliados em um delineamento em blocos ao acaso com três repetições. A parcela experimental foi composta de quatro linhas com 3 m de comprimento, espaçadas a 1 m e adubadas com 100 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 100 kg de N, 60 kg de K<sub>2</sub>O e 25 kg de micronutrientes/ha. Os genótipos diferiram significativamente quanto à altura da planta e à produção de MS, de PB e matéria seca digestível (MSD)/ha. Os genótipos CNPGL 92-94-01, CNPGL 92-79-02, CNPGL 91-06-02, CNPGL

94-07-02, CNPGL 94-09-01, BAG 66, CNPGL 93-32-02 e cv. Cameroon apresentaram os maiores rendimentos de MS, PB e MSD e não diferiram significativamente quanto à relação folha/colmo (F/C). A análise de cluster sugeriu o agrupamento dos genótipos de maior produção de MS, PB e MSD e dos genótipos com menores produções de MS, PB e MSD.

O estudo realizado por Reis et al. (2008) teve como objetivo avaliar o potencial para programa de seleção recorrente em uma população alohexaploide de milheto x capim-elefante (HGL), por meio de progênies de polinização aberta. Setenta e oito progênies, uma testemunha representativa da população e duas cultivares comerciais, a 'Pioneiro' e a 'Paraíso', foram avaliadas no delineamento látice triplo 9x9, em dois locais. Os caracteres altura de plantas e produtividade de matéria seca foram avaliados por três e quatro cortes, respectivamente. Quanto à altura de plantas, a média das 17 melhores progênies foi similar às das testemunhas comerciais e, quanto à produtividade de matéria seca, foi maior do que a da cultivar Paraíso e menor do que a da cultivar Pioneiro. A correlação entre progênies e colheitas mostrou que a quarta colheita representa a média de todas as colheitas e a possibilidade de seleção precoce. As estimativas de herdabilidade na média das colheitas e locais foram de 56,9% para altura de plantas e de 58,8% quanto à produtividade de matéria seca. A repostagem esperada com a seleção foi de 23,4% para produtividade de matéria seca e 18,1% para altura de plantas. Esses resultados demonstram o potencial promissor da população HGL para programa de seleção recorrente.

A análise de FDN estima a concentração total de celulose, hemicelulose e lignina da parede celular (Soest 1994), sendo o seu teor inversamente relacionado com a capacidade de consumo de MS. Isso significa que quanto menor for esse valor estimado, maior será a expectativa de consumo. A análise de FDA representa uma estimativa do teor total de celulose e lignina da amostra, sendo inversamente relacionada com a digestibilidade da MS. Assim, valores

menores de FDA indicam a presença de menor concentração de lignina na parede celular e, portanto, maior digestibilidade da MS (Soest, 1994).

A estimativa da digestibilidade pelo método convencional, *in vivo*, é a medida que apresenta o maior grau de confiança, porém, é oneroso e demorado, não permite a avaliação simultânea de grande número de alimentos e exige grande quantidade de material (Pires et al., 1979). Dessa forma, outros métodos têm sido desenvolvidos, como a técnica *in vitro*, desenvolvida por Tilley & Terry (1963), que simula a digestão no trato gástrico dos ruminantes, permitindo fazer estimativas de digestibilidade da matéria seca ou orgânica dos alimentos. A estimativa da digestibilidade *in vitro* dos alimentos tem sido amplamente utilizada nas análises dos alimentos, devido à sua alta correlação com a digestibilidade *in vivo* (Silva, 1990).

Tendo em vista estas informações acima, Martins-Costa et al. (2008) realizaram trabalho com o objetivo de determinar a composição químico/bromatológica, os parâmetros da degradabilidade *in situ* da matéria seca (MS) e fibra em detergente neutro (FDN), a digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e o teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) do capim-elefante obtido em diferentes idades de corte, na época das águas. A forrageira foi submetida ao corte nas idades de 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias, de dezembro a março. Entre outras características, as amostras foram analisadas para matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA). Adicionalmente, foram pesadas em sacos de náilon, incubadas no rúmen de três bovinos fistulados, sendo os resíduos analisados para MS e FDN residual. Posteriormente, foram submetidas à incubação *in vitro* com líquido ruminal e solução de pepsina ácida, para determinação da digestibilidade da MS (DIVMS), cujos valores foram utilizados para estimação do teor de nutrientes digestíveis totais (NDT). O teor de PB foi linearmente reduzido pelo avanço da idade de corte, enquanto os teores de FDN e FDA foram aumentados. A DIVMS

e o NDT foram quadraticamente ( $P < 0,05$ ) afetados pelo aumento da idade de corte, apresentando valores máximos de 69,00% e 57,21%, às idades de 19,64 e 48,98 dias, respectivamente.

### **2.3 Histórico da cooperação entre a UFLA e a Embrapa Gado de Leite para o melhoramento do capim-elefante**

O Banco Ativo de Germoplasma de capim-elefante da Embrapa Gado de Leite (BAGCE), localizado em Coronel Pacheco, MG, tem uma das maiores coleções de *Pennisetum* sp. do Brasil, com diversos acessos de capim-elefante e milheto. O germoplasma é geneticamente constituído por clones, populações e cultivares melhoradas de *Pennisetum purpureum* Schum., raças cromossômicas (triploides e hexaploides) resultantes da hibridação entre *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br., acessos de *Pennisetum glaucum* e várias outras espécies selvagens de *Pennisetum* (Pereira, 1999).

A partir de 1996, a Universidade Federal de Lavras vem trabalhando conjuntamente com a Embrapa Gado de Leite, no sentido de caracterizar citogenética e morfológicamente genótipos de capim-elefante, milheto e híbridos. Como resultado dessa cooperação, diversas dissertações e teses foram concluídas, aumentando o conhecimento básico dessas gramíneas e fornecendo importantes informações para o conhecimento citogenético e ao programa de melhoramento genético do capim-elefante da Embrapa Gado de Leite.

Por ordem cronológica, a primeira dissertação foi realizada por Vânia Helena Techio, sob a orientação da Prof. Dra. Lisete Chamma Davide, que também orientou todas as dissertações e teses que aqui serão apresentadas. O título desse primeiro trabalho foi “Citotaxonomia de algumas espécies e de híbridos interespecíficos de *Pennisetum*” (Techio, 1998; Techio et al., 2002). Nesse trabalho, foram realizados estudos citotaxonomícos em 27 acessos de *Pennisetum* spp. pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa



Gado de Leite (BACGE). Para cada um desses acessos foram apresentados dados morfológicos, reprodutivos e citogenéticos, os quais permitiram estabelecer agrupamentos entre eles e sugerir as identificações botânicas. As metáfases dos acessos caracterizados como *Pennisetum purpureum* confirmaram  $2n = 28$  cromossomos, já descritos para esta espécie. Para os híbridos entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum* e para os hexaploides, resultantes da duplicação dos cromossomos desses híbridos, foram confirmados  $2n = 21$  e  $2n = 42$  cromossomos, respectivamente. Os acessos selvagens 3, 4, 5 e 6, identificados como *Pennisetum setosum*, mostraram metáfases com  $2n = 54$  cromossomos, enquanto que para os acessos selvagens 1, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, e 17, caracterizados como *Pennisetum nervosum*, foram observadas células com  $2n = 36$  cromossomos. Distinto dos demais pelos caracteres morfológicos, o acesso selvagem 15, com  $2n = 36$  cromossomos, foi classificado como *Pennisetum af. orientale*. Por apresentar variação de 54 a 66 cromossomos em células de uma mesma raiz, o acesso BAG 55, reconhecido no BAGCE como capim-elefante cultivar Baiano, não foi identificado taxonomicamente. Foram ainda empregados dois procedimentos estatísticos (variáveis canônicas e análise de agrupamento com base na distância generalizada de Mahalanobis), que reforçaram as conclusões obtidas a partir da análise citogenética e morfológica.

O segundo trabalho acadêmico foi a dissertação intitulada “Citogenética de híbridos entre *Pennisetum purpureum* Schumack e *Pennisetum glaucum* L. e seus genitores” (Barbosa, 2000; Barbosa et al., 2003). O autor foi Sandro Barbosa, que investigou as relações citogenéticas em cinco acessos de híbridos interespecíficos entre *Pennisetum purpureum*, *Pennisetum glaucum* e seus genitores. As análises citogenéticas mitóticas foram realizadas por meio de coloração convencional (Feulgen) e confirmaram o número cromossômico de  $2n = 14$ ,  $28$  e  $21$ , para os acessos de *Pennisetum glaucum*, *Pennisetum purpureum* e híbridos, respectivamente. Para cada um desses acessos foram apresentadas as

descrições do complemento cromossômico e idiogramas que permitiram estabelecer as relações cariotípicas entre os híbridos e seus genitores. Baseado nos dados de comprimento total do cromossomo foi possível estabelecer a classificação do cariótipo dos acessos com relação à simetria. Os cariótipos dos acessos de *Pennisetum glaucum* foram considerados simétricos, enquanto os híbridos apresentaram cariótipos assimétricos. Para *Pennisetum purpureum*, dois acessos (BAGs 63 e 75) mostraram cariótipos simétricos e três (BAGs 54, 65 e 91) assimétricos. Nos híbridos interespecíficos entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*, foi possível inferir a procedência de alguns cromossomos parentais com base nas medidas de comprimento total do cromossomo, presença de satélite e morfologia do cromossomo.

Juscélio Clemente de Abreu defendeu a tese intitulada “Mixoploidia em híbridos de capim-elefante e milho tratados com agentes antimitóticos” (Abreu, 2002; Abreu et al., 2006). O objetivo do estudo foi promover a restauração da fertilidade dos híbridos utilizando soluções de colchicina 0,05% e 0,1% e de ciclohexamida 25 mg/L:8-hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) aplicadas em gema *in vivo* e *in vitro*, sementes, plântulas e perfilhos, em diferentes períodos de exposição. Os efeitos dos antimitóticos foram avaliados por meio da taxa de sobrevivência após tratamento, número cromossômico e presença de anomalias no ciclo celular em meristemas de raízes. Não houve sobreviventes quando foram tratadas sementes e gemas, tanto *in vitro* como *in vivo*. A colchicina apresentou melhor efeito sobre plântulas, enquanto a ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína (1:1) atuou melhor sobre perfilhos. De modo geral, nos diferentes experimentos, observou-se a ocorrência de mixoploidia, com células apresentando desde 14 até 42 cromossomos. Em média, 86,4% das células analisadas apresentaram número cromossômico diferente de 21. Estes resultados indicam que houve tanto duplicação quanto eliminação cromossômica.

O quarto trabalho foi a tese intitulada “Meiose e análise genômica em *Pennisetum spp*” (Techio, 2002; Techio et al., 2006), defendida por Vânia Helena Techio. Nesse trabalho avaliou-se a meiose por meio de protocolo convencional, o que permitiu descrever o comportamento cromossômico dos parentais milho e capim-elefante, bem como do híbrido originado a partir desse cruzamento. Também foi determinada a viabilidade do pólen e a afinidade genômica pela aplicação do modelo matemático de Alonso & Kimber (1981), revisado por Chapman & Kimber (1992). Para o milho e o capim-elefante, foram observados 7 e 14 bivalentes, respectivamente, regularmente distribuídos na placa equatorial e alta viabilidade de pólen pelos testes de coloração. Um dos acessos de capim-elefante (BAG 63), oriundo de cultura de tecidos, apresentou maior frequência de anormalidades meióticas. Nos testes de germinação *in vitro*, o milho e o capim-elefante exibiram frequência reduzida de pólenes funcionais, mostrando inabilidade de emitir tubo polínico nas condições artificiais do meio de cultura. Os três acessos híbridos apresentaram altas taxas de anormalidades caracterizadas pela segregação irregular dos cromossomos que resultaram na formação de grãos de pólen inviáveis. As estimativas das relações de pareamento nos três híbridos entre o capim-elefante e o milho mostraram que os acessos M24 e BAG75, genitores do F-94-60-01, apresentam maior proximidade genética entre seus complementos cromossômicos.

A próxima investigação científica foi a tese de Sandro Barbosa, intitulada “Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milho” (Barbosa, 2004; Barbosa et al., 2007). Nesse estudo, o objetivo foi restaurar a fertilidade de híbridos entre capim-elefante e milho a partir da utilização de soluções de colchicina 0,05% e 0,1%, aplicadas em ‘seedlings’, plântulas e segmentos caulinares cultivados *in vitro* em intervalos de 12 e 24 horas de exposição. ‘Seedlings’ de diferentes genótipos híbridos cultivados *in vivo* foram submetidos à exposição de 24 horas em

solução de 0,05% de colchicina, mesmo tratamento aplicado a meristemas laterais em diferentes períodos de exposição. A duplicação cromossômica foi confirmada por meio do número cromossômico em células de meristemas de raiz e avaliação da viabilidade polínica por meio de testes de germinação *in vitro*. ‘Seedlings’ cultivados e tratados *in vitro* apresentaram a melhor resposta ao tratamento de indução de poliploidia em solução de colchicina 0,1% por 24 horas, no qual 38% das plantas sobreviventes apresentaram o conjunto cromossômico duplicado e a fertilidade confirmada pela presença de pólen viáveis.

O sexto trabalho acadêmico foi a dissertação de Elisa Aparecida Alves Paiva, intitulada “Meiose em híbridos hexaploides de capim-elefante e milheto” (Paiva, 2006). Nesse, trabalho a meiose foi avaliada em dez híbridos hexaploides entre capim-elefante e milheto, sendo cinco de origem americana e cinco nacionais, com o objetivo de avaliar os híbridos quanto à estabilidade meiótica e à viabilidade do grão de pólen. As anormalidades mais frequentes foram: pareamento irregular na diacinese, ascensão precoce de cromossomos na metáfase, segregação irregular na anáfase e formação de micronúcleos na telófase e em tétrades. Tais anormalidades afetaram diretamente a fertilidade do pólen pela produção de gametas aneuploides, o que foi observado pelas baixas taxas de viabilidade do pólen, tanto por coloração quanto por germinação *in vitro*. O híbrido ‘Paraíso’ (cultivar comercial), apesar de apresentar alta taxa de irregularidades meióticas, apresentou 49,96% de viabilidade pelos testes de coloração e 86,17% para germinação *in vitro*. A utilização desses híbridos nos programas de melhoramento do capim-elefante foi discutida.

Em uma sétima abordagem, José Marcelo Sallabert de Campos defendeu a tese intitulada “Obtenção de híbridos hexaploides e análise genômica de *Pennisetum* spp por citometria de fluxo” (Campos, 2007). Nesse trabalho, o autor conclui que a manipulação de ploidia no capim-elefante necessita de uma

metodologia para análise em larga-escala das plantas e que a citometria de fluxo representa esta tecnologia, permitindo a obtenção de medidas físicas e químicas de partículas (células, núcleos, cromossomos e organelas). É também comentado no trabalho que a citometria aplicada ao melhoramento de plantas apresenta um grande número de aplicações e, quando comparada à análise de ploidia por contagem de cromossomos, a citometria de fluxo oferece um método alternativo, rápido, simples e acurado. Por essas razões, ela tem se tornado um método popular para análise de ploidia, detecção de mixoploides e aneuploides, análise de ciclo celular e de polisomatia, análise de grãos de pólen e estimativas do conteúdo de DNA absoluto ou tamanho de genoma. A citometria de fluxo foi utilizada nesse trabalho para estimar o conteúdo de DNA e ploidia em plantas da população Capileto, com o objetivo de seleção de plantas hexaploides. Adicionalmente, a técnica foi utilizada para avaliação de ploidia em um experimento de duplicação cromossômica. Nesta análise, 8,5% das plantas foram identificadas como hexaploides. A confirmação posterior da condição hexaploide foi realizada por meio de características estomáticas e contagem de cromossomos. Mudanças genômicas associadas com a hibridação interespecífica e aloploidização foram observadas. Os dados obtidos sugerem a eliminação de sequências de cromossomos durante a aloploidização, que pode representar uma resposta adaptativa programada ao estresse genômico causado pela hibridação e aloploidização.

O próximo estudo foi a dissertação de Ana Luiza Oliveira Timbó intitulada “Obtenção de protoplastos de híbridos triploides entre o capim-elefante e o milheto” (Timbó, 2007). Nesse trabalho, o oitavo, a autora aponta que o processo de duplicação cromossômica para a obtenção do híbrido hexaploide tem resultado em plantas na maioria mixoploides e poucas hexaploides estáveis. Devido a essa dificuldade, o objetivo foi estudar a germinação de sementes *in vitro* e a obtenção de protoplastos dos híbridos

triploides como base para futuros trabalhos de duplicação cromossômica via fusão de protoplastos e subsequente regeneração de híbridos hexaploides estáveis.

Cristiane Gouvêa Fajardo defendeu a dissertação intitulada “Estrutura de núcleos interfásicos e distribuição da heterocromatina em *Pennisetum* sp.” (Fajardo, 2008), o nono trabalho desta lista. O estudo foi realizado com o objetivo de analisar os caracteres nucleares do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), do milheto (*Pennisetum glaucum*) e do híbrido resultante deste cruzamento, bem como estabelecer o padrão de distribuição da heterocromatina do capim-elefante e do milheto por meio da técnica de bandeamento C. No capim-elefante, foram observados núcleos arreticulados e, para o milheto e o híbrido triploide, os núcleos se apresentaram semirreticulados, apesar de o híbrido apresentar uma pequena porcentagem (6%) de núcleos arreticulados, como os do parental capim-elefante. As maiores médias para as dimensões nucleares, como volume nuclear, diâmetro e raio, foram obtidas para o milheto, seguido do híbrido interespecífico e do capim-elefante. A partir da técnica de bandeamento-C, verificaram-se bandas centroméricas em todos os cromossomos do capim-elefante, enquanto no complemento cromossômico do milheto encontraram-se bandas proximais e intersticiais e menor proporção de heterocromatina constitutiva.

Com a dissertação intitulada “Variações cromossômicas associadas à poliploidização em híbridos de *Pennisetum* spp.: um estudo temporal e tecido específico”, Fernanda de Oliveira Bustamante concluiu o seu mestrado (Bustamante, 2009). Em seu trabalho foram analisados o número cromossômico, o teor de DNA em folhas e raízes e o ciclo celular de híbridos entre capim-elefante e milheto, que divergem quanto ao tempo de indução de duplicação cromossômica, sendo constatadas variações no número cromossômico para todos os híbridos avaliados, com o intervalo de 14 a 42 sendo o mais frequente.

O comportamento dos híbridos triploides duplicados há mais tempo (americanos) e mais recentemente (nacionais) foi semelhante quanto ao número cromossômico, isto é, todos apresentaram mixoploidia em células meristemáticas. Não houve variação no conteúdo de DNA entre os tecidos avaliados (folhas e raízes) de um mesmo híbrido, mas houve variação entre os híbridos. As taxas de irregularidades nas fases do ciclo celular foram muito baixas para todos os genótipos. Os resultados obtidos mostraram a dificuldade em obterem-se plantas com todo o complemento duplicado. No entanto, a eliminação cromossômica ocorrida nos híbridos pode ser uma ferramenta utilizada nos programas de melhoramento do capim-elefante.

Com base nesse histórico, percebe-se o grande volume de informações obtidas, integrando a citogenética como ciência básica e o melhoramento com um cunho mais aplicado. Seguindo essa linha de pesquisa, no presente trabalho também se deu ênfase à ciência básica, por caracterizar as raças cromossômicas oriundas do retrocruzamento do hexaploide com os parentais capim-elefante e milheto, do ponto de vista citogenético e anatômico. Mas, pela primeira vez, também são abordadas as características agronômicas e bromatológicas das raças cromossômicas e a possível utilização desses genótipos, já que os mesmos podem vir a serem lançados como novas cultivares de propagação vegetativa, caso possuam maior valor agronômico que as cultivares de capim-elefante tetraploide.

#### **2.4 Citogenética do capim-elefante, milheto e híbridos**

Os complementos cromossômicos das espécies mais conhecidas do gênero *Pennisetum* evidenciam variação no número básico de cromossomos ( $x = 5, 7, 8$  e  $9$ ), morfometria cromossômica e genômica, de acordo com os níveis de ploidia diploide a octaploide (Martel et al., 1997).

Uma relação entre o tamanho e o número cromossômico foi apresentada

por Pantulu & Rao (1982), os quais verificaram que, em todas as espécies de *Pennisetum* com  $x = 9$ , os cromossomos eram pequenos; em *P. purpureum* e *P. typhoides* (*P. glaucum*), com  $x = 7$ , os cromossomos apresentavam tamanho médio e a espécie *P. ramosum* ( $x = 5$ ) apresentou os maiores cromossomos entre os representantes da tribo Paniceae.

O germoplasma de *Pennisetum* encontra-se dividido em três conjuntos gênicos. O milheto (*P. glaucum*), com  $2n = 2x = 14$ , juntamente com duas outras espécies diploides selvagens (*P. mollissimum* e *P. violaceum*), integra o conjunto gênico primário. No segundo grupo, encontra-se o capim-elefante (*P. purpureum* Schum) com  $2n = 4x = 28$  e, no conjunto terciário, as demais espécies (Harlan & Wet, 1971; Martel et al., 1996).

O número básico de cromossomos do capim-elefante é  $x = 7$ , apresentando genoma  $2n = 4x = 28$ , um alotetraploide de constituição A'A'BB e comportamento diploide normal (Krishnaswamy & Raman, 1954; Jauhar, 1981; Martel et al., 1996; Jauhar & Hanna, 1998). Os cromossomos do genoma B ainda não têm sua origem definida (Jauhar, 1981), mas evidências de várias pesquisas têm mostrado que os cromossomos do genoma A' são homeólogos aos do genoma A do milheto (Techio et al., 2006).

O estudo da morfologia cromossômica do capim-elefante, tanto na meiose como na mitose, aponta algumas divergências entre alguns autores. A confirmação da ocorrência de variação intravarietal em *P. purpureum* permite inferir que as alterações estruturais, como deleções e adições, devem ter contribuído para aumentar ou diminuir a diferença de tamanho entre o maior e o menor cromossomo dos diferentes acessos de capim-elefante (Barbosa et al., 2003).

Segundo Pantulu & Venkateswarlu (1968), estudos sobre a morfologia dos cromossomos no paquíteno mostraram que os cromossomos 1 e 14 do capim-elefante apresentam os organizadores nucleolares e o primeiro mostrou-se



2,7 vezes maior que o último, caracterizando um cariótipo assimétrico. Para Jauhar (1981), o cariótipo do capim-elefante é constituído de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e um acrocêntrico. Com base nessas observações, o cariótipo do capim-elefante foi incluído na categoria 2b da classificação de assimetria proposta por Stebbins (1958).

Barbosa et al. (2003), estudando cinco acessos de capim-elefante do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite (BAGs 54, 63, 65, 75 e 91), relataram a presença de cromossomos metacêntricos. Contudo, foi observado, entre os sete primeiros pares de cromossomos, que há, pelo menos, dois pares submetacêntricos e, entre os sete pares restantes, ocorre pelo menos um par submetacêntrico, que foi suprimido por estar presente em todas as metáfases analisadas. Este fato, associado à diferença de comprimento relativo ser praticamente o dobro entre o maior e o menor par nos BAGs 54, 65 e 91, sugere a inclusão do cariótipo desses acessos na categoria 2b, de acordo com a classificação de Stebbins (1958). Para os acessos BAGs 63 e 75, devido à relação entre o maior e menor braço ter sido menor que 2:1, o cariótipo enquadra-se na categoria 1a - simétrico.

Techio et al. (2006) estudaram a segregação cromossômica na meiose do capim-elefante. A meiose nos acessos BAGs 63, 75 e 91 foi analisada e verificou-se frequente formação de 14 bivalentes nas diacineses e metáfases desses acessos, o que confirma que, apesar de ser alotetraploide, o capim-elefante comporta-se, em termos de segregação cromossômica, como um típico diploide.

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

Jauhar (1981) apresentou o cariótipo do milheto como simétrico devido à presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e pelo fato de o

maior deles ser 1,5 vez maior que o menor. Portanto, é incluído na categoria 1a de Stebbins (1958). Este mesmo resultado foi verificado por Barbosa et al. (2003) que observaram que, além de os cromossomos do milheto serem metacêntricos e submetacêntricos, a diferença entre o maior e o menor par de cromossomos é de 1,6 vez, classificando também o cariótipo como simétrico.

Na meiose, o milheto apresenta sete bivalentes e dois quiasmas em cada um, exceto o bivalente nucleolar, que apresenta um quiasma (Techio et al., 2006). Uma baixa taxa de anormalidade foi observada por esses autores, em que a ascensão precoce de cromossomos foi a mais frequente nos genótipos analisados. No entanto, a porcentagem de tétrades normais e a alta viabilidade do pólen mostraram que as fases subsequentes da meiose não foram afetadas e que os cromossomos adiantados foram incluídos nos núcleos em formação.

Os híbridos interespecíficos possuem  $2n = 3x = 21$  cromossomos, possuindo os genomas AA'B, dos quais sete são oriundos do diploide (2x) *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. e 14 do tetraploide (4x) *Pennisetum purpureum* Schum. Vários estudos têm evidenciado a existência de homologia/homeologia entre os sete cromossomos do genoma A' aos sete do genoma A (Jauhar, 1981; Jauhar & Hanna, 1998; Hanna, 1999; Techio et al., 2006). Os cromossomos das duas espécies são facilmente distinguíveis pelo tamanho e pela forma na placa equatorial, pois os de *Pennisetum glaucum* são de maior tamanho que os de *Pennisetum purpureum* (Burton, 1944; Barbosa et al., 2003).

Devido à sua condição triploide, o híbrido é estéril, mas a restauração da fertilidade pode ser conseguida pela duplicação do conjunto cromossômico (Hanna, 1981; Hanna et al., 1984; Dujardin & Hanna, 1985; Hanna & Dujardin, 1986; Barbosa et al., 2003), produzindo um hexaploide  $2n = 6x = 42$ , genoma AAA'A'BB, que apresenta megasporogênese e desenvolvimento do saco embrionário normal, como no capim-elefante (Hanna, 1981).

De acordo com Gonzalez & Hanna (1984), o genoma B tem um efeito

dominante sobre o genoma A em capim-elefante, com relação ao tamanho da semente, juvenilidade e características de inflorescência e folha e, por isso, os híbridos se assemelham mais ao capim-elefante.

Jauhar & Hanna (1998) também relatam a possibilidade de o genoma B exercer dominância em relação aos genomas A e A' e que, provavelmente, esse genoma seria o responsável pela semelhança fenotípica entre o capim-elefante e o híbrido hexaploide.

Krishnaswamy & Raman (1954) também consideram o genoma B dominante, pois, alterando-se a proporção do genoma A em relação ao genoma B de 2:1 para 5:1, a manifestação fenotípica do genoma B ainda é maior que a dos genomas A combinados. No híbrido com constituição genômica AAAAA'B, por exemplo, a única dose do genoma B faz com que este se assemelhe mais ao *Pennisetum purpureum*. Isso indica que o genoma B foi dominante ou, talvez, epistático, sobre as cinco doses do genoma A, em relação às características analisadas.

Abreu et al. (2006) avaliaram métodos de duplicação cromossômica com uso de agentes antimitóticos e diversos materiais botânicos como explantes dos híbridos entre capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.). Estes autores utilizaram soluções de colchicina a 50 mg L<sup>-1</sup> e 100 mg L<sup>-1</sup> e de ciclohexamida 25 mg L<sup>-1</sup>:8-hidroxiquinoleína 300 mg L<sup>-1</sup> (1:1), aplicadas *in vitro* em segmentos nodais e *in vivo* em plântulas e perfilhos, com diferentes períodos de exposição. O efeito dos antimitóticos foi avaliado por meio da taxa de sobrevivência, do número cromossômico e da presença de anomalias no ciclo celular, em meristemas de raízes das plantas sobreviventes. A colchicina apresentou melhor efeito sobre as plântulas, enquanto a ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína (1:1) atuou melhor sobre os perfilhos. Observou-se ocorrência de mixoploidia em células que apresentaram de 14 até 42 cromossomos, o que indica que houve duplicação

seguida de eliminação cromossômica, confirmada pelas aberrações cromossômicas. Das células analisadas, 86,4%, em média, apresentaram número cromossômico diferente de 21.

Análises meióticas de 5 híbridos nacionais, 4 provenientes dos Estados Unidos, sendo um deles a cultivar Paraíso, submetidos à duplicação cromossômica, foram realizadas por Paiva (2006). A autora verificou irregularidades meióticas em todos os híbridos, desde as fases iniciais da meiose até a formação de grãos de pólen. A porcentagem de células com anormalidades meióticas nos híbridos nacionais variou de 65,14% a 74,72%; nos híbridos americanos, foi de 59,46% a 70,84%. Com relação à viabilidade do grão de pólen, os híbridos nacionais apresentaram de 0,17% a 34,21% de grãos de pólen viáveis por coloração e de 0% a 30,71% de grãos de pólen viáveis por germinação; os híbridos americanos apresentaram de 2,39% a 49,96% de grãos de pólen viáveis por coloração e de 0% a 86,17% de grãos de pólen viáveis por germinação.

Bustamante et al. (2007) avaliaram esses mesmos híbridos quanto ao número cromossômico e à frequência de alterações no ciclo celular. Os autores verificaram que os números cromossômicos somáticos dos genótipos hexaploides variaram de 14 a 42, tendo todos os genótipos apresentado células com 40 cromossomos. Esse resultado indica que houve duplicação em todos os genótipos, mas que os cromossomos foram sendo perdidos, tornando as plantas mixoploides. Com relação à frequência de alterações no ciclo celular, os autores verificaram que a perda de cromossomos deve-se à ocorrência de anormalidades, como metáfase com ascensão precoce de cromossomos, anáfase com cromossomos atrasados, anáfase com ponte e cromossomos stickiness.

Techio et al. (2006) estudaram a viabilidade do grão do pólen de acessos híbridos interespecíficos triploides por meio de germinação *in vitro* e coloração com carmim propiônico, orceína acética e corante de Alexander. Os acessos

foram obtidos junto à coleção de germoplasma da Embrapa Gado de Leite. Os autores verificaram altas taxas de pólenes funcionais com os corantes nucleares, mas, com o corante de Alexander, a esterilidade dos acessos foi confirmada.

Barbosa et al. (2007) realizaram estudo para duplicar o complemento cromossômico de híbridos triploides de capim-elefante e milho para a obtenção de plantas hexaploides férteis. *Seedlings*, plântulas e segmentos caulinares cultivados *in vitro* foram tratados com colchicina a 0,05% ou a 0,1%, aplicada por 12 ou 24 horas. *Seedlings* de genótipos híbridos diferentes e meristemas de dois híbridos interespecíficos cultivados *in vivo* foram tratados por 24 horas com colchicina a 0,05%. A duplicação cromossômica foi confirmada pela contagem de cromossomos em células meristemáticas de pontas de raízes. A viabilidade polínica, os testes de germinação *in vitro* e a produção de sementes foram utilizados para avaliar a fertilidade dos hexaploides. *Seedlings* cultivados *in vitro* e tratados com colchicina a 0,1% por 24 horas tiveram melhor resposta à indução de poliploidia; em 38% das plantas sobreviventes, obtiveram-se o conjunto cromossômico duplicado e a presença de pólenes viáveis, confirmando a fertilidade dos hexaploides. Esta estratégia permitirá o uso de hexaploides em programas de melhoramento genético do capim-elefante, por meio da transferência de alelos com as características desejadas, tornando possível sua propagação via semente.

Os resultados mostram a possibilidade de se obter plantas com todo o complemento cromossômico duplicado e com ciclo celular estável e que poderiam ser utilizados em programas de melhoramento do capim-elefante. Nota-se que há produção de grãos de pólenes viáveis e também existe a possibilidade de se obter raças cromossômicas, pois algumas perdas cromossômicas podem levar à estabilização de um complemento completo do capim-elefante acrescido de um ou alguns cromossomos de interesse, oriundos do milho.

## **2.5 Alterações genômicas em hibridações interespecíficas**

Plantas aloploidoides são híbridos que podem conter duas cópias do genoma de cada parental, mas também há casos em que um parental pode contribuir com maior número de genomas que o outro (exemplo do triploide AA'B entre capim-elefante e milho). Enquanto os aloploidoides naturais são bem adaptados, aqueles obtidos pelo homem são tipicamente instáveis, exibindo transformações homeóticas e letalidade, assim como rearranjos cromossômicos e mudanças no número e na distribuição de sequências de DNA repetitivo da heterocromatina (Comai, 2000).

Ridle & Birchler (2003) apontam que a nova constituição genômica produzida após a fertilização interespecífica conduz a reorganizações genéticas e epigenéticas, pois dois genomas diferentes são combinados dentro de um núcleo, podendo resultar em conflitos intergenômicos.

Adams & Wendel (2005) relatam que a poliploidia é uma das forças evolutivas mais penetrantes e que os genes duplicados na primeira geração do processo de poliploidização podem sofrer silenciamento. Eventos epigenéticos, como mudanças na metilação de citosinas e modificações em histonas, teriam papel relevante no silenciamento gênico. Doyle et al. (2008) explicam que o profundo efeito da poliploidia na expressão dos genes parece ser causado mais pelo efeito da hibridização do que pela duplicação do genoma e que os mecanismos epigenéticos envolvidos ainda são pobremente entendidos. Os mesmos autores comentam, ainda, que a retenção preferencial ou a perda de genes ocorrem em um grande número de taxas, sugerindo que existem eventos específicos que governam os genes duplicados. Estudos posteriores seriam requeridos para elucidação desses eventos, envolvendo diferentes famílias de plantas, tipos de poliploidia e poliploides de diferentes idades. Levy & Feldman (2004) analisaram alterações na estrutura e na expressão do genoma em aloploidoides naturais e sintéticos de trigo. Os autores encontraram rápida

evolução do genoma por meio da geração instantânea de variabilidade, levando a eliminação de sequências de DNA, mudanças epigenéticas como a metilação de sequências codantes e não codantes de DNA, silenciamento gênico e ativação de retroelementos que alteram a expressão de genes adjacentes. Todas essas mudanças, assim como a eliminação de sequências não codantes, aumentam a diferenciação dos cromossomos homeólogos na ploidia, levando à divergência física entre os cromossomos homeólogos e contribuindo para que o comportamento meiótico do poliploide seja semelhante ao do diploide. Shaked et al. (2001), também trabalhando com trigo, demonstraram a eliminação de sequências curtas não aleatórias do genoma em aloploidos recém-sintetizados.

Na família Poaceae, Kopecky et al. (2006) estudaram o híbrido oriundo do cruzamento de *Lolium multiflorae* x *Lolium perenne*, também chamado Festulolium, amplamente utilizado como forrageira. Esse híbrido reúne características agrônomicas superiores, como produtividade, boa palatabilidade e digestibilidade, quando comparado aos parentais. Usando técnicas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e hibridação genômica fluorescente (GISH), os autores analisaram a constituição genômica de 600 híbridos e encontraram grande variação na proporção dos genomas parentais, extensas recombinações intergenômicas e eliminações de cromossomos específicos e grupos de cromossomos.

Diversos outros autores também relatam a eliminação somática total ou parcial de cromossomos em cruzamentos interspecíficos em gramíneas. Laurie & Bennett (1986), a partir de hibridização entre trigo hexaploide (*Triticum aestivum*) e milho (*Zea mays*), obtiveram um zigoto híbrido com um lote cromossômico completo de cada parental, tendo os cromossomos de milho sido subsequentemente eliminados. Os autores evidenciam o potencial desse sistema para a produção de trigo haploide e a transferência de segmentos de DNA do

milho, incluindo elementos transponíveis, para o trigo.

Laurie & Bennett (1989) estudaram o desenvolvimento inicial de sementes em cruzamentos entre o genótipo “Chinese Spring”, de trigo hexaploide e “Sêneca 60”, de milho, para determinar o tempo de eliminação dos cromossomos de milho. Esses autores verificaram que um ou mais cromossomos de milho são eliminados em cerca de 70% da primeira mitose zigótica. Células zigóticas com dois núcleos já tinham de 5 a 10 cromossomos menos do que aquelas com um núcleo e cerca de metade dos zigotos com 4 células embrionárias não mais continha cromossomos de milho, tendo a outra metade de 1 a 5. Todos os embriões com quatro ou mais células continham micronúcleos. Como hipótese para explicar a eliminação cromossômica do híbrido, os autores propõem que houve assincronia na síntese de nucleoproteínas, levando à perda de cromossomos com segregação tardia.

A eliminação somática total ou parcial de cromossomos de uma das espécies parentais em cruzamentos interespecíficos na família Poaceae também foi relatada, por Barclay (1975), para *Triticum aestivum* x *H. vulgare*; por Riera-Lizarazu et al. (1996), para *Avena sativa* x *Zea mays*; por Linde-Laursen & Bothmer (1999), para *Hordeum lechleri* x *H. vulgare* e por Gernand et al. (2005), para *Triticum aestivum* x *Pennisetum glaucum*.

Os híbridos provenientes do cruzamento entre trigo e milheto foram estudados por Gernand et al. (2005), que observaram eliminação uniparental dos cromossomos do milheto com formação de micronúcleos, fragmentação e heterocromatinização do DNA. A eliminação cromossômica iniciou-se logo após a fertilização, como relatado por Laurie & Bennett (1989) e Mochida et al. (2004), e os cromossomos ou fragmentos eliminados não se alinharam corretamente na metáfase, segregando tardiamente na anáfase e formando micronúcleos. Os cromossomos do milheto ocuparam posição periférica no núcleo interfásico, sofrendo fragmentação durante a replicação do DNA.



Abreu et al. (2006) estudaram o fenômeno da mixoploidia que ocorre em híbridos de capim-elefante e milho tratados com agentes antimitóticos e observaram números cromossômicos variando de 14 a 42 cromossomos nas metáfases analisadas, bem como anormalidades citológicas, como anáfases com cromossomos atrasados, cromossomos não orientados na metáfase e formação de micronúcleos.

Barbosa et al. (2007) tentaram restaurar a fertilidade de híbridos entre capim-elefante e milho para a produção de um hexaploide estável a partir da utilização de soluções de colchicina em diversas concentrações aplicadas em 'seedlings', plântulas e segmentos caulinares. A duplicação cromossômica pela presença de pólenes viáveis foi confirmada em 38% das plantas sobreviventes e, assim como no trabalho de Abreu et al. (2006), mixoploidia com número cromossômico variando de 14 a 42 também foi detectada.

Campos et al. (2009b) trabalharam em um método eficiente para tratar híbridos triploides de capim-elefante e milho com colchicina, para posterior obtenção de hexaploides. Para identificação dos hexaploides, os autores utilizaram citometria de fluxo, contagem cromossômica e análise da morfologia de estômatos. Das 480 plântulas triploides tratadas com colchicina, 200 sobreviveram e foram analisadas por citometria de fluxo para determinar sua ploidia, sendo 17 hexaploides, 115 mixoploides e 68 triploides. A alta porcentagem de mixoploides encontrada concorda com trabalhos anteriores que relatam a perda de cromossomos e sequências de DNA quando diferentes genomas são reunidos em um mesmo núcleo.

## **2.6 Aplicações da citometria de fluxo**

A análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear em células em interfase e metáfase é uma excelente alternativa aos métodos microscópicos clássicos de contagem de cromossomos. Comparativamente, a

citometria de fluxo apresenta as seguintes vantagens: é mais conveniente (a preparação da amostra é fácil), rápida (processamento de dezenas de amostras num único dia de trabalho), não necessita de células em divisão, é uma metodologia não destrutiva (uma amostra pode ser preparada, por exemplo, a partir de 50 mg de tecido foliar) e é capaz de detectar mixoploidias. Por essas razões, a citometria de fluxo é uma metodologia utilizada em diferentes áreas que vão desde a investigação básica até ao melhoramento de plantas e indústria (Doležel, 1997).

Segundo Heslop-Harrison & Schwarzacher (2001), a citometria de fluxo é uma técnica utilizada para mensurar o conteúdo de DNA de núcleos, permitindo avaliar o nível de ploidia, fazer comparações intra e interespecíficas do tamanho nuclear e avaliar o teor de DNA de cada cromossomo do complemento de uma espécie. A quantidade de DNA em células vegetais pode ser medida por meio de um procedimento relativamente simples, sendo possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucas gramas de tecido foliar macerado em solução tampão que mantém a integridade nuclear (Galbraith et al., 1983).

O princípio da técnica de citometria de fluxo (Dolezel & Bartos, 2005) está relacionado às propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos, organelas) que fluem em uma suspensão líquida. As partículas em suspensão movem-se emergidas num fluido (tampão de extração) no interior de um capilar dentro de um aparelho denominado citômetro de fluxo (Dolezel, 1997). Essas partículas intersectam, uma a uma, um feixe de laser ocorrendo um processo de dispersão da luz e ou emissão de fluorescência (Dolezel & Bartos, 2005). A intensidade de dispersão da luz ou da emissão de fluorescência está relacionada com as propriedades das partículas que estão sendo analisadas (Dolezel & Bartos, 2005). A técnica tem uma série de aplicações, desde a pesquisa básica até o melhoramento de plantas,

entre elas, estimação do tamanho do genoma, avaliação de ploidia, detecção de mixoploidia e aneuploidias, avaliação de ciclo celular, estudo de eliminação cromossômica, separação de células, cromossomos ou organelas (Dolezel & Bartos, 2005).

Diversos trabalhos utilizaram a citometria de fluxo como eficiente ferramenta para a medição da quantidade de DNA da célula em picogramas (pg). Suda (2002) analisou o nível de ploidia do gênero *Empetrum*, representado na Europa por dois taxa intimamente relacionados: o diploide *E. nigrum s. stricto* ( $2n = 2x = 26$ ) e o tetraploide *E. hermaphroditum* ( $2n = 4x = 52$ ), havendo discordância entre os botânicos quanto à classificação desse taxa. Este autor estudou 71 amostras do gênero, coletadas em 32 localidades da Suécia, Noruega e Dinamarca, para determinação do nível de ploidia por citometria de fluxo. A espécie diploide foi encontrada em 10 localidades, a tetraploide em 24, havendo áreas de coexistência de ambas. Nesses locais, um novo nível de ploidia foi detectado, provavelmente originado de indivíduos triploides híbridos. Os valores 2C foram de 1,29 pg, 1,94 pg e 2,56 pg, para os níveis 2x, 3x e 4x de DNA, respectivamente.

Souza et al. (2004) estudaram a variação no tamanho do genoma nuclear de 8 taxas do gênero *Passiflora*, utilizando citometria de fluxo por meio de núcleos corados com iodeto de propídeo. Os autores verificaram que o conteúdo de DNA variou de 3,16 a 5,36 pg de DNA para os diploides e 1,83 pg de DNA para tetraploides. Diferenças no tamanho do genoma nuclear entre as diversas espécies de *Passiflora* foram observadas, e o maior valor era 192% maior que o menor.

Para determinar o nível de ploidia de embriões somáticos de *Vitis vinifera* L. derivados de plantas obtidas a partir de cultura de anteras, Leal et al. (2006) utilizaram a técnica de citometria de fluxo. Apenas uma entre as 41 plantas analisadas (2,4%) apresentou variação somaclonal (tetraploidia); as

outras plantas foram diploides. Diferenças significativas não foram detectadas entre os materiais diploides e as plantas progenitoras de campo. Plantas haploides ou aneuploides não foram observadas. O conteúdo de DNA nuclear de nove cultivares de *Vitis vinifera* também foi estimado utilizando-se citometria de fluxo e variação não significativa do conteúdo de DNA foi observada (1,17 pg/2C a 1,26 pg/2C). Esses resultados e outros estudos prévios em espécies de *Vitis vinifera* sugerem que o genoma de *Vitis* é estável quanto ao conteúdo de DNA nuclear.

Para a família Poaceae, também existem diversos relatos da utilização da citometria de fluxo. Vilhar et al. (2002) estudaram cinco populações naturais de *Dactylis glomerata* L. oriundas de diferentes altitudes nos Alpes do norte da Eslovênia para determinar a ocorrência de subespécies. O comprimento dos estômatos, o diâmetro de pólen e a contagem cromossômica foram consistentes com o taxon tetraploide *D. glomerata* subsp *glomerata* ( $2n = 2x = 28$ ). O tamanho do genoma foi medido em 55 indivíduos e o valor médio 2C foi de 8,6 pg de DNA. A média dos valores 2C de populações que cresciam em diferentes altitudes mostrou apenas 2,1% de variação, não sendo observada correlação entre altitude e tamanho do genoma.

Martel et al. (1997) determinaram a quantidade de DNA para 15 espécies pertencentes aos três conjuntos gênicos de *Pennisetum*, caracterizando diferentes níveis de ploidia e variabilidade para todos os números básicos ( $x = 5, 7, 8$  e  $9$ ). O autor relata que as espécies cultivadas *P. purpureum* e *P. glaucum* apresentam níveis de ploidia, números cromossômicos e morfometria cariotípicas diferentes, mas que os genomas são praticamente iguais quanto à quantidade de DNA (4,59 e 4,71 pg, respectivamente).

Trabalhando com híbridos triploides entre capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.) e milheto (*P. glaucum* (L.) R. Br.), Campos et al. (2009a) objetivaram estabelecer um protocolo eficiente de embriogênese

somática e avaliar, por citometria de fluxo, a estabilidade genômica das plantas obtidas *in vitro*. Os autores detectaram que a quantidade de DNA nuclear e a ploidia das plantas regeneradas foram estáveis e homogêneas, em comparação às das plantas controle.

Os mesmos autores (Campos et al., 2009b) utilizaram um método *in vitro* eficiente, proposto por Barbosa et al. (2007), utilizando plântulas triploides oriundas do cruzamento entre capim-elefante e milho tratadas com colchicina para a produção de híbridos hexaploides e sua subsequente identificação por citometria de fluxo. Nesse estudo, a partir de materiais oriundos do programa de melhoramento genético do capim-elefante da Embrapa Gado de Leite, foram utilizadas a contagem cromossômica e a análise da morfologia de estômatos para a análise de ploidia dos híbridos hexaploides obtidos. Quatrocentas e oitenta sementes triploides, representando 12 diferentes híbridos, foram submetidas à duplicação cromossômica. As plantas sobreviventes (200) foram submetidas à citometria de fluxo, das quais 17 foram hexaploides (8,5%), 115 mixoploides (57,5%) e 68 triploides (34%). A contagem cromossômica foi feita apenas nas plantas identificadas como hexaploides. A partir de 6 plantas triploides e hexaploides (controle), o tamanho e a frequência dos estômatos foram analisados. A posterior confirmação da condição hexaploide foi feita por meio da morfologia estomática (redução da frequência estomática e aumento do comprimento dos estômatos) e da contagem cromossômica ( $2n = 2x = 42$ ).

## **2.7 Anatomia de estômatos e sua aplicação no melhoramento**

O estudo da anatomia foliar tem grande importância para a ecologia e fisiologia, além de ter aplicação para a fitopatologia e o melhoramento genético. Estudos anatômicos assumem maior importância quando associados aos aspectos ecológicos, fisiológicos e comparativos, subsidiando trabalhos taxonômicos (Metcalf & Chalk, 1979). Pela anatomia da epiderme foliar pode-se

inferir sobre a absorção de nutrientes nas faces abaxial e adaxial, levando ao aumento da eficiência da aplicação foliar de nutrientes (Leece, 1976; Kannan, 1980). Também é importante identificar estruturas que atuam na resistência de plantas a patógenos, para subsidiar estudos de fitopatologia e melhoramento genético.

Estômatos são pequenas estruturas epidérmicas existentes principalmente nas folhas, mas podem ser encontrados em frutos, flores e caules jovens. Os estômatos são formados por duas células estomáticas (células guardas), que delimitam uma fenda (ostíolo), duas ou mais células anexas (acessórias ou subsidiárias) adjacentes e uma câmara subestomática, a qual está em conexão com os espaços intercelulares. Por meio dos estômatos há comunicação direta do interior da planta com o ambiente. O número de estômatos nas folhas varia entre 1000 e 100.000 por  $\text{cm}^2$ , em diversas famílias. O tamanho médio varia de 3 a 12  $\mu\text{m}$  de largura por 7 a 40  $\mu\text{m}$  de comprimento e, quando abertos, 100  $\mu\text{m}$  quadrados de área ocupando cerca de 1% a 2% da área foliar total. Pode localizar-se nas duas faces das folhas (superior e inferior), variando de acordo com a espécie (Apezzato-da-Gloria & Carmello-Guerreiro, 2003).

A densidade, o tamanho e a posição dos estômatos na folha influenciam o processo de trocas gasosas e estão de acordo com a proporção de transpiração da planta, sendo sua densidade também influenciada pelas condições ambientais de estresse (Stenglein et al., 2005).

Entre outras utilidades na citogenética e no melhoramento de plantas, o estudo do número e do comprimento dos estômatos pode ser útil na confirmação do nível de ploidia. Silva et al. (2000) estudaram o efeito da colchicina em corpos semelhantes a protocormos de *Cattleya intermedia* L. (Orchidaceae). Diferentes concentrações da droga (0,00%, 0,05%, 0,10% e 0,20%), bem como diferentes tempos de cultura (4 ou 8 dias), foram testadas para determinar o

melhor tratamento para a indução de plantas tetraploides. Dos três níveis de colchicina aplicados, os tratamentos com 0,05% e 0,10% da droga parecem ser mais efetivos na produção de mixoploides e tetraploides, podendo tais tratamentos ser utilizados em programas de melhoramento. Como critério para distinção entre diploides e tetraploides, foram realizadas medidas de área e densidade de estômatos das folhas. Os resultados sugerem que as plantas tetraploides podem ser identificadas com elevado grau de certeza, quando a seleção é realizada com base na densidade de estômatos.

A análise estomática de três híbridos somáticos de citros obtidos por fusão de protoplastos foi realizada por Costa et al. (2004). Folhas jovens dos híbridos somáticos e dos seus respectivos parentais foram coletadas e preparadas para observações em microscópio eletrônico de varredura. Os híbridos somáticos poliploides apresentaram menor número de estômatos por área, com maior tamanho individual, quando comparados com as plantas diploides parentais. Não foram observadas diferenças no arranjo interno das células estomáticas entre as plantas parentais e os híbridos somáticos.

No trabalho de Vichiato et al. (2006) o objetivo foi comparar plantas diploides ( $2n = 2x = 38$ ) e tetraploides induzidos ( $2n = 4x = 76$ ) de *Dendrobium nobile* Lindl., mediante análises estomática das folhas e de crescimento das plantas. Para a análise estomática, foram coletadas folhas completamente expandidas do terceiro nó, que foram submetidas aos procedimentos usuais em microtécnica vegetal para microscopia de luz e eletrônica de varredura. Foram avaliados a frequência estomática, a frequência das outras células epidérmicas, o índice estomático, o diâmetro polar e equatorial dos estômatos e a relação entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial. *D. nobile* apresentou estômatos elípticos, com laterais gradualmente inclinadas, sendo o tamanho dos estômatos inversamente proporcional ao nível de ploidia. As plantas poliploides apresentaram menor crescimento quando comparadas com as diploides.

Portanto, foi possível distinguir plantas de *D. nobile* diploides das plantas tetraploides utilizando as análises estomáticas e morfométricas.

Vichiato et al. (2006) acrescentam que a análise estomática é uma metodologia fácil e simples, que possibilita a identificação de supostos poliploides e testemunhas diploides de um ensaio, por meio da contagem e da medição comparativa de estômatos, uma vez que o comprimento dos mesmos normalmente aumenta com o número de cromossomos. No entanto, alguns autores enfatizam que a análise estomática nem sempre é eficiente e segura, devido aos efeitos genéticos e da análise individual de algumas variáveis, que podem ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos em relação ao nível de ploidia (Vandenhout et al., 1995; Magallanes et al., 1996).

A determinação citomorfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) obtidos por cruzamentos interespecíficos foi estudada por Magallanes et al. (1996). Visando à introgressão de genes de espécies selvagens que podem contribuir para a maximização da heterozigose, a produção de di-haploides ( $2n = 2x = 24$ ) de *Solanum tuberosum* L. foi utilizada com o indutor *Solanum phureja* Juz. E Buk. Por meio dessa técnica obtêm-se clones diploides, triploides e tetraploides. Os autores concluíram que, dos métodos citomorfológicos utilizados para a discriminação das ploidias, somente a avaliação do número de cloroplastos das células guardas dos estômatos foi eficiente, não tendo a densidade estomática discriminado satisfatoriamente os clones de diversas ploidias.

Características morfoanatômicas da epiderme foliar de plantas variantes e não variantes somaclonais de bananeiras (*Musa* sp. Colla cv. Prata-Anã) cultivadas *in vitro* foram estudadas por Lacerda et al. (2008). O objetivo do trabalho foi averiguar as diferenças morfoanatômicas da epiderme foliar na tentativa de diferenciar as plantas de ‘Prata-Anã’ em relação aos seus variantes somaclonais que apresentam a característica de gigantismo. A análise por



microscopia eletrônica de varredura mostrou uma diferença significativa entre o diâmetro polar dos estômatos da 'Prata-Anã' não variante e suas variantes, ambas em condições *in vitro*, tendo sido observado que o mesmo não ocorre para as plantas *in vivo*. O número médio de estômatos é menor nas plantas variantes somaclonais, porém, sem diferenças significativas, a não ser para a planta PIII. Conclui-se que os caracteres morfoanatômicos da epiderme foliar, densidade estomática e diâmetro estomático polar atuam como marcadores morfológicos para caracterizar as plantas micropropagadas de 'Prata-Anã' em relação aos seus variantes somaclonais para a característica gigantismo.

Campos et al. (2009b), visando confirmar a ploidia de plântulas triploides oriundas do cruzamento entre capim-elefante e milho tratadas com colchicina para a produção de híbridos hexaploides, analisaram a morfologia de estômatos. Quatrocentas e oitenta sementes triploides, representando doze diferentes híbridos, foram submetidas à duplicação cromossômica. As plantas sobreviventes (200) foram submetidas à citometria de fluxo, das quais 17 foram hexaploides (8,5%), 115 mixoploides (57,5%) e 68 triploides (34%). A posterior confirmação da condição hexaploide foi feita por meio da morfologia estomática, havendo redução da frequência estomática e aumento do comprimento dos estômatos. Os autores encontraram redução na frequência estomática de, aproximadamente, 48,83% e 44,83% nas plantas hexaploides, para a superfície abaxial e adaxial, respectivamente. Considerando todos os comprimentos estomáticos avaliados (polar e equatorial das superfícies abaxial e adaxial), o tamanho dos estômatos nas plantas hexaploides foi 1,52 vez maior do que o observado nas plantas triploides. Nas plantas mixoploides, o tamanho e o comprimento dos estômatos foram intermediários entre aqueles observados nas plantas triploides e hexaploides. Por meio deste estudo, mostrou-se que características estomáticas diferem marcadamente entre plantas triploides e hexaploides.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ADAMS, K.L.; WENDEL, J.F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Boston, v.8, n.2, p.135-141, Apr. 2005.

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

ALONSO, L.C.; KIMBER, G. The analysis of meiosis in hybrids. II: triploid hybrids. **Genome**, Ottawa, v.23, n.2, p.221-234, Feb. 1981.

ALVES DE BRITO, C.J.F.; RODELLA, R.A.; DESCHAMPS, F.C. Anatomia quantitativa e degradação *in vitro* de tecidos em cultivares de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schumack). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.28, n.2, p.223-229, mar. 1999.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.N. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p.109-127.

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

BARBOSA, S. **Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim elefante e milheto**. 2004. 119p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BARBOSA, S.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V. Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* Schmach x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents.

**Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.26-35, jan./fev. 2003.

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

BARCLAY, I.R. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. **Nature**, London, v.256, n.7, p.410-411, July 1975.

BARRETO, G.P.; LIRA, M.A.; SANTOS, M.V.F.; DUBEUX JUNIOR, J.C.B. Avaliação de clones de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e de um híbrido com o milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) submetidos a estresse hídrico, I: parâmetros morfológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.30, n.1, p.1-6, jan. 2001.

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

BOTREL, M.A.; PEREIRA, A.V.; FREITAS, V.P.; XAVIER, D.F. Potencial forrageiro de novos clones de capim elefante. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.29, n.2, p.334-340, mar. 2000.

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

BURTON, G.W. Hybrids between napier grass and cattail millet. **The Journal of Heredity**, Washington, v.35, n.8, p.227-232, Aug. 1944.

BUSTAMANTE, F.O. Variações cromossômicas associadas à poliploidização em híbridos de *Pennisetum* spp.: um estudo temporal e tecido específico. 2009. 57p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BUSTAMANTE, F.O.; PAIVA, E.A.A.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V. Análise mitótica de híbridos hexaploides entre capim elefante e milheto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., 2007, São Lourenço. **Anais...** São Lourenço: Setor Forrageiras, 2007. 1 CD-ROM.

CAMPOS, J.M.S. **Análise genômica por citometria de fluxo no melhoramento de plantas *Pennisetum sp.*** 2007. 136p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAMPOS, J.M.S.; CALDERANO, C.A.; PEREIRA, A.V.; DAVIDE, L.C.; VICCINI, L.F.; SANTOS, M.O. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum sp.* e avaliação de estabilidade genômica por citometria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.1, p.38-44, jan. 2009a.

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

CHAPMAN, C.G.D.; KIMBER, G. Developments in the meiotic analysis of hybrids. I: review of theory and optimization in triploids. **Heredity**, London, v.68, n. 5, p.97-103, May 1992.

COMAI, L. Genetic and epigenetic interaction in allopolyploid plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.43, n.2/3, p.387-399, June 2000.

COSTA, M.A.P.C.; ALMEIDA, W.A.B.; FILHO, F.A.A.M.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Stomatal analysis of citrus somatic hybrids obtained by protoplast fusion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.3, p.297-300, mar. 2004.

DIZ, D.A. **Breeding procedures and seed production management in pearl millet x elephant grass hexaploid hybrids.** Florida: University of Florida, 1994. 118p.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v.38, n.3, p.285-302, Mar. 1997.

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.

DOYLE, J.J.; FLAGEL, L.E.; PATERSON, A.H.; RAPP, R.A.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; JONATHAN, F.; WENDEL, J.F. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.42, p.443-461, Dec. 2008.

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

FAJARDO, C.G. **Estrutura de núcleos interfásicos e distribuição da heterocromatina em *Pennisetum sp.*** 2008. 45p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

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

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

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

HANNA, W.W. Melhoramento do capim elefante. In: PASSOS, L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A.V. (Ed.). **Biologia e manejo do capim elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p.17-28.

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

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

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

HANNA, W.W.; MONSON, W.G. Yield, quality, and breeding behavior of pearl millet x napiergrass interspecific hybrids. **Agronomy Journal**, Madison, v.72, p.358-360, Mar. 1980.

HARLAN, J.R.; WET, J.M.J. de. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, Utrecht, v.20, n.4, p.509-517, Aug. 1971.

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

HRISHI, N.J. Studies on the cytogenetics of six species of *Pennisetums* and their comparative morphology and anatomy. **Genetica**, Netherlands, v.26, n.1, p.280-356, Dec. 1953.

HUMPHREYS, L.R.; RIVEROS, F. **Tropical pasture deed production**. 3. ed. Roma: FAO, 1986. 203p. (FAO Plant Production and Protection Paper, 8).

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

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

KANNAN, S. Mechanisms of foliar uptake of plant nutrients: accomplishments and prospects. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.2, n.6, p.717-735, June 1980.

KATIVU, S.; MITHEN, R. *Pennisetum* in southern Africa. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v.73, p.1-8, Apr. 1987.

KOPECKY, D.; LOUREIRO, J.; ZWIERZYKOWSKI, Z.; GHESQUIERE, M.; DOLEZEL, J. Genome constitution and evolution in *Lolium & Festuca* hybrid cultivars (Festulolium). **Theoretical and applied genetics**, Berlin, v.113, n.4, p.731-742, Aug. 2006.

KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V.S. Studies on the interspecific hybrid of *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. x *P. purpureum* Schumach. III: the cytogenetics of the colchicine-induced amphidiploid. **Genetica**, Netherlands, v.27, n.1, p.253-272, Dec. 1954.

LACERDA, G.A.; COSTA E SILVA, J.O.; ABREU, J.C.; ALVES, E.; PAIVA, L.V. Características morfoanatômicas da epiderme foliar de plantas variantes e não variantes somaclonais de bananeiras (*Musa* sp. Colla cv. Prata-anã) cultivadas *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v.22, n.1, p.85-90, mar. 2008.

LAURIE, D.A.; BENNETT, M.D. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat x maize crosses. **Genome**, Ottawa, v.32, n.4, p.953-961, Apr. 1989.

LAURIE, D.A.; BENNETT, M.D. Wheat x Maize hybridization. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v.28, n.9, p.313-316, Sept. 1986.

LEAL, F.; LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; PAIS, M.S.; SANTOS, C.; PINTO-CARNIDE, O. Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.25, n.9, p.978-985, Sept. 2006.

LEECE, D.R. Composition and ultrastructure of leaf cuticles from fruit trees, relative to differential foliar absorption. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.3, n.6, p.833-847, June 1976.

LEVY, A.A.; FELDMAN, M. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. **Biological Journal**, London, v.82, n.4, p.607-613, Aug. 2004.

LIMA, E.S.; SILVA, J.F.C. da; VASQUEZ, H.M.; ARAUJO, S.A.C.; LISTA, F.N.; COSTA, D.P.B. Produção de matéria seca, proteína bruta e relação folha/colmo de genótipos de capim elefante, aos 56 dias de rebrota. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.36, n.5, p.1518-1523, out. 2007.

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

MAGALLANES, M.G.R.; PINTO, C.A.B.P.; DAVIDE, L.C. Determinação cito-morfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) obtidos por cruzamentos interespecíficos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.20, n.4, p.480-484, out. 1996.

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

MARTEL, E.; PONCET, V.; LAMY, F.; SILJAK, Y.S.; LEJEUNE, B.; SARR, A. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v.61, n.1, p.1-17, Nov. 2004.

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

MARTINS-COSTA, R.H.A.; CABRAL, L.S.; BHERING, M.; ABREU, J.G.; ZERVOUDAKIS, J.T.; RODRIGUES, R.C.; OLIVEIRA, I.S. Nutritive value of the elephant-grass obtained on different cut ages. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.9, n.3, p.397-406, jul./set. 2008.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon, 1979. 276p.

MOCHIDA, K.; TSUJIMOTO, H.; SASAKUMA, T. Confocal analysis of chromosome behaviour in wheat x maize zygotes. **Genome**, Ottawa, v.47, n.1, p.199-205, Feb. 2004.

OSGOOD, R.V.; HANNA, W.W.; TEW, T.L. Hybrids seed production or pearl millet x napiergrass triploid hybrids. **Crop Science**, Madison, v.37, n.3, p.998-999, June 1997.

PAIVA, E.A.A. **Meiose em híbridos hexaploides de capim elefante e milheto**. 2006. 53p. Tese (Dissertação em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.



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

PANTULU, J.V.; VENKATESWARLU, J. Morphology of pachytene chromosome of *Pennisetum purpureum* Schum. **Genetica**, Grauenhage, v.39, n.5, p.41-44, May 1968.

PEREIRA, A.V. Germoplasma e diversidade genética do capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). In: PASSOS, L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A.V. (Ed.). **Biologia e manejo do capim elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p.17-28.

PEREIRA, A.V.; CRUZ, C.D.; FERREIRA, R.P.; BOTREL, M.A.; OLIVEIRA, J.S. Influência da estabilização de genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* schum.) sobre a estimativa da repetibilidade de características forrageiras. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.4, p.762-767, jul. 2002.

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

PEREIRA, A.V.; SOUZA SOBRINHO, F.; SOUZA, F.H.D.; LÉDO, F.J.S. Tendências no melhoramento genético e produção de sementes de forrageiras no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 7., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 1 CD-ROM.

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

PIRES, M.B.G.; FREITAS, E.A.G.; TRINDADE, D.S.; QUADROS, A.T.F. Estabelecimento de um sistema de digestibilidade in vitro no laboratório da equipe de pesquisa em nutrição animal da Secretaria da Agricultura. **Anuário Técnico do IPZFO**, Porto Alegre, v.6, p.345-385, 1979.

POWELL, J.; HANNA, W.; BURTON, G. Origin, cytology, and reproductive characteristic of haploids in pearl millet. **Crop Science**, Madison, v.15, n.3, p.389-392, May 1975.

REIS, M.C.; SOUZA SOBRINHO, F.; RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F.; LEDO, J.F.S.; PEREIRA, A.V. Allohexaploid pearl millet x elephantgrass population potential for a recurrent selection program. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.2, p.195-199, fev. 2008.

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

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

SALERNO, A.R.; VETTERLE, C.P.; DESCHAMPS, F.C.; FREITAS, E.A.G. **Gramíneas forrageiras estivais perenes no Baixo Vale do Itajaí**. Florianópolis: EMPASC, 1990. 99p. (EMPASC, Boletim Técnico 49).  
SCHMELZER, G.H. Review of *Pennisetum* section *Brevivalvula* (Poaceae). **Euphytica**, Netherlands, v.97, n.1, p.1-20, Sept. 1997.

SHAKED, H.; KASHKUSH, K.; OZKAN, H.; FELDMAN, M.; LEVY, A.A. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproductible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploid in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v.13, n.8, p.1749-1759, Aug. 2001.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 1990. 165p.

SILVA, P.A.K.X.M.; CALEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* lindl. (orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.105-111, jan. 2000.

SOEST, P.J. van. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.

SOUZA, M.M.; PALOMINO, G.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; VIANA, A.P. Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. **Hereditas**, Lund, v.141, n.1, p.31-38, Aug. 2004.

SOUZA SOBRINHO, F.; LÉDO, J.F.S.; PEREIRA, A.V.; OLIVEIRA, J.S. Evaluation of the potential of propagation by seed of hexaploid elephant-grass. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.974-977, maio/jun. 2008.

SOUZA SOBRINHO, F.; PEREIRA, A.V.; LEDO, J.F.S.; BOTREL, M.A.; OLIVEIRA, J.S.; XAVIER, D.F. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim elefante e milheto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.9, p.873-880, set. 2005.

STEBBINS, G.L. Longevity, habitat, release of genetic variability in the higher plants. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, v.23, n. 1, p.365-387, 1958.

STENGLEIN, S.A.; ARAMBARRIA, A.M.; SEVILLANOD, M.D.C.M.; BALATTI, P.A. Leaf epidermal characters related with plant's passive resistance to pathogens vary among accessions of wild beans *Phaseolus vulgaris* var. aborigineus (Leguminosae – Phaseoleae). **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, Jena, v.200, n.3, p.285-295, July 2005.

SUDA, J. New DNA ploidy level in *Empetrum* (Empetraceae) revealed by flow cytometry. **Annales Botanici Fennici**, Helsinki, v.39, p.133-141, June 2002.

TCACENCO, F.A. Seleção de caracteres para a classificação de três cultivares de capim elefante. **Pasturas Tropicales**, Cali, v.10, n.1, p.14-19, Apr. 1988.

TCACENCO, F.A.; LANCE, G.N. Selection of morphological traits for characterisation of elephant grass accessions. **Tropical Grasslands**, Gainesville, v.26, n.3, p.145-155, Sept. 1992.

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

TECHIO, V.H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp.** 2002. 104p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

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

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Grass and Forage Science**, Oxford, v.18, n.2, p.104-111, Feb. 1963.

TIMBÓ, A.L. O. **Obtenção de protoplasto de híbridos triploides entre o capim elefante e o milheto**. 2007. 44p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VANDENHOUT, H.; ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D.; SWENNEN R.; BAI, K.V. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plants and banana hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v.83, n.2, p.117-122, June 1995.

VICHIATO, M.R.M.; CASTRO, D.M.; GONÇALVES, S.V.B.; LIMA, M.P. Anatomia foliar de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 55., 2004, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2006. p.1-28.

VILHAR, B.; VIDIC, T.; JOGAN, N.; DERMASTIA, M. Genome size and the nucleolar number as estimators of ploidy level in *Dactylis glomerata* in the Slovenian Alps. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v.234, n.1/4, p.1-13, Nov. 2002.

WILSON, J.R. Structural and anatomical traits of forage influencing their nutritive value for ruminants. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 3., 1997, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: DZO-UFV, 1997. p.173-208.

XAVIER, D.F.; BOTREL, M.A.; DAHER, R.F.; GOMES, F.T.; PEREIRA, A.V. **Caracterização morfológica e agrônômica de algumas cultivares de capim elefante**. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1995. 24p. (Documentos, 60).

XAVIER, D.F.; DAHER, R.F.; PEREIRA, J.R.; BOTREL, M.A. Poder germinativo de sementes de capim elefante. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.22, n.4, p.565-571, jul. 1993.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E ESTOMÁTICA DE COMBINAÇÕES GENÔMICAS DE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO**

## 1 RESUMO

LEÃO, Fernando Ferreira. Caracterização citogenética e estomática de combinações genômicas de capim-elefante e milho. In:\_\_\_\_\_. **Citogenética e potencial forrageiro de combinações genômicas de capim-elefante e milho.** 2009. Cap.2, p.58-89. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*.

Com o objetivo de caracterizar as combinações genômicas tetraploides (AAA'B) e pentaploides (AA'A'BB) resultantes do retrocruzamento do híbrido hexaploide com seus parentais capim-elefante e milho, estudos de contagem cromossômica, citometria de fluxo e anatomia de estômatos foram efetuados. Para a contagem cromossômica, as combinações genômicas pentaploides AA'A'BB e tetraploides AAA'B mostraram elevado grau de mixoploidia. A combinação genômica HCM-6x-2 e a cultivar comercial Paraíso também foram estudadas. O número cromossômico dos pentaploides variou entre 20 e 34, sendo 28 o mais frequente, enquanto, nos tetraploides, o número cromossômico variou entre 16 e 28, sendo 21 o mais frequente. A mixoploidia também foi verificada entre os hexaploides, com o número cromossômico variando entre 14 a 42, sendo 28 o mais frequente em HCM-6x-2 e 36 na cultivar comercial Paraíso. Análise de variância efetuada entre as combinações genômicas 4x e 5x mostrou que a variação do número cromossômico foi maior nas combinações genômicas pentaploides do que nas tetraploides. A citometria de fluxo efetuada em folhas jovens demonstrou que ocorreu perda de DNA nas combinações genômicas, variando de 14,71% a 19,00% nas tetraploides, de 9,25% a 14,45% nas pentaploides, de 15,39% a 23,47% na cultivar comercial Paraíso e de 2,80% a 27,88% para a combinação genômica HCM-6x-2. A correlação de Pearson entre o número de cromossomos observados e a quantidade de DNA observada em pg foi de 0,958. Para a anatomia de estômatos, houve tendência das combinações genômicas tetraploides apresentarem estômatos menores e mais numerosos, o contrário ocorrendo com as pentaploides. A contagem cromossômica e a citometria de fluxo foram mais eficazes que a anatomia de estômatos para a caracterização das combinações genômicas.

---

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

## 2 ABSTRACT

LEÃO, Fernando Ferreira. Cytogenetics and genomic stomatal combinations of elephant grass and pearl millet. In:\_\_\_\_\_. **Cytogenetics and forage potential of genomic combinations in elephant grass and pearl millet**. 2009. Cap.2, p.58-89. Thesis (Doctor Genetics and Plant Breeding) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG \*.

Aiming at characterizing the tetraploids (AAA'B) and pentaploids (AA'A'BB) genomic combinations resulting from backcrossing hexaploid hybrids with its parentals elephant grass and pearl millet, chromosome counting, flow cytometry and anatomy of stomata studies were performed. For the chromosome counting, both AA'A'BB pentaploid as the AAA'B tetraploid genomic combinations showed a high degree of mixoploidy. The HCM-6x-2 genomic combination, as well as the Paraíso variety (both hexaploids) was also studied. The assessed chromosome number of pentaploids ranged from 20 to 34, and the most frequent ones numbered 28. The tetraploid chromosome number ranged from 16 to 28, and the most common ones numbered 21. For HCM-6x-2, the most frequent chromosome number was 28, and for the Paraíso variety it was 36. They both showed mixoploidy, and the chromosome number evaluated ranged from 14 to 42. The analysis of variance performed between pentaploids and tetraploids combinations showed higher variation in the chromosome number of pentaploid genomic combinations than in the tetraploids. The flow cytometry performed on young leaves showed DNA loss in genomic combinations, which ranged from 14.71 to 19.00% in tetraploids, 9.25 to 14.45% in pentaploids, 15.39 to 23.47% in Paraíso variety, and 2.80 to 27.88% in genomic combination HCM-6x-2. The Pearson's correlation between number of watched chromosomes and quantity of watched DNA in pg was 0.958. As to stomata anatomy, tetraploid genomic combinations tended to have smaller and more numerous stomata, as opposed to what was observed in pentaploids. Both Chromosome counting and flow cytometry were more effective than stomata anatomy for genomic combination characterization.

---

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

### 3 INTRODUÇÃO

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e o milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) são as espécies cultivadas de maior importância econômica e forrageira do gênero *Pennisetum* Rich. (Poaceae).

O capim-elefante é uma espécie alotetraploide com  $2n = 4x = 28$  cromossomos (genomas A'A'BB) e o milheto, uma espécie diploide com  $2n = 2x = 14$  cromossomos (genomas AA). Por serem estreitamente relacionadas, apresentam boa capacidade de combinação genética e o cruzamento entre essas espécies resulta na obtenção de híbridos triploides estéreis com  $2n = 3x = 21$  cromossomos (genomas AA'B), propagados vegetativamente, porém, de grande potencial forrageiro, tendo em vista serem tão produtivos e mais palatáveis que o próprio capim-elefante (Hanna, 1999).

A fertilidade do híbrido pode ser resgatada por meio da duplicação cromossômica para a obtenção de hexaploides férteis com  $2n = 6x = 42$  cromossomos (genomas AAA'A'BB) e, teoricamente, espera-se que esses materiais apresentem meiose regular, com produção de gametas e sementes viáveis.

As combinações genômicas AAA'B e AA'A'BB podem ser obtidas com o retrocruzamento do hexaploide com os parentais milheto e capim-elefante, respectivamente. Com essa abordagem, espera-se reunir nesses híbridos as características favoráveis de forragem e sementes maiores, conferidas pelo genoma A (Hanna, 1999), bem como rusticidade, agressividade, perenidade e elevada produção de matéria seca, proporcionadas pelo genoma B (Gonzalez & Hanna, 1984).

Nesse contexto, objetivou-se, por meio de citogenética convencional, realizar a caracterização de combinações genômicas resultantes dos cruzamentos entre híbridos hexaploides com capim-elefante e milheto e, por meio da citometria de fluxo e análise estomática, a caracterização de combinações genômicas



triploides, tetraploides, pentaploides e hexaploides, além de verificar a eficiência dessas metodologias.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material genético

O trabalho foi realizado a partir de análises efetuadas em quinze genótipos (Tabela 1), dos quais treze foram propagados vegetativamente (clones). A cultivar comercial Paraíso, oriunda da mistura de sementes de sete plantas diferentes e o milho M36 foram propagados por sementes (população). Os genótipos hexaploides foram obtidos por indução de duplicação cromossômica, sendo a combinação genômica HCM-6x-1 obtida a partir de seis clones diferentes e HCM-6x-2, a partir de sete clones diferentes.

A contagem cromossômica foi efetuada nas combinações genômicas 4x e 5x, sendo, para fins de comparação, também realizada na cultivar comercial Paraíso e no genótipo HCM-6x-2 (hexaploides). Para a citometria de fluxo e análises estomáticas, todos os genótipos foram avaliados. O material genético foi obtido de um experimento instalado no Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite, localizada em Coronel Pacheco, MG.

Após as coletas de estacas e folhas, os demais trabalhos foram conduzidos nos laboratórios de Citogenética e de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG e no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

A implantação do experimento de campo ocorreu em 11/04/2008. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com duas repetições. A parcela foi composta por uma linha de 6 m, sendo o espaçamento de 1,5 m entre linhas. A adubação de plantio foi composta por superfosfato simples (50 g/m de sulco) e, no plantio, utilizaram-se 90 gemas por 6 m de linha. O corte de uniformização foi realizado em 22/10/08 e os cortes para avaliação de características agrônomicas foram realizados em 22/12/2008 e 19/02/2009.

TABELA 1 Combinação genética, cromossômica e ploidia esperada dos genótipos de *Pennisetum* sp. utilizados no experimento.

Genótipos	Identificação dos genótipos	Combinação genômica	Ploidia esperada (constituição genômica)
M-36	Milheto 36 (população de milheto)	2x	Diploide AA
CNPGL 92-176-3	Cultivar Merker (clone de capim-elefante) x CMS 464 (população de milheto)	(4x) x (2x)	Triploide (AA'B)
CNPGL 94-49-6	Cultivar Pasto Panamá (clone de capim-elefante) x Milheto 38 (população de milheto)	(4x) x (2x)	Triploide (AA'B)
Pioneiro	Cultivar Três Rios (clone de capim-elefante) x cultivar Merker de Santa Rita (clone de capim-elefante)	(4x) x (4x)	Tetraploide (A'A'BB)
Cameroon	Cultivar Cameroon (clone de capim-elefante)	4x	Tetraploide (A'A'BB)
HCM*-4x-1	Hexaploide-165 (clone hexaploide de capim-elefante x milheto) x Milheto 36 (população de milheto)	(6x) x (2x)	Tetraploide (AAA'B)
HCM-4x-2	Hexaploide 165 (clone hexaploide de capim-elefante x milheto) x Milheto 36 (população de milheto)	(6x) x (2x)	Tetraploide (AAA'B)
HCM-4x-3	Cultivar Paraíso (população hexaploide de capim-elefante x milheto) x Milheto MSI (população de milheto)	(6x) x (2x)	Tetraploide (AAA'B)
HCM-4x-4	Hexaploide 07-3 (população hexaploide de capim-elefante x milheto) x Milheto 35 (população de milheto)	(6x) x (2x)	Tetraploide (AAA'B)

...continua...

Tabela 1, Cont.

HCM-5x -1	CNPGL 96-27-3 (clone de capim-elefante) x cultivar Paraíso (população hexaploide de capim-elefante x milho)	(4x) x (6x)	Pentaploide (A A'A'BB)
HCM-5x-2	CNPGL 96-27-3 (clone de capim-elefante) x Cultivar Paraíso (população hexaploide de capim-elefante x milho)	(4x) x (6x)	Pentaploide (A A'A'BB)
HCM-5x-3	CNPGL 96-27-3 (clone de capim-elefante) x cultivar Paraíso (população hexaploide de capim-elefante x milho)	(4x) x (6x)	Pentaploide (A A'A'BB)
Paraíso	Cultivar Paraíso (população hexaploide de capim-elefante x milho)	6x	Hexaploide (AAA'A'BB)
HCM-6x-1	Hexaploide 07-1 (população hexaploide de capim-elefante x milho)	6x	Hexaploide (AAA'A'BB)
HCM-6x-2	Hexaploide 07-2 (população hexaploide de capim-elefante x milho)	6x	Hexaploide (AAA'A'BB)

\*HCM = híbrido de capim-elefante x milho

#### 4.2 Análise citogenética

Para a contagem de cromossomos metafásicos, adaptou-se a metodologia proposta por Techio et al. (2002). Utilizaram-se pré-tratamentos com ciclohexamida 25 mg.L<sup>-1</sup> e hidroxiquinoleína 300 mg.L<sup>-1</sup> (1:1), por 2 horas e 45 minutos, para as pontas de raízes que foram coletadas. As raízes foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos, em água destilada, após o tratamento, secas e

fixadas em solução de Carnoy (etanol e ácido acético – 3:1), por 24 horas. Posteriormente, procedeu-se a maceração enzimática das raízes em solução de pectinase (40%)/celulase (4%) por 4 a 6 horas, extração e fragmentação do meristema. A técnica de esmagamento foi utilizada para a montagem das lâminas, sendo a coloração feita por Giemsa 5%, por 10 minutos. A avaliação das lâminas foi feita em microscópio de campo claro (Leica DMLS), equipado com microcâmara (Nikon Digital Sight DS-Fi1) para digitalização das imagens.

Para as raças cromossômicas 4x e 5x, avaliaram-se 10 lâminas por genótipo e 5 metáfases por lâmina, sendo o experimento composto por 2 blocos (repetições). Avaliaram-se 100 metáfases para as combinações genômicas HCM-4x-1, HCM-4x-2, HCM-4x-3 e HCM-5x-1. Porém, para os genótipos e HCM-4x-4, HCM-5x-2 e HCM-5x-3, não foi possível obter estacas oriundas das parcelas dos dois blocos e analisaram-se estacas oriundas de parcelas de apenas um dos blocos, totalizando 50 metáfases. Para o genótipo HCM-6x-2, avaliou-se um total de 41 metáfases e, para a cultivar comercial Paraíso, avaliou-se um total de 59 metáfases.

A verificação da variação do número cromossômico entre as combinações genômicas 4x e 5x foi realizada a partir de análise de variância e, para comparar a eficiência dos métodos de contagem cromossômica e citometria de fluxo, efetuou-se uma análise de correlação entre as variáveis número cromossômico esperado e quantidade de DNA observada em picogramas (pg), por meio de estimativa de correlação de Pearson.

### **4.3 Citometria de fluxo**

Três amostras foram avaliadas para cada genótipo, com o objetivo de estimar a quantidade de DNA e inferir a ploidia ou a mixoploidia, utilizando-se, aproximadamente, 20 a 30 mg de tecido foliar jovem para cada amostra, juntamente com a mesma quantidade de tecido foliar jovem de *Glycine max*

(padrão interno de referência). Os tecidos foliares foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a obtenção de suspensão nuclear (Dolezel, 1997) e, posteriormente, aspirada por meio de duas camadas de gaze. Em seguida, a suspensão nuclear foi filtrada em uma malha de 50µm, sendo adicionados à mesma 25µL de iodeto de propídio e 2,5µL de RNase. Para cada amostra foram analisados, pelo menos, 10 mil núcleos.

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), sendo os histogramas obtidos no software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.8. O conteúdo de DNA nuclear (pg) dos tratamentos foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*Glycine max*). Os valores observados da quantidade de DNA foram utilizados para comparar com os valores esperados, segundo Campos et al. (2009), que apontam, para o capim-elefante, a quantidade de 4,54 pg de DNA e, para o milho, 4,75 pg.

#### **4.4 Análise estomática**

##### **4.4.1 Confecção das lâminas**

Foram utilizadas folhas de todos os genótipos, nas quais foi feito um corte de cerca de 10 cm em sua parte mediana, evitando-se a nervura principal. Utilizando-se a técnica de impressão de epiderme (Segato et al., 2004), os estômatos das faces adaxiais e abaxiais foram analisados.

##### **4.4.2 Técnica da impressão da epiderme**

Consiste em colocar uma gota de adesivo instantâneo universal (Super Bonder®) sobre uma lâmina de vidro (Segato et al., 2004). A região de interesse da folha é, então, pressionada sobre a lâmina, por, aproximadamente, 10 segundos, tempo necessário para que o adesivo se espalhe e seque o suficiente, permitindo a separação da folha da lâmina e a manutenção da impressão da

epiderme. É necessário que parte da folha não receba o adesivo, pois a separação da folha e da lâmina é feita com um puxão a partir desse local que não recebeu o adesivo. Depois de confeccionadas, as lâminas devem ser mantidas em condições ambientais até a avaliação.

#### **4.4.3 Análise de densidade e diâmetro estomático**

Para cada um dos 15 genótipos foram confeccionadas 10 lâminas (10 repetições), totalizando 150 lâminas. Em cada tratamento, os estômatos foram contados e medidos na face abaxial (5 lâminas) e na face adaxial (5 lâminas).

O diâmetro estomático em  $\mu\text{m}$  foi analisado a partir da medida dos diâmetros equatorial e polar de 4 estômatos por lâmina, totalizando 40 medidas por genótipo, 20 na face adaxial e 20 na abaxial. A densidade estomática (número de estômatos por  $\text{mm}^2$ ) foi medida a partir de 2 repetições por lâmina, totalizando 20 medidas por genótipo, 10 na face adaxial e 10 na abaxial. A avaliação das lâminas foi feita em microscópio de campo claro (Leica DMLS), equipado com microcâmera (Nikon Digital Sight DS-Fi1), para digitalização das imagens. As análises de variância foram feitas com base no modelo inteiramente casualizado, com utilização do teste de Scott & Knott (1974) para a detecção de variações entre os genótipos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sendo o número básico de cromossomos  $x = 7$ , tanto para o capim-elefante como para o milheto, o número cromossômico esperado nas combinações genômicas tetraploides era 28, nas pentaploides, de 35 e, para os genótipos poliploidizados ( $6x$ ), incluídos para fins de comparação, 42. Todas as combinações genômicas apresentaram mixoploidia e houve a nítida separação das raças cromossômicas  $4x$ ,  $5x$  e  $6x$  em três grupos, tendo os números cromossômicos observados acompanhado o aumento da ploidia (Tabela 2). As combinações genômicas  $4x$  apresentaram células com número cromossômico variando entre 16 e 28 (Figura 1 e Tabela 2), tendo variação para os números cromossômicos modais ficado entre 20 e 21 (Tabela 2), enquanto, nas  $5x$ , a variação do número cromossômico ficou entre 20 e 34 (Figura 2 e Tabela 2), e a variação para os números cromossômicos modais ficou entre 27 e 32 (Tabela 2). Já os genótipos submetidos à duplicação cromossômica apresentaram células com 14 a 42 cromossomos (Figura 3 e Tabela 2), sendo 36 o número modal para a cultivar comercial Paraíso e 28 para a combinação genômica HCM- $6x-2$ . O número de células observadas com o complemento cromossômico completo (28 para as  $4x$ , 35 para as  $5x$  e 42 para as  $6x$ ) foi muito reduzido, embora tenha sido um pouco mais frequente na combinação genômica HCM- $6x-2$  (Tabela 2).



TABELA 2 Números de metáfases analisadas, de cromossomos determinados, modal e percentagem de metáfases com o número modal.

Genótipos	Nº de metáfases analisadas	Nº cromossômico determinado*	Nº modal	% de metáfases com o nº modal
HCM-4x-1	100	18(6), 19(14), 20(14), 21(19), 22(13), 23(14), 24(11), 25(2), 26(6), 27(0), 28(1)	21	19
HCM-4x-2	100	16(2), 17(3), 18(4), 19(13), 20(11), 21(24), 22(20), 23(16), 24(4), 25(3)	21	24
HCM-4x-3	100	17(1), 18(13), 19(11), 20(27), 21(26), 22(12), 23(6), 24(2), 25(1), 26(0), 27(0), 28(1)	20	27
HCM-4x-4	50	17(2), 18(4), 19(9), 20(12), 21(11), 22(7), 23(1), 24(3), 25(1)	20	24
HCM-5x-1	100	25(4), 26(3), 27(7), 28(7), 29(13), 30(17), 31(13), 32(20), 33(11), 34(5)	32	20
HCM-5x-2	50	20(1), 21(1), 22(1), 23(0), 24(1), 25(6), 26(7), 27(6), 28(13), 29(5), 30(4), 31(2), 32(2), 33(1)	28	26
HCM-5x-3	50	22(2), 23(0), 24(2), 25(4), 26(1), 27(11), 28(7), 29(6), 30(7), 31(6), 32(1), 33(3)	27	22

...Continua...

Tabela 2, Cont.

Paraíso	59	14(1), 17(0), 20(3), 23(0), 26(1), 29(0), 32(5), 35(0), 38(7), 41(0),	15(0), 18(0), 21(0), 24(7), 27(1), 30(4), 33(0), 36(8), 39(1), 42(1)	16(1), 19(0), 22(3), 25(4), 28(4), 31(0), 34(1), 37(0), 40(7),	36	13,56
HCM-6x-2	41	14(2), 17(0), 20(2), 23(0), 26(2), 29(0), 32(1), 35(0), 38(1), 41(0),	15(0), 18(2), 21(0), 24(0), 27(0), 30(1), 33(0), 36(6), 39(0), 42(7)	16(0), 19(0), 22(1), 25(0), 28(8), 31(0), 34(1), 37(2), 40(5),	28	19,51

\* = entre parênteses, o número de metáfases contadas com o determinado número cromossômico

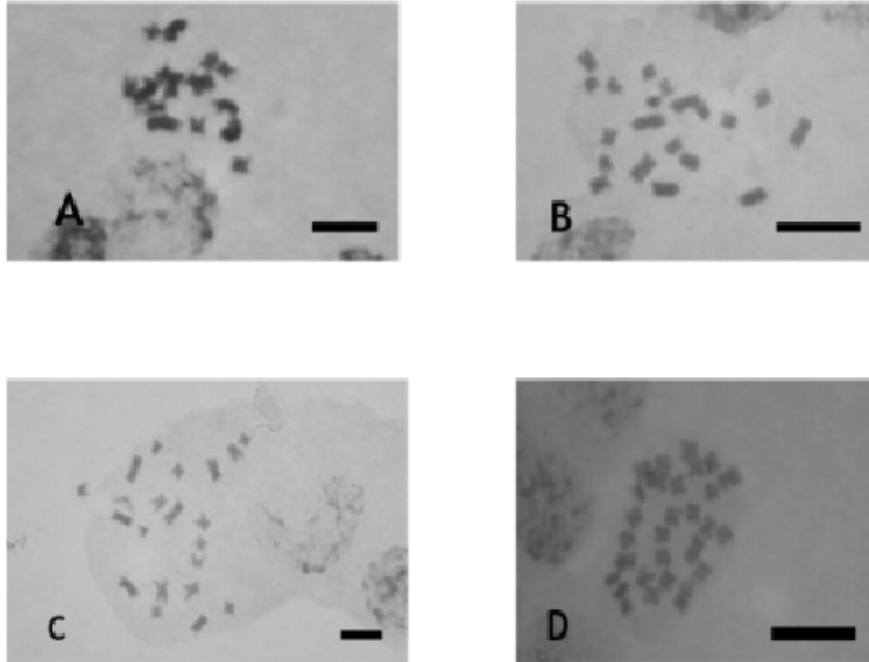


FIGURA 1 Números cromossômicos em genótipos 4x. A) HCM-4x-2 com 16 cromossomos. B) HCM-4x-3 com 20 cromossomos. C) HCM-4x-2 com 21 cromossomos. D) HCM-4x-3 com 28 cromossomos. Para A, B e C, as barras representam 5  $\mu\text{m}$  e para D, 10  $\mu\text{m}$ .

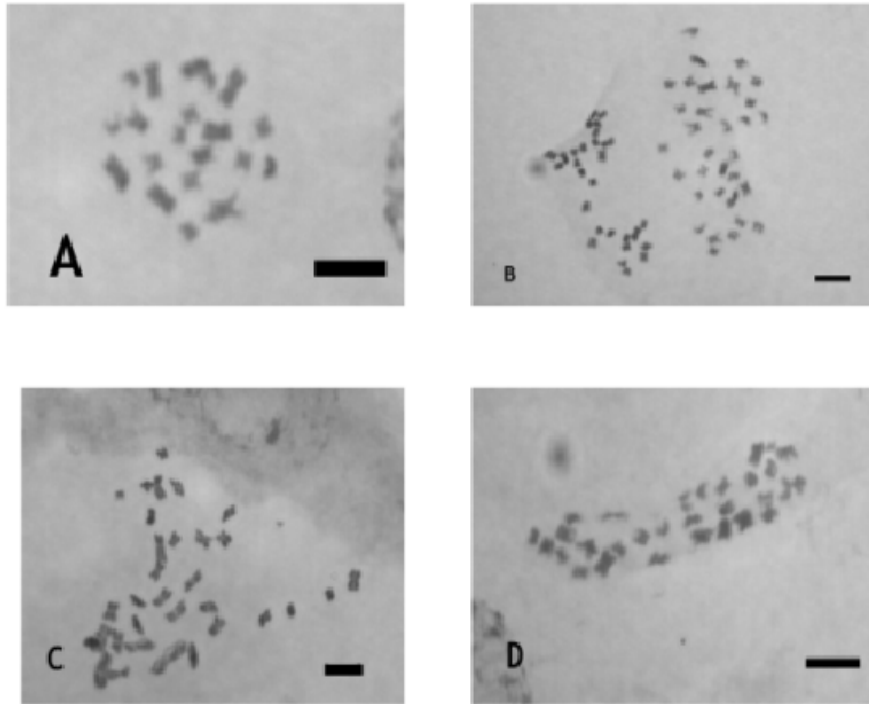


FIGURA 2 Números cromossômicos em genótipos 5x. A) HCM-5x-2 com 20 cromossomos. B) Duas metáfases de HCM-5x-3 com 28 e 32 cromossomos. C) HCM-5x-1 com 32 cromossomos. D) HCM-5x-1 com 32 cromossomos. Para A, B e D, as barras representam 5  $\mu\text{m}$  e, para C, 2,5  $\mu\text{m}$ .

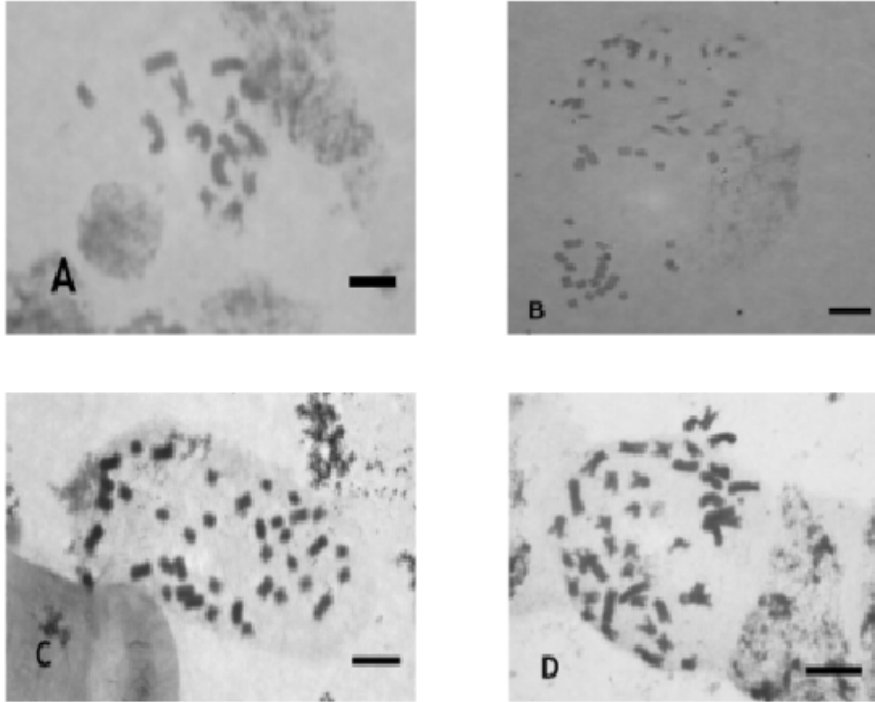


FIGURA 3 Números cromossômicos em genótipos 6x. A) HCM-6x-2 com 14 cromossomos. B) Duas metáfases de HCM-6x-2 com 26 e 28 cromossomos. C) HCM-6x-2 com 39 cromossomos. D) Paraíso com 42 cromossomos. Para A, B e C, as barras representam 2,5  $\mu\text{m}$  e para D, 5  $\mu\text{m}$ .

A análise de variância (Tabela 3) confirma que as combinações genômicas 4x e 5x são estatisticamente diferentes entre si quanto ao número cromossômico e que, dentro das raças cromossômicas 4x, há menos variação que dentro das raças cromossômicas 5x, principalmente levando-se em conta o número modal (Tabela 2).

TABELA 3 Análise de variância do número cromossômico para as raças cromossômicas 4x e 5x.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios
Genótipos	10	180,24**
5x	3	23,70**
4x	6	4,03 <sup>ns</sup>
5x vs 4x	1	1707,09**
Erro	99	2,96
CV (%)	-	7,27

<sup>ns</sup> Não significativo e \*\* significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

As alterações genômicas em hibridações interespecíficas têm sido relatadas em diversos trabalhos (Comai, 2000; Ridle & Birchler, 2003; Levy & Feldman, 2004; Adams & Wendel, 2005; Doyle et al., 2008; Campos et al., 2009, entre outros) que, de forma geral, apontam que a presença de dois ou mais genomas diferentes no mesmo núcleo levam a rearranjos cromossômicos e a mudanças no número e na distribuição de sequências de DNA, podendo haver conflitos intergenômicos e perda de cromossomos.

Os híbridos provenientes do cruzamento entre trigo e milho foram estudados por Gernand et al. (2005). Os autores observaram eliminação uniparental dos cromossomos do milho com formação de micronúcleos, fragmentação e heterocromatinização do DNA. A eliminação cromossômica iniciou-se logo após a fertilização, como relatado por Laurie & Bennett (1989) e Mochida et al. (2004). Os cromossomos do milho ocuparam posição periférica no núcleo interfásico, sofrendo fragmentação devido à assincronia no processo de replicação do DNA.

Kunakh et al. (2008) estudaram o número cromossômico de células de

meristemas de raízes de espécies cultivadas de crucíferas capazes de hibridizar com *Brassica napus* e encontraram, para *Brassica nigra*, menos da metade dos *seedlings* como verdadeiramente diploides, sendo a maioria mixoploides. Esses autores explicam que um alto nível de mixoploidia pode evidenciar um elevado grau de plasticidade do genoma, característica útil para aumentar a adaptabilidade da planta em condições desfavoráveis.

Neste trabalho, a coloração utilizada para a contagem cromossômica foi a convencional, não havendo como afirmar se os cromossomos perdidos seriam oriundos do capim-elefante ou do milho. Esta questão poderia ser esclarecida com a utilização da técnica de citogenética molecular de hibridização genômica *in situ* (GISH), em que o DNA genômico total de uma espécie é utilizado para identificar cromossomos em híbridos naturais ou artificiais; além disso, a mixoploidia que caracterizou as combinações genômicas também poderia ser explicada pela diferente duração de tempo do ciclo celular dos genomas A, A' e B, visto que essa informação ainda não está disponível na literatura e que existem dois genomas B nas combinações genômicas 5x e apenas um nas 4x.

A mixoploidia encontrada neste estudo também foi verificada por Abreu et al. (2006). Estes autores relatam que, para os híbridos triploides submetidos a tratamento com agentes antimitóticos, houve duplicação seguida de eliminação cromossômica, confirmada pelas aberrações cromossômicas e que, das células analisadas, 86,4%, em média, apresentaram número cromossômico diferente de 21. Barbosa et al. (2007), ao estudarem os híbridos de capim-elefante e milho submetidos à duplicação cromossômica e tratados com agentes antimitóticos, observaram números cromossômicos que variaram de 14 a 42, nas metáfases analisadas. Campos et al. (2009) relatam que 480 plântulas triploides (híbridos de capim-elefante e milho) foram tratadas com colchicina para a obtenção de hexaploides e, das 200 sobreviventes, 115 foram mixoploides.

Para este trabalho, reduções na quantidade de DNA foram evidenciadas

pelas análises de citometria de fluxo (Tabela 4). A quantidade de DNA esperada para as combinações genômicas avaliadas neste trabalho foi calculada a partir da quantidade de DNA observada para o milheto (4,75 pg) e capim-elefante (4,54 pg), obtida por Campos et al. (2009). Dessa forma, espera-se que o híbrido triploide apresente uma quantidade de DNA intermediária à dos progenitores (4,645 pg) e, por duplicação desta quantidade, o híbrido hexaploide apresente 9,29 pg de DNA. A quantidade de DNA em pg esperada para as combinações genômicas pentaploides são obtidas a partir da soma do valor n dos parentais (4,645 pg do híbrido hexaploide + 2,27 pg do capim-elefante). Para as combinações genômicas tetraplóides, é válida a mesma explicação (4,645 pg do híbrido hexaploide + 2,375 pg do milheto).

A variação na redução da quantidade de DNA (Tabela 4) das combinações genômicas ocorreu devido à diferente composição das mesmas. Os híbridos triploides e combinações genômicas 4x e 5x são clones, ao passo que as combinações genômicas hexaploides foram obtidas a partir da mistura de 6 e 7 clones diferentes da população capileto (HCM-6x-1 e HCM-6x-2, respectivamente). A cultivar comercial Paraíso também foi obtida a partir da mistura de sementes de sete plantas diferentes, o que contribuiu para a variação na redução da perda de DNA (Tabela 4).

Para a combinação genômica CNPGL 92-176-3, aferiu-se pequena perda percentual na quantidade de DNA (Tabela 4 e Figura 4), indicando que esses triploides estão genética e evolutivamente bem estabelecidos, quando comparados às combinações genômicas 4x e 5x, que apresentaram reduções bem maiores nas quantidades de DNA, mostrando que as mesmas têm tendência para menor estabilidade genômica, por serem híbridos interespecíficos artificiais recentemente obtidos. Esses resultados indicam a possibilidade do uso das combinações genômicas 4x e 5x em programas de melhoramento genético, pois, após alguns ciclos de seleção, provavelmente, os rearranjos genômicos



diminuirão, tornando-as mais estáveis.

TABELA 4 Quantidade de DNA esperada, observada e perda percentual de DNA para os genótipos analisados.

Genótipos	Nº de repetições	Ploidia esperada	Quantidade de DNA esperada (pg)	Quantidade de DNA observada (pg)	Perda (%) de DNA (pg)
MilhetoM36	1	2x	4,75	4,72	----
CNPGL 92-176-3	1	3x	4,64	4,54	2,16%
	2	3x	4,64	4,56	1,72%
CNPGL 94-49-6	1	3x	4,64	4,62	0,43%
	2	3x	4,64	4,66	0,00%
Pioneiro	1	4x	4,54	4,47	----
	2	4x	4,54	4,55	----
Cameroon	1	4x	4,54	4,57	----
	2	4x	4,54	4,62	----
HCM*-4x-1	1	4x	7,00	5,75	17,86%
	2	4x	7,00	5,97	14,71%
HCM-4x-2	1	4x	7,00	5,67	19,00%
	2	4x	7,00	5,90	15,77%
HCM-4x-3	1	4x	7,00	5,81	17,00%
	2	4x	7,00	5,88	16,00%
HCM-4x-4	1	4x	7,00	5,78	17,43%
	2	4x	7,00	5,78	17,43%
HCM-5x-1	1	5x	6,92	6,16	10,98%
	2	5x	6,92	5,92	14,45%
HCM-5x-2	1	5x	6,92	6,28	9,25%
HCM-5x-3	1	5x	6,92	6,04	12,72%
Paraíso	1	6x	9,29	7,86	15,39%
	2	6x	9,29	7,11	23,47%
HCM-6x-1	1	6x	9,29	8,46	8,93%
	2	6x	9,29	6,84	26,37%
HCM-6x-2	1	6x	9,29	6,70	27,88%
	2	6x	9,29	9,03	2,80%

\*HCM = híbrido de capim-elefante x milheto

Observando-se as combinações genômicas 4x (AAA'B) e 5x

(AA'A'BB), percebe-se que a combinação genômica pentaploide é muito semelhante à combinação genômica do capim-elefante (A'A'BB), tendo apenas uma dose extra do genoma A, ao passo que a combinação genômica tetraploide assemelha-se mais à combinação genômica do milheto (AA), apresentando dois genomas extras (A' e B). Essas observações talvez possam contribuir para explicar a maior redução na quantidade de DNA observada nas raças cromossômicas 4x, que apresentariam maior desequilíbrio genômico, quando comparadas às 5x.

Como as raças cromossômicas 4x apresentaram menor variação no número cromossômico e maior perda de DNA e as 5x, maior variação no número cromossômico e menor perda de DNA, levantou-se a hipótese de que as perdas de segmentos cromossômicos nas 4x tenham sido maiores que nas 5x que, provavelmente, eliminaram mais cromossomos inteiros que as 4x. Com a utilização da técnica de citogenética molecular de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), esses cromossomos poderiam ser identificados, visando à produção de linhas de adição ou substituição que poderiam ser interessantes para o programa de melhoramento genético do capim-elefante.

A perda de DNA para os genótipos hexaploides da população capileto já foi verificada por Campos et al. (2009). Entre as repetições 1 e 2 das combinações genômicas HCM-6x-1 e HCM-6x-2, houve grande diferença na quantidade de DNA observada em relação à esperada (Tabela 4) porque as mesmas foram obtidas a partir da mistura de clones diferentes. Infere-se que a estabilidade dos genótipos nos quais houve menor perda de DNA (repetição 1 do genótipo HCM-6x-1 e repetição 2 do genótipo HCM-6x-2) é maior e que ainda estão ocorrendo conflitos genômicos e perda de sequências em maior quantidade na repetição 2 do genótipo HCM-6x-1 e na repetição 1 do genótipo HCM-6x-2. A cultivar comercial Paraíso, obtida a partir da mistura de sementes de sete plantas diferentes, também apresentou variação quanto à perda de DNA, mas

esta não foi tão contrastante entre as duas repetições como as apresentadas pelos genótipos HCM-6x-1 e HCM-6x-2 (Tabela 4).

Gráficos foram obtidos (Figuras 4, 5 e 6) a partir das análises de citometria de fluxo.

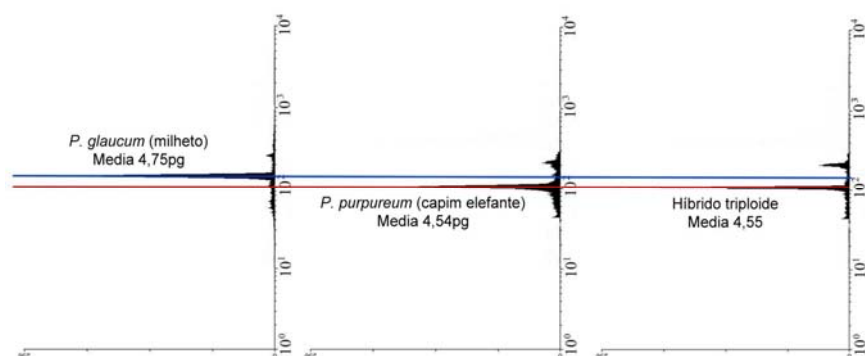


FIGURA 4 Citometria de fluxo do milheto, capim-elefante e combinação genômica CNPGL 92-176-3 (híbrido triploide).

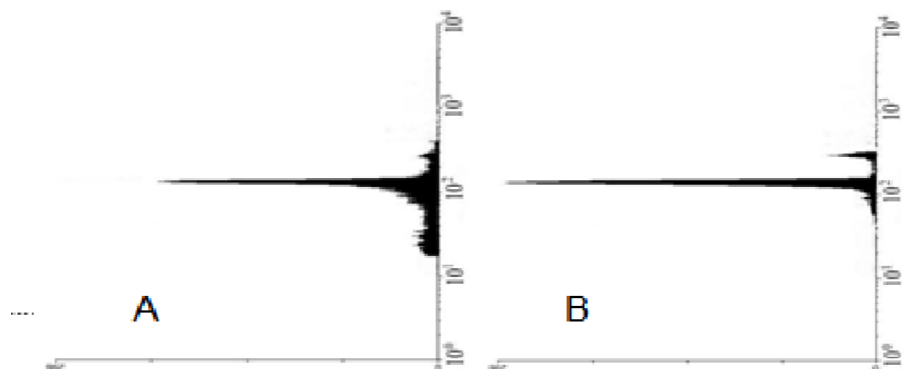


FIGURA 5 Citometria de fluxo com quantidades de DNA semelhantes à da repetição 2 da combinação genômica HCM-4x-2, com 5,90 pg de DNA (A) e à da repetição 2 da combinação genômica HCM-5x-1, com 5,92 pg de DNA (B).

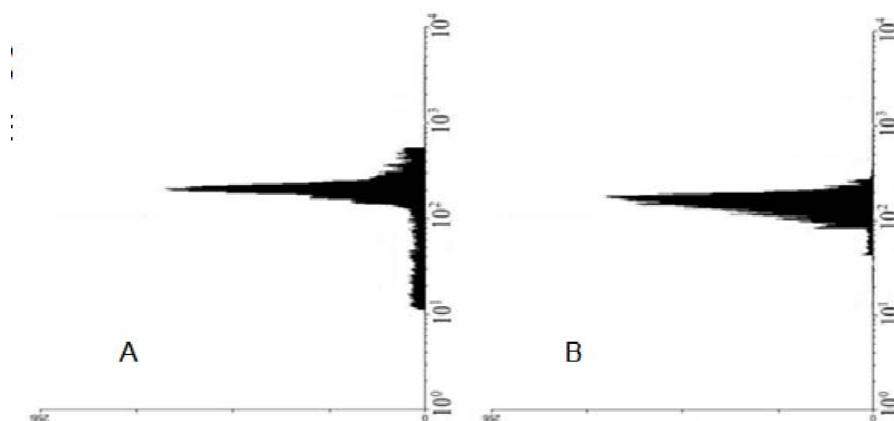


FIGURA 6 Citometria de fluxo da repetição 2 da combinação genômica HCM-6x-2 (A), com 9,03 pg de DNA e da repetição 1 da combinação genômica HCM-6x-1 (B), com 8,46 pg de DNA.

Considerando-se o número cromossômico básico  $x=7$ , efetuou-se uma estimativa de correlação de Pearson entre contagem cromossômica e citometria de fluxo para as combinações genômicas 4x e 5x. As variáveis analisadas foram o número de cromossomos e a quantidade de DNA observados. O resultado encontrado de 0,958, significativo a 1% pelo teste t, demonstrou que quanto maior o número cromossômico observado, maior a quantidade de DNA observada. Dessa forma, constatou-se, estatisticamente, a eficiência da contagem cromossômica e da citometria de fluxo para a caracterização das raças cromossômicas 4x e 5x.

Nas análises de densidade e diâmetro estomáticos, deu-se ênfase às observações das raças cromossômicas 4x e 5x, para verificar se essa abordagem é útil na distinção das combinações genômicas entre si e entre os demais genótipos que faziam parte do experimento.

Quanto à densidade estomática (número de estômatos por  $\text{mm}^2$ ), o teste de Scot & Knott (1974) apontou diferença entre as faces adaxial e abaxial, implicando que ambas as faces podem ser avaliadas quanto a essa característica

(Tabela 5).

Para a densidade nas faces adaxial e abaxial, os genótipos 4x posicionaram-se entre aqueles que apresentaram número de estômatos maior e intermediário e os 5x, entre os de número intermediário e pequeno (Tabela 5). O teste de Scot & Knott (1974) foi eficiente na distinção das raças cromossômicas 4x e 5x para a densidade na face abaxial da folha, o mesmo não ocorrendo com a face adaxial. Houve tendência dos genótipos de maior ploidia apresentar menor número de estômatos. As combinações genômicas 3x e 6x foram bem caracterizadas e esse resultado concorda com outros trabalhos sobre densidade estomática, entre eles o de Campos et al. (2009), que conseguiram distinguir genótipos triploides de hexaploides em capim-elefante.

Quanto ao diâmetro estomático (medido em  $\mu\text{m}$ ) na face adaxial, o teste de Scot & Knott (1974) apontou diferenças entre os diâmetros polares e equatoriais, implicando que ambos devem ser avaliados quanto a essa característica (Tabela 5).

Para a análise envolvendo os diâmetros equatoriais e polares da face adaxial, as raças cromossômicas 4x apresentaram diâmetros pequenos e intermediários e as 5x, intermediários e grandes (Tabela 5). Com relação ao diâmetro polar, os triploides e hexaploides puderam ser nitidamente separados. Tanto para os diâmetros equatoriais como para os polares, a distinção das raças cromossômicas 4x e 5x entre si e entre os demais genótipos mostrou-se difícil, embora haja a tendência do aumento do diâmetro com o aumento da ploidia (Figura 7).

Com relação ao diâmetro estomático (medido em  $\mu\text{m}$ ) na face abaxial, o teste de Scot & Knott (1974) apontou diferenças entre os diâmetros polares e equatoriais (Tabela 5). Mais uma vez, as raças cromossômicas 4x apresentaram diâmetros intermediários e pequenos e as 5x, intermediários e grandes, dificultando a distinção entre elas e entre os demais genótipos.

TABELA 5 Teste de médias e análises de variância para densidade e diâmetro estomáticos.

Genótipos	Densidade adaxial	Densidade abaxial	Diâmetro adaxial polar	Diâmetro adaxial equatorial	Diâmetro abaxial polar	Diâmetro abaxial equatorial
Milheto M36	25,35 b	28,00 b	13,80 b	31,07 c	14,91 c	32,67 b
CNPGL 92-176-3	24,50 b	35,00 a	10,52 c	26,07 c	15,94 b	35,68 b
CNPGL 94-49-6	24,75 b	32,75 a	13,40 b	34,69 b	13,84 c	34,80 b
Pioneiro	25,75 b	28,25 b	13,24 b	36,34 b	16,31 b	39,57 a
Cameroon	21,50 b	26,00 c	13,63 b	35,18 b	15,84 b	38,50 a
HCM <sup>1</sup> -4x-1	28,50 a	31,75 a	11,02 c	34,15 b	11,47 d	34,34 b
HCM-4x-2	27,25 a	31,75 a	12,94 b	29,61 c	13,40 c	29,60 b
HCM-4x-3	32,50 a	34,25 a	12,23 c	31,11 c	11,97 d	31,91 b
HCM-4x-4	23,00 b	28,75 b	11,20 c	33,07 b	13,95 c	38,83 a
HCM-5x-1	15,25 c	23,50 c	17,51 a	45,03 a	19,67 a	42,97 a
HCM-5x-2	13,25 c	21,00 d	14,16 b	33,84 b	14,21 c	36,53 b
HCM-5x-3	23,00 b	27,00 c	13,94 b	34,20 b	14,11 c	35,32 b
Paraíso	16,25 c	20,00 d	16,11 a	41,07 a	16,46 b	42,54 a
HCM-6x-1	12,25 c	19,50 d	15,37 a	36,44 b	18,59 a	42,48 a
HCM-6x-2	20,75 b	25,75 c	15,62 a	41,00 a	16,42 b	38,72 a
Média Geral	22,12	27,55	13,65	34,90	15,14	36,96
QMG <sup>2</sup>	330,97**	251,36**	19,16**	118,22**	25,00**	81,31**
CV%	25,07	21,33	12,60	11,88	9,51	9,81

<sup>1</sup>: HCM = híbrido de capim-elefante x milho

<sup>2</sup>: QMG = quadrado médio de genótipos

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 1% de probabilidade.

Diversos trabalhos (Silva et al., 2000; Costa et al., 2004; Vichiato et al., 2006; Campos et al., 2009) indicam que a análise do número e do tamanho dos estômatos são indicadores confiáveis para a distinção de espécies ou indivíduos com diferentes níveis de ploidia. O mesmo ocorreu neste trabalho, com boa

distinção dos genótipos triploides e hexaploides (Figura 7). Quanto às raças cromossômicas 4x e 5x, observou-se tendência de as 4x apresentarem maior número estomático com menores diâmetros e as 5x, menor número estomático com maiores diâmetros. Mas, isso foi apenas uma tendência. Frequentemente foi difícil a discriminação das raças cromossômicas em relação aos demais genótipos, com as 4x mostrando-se mais semelhantes ao milheto e capim-elefante e as 5x aproximando-se mais dos genótipos Paraíso e combinações genômicas hexaploides.

Diante dos resultados, a utilização da anatomia de estômatos como técnica isolada para a distinção de ploidias e combinações genômicas no gênero *Pennisetum* não é recomendável, pois a técnica está sujeita a efeitos ambientais que podem alterar os resultados. Além disso, a quantidade de DNA entre capim-elefante (4,55 pg) e milheto (4,74 pg) é muito próxima, fazendo com que os estômatos tenham tamanhos muito similares. Martel et al. (2004) apontam que, durante a evolução do gênero *Pennisetum*, teria havido duplicações em regiões dos cromossomos do milheto, o que teria contribuído para o seu aumento de tamanho e de quantidade de DNA.

Na comparação entre capim-elefante (4x) e milheto (2x), a diminuição da ploidia e do número cromossômico no milheto é acompanhada por um aumento na quantidade de DNA. As diversas combinações genômicas possuem dosagens variadas dos genomas A, A' e B, produzindo uma graduação de valores que caracterizam satisfatoriamente as combinações genômicas 3x e 6x, mas não as de ploidia intermediária (4x e 5x).

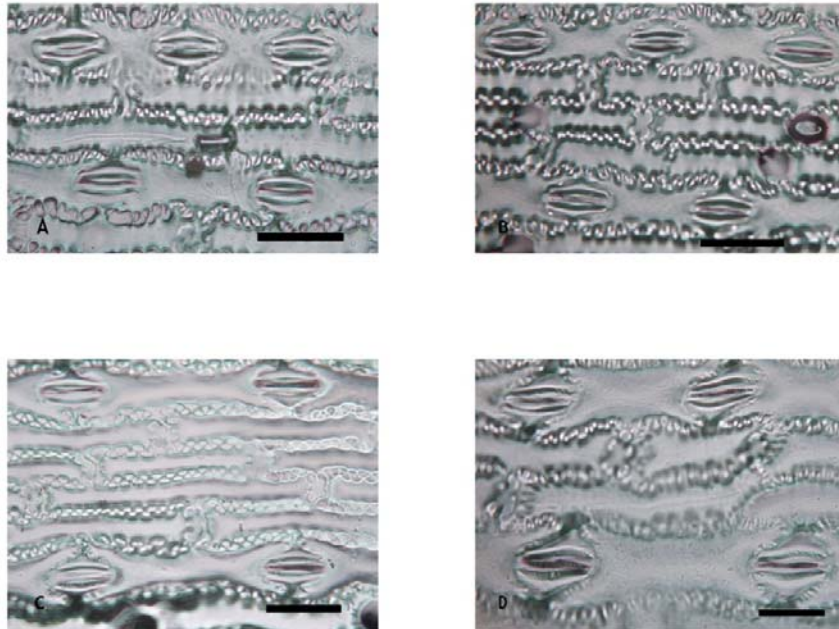


FIGURA 7 Estômatos da face abaxial do genótipo CNPGL 92-176-3 (A), da face abaxial do genótipo HCM-4x-1 (B), da face adaxial do genótipo HCM-5x-1 (C) e da face adaxial do genótipo HCM-6x-1(D). As barras representam 40  $\mu\text{m}$ .



## 6 CONCLUSÕES

Para discriminação das raças cromossômicas, as análises anatômicas dos estômatos mostraram-se menos eficientes que a contagem cromossômica e citometria de fluxo.

A densidade de estômatos na face abaxial pode ser utilizada para diferenciar combinações genômicas 4x e 5x.

As combinações genômicas 4x e 5x são mixoploides, tendo a variação do número cromossômico dentro das raças cromossômicas 5x sido maior que nas 4x.

Ocorreram alterações genômicas nas raças cromossômicas 4x, que levaram à maior redução na quantidade de DNA do que nas 5x.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J.C.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; BARBOSA, S. Mixoploidia em híbridos de capim elefante x milho tratados com agentes anti-mitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.11, p.1629-1635, nov. 2006.
- ADAMS, K.L.; WENDEL, J.F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Boston, v.8, n.2, p.135-141, Apr. 2005.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V. Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* Schumacher x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.26-35, jan./fev. 2003.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; ABREU, J.C. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim elefante e milho. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.3, p.365-372, jul. 2007.
- CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE, L.C.; SALGADO, C.C.; SANTOS, F.C.; COSTA, P.N.; SILVA, P.S.; ALVES, C.C.S.; VICCINI, L.F.; PEREIRA, A.V. In vitro induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, Berlin, v.128, n.1, p.101-104, Jan. 2009.
- COMAI, L. Genetic and epigenetic interaction in allopolyploid plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.43, n.2/3, p.387-399, June 2000.
- COSTA, M.A.P.C.; ALMEIDA, W.A.B.; FILHO, F.A.A.M.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Stomatal analysis of citrus somatic hybrids obtained by protoplast fusion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.3, p.297-300, mar. 2004.
- DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v.38, n.3, p.285-302, Mar. 1997.
- DOYLE, J.J.; FLAGEL, L.E.; PATERSON, A.H.; RAPP, R.A.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; JONATHAN, F.; WENDEL, J.F. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.42, p.443-461, Dec. 2008.

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

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

HANNA, W.W. Melhoramento do capim elefante. In: PASSOS, L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A.V. (Ed.). **Biologia e manejo do capim elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p.17-28.

KOPECKY, D.; LOUREIRO, J.; ZWIERZYKOWSKI, Z.; GHESQUIERE, M.; DOLEZEL, J. Genome constitution and evolution in *Lolium & Festuca* hybrid cultivars (Festulolium). **Theoretical and applied genetics**, Berlin, v.113, n.4, p.731-742, Aug. 2006.

KUNAKH, V.A.; ADONIN, V.I.; OZHEREDOV, S.P.; BLYUM, Y.B. Mixoploidy in wild and cultivated species of *Cruciferae* capable of hybridizing with rapeseed *Brassica napus*. **Cytology And Genetics**, New York, v.42, n.3, p.83-88, June 2008.

LAURIE, D.A.; BENNETT, M.D. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat x maize crosses. **Genome**, Ottawa, v.32, n.4, p.953-961, Apr. 1989.

LEVY, A.A.; FELDMAN, M. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. **Biological Journal**, London, v.82, n.4, p.607-613, Aug. 2004.

MARTEL, E.; PONCET, V.; LAMY, F.; SILJAK, Y.S.; LEJEUNE, B.; SARR, A. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v.61, n.1, p.1-17, Nov. 2004.

MOCHIDA, K.; TSUJIMOTO, H.; SASAKUMA, T. Confocal analysis of chromosome behaviour in wheat x maize zygotes. **Genome**, Ottawa, v.47, n.1, p.199-205, Feb. 2004.

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

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

SEGATO, F.B.; BISOGNIN, D.A.; BENEDETTI, M.; COSTA, L.C.; RAMPELOTTO, M.V.; NICOLOSO, F.T. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1597-1601, set/out. 2004.

SILVA, P.A.K.X.M.; CALEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.105-111, jan. 2000.

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

VICHIATO, M.R.M.; CASTRO, D.M.; GONÇALVES, S.V.B.; LIMA, M.P. Anatomia foliar de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 55., 2004, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2004. p.1-28.

## **CAPÍTULO 3**

### **PRODUÇÃO FORRAGEIRA E COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DE COMBINAÇÕES GENÔMICAS DE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO**

## 1 RESUMO

LEÃO, Fernando Ferreira. Produção forrageira e composição bromatológica de combinações genômicas de capim-elefante e milho. In:\_\_\_\_\_. **Caracterização citogenética e estomática de combinações genômicas de capim-elefante e milho.** 2009. Cap.3, p. 89-112. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*.

*Pennisetum purpureum* ( $2n=4x=28$ , genomas A'A'BB) e *Pennisetum glaucum* ( $2n=2x=14$ , genomas AA) produzem o híbrido triploide de constituição genômica AA'B, que reúne características forrageiras superiores de ambos os progenitores, porém, é estéril devido ao pareamento irregular dos cromossomos na meiose. Submetido à duplicação cromossômica com utilização de antimitóticos, obtém-se o hexaploide de constituição genômica AAA'A'BB que, quando retrocruzado com os parentais capim-elefante e milho, produz as combinações genômicas AA'A'BB e AAA'B, respectivamente. Visando contribuir com o programa de melhoramento genético do capim-elefante da Embrapa Gado de Leite, as combinações genômicas foram avaliadas para características agrônomicas e bromatológicas. Avaliaram-se produção de matéria verde total (PMV), produção de matéria seca total (PMS), percentagem de matéria seca (%MS), produção de matéria seca de folhas (PMSF), produção de matéria seca de caule (PMSC), relação caule/folha (RFC), altura (ALT), vigor fenotípico (VF), número de perfilhos (NP), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), proteína bruta de (PB) e digestibilidade *in vitro* de matéria seca (DIVMS). Excetuando RFC e NP, todas as demais características apresentaram diferenças significativas para os genótipos ( $P<0,05$ ), indicando variabilidade genética entre os genótipos avaliados. A combinação genômica HCM-5x-2 destacou-se entre os pentaploides quanto à produção de matéria seca de forragem e a combinação genômica HCM-4x-2 destacou-se entre os tetraploides para a mesma característica. O efeito na melhoria da qualidade forrageira em *Pennisetum* por meio da introgressão de características favoráveis do milho foi evidenciado pelo melhor desempenho das combinações genômicas pentaploides para características bromatológicas, mostrando o potencial das mesmas para inclusão em programas de melhoramento genético.

---

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

## 2 ABSTRACT

LEÃO, Fernando Ferreira. Forage production and chemical composition of genomic combinations of elephant grass and pearl millet. In:\_\_\_\_\_. **Cytogenetics and forage potential of genomic combinations in elephant grass and pearl millet.** 2009. Cap.3, p. 89-112. Thesis (Doctor Genetics and Plant Breeding) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG \*.

*Pennisetum purpureum* ( $2n = 4x = 28$ , genomes A'A'BB) and *Pennisetum glaucum* ( $2n = 2x = 14$ , genomes AA) produce the triploid hybrid with genomic formation AA'B, gathering superior fodder characteristics from both parents. However, it is sterile due to irregular pairing of chromosomes in meiosis. The hexaploid of genomic constitution AAA'A'BB is obtained through the chromosome doubling by using an antimetabolic. When it is backcrossed with its parentals, elephant grass and pearl millet, AAA'A'BB produces the genomic combinations AA'A'BB and AAA'B, respectively. Aiming at contributing to the elephant grass improvement program of the Embrapa Gado de Leite, those genomic combinations were evaluated for both agronomic and bromatological characteristics. Fresh forage production (PMV), total dry matter production (PMS), dry matter ratio (%MS), leaves dry matter production (PMSF), stem dry matter production (PMSC), leaf/stem ratio (RFC), height (ALT), plant vigor (VF), number of tillers (NP), acid detergent fiber ratio (FDA), neutral detergent fiber ratio (FDN), crude protein ratio (PB), *in vitro* dry matter digestibility (DIVMS) were evaluated. Except for RFC and NP, all characteristics showed significant differences for genotypes ( $P < 0,05$ ), indicating genetic variability between the evaluated genotypes. As to forage dry matter production, the HCM-5x-2 genomic combination outstood the pentaploids while the HCM-4x-2 outstood the tetraploids. The improvement of forage quality in *Pennisetum* through the introgression of favorable traits from millet was enhanced by the improvement of genomic pentaploids combinations performance for bromatologic traits, showing their potential for being included in genetic breeding programs.

---

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

### 3 INTRODUÇÃO

O capim-elefante e o milheto são espécies cultivadas em quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. O capim-elefante é uma espécie alotetraploide com  $2n = 4x = 28$  cromossomos (genomas A'A'BB) e o milheto, uma espécie diploide com  $2n = 2x = 14$  cromossomos (genomas AA). Por serem estreitamente relacionadas, apresentam boa capacidade de combinação genética; nos híbridos obtidos pelo cruzamento de capim-elefante com o milheto, o milheto contribui com caracteres como vigor, resistência à seca e tolerância a doenças, qualidade forrageira e tamanho das sementes e o capim-elefante, com a rusticidade, agressividade, perenidade e elevada produtividade de matéria seca (Pereira et al., 2003). A partir deste cruzamento, obtêm-se híbridos triploides estéreis com  $2n = 3x = 21$  cromossomos (genomas AA'B), propagados vegetativamente, porém, de grande potencial forrageiro, tendo em vista serem tão produtivos e mais palatáveis que o próprio capim-elefante (Diz, 1994).

A fertilidade do híbrido pode ser resgatada por meio da duplicação cromossômica para a obtenção de hexaploides férteis com  $2n = 6x = 42$  cromossomos (genomas AAA'A'BB) e novas combinações gênômicas ou raças cromossômicas podem ser obtidas com o retrocruzamento do híbrido hexaploide com seu parental tetraploide (capim-elefante) e diploide (milheto). Espera-se que o hexaploide, quando cruzado com o capim-elefante, produza um híbrido pentaploide com  $2n = 5x = 35$  cromossomos (genomas AA'A'BB) e, quando cruzado com o milheto, produza um híbrido tetraploide com  $2n = 4x = 28$  cromossomos (genomas AAA'B). Embora esses cruzamentos possam ser realizados, não existem informações sobre o comportamento citogenético dos genótipos obtidos e nem sobre o potencial forrageiro dos mesmos. Mas, espera-se que ocorra a introgressão de características do milheto para o capim-elefante, produzindo combinações gênômicas com potencial forrageiro utilizável pelo programa de melhoramento



genético do capim-elefante da Embrapa Gado de Leite.

Tendo em vista a grande procura por novas variedades forrageiras para a produção de leite e a constante necessidade de criação de variabilidade genética que o melhoramento impõe, a obtenção de novas variedades de capim-elefante, por meio do cruzamento com o milheto, é uma estratégia de grande importância. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a produção de forragem e a composição bromatológica de genótipos obtidos por diferentes combinações genômicas de capim-elefante e milheto.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Campo Experimental de Coronel Pacheco da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, MG (latitude 21°33' S e longitude 43°6' W e altitude de 426 m). O clima da região é do tipo Cwa (temperado úmido com inverno seco e verão quente). O solo apresentava as seguintes características químicas: pH H<sub>2</sub>O = 5,9; P = 2,5 mg/dm<sup>3</sup>; K = 27 mg/dm<sup>3</sup>; Ca<sup>+2</sup> = 2,3 cmolc/dm<sup>3</sup>; Mg<sup>+2</sup> = 1,0 cmolc/dm<sup>3</sup>; Al<sup>+3</sup> = 0,0 cmolc/dm<sup>3</sup>; H + Al = 3,8 cmolc/dm<sup>3</sup>, matéria orgânica = 17,1 g/kg e carbono = 9,9 g/kg.

Foi utilizado o delineamento de blocos casualizados, com duas repetições. A parcela foi composta por uma linha de 6 metros, com espaçamento de 1,5 m entre linhas. O plantio do experimento ocorreu em 11/04/2008. Foram utilizados, na adubação de plantio, 50 g de superfostato simples por metro de sulco. O corte de uniformização foi realizado em 22/10/2008 e os cortes para avaliação de características agrônômicas foram realizados em 22/12/2008 (corte 1) e 19/02/2009 (corte 2). Foi realizada uma adubação de cobertura 40 dias após o plantio, utilizando-se 200 kg/ha da fórmula 20-05-20 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O).

Foram avaliados 14 genótipos de *Pennisetum* sp. (Tabela 1): dois híbridos interespecíficos triploides de *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum glaucum* (CNPGL 92-176-3 e CNPGL 94-49-6); quatro híbridos interespecíficos tetraploides de *P. purpureum* x *P. glaucum* (HCM-4x-1; HCM-4x-2; HCM-4x-3 e HCM-4x-4); três híbridos interespecíficos pentaploides de *P. purpureum* x *P. glaucum* (HCM-5x-1; HCM-5x-2 e HCM-5x-3); dois híbridos interespecíficos hexaploides de *P. purpureum* x *P. glaucum* (HCM-6x-1 e HCM-6x-2); uma população interespecífica hexaploide de *P. purpureum* x *P. glaucum* (cultivar Paraíso) e dois genótipos tetraploides de *Pennisetum purpureum* (cultivares Pioneiro e Cameroon). Dos 14 genótipos, 13 foram propagados vegetativamente

(clones) e apenas a cultivar Paraíso foi propagada por sementes (população).

TABELA 1 Combinação genética, cromossômica e ploidia esperada dos genótipos de *Pennisetum* sp. utilizados no experimento.

Genótipos	Identificação dos genótipos	Combinação genômica	Ploidia esperada (constituição genômica)
M-36	Milheto 36 (população de milheto)	2x	Diploide AA
CNPGL 92-176-3	Cultivar Merker (clone de capim-elefante) x CMS 464 (população de milheto)	(4x) x (2x)	Triploide (AA'B)
CNPGL 94-49-6	Cultivar Pasto Panamá (clone de capim-elefante) x Milheto 38 (população de milheto)	(4x) x (2x)	Triploide (AA'B)
Pioneiro	Cultivar Três Rios (clone de capim-elefante) x cultivar Merker de Santa Rita (clone de capim-elefante)	(4x) x (4x)	Tetraploide (A'A'BB)
Cameroon	Cultivar Cameroon (clone de capim-elefante)	4x	Tetraploide (A'A'BB)
HCM*-4x-1	Hexaploide-165 (clone hexaploide de capim-elefante x milheto) x Milheto 36 (população de milheto)	(6x) x (2x)	Tetraploide (AAA'B)
HCM-4x-2	Hexaploide 165 (clone hexaploide de capim-elefante x milheto) x Milheto 36 (população de milheto)	(6x) x (2x)	Tetraploide (AAA'B)
HCM-4x-3	Cultivar Paraíso (população hexaploide de capim-elefante x milheto) x Milheto MSI (população de milheto)	(6x) x (2x)	Tetraploide (AAA'B)

...continua...

Tabela 1, Cont.

HCM-4x-4	Hexaploide 07-3 (população hexaploide de capim-elefante x milheto) x Milheto 35 (população de milheto)	(6x) x (2x)	Tetraploide (AAA'B)
HCM-5x-1	CNPGL 96-27-3 (clone de capim-elefante) x cultivar Paraíso (população hexaploide de capim-elefante x milheto)	(4x) x (6x)	Pentaploide (A A'A'BB)
HCM-5x-2	CNPGL 96-27-3 (clone de capim-elefante) x Cultivar Paraíso (população hexaploide de capim-elefante x milheto)	(4x) x (6x)	Pentaploide (A A'A'BB)
HCM-5x-3	CNPGL 96-27-3 (clone de capim-elefante) x cultivar Paraíso (população hexaploide de capim-elefante x milheto)	(4x) x (6x)	Pentaploide (A A'A'BB)
Paraíso	Cultivar Paraíso (população hexaploide de capim-elefante x milheto)	6x	Hexaploide (AAA'A'BB)
HCM-6x-1	Hexaploide 07-1 (população hexaploide de capim-elefante x milheto)	6x	Hexaploide (AAA'A'BB)
HCM-6x-2	Hexaploide 07-2 (população hexaploide de capim-elefante x milheto)	6x	Hexaploide (AAA'A'BB)

\*HCM = híbrido de capim-elefante x milheto

As características agronômicas avaliadas nos dois cortes foram: altura das plantas (ALT), medida do solo até a curvatura da última folha completamente expandida; produção de matéria verde total (PMV); produção de matéria seca total (PMS), obtida após secagem em estufa, a 60°C, por 72 horas;

percentagem de matéria seca (%MS); produção de matéria seca de folhas (PMSF); produção de matéria seca de caule (PMSC) e relação folha/caule (RFC). Também foram analisados o vigor fenotípico (VF), com escores de 1 (ruim) a 5 (excelente) e o número de perfilhos por metro linear (NP). As características diâmetro de caule (DC), comprimento de folha em cm (CF) e largura de folha (LF) foram mensuradas apenas no segundo corte.

As características bromatológicas avaliadas no primeiro corte foram: digestibilidade *in vitro* da matéria seca de planta inteira (DIVMS), percentagem de fibra em detergente ácido de planta inteira (FDA), percentagem de fibra em detergente neutro de planta inteira (FDN) e percentagem de proteína bruta de planta inteira (PB). No segundo corte, foram avaliadas: percentagem de fibra em detergente ácido do caule (FDAC), percentagem de fibra em detergente neutro do caule (FDNC), percentagem de proteína bruta do caule (PBC), percentagem de fibra em detergente ácido das folhas (FDAF), percentagem de fibra em detergente neutro das folhas (FDNF) e percentagem de proteína bruta das folhas (PBF). As análises bromatológicas foram realizadas pelo Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite, de acordo com os procedimentos descritos por Silva & Queiroz (2002).

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e, para as características que foram significativas ( $P < 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de variância e dos testes de médias para as características agronômicas encontram-se nas Tabelas 2 e 3. A maioria das características agronômicas apresentou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ), indicando a existência de variabilidade genética entre os genótipos de *Pennisetum* sp. avaliados (Tabelas 2 e 3). Apenas as características relação folha/caule (RFC) e número de perfilhos (NP) não apresentaram diferenças significativas entre os genótipos ( $P > 0,05$ ).

O milheto não foi incluído neste estudo por tratar-se de de uma cultura de ciclo anual. Para as combinações genômicas, o padrão de referência é o capim-elefante.

Para a produção de matéria verde total (PMV), a média dos genótipos foi de 28,63 t/ha/corte, tendo a cultivar de capim-elefante Pioneiro se destacado com produção de 55,03 t/ha/corte. Também se observou que as diferentes combinações genômicas apresentaram potencial de produção de matéria verde (29,11 a 37,05 t/ha/corte), visto o destaque apresentado pelos híbridos triploides CNPGL 92-176-3 e CNPGL 94-49-6, tetraploides HCM-4x-1 e HCM-4x-2, pentaploides HCM-5x-1 e HCM-5x-2 e hexaploide HCM-6x-1 (Tabela 2). Os resultados para PMV demonstram que as diferentes combinações genômicas apresentam potencial produtivo para o desenvolvimento de cultivares forrageiras.

Quanto à produção de matéria seca total (PMS), a média dos genótipos foi de 4,86 t/ha/corte, tendo novamente a cultivar Pioneiro de capim-elefante se destacado com produção de 9,76 t/ha/corte. O potencial para produção de matéria seca total também foi observado nas combinações genômicas CNPGL 94-49-6, HCM-4x-2 e HCM-5x-2, com produções de 6,06, 6,19 e 6,44 t/ha/corte, respectivamente (Tabela 2). Para esta característica, a combinação

genômica hexaploide HCM-6x-1 não ocorreu entre as de melhor desempenho, mas, como ela se destacou para PMS, infere-se que este genótipo apresente maior quantidade de água na planta, com conseqüente menor teor de PMS e porcentagem de MS. Este resultado demonstra que os híbridos hexaploides são menos recomendados para a produção de silagem e feno, em função do maior teor de umidade.

Para a porcentagem de matéria seca (%MS), a média geral foi de 17,16% e destacou-se a combinação genômica HCM-4x-4, com 22,01%. A combinação genômica HCM-5x-2 também obteve bom desempenho, com 20,41%. As combinações genômicas HCM-4x-2, HCM-4x-3 e CNPGL 92-176-3 também apresentaram potencial para %MS com 18,93%, 18,62% e 17,55%, respectivamente, resultado semelhante ao das cultivares Pioneiro e Cameroon de capim-elefante, que serviram como testemunha (Tabela 2). Para esta característica, novamente, as combinações genômicas hexaploides tiveram desempenho abaixo do das demais raças cromossômicas.

Quanto à produção de matéria seca de folhas (PMSF), a média geral foi de 2,39 t/ha/corte. A cultivar Pioneiro de capim-elefante novamente se destacou, com produção de 4,79 t/ha/corte, seguida das combinações genômicas CNPGL 94-49-6, CNPGL 92-176-3 e HCM 4x-2, com produtividade de 3,15, 2,78 e 3,20 t/ha/corte, respectivamente (Tabela 2). Juntando-se às combinações genômicas hexaploides, para esta característica, as raças cromossômicas pentaploides tiveram desempenho abaixo das tetraploides e triploides.

Para a produção de matéria seca de caule (PMSC), a média geral foi de 2,48 t/ha/corte e a cultivar Pioneiro de capim-elefante produziu 4,97 t/ha/corte. A combinação genômica HCM-5x-2 também se destacou, com 3,86 t/ha/corte. A combinação genômica HCM-4x-2 produziu 3,00 t/ha/corte, resultado semelhante ao da cultivar Cameroon de capim-elefante (Tabela 2).

A relação folha/caule é fator importante na previsão do valor nutritivo

de uma cultivar, pois indica a proporção de folhas que está presente na forragem total, as quais são de maior valor nutritivo, quando comparadas com os caules. Assim, a alta proporção de folhas em relação aos caules constitui uma característica desejável em uma planta forrageira, por estar diretamente associada com a qualidade e o consumo, principalmente em espécies que apresentam caules mais grossos, como o capim-elefante (Laredo & Minson, 1973). Para a relação folha/caule (RFC), neste trabalho, não houve diferença significativa entre os genótipos avaliados ( $P>0,05$ ). As médias entre os genótipos variaram de 0,67 a 1,15.

Os resultados demonstram que, de maneira geral, ao menos uma combinação genômica tetraploide se destacou para todas as características agrônômicas avaliadas (Tabela 2), mostrando potencial produtivo para características forrageiras. As combinações genômicas triploides também apresentaram bom desempenho, exceto para PMSC. Em seguida, ocorreram as combinações genômicas pentaploides, com bom desempenho para PMV, PMS e %MS, seguida da combinação genômica hexaploide HCM-6x-1, que se destacou apenas para PMV.

A cultivar Pioneiro de capim-elefante destacou-se dos demais genótipos para PMV, PMS, PMSF e PMSC, além de apresentar boa estabilidade de produção nas diferentes épocas do ano (Pereira et al., 1997). Os resultados alcançados pela cultivar Pioneiro reforçam a importância da avaliação regional no processo de seleção de clones de capim-elefante (Freitas, 2000).

Para a característica altura de planta (ALT), a média geral foi de 1,57 m. A cultivar Pioneiro de capim-elefante e a combinação genômica HCM-5x-3 obtiveram as maiores alturas, com médias de 2,04 e 2,01 m, respectivamente. De maneira geral, as plantas mais altas mostraram-se mais vigorosas (Tabela 3).

Quanto à característica vigor fenotípico (VF), a média geral foi de 3,93. A cultivar Pioneiro de capim-elefante foi a que obteve a melhor nota (4,88).



Apenas a cultivar Paraíso e a combinação genômica HCM-4x-3 receberam notas mais baixas (3,0). Todas as demais combinações genômicas apresentaram potencial semelhante ao da cultivar Cameroon para esta característica (Tabela 3), o que denota bom potencial para características forrageiras.

O maior número de perfilhos basais implica em maior número de gemas axilares para o desenvolvimento de perfilhos aéreos (Jacques, 1994), os quais, segundo Corsi (1993), são a base de produção da pastagem durante o período de crescimento. Assim, cultivares que apresentam elevado número de perfilhos basais e aéreos têm maior potencial de uso em sistema de pastejo rotativo. Para este trabalho, com relação ao número de perfilhos por metro linear (NP), não houve diferença significativa entre os genótipos avaliados (Tabela 3). A combinação genômica triploide CNPGL 94-49-6 obteve a maior média, com 43 perfilhos por metro linear e a combinação genômica HCM-5x-2, a menor, 21,5 perfilhos por metro linear (Tabela 3). A falta de diferença para os tratamentos para o número de perfilhos pode ser explicada pela idade das plantas, que perfilham menos quando mais novas. Sugere-se que a confirmação da diferença seja avaliada em plantas com mais de um ano, o que não foi possível neste trabalho.

Quanto ao diâmetro do caule (DC), a média geral foi de 1,45 cm, tendo a cultivar Pioneiro de capim-elefante sido a que apresentou o menor diâmetro, com 1,05 cm (Tabela 3). Para o CF, a média geral foi de 90,93 cm e as combinações genômicas CNPGL 94-49-6, HCM-4x-4, HCM-5x-3 e Cameroon apresentaram as maiores médias (103,0 cm, 104,5 cm, 108,5 e 98,0 cm, respectivamente) e a cultivar Pioneiro a menor média (65,3 cm). Com relação à largura de folha (LF), a média geral foi de 2,31 cm e as combinações genômicas HCM-6x-2, HCM-4x-3 e HCM-6x-1 foram as de maior largura, com 2,80 cm, 2,75 cm e 2,73 cm, respectivamente (Tabela 5). A cultivar Pioneiro de capim-elefante foi a que apresentou a menor largura, 1,53 cm (Tabela 3).

TABELA 2 Teste de médias e análises de variância para produção de matéria verde total (PMV), produção de matéria seca total (PMS), percentagem de matéria seca (%MS), produção de matéria seca de folhas (PMSF), produção de matéria seca de caule (PMSC) e relação folha/caule (RFC).

Genótipos	PMV (t/ha/corte)	PMS (t/ha/corte)	%MS	PMSF (t/ha/corte)	PMSC (t/ha/corte)	RFC
CNPGL 92-176-3	29,11 ab	5,25 b	17,55 abc	2,78 ab	2,47 bc	1,11
CNPGL 94-49-6	37,05 ab	6,06 ab	16,42 bc	3,15 ab	2,91 bc	1,08
Pioneiro	55,03 a	9,76 a	17,93 abc	4,79 a	4,97 a	1,04
Cameroon	33,51 ab	5,82 ab	17,95 abc	2,85 ab	2,97 abc	0,99
HCM <sup>1</sup> -4x-1	28,64 ab	4,52 b	15,60 bc	2,17 b	2,35 bc	0,97
HCM-4x-2	33,48 ab	6,19 ab	18,93 abc	3,20 ab	3,00 abc	1,05
HCM-4x-3	13,10 b	2,47 b	18,62 abc	1,16 b	1,30 c	0,95
HCM-4x-4	15,92 b	3,55 b	22,01 a	1,67 b	1,88 bc	1,01
HCM-5x-1	30,05 ab	4,22 b	14,01 c	2,14 b	2,08 bc	1,05
HCM-5x-2	31,40 ab	6,44 ab	20,41 ab	2,58 b	3,86 ab	0,67
HCM-5x-3	17,76 b	2,80 b	15,98 bc	1,50 b	1,29 c	1,15
Paraíso	20,06 b	2,81 b	14,10 c	1,48 b	1,33 c	1,19
HCM-6x-1	35,39 ab	4,97 b	14,53 c	2,42 b	2,56 bc	0,93
HCM-6x-2	20,33 b	3,25 b	16,21 bc	1,55 b	1,71 c	0,92
Média Geral	28,63	4,86	17,16	2,39	2,48	1,00
QMG <sup>2</sup>	236,00**	7,66**	11,11**	1,82**	2,16**	0,03 <sup>ns</sup>
CV%	24,84	20,46	7,67	21,57	20,10	11,03

<sup>1</sup>: HCM = híbrido de capim-elefante x milheto

<sup>2</sup>: QMG = quadrado médio de genótipos

<sup>ns</sup> Não significativo e \*\* Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey (1949), a 1% de probabilidade.

TABELA 3 Teste de média e análises de variância para altura da planta (ALT), vigor fenotípico (VF), número de perfilhos (NP), diâmetro do caule (DC), comprimento da folha (CF) e largura da folha (LF).

Genótipo	ALT (m)	VF (1 a 5)	NP (perf./m)	DC (cm)	CF (cm)	LF (cm)
CNPGL 92-176-3	1,39 b	3,75 ab	38,75	1,45 abcd	95,8 ab	2,55 ab
CNPGL 94-49-6	1,62 ab	4,50 ab	43,00	1,15 cd	103,0 a	2,20 abcd
Pioneiro	2,04 a	4,88 a	37,25	1,05 d	65,3 b	1,53 d
Cameroon	1,75 ab	4,38 ab	36,25	1,38 abcd	98,0 a	2,00 bcd
HCM <sup>1</sup> *-4x-1	1,73 ab	4,50 ab	39,00	1,60 abcd	88,3 ab	2,48 ab
HCM-4x-2	1,63 ab	4,13 ab	31,25	1,60 abcd	90,0 ab	2,23 abcd
HCM-4x-3	1,20 b	3,00 b	31,00	1,65 abc	88,3 ab	2,75 a
HCM-4x-4	1,66 ab	3,75 ab	38,50	1,15 cd	104,5 a	2,50 ab
HCM-5x-1	1,41 b	3,63 ab	34,00	1,25 bcd	85,5 ab	1,63 cd
HCM-5x-2	1,68 ab	4,25 ab	21,50	1,65 abc	85,0 ab	2,35 ab
HCM-5x-3	2,01 a	4,00 ab	23,50	1,40 abcd	108,5 a	2,35 ab
Paraíso	1,24 b	3,00 b	41,00	1,38 abcd	80,3 ab	2,25 abc
HCM-6x-1	1,41 b	3,75 ab	23,75	1,75 ab	86,0 ab	2,73 a
HCM-6x-2	1,24 b	3,50 ab	36,50	1,83 a	94,8 ab	2,80 a
Média Geral	1,57	3,93	33,95	1,45	90,93	2,31
QMG <sup>2</sup>	0,14**	0,61*	95,50 <sup>ns</sup>	0,12**	46,78**	0,30**
CV%	8,80	11,12	23,22	9,75	8,87	7,70

<sup>1</sup>: HCM = híbrido de capim-elefante x milho

<sup>2</sup>: QMG = quadrado médio de genótipos

<sup>ns</sup> Não significativo e \*\* e \* Significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey (1949), a 1% de probabilidade.

Para todas as características bromatológicas (Tabelas 4 e 5), verificaram-se diferenças significativas entre os genótipos (P<0,05).

TABELA 4 Teste de média e análises de variância para percentagem de fibra em detergente ácido (FDA), percentagem de fibra em detergente neutro (FDN), percentagem de proteína bruta (PB) e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS).

Genótipo	FDA(%)	FDN(%)	PB(%)	DIVMS(%)
CNPGL 92-176-3	40,11 bc	69,96 efg	7,51 abc	58,02 ab
CNPGL 94-49-6	44,99 d	73,67 h	5,71 bc	54,71 abc
Pioneiro	38,97 bc	67,70 cde	5,03 c	56,65 ab
Cameroon	41,68 cd	69,72 efg	4,77 c	55,06 abc
HCM <sup>1</sup> -4x-1	42,04 cd	72,68 gh	6,07 bc	58,49 ab
HCM-4x-2	39,34 bc	68,22 cde	6,31 bc	53,36 bc
HCM-4x-3	38,25 abc	68,51 def	7,27 abc	56,47 ab
HCM-4x-4	41,86 cd	71,77 fgh	6,45 bc	52,88 bc
HCM-5x-1	37,59 ab	63,70 ab	8,33 ab	54,33 abc
HCM-5x-2	34,46 a	60,52 a	9,74 a	50,78 c
HCM-5x-3	41,72 cd	67,82 cde	7,13 abc	57,04 ab
Paraíso	37,46 ab	65,01 bc	7,64 abc	57,98 ab
HCM-6x-1	39,22 bc	65,85 bcd	7,09 abc	59,91 a
HCM-6x-2	38,60 bc	66,08 bcd	7,14 abc	56,90 ab
Média geral	39,73	67,94	6,87	55,90
QMG <sup>2</sup>	13,45**	25,71**	3,39**	12,49**
CV%	2,40	1,26	1,93	2,51

<sup>1</sup>: HCM = híbrido de capim-elefante x milheto

<sup>2</sup>: QMG = quadrado médio de genótipos

\*\* Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey (1949), a 1% de probabilidade.

TABELA 5 Teste de média e análises de variância para percentagem de fibra em detergente ácido das folhas (FDAF), percentagem de fibra em detergente neutro das folhas (FDNF), percentagem de proteína bruta das folhas no (PBF), percentagem de fibra em detergente ácido do caule (FDAC), percentagem de fibra em detergente neutro do caule (FDNC) e percentagem de proteína bruta (PBC).

Genótipos	FDAF(%)	FDNF(%)	PBF(%)	FDAC(%)	FDNC(%)	PBC(%)
CNPGL 92-176-3	38,66 abc	69,06 bc	11,17 ab	41,20 abcd	70,62 cd	3,94 abc
CNPGL 94-49-6	40,44 bc	70,95 c	9,09 ab	41,87 abcd	72,08 de	3,57 abc
Pioneiro	38,12 abc	68,39 abc	9,45 ab	42,77 abcde	71,84 de	3,04 bc
Cameroon	41,56 c	70,72 c	7,76 b	42,88 bcde	73,02 de	3,70 abc
HCM <sup>1</sup> -4x-1	40,85 bc	71,83 c	9,10 ab	44,62 de	73,33 e	3,27 bc
HCM-4x-2	39,14 abc	67,87 abc	9,16 ab	39,31 a	68,67 bc	2,80 c
HCM-4x-3	38,43 abc	68,45 abc	10,53 ab	43,36 cde	72,07 de	3,56 abc
HCM-4x-4	38,90 abc	70,19 c	9,71 ab	50,54 f	80,13 f	2,64 c
HCM-5x-1	35,54 ab	63,04 ab	11,55 a	40,54 abc	66,11 ab	4,90 a
HCM-5x-2	33,75 a	61,95 a	10,06 ab	46,00 e	68,40 abc	2,85 c
HCM-5x-3	38,76 abc	66,57 abc	8,60 ab	41,68 abcd	72,00 de	3,68 abc
Paraíso	38,25 abc	67,26 abc	10,17 ab	39,65 ab	65,74 a	4,26 ab
HCM-6x-1	38,88 abc	67,64 abc	9,61 ab	40,24 abc	66,35 ab	3,93 abc
HCM-6x-2	35,27 ab	65,98 abc	10,57 ab	41,73 abcd	68,44 bc	3,79 abc
Média Geral	38,32	67,85	9,75	42,60	70,63	3,56
QMG <sup>2</sup>	9,38**	16,11**	2,06*	17,36**	28,77**	0,76**
CV%	3,88	2,40	9,03	2,02	0,94	9,39

<sup>1</sup>: HCM = híbrido de capim-elefante x milheto

<sup>2</sup>: QMG = quadrado médio de genótipos

\*\* e \* Significativo, a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey (1949), a 1% de probabilidade.

Para a percentagem de fibra em detergente ácido de planta inteira (FDA), a média geral foi de 39,73% (Tabela 4). A combinação genômica HCM-5x-2 apresentou a menor FDA, com 34,46%, seguida de Paraíso e HCM-5x-1 (37,46% e 37,59%, respectivamente), sendo ambas menores que as obtidas pelas testemunhas Pioneiro e Cameroon de capim-elefante (38,97% e 41,68%,

respectivamente). O genótipo CNPGL 94-49-6 obteve a maior FDA, com 44,99%. Segundo Soest (1994), a análise de FDA representa uma estimativa do teor total de celulose e lignina da amostra, sendo inversamente relacionada com a digestibilidade da MS. Assim, valores menores de FDA indicam a presença de menor concentração de lignina na parede celular e, portanto, maior digestibilidade da MS (Soest, 1994). Verifica-se, portanto, que, para essa característica, o melhor desempenho foi da combinação genômica HCM-5x-2 e o pior, do genótipo CNPGL 94-49-6.

Quanto à percentagem de fibra em detergente neutro de planta inteira (FDN), a média geral foi de 67,94% (Tabela 4) e o comportamento dos genótipos foi muito semelhante ao da FDA. A combinação genômica HCM-5x-2 apresentou a menor FDN, com 60,52%, seguida de HCM-5x-1 com 63,70%, sendo ambas inferiores às obtidas pelas testemunhas Paraíso, Pioneiro e Cameroon de capim-elefante (65,01%, 67,70% e 69,72%, respectivamente). O genótipo CNPGL 94-49-6 obteve a maior FDN, com 73,67%. Segundo Soest (1994), a análise de FDN estima a concentração total de celulose, hemicelulose e lignina da parede celular, sendo o teor de FDN inversamente relacionado com a capacidade de consumo de MS, o que significa que quanto menor for esse valor estimado, maior será a expectativa de consumo. Verifica-se, portanto, que, para essa característica, o melhor desempenho foi o da combinação genômica HCM-5x-2 e o pior do genótipo CNPGL 94-49-6.

Quanto à percentagem de proteína bruta de planta inteira (PB), a média geral foi de 6,87% (Tabela 4). As maiores PB foram obtidas por HCM-5x-2 (9,74%), seguido de HCM-5x-1 (8,33%). As testemunhas Cameroon e Pioneiro apresentaram as menores PB (4,77% e 5,03%, respectivamente). Esses resultados demonstram que híbridos interespecíficos de capim-elefante com milho tendem a apresentar maior percentagem de proteína bruta, quando comparados com clones tetraploides de capim-elefante, indicando a introgressão

de características de interesse do milheto para a melhoria da qualidade nutricional destes híbridos. Assim sendo, é elevado o potencial para inclusão desses materiais no programa de melhoramento genético de capim-elefante.

A digestibilidade *in vitro* da matéria seca de planta inteira (DIVMS) teve média geral 55,90 (Tabela 4). O genótipo HCM-6x-1 apresentou a maior DIVMS (59,91%). Entretanto, o genótipo HCM-5x-2 obteve a menor DIVMS (50,78), o que não era esperado, já que esse genótipo teve boa performance para FDA, FDN e PB.

De maneira geral, o melhor desempenho para as características bromatológicas de planta inteira foi obtido pelas combinações genômicas pentaploides, destacando-se o genótipo HCM-5x-2.

Deve ser ressaltado que as combinações genômicas pentaploides (AA'A'BB) têm constituição genômica semelhante à do capim-elefante (A'A'BB), sendo a diferença composta pela inclusão adicional do genoma A do milheto. Como o desempenho para características bromatológicas das combinações genômicas pentaploides foi superior ao das testemunhas de capim-elefante, infere-se que a presença do genoma adicional do milheto foi importante para a introgressão dessas características.

Para percentagem de fibra em detergente ácido das folhas (FDAF) e fibra em detergente neutro das folhas (FDNF), as médias gerais foram, respectivamente, de 38,32% e 67,85% (Tabela 5). A combinação genômica HCM-5x-2 apresentou as menores FDAF (33,75%), seguido do HCM-6x-2 e HCM-5x-1 (35,27 e 35,54%, respectivamente). Para FDNF, o HCM-5x-2 obteve novamente a menor média (61,95%), seguido do HCM-5x-1 (63,04%). As maiores FDAF foram apresentadas pelos genótipos Cameroon, HCM-4x-1 e CNPGL 94-49-6 (41,56%, 40,85% e 40,44%, respectivamente). Para FDNF, os maiores valores também foram apresentados pelos genótipos HCM-4x-1, CNPGL 94-49-6 e Cameroon (71,83%, 70,95% e 70,72%, respectivamente).

Estes resultados indicam o bom potencial das combinações genômicas pentaploides para inclusão no programa de melhoramento genético do capim-elefante, também devendo ser citada a combinação genômica hexaploide HCM-6x-2, com FDAF de 35,27%.

A percentagem de proteína bruta das folhas (PBF) teve média geral de 9,75% e, novamente, uma combinação genômica pentaploide, desta vez HCM-5x-1, obteve o melhor resultado, com 11,55% (Tabela 5). A menor PBF foi obtida pela cultivar Cameroon (7,76%). Os demais genótipos tiveram desempenho variando de 8,60% a 11,55%.

Os resultados para as características bromatológicas de folha demonstram o bom potencial bromatológico das combinações genômicas, em especial das pentaploides, principalmente levando-se em conta que as folhas apresentam melhor qualidade nutricional que o caule, visto que, no pastejo de capim-elefante, essas representam a quase totalidade da forragem consumida (Boddorff & Ocumpaugh, 1986). Esses resultados concordam com Hanna & Monson (1980) e Boddorff & Ocumpaugh (1986), os quais observaram que os híbridos interespecíficos podem apresentar melhor qualidade forrageira do que o capim-elefante.

Para as características bromatológicas de caule (Tabela 5), a percentagem de fibra em detergente ácido do caule (FDAC) teve média geral de 42,60%. A combinação genômica HCM-4x-2 obteve a menor FDAC, com 39,31%, seguida da cultivar Paraíso (39,65%). Os genótipos HCM-4x-4 e HCM-5x-2 apresentaram as maiores FDAC (50,54% e 46,00%, respectivamente).

Para percentagem de fibra em detergente neutro do caule (FDNC), a média geral foi de 70,63% e o melhor desempenho foi o da cultivar Paraíso, com 65,74% (Tabela 5). As combinações genômicas HCM-5x-1 e HCM-6x-1, com 66,11% e 66,35%, respectivamente também mostraram bom potencial para essa característica, seguidas da combinação genômica HCM-5x-2, com 68,40%.



A percentagem de proteína bruta do caule (PBC) teve média geral de 3,56%. A combinação genômica HCM-5x-1 destacou-se com 4,90% (Tabela 5), seguida da cultivar Paraíso, com 4,26%. Os genótipos HCM-4x-4, HCM-4x-2 e HCM-5x-2 apresentaram as menores PBC (2,64%, 2,80% e 2,85%, respectivamente).

Para as características bromatológicas de caule, de maneira geral, as combinações genômicas apresentaram bom potencial para o melhoramento, com destaque para HCM-4x-2, que obteve o menor valor de FDAC (39,31%) e HCM-5x-1, com o maior valor para PBC (4,90%), alcançando resultados superiores aos das testemunhas Pioneiro e Cameroon de capim-elefante (Tabela 5).

## 6 CONCLUSÕES

Existe variabilidade entre as combinações genômicas para a maioria das características estudadas.

A combinação genômica HCM-5x-2 destacou-se entre os pentaploides quanto à produção de matéria seca de forragem e a combinação genômica HCM-4x-2 destacou-se entre os tetraploides para a mesma característica.

As combinações genômicas pentaploides HCM-5x-1 e HCM-5x-2 tiveram o melhor desempenho para as características bromatológicas de planta inteira e de folha (FDA, FDN e PB), demonstrando o efeito do uso do milho no melhoramento da qualidade forrageira em *Pennisetum*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BODDORFF, D.; OCUMPAUGH, W.R. Forage quality of pearl millet x napiergrass hybrids and dwarf napiergrass. **Proceedings. Soil and Crop Science Society of Florida**, Belle Glade, v.45, p.170-173, July 1986.

BOTREL, M.A.; PEREIRA, A.V.; FREITAS, V.P.; XAVIER, D.F. Potencial forrageiro de novos clones de capim elefante. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.29, n.2, p.334-340, mar. 2000.

CORSI, M. Manejo de capim elefante sob pastejo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 10., 1992, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1993. p.143-167.

DIZ, D.A. **Breeding procedures and seed production management in pearl millet x elephantgrass hexaploids hybrids**. 1994. 118p. These (Doctor of Science in Agronomy/Genetics and Plant Breeding) - University of Florida, Florida.

FREITAS, F.V. **Avaliação e seleção para pastejo de clones de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e de um híbrido com o milheto (*Pennisetum glaucum* (E.) Leek)**. 2000. 105p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

GOMIDE, J.A. Capim elefante cultivar Mott, uma variedade anã de *Pennisetum purpureum*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.192, p.62-65, mar. 1998.

HANNA, W.W.; MONSON, W.G. Yield, quality, and breeding behavior of pearl millet x napiergrass interspecific hybrids. **Agronomy Journal**, Madison, v.72, p.358-360, Mar. 1980.

JACQUES, A.V.A. Caracteres morfo-fisiológicos e suas implicações com o manejo. In: CARVALHO, M.M.; ALVIM, M.J.; XAVIER, D.F. (Ed.). **Capim elefante: produção e utilização**. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1994. p.31-47.

LAREDO, M.A.; MINSON, D.J. The voluntary intake, digestibility and retention time by sheep leaf and stem fractions of five grasses. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.24, n.2, p.875-888, 1973.

PEREIRA, A.V.; MARTINS, C.A.; FILHO, A.B.C.; CÓSER, A.C.; TELES, F.M.; FERREIRA, R.P.; AMORIM, M.E.T.; ROCHA, A.F. Pioneiro - nova cultivar de capim elefante para pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: SBZ, 1997. p.102-104.

PEREIRA, A.V.; SOUZA SOBRINHO, F.; SOUZA, F.H.D.; LÉDO, F.J.S. Tendências no melhoramento genético e produção de sementes de forrageiras no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 7., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 1 CD-ROM.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2002. 235p.

SOEST, P.J. van. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.

TUKEY, J.W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**, Washington, v.5, n.3, p.232-242, Sept. 1949.