



LARISSA FONSECA ANDRADE VIEIRA

**ANÁLISE CITOMOLECULAR EM HÍBRIDOS
DE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO (*Pennisetum*
sp. Schum., Poaceae)**

LAVRAS - MG

2010

LARISSA FONSECA ANDRADE VIEIRA

**ANÁLISE CITOMOLECULAR EM HÍBRIDOS DE CAPIM-
ELEFANTE E MILHETO (*Pennisetum* sp. Schum., Poaceae)**

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

Orientadora
Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

**LAVRAS - MG
2010**

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

Vieira, Larissa Fonseca Andrade.

Análise citomolecular em híbridos de capim-elefante e milheto
(*Pennisetum sp.* Schum., Poaceae) / Larissa Fonseca Andrade

Vieira. – Lavras : UFLA, 2010.

123 p. : il.

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

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. Hibridização in situ. 2. Mapeamento físico. 3. Alterações
genômicas. 4. Eliminação cromossômica. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 633.2

LARISSA FONSECA ANDRADE VIEIRA

**ANÁLISE CITOMOLECULAR EM HÍBRIDOS DE CAPIM-
ELEFANTE E MILHETO (*Pennisetum* sp. Schum., Poaceae)**

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

APROVADA em 11 de junho de 2010.

| | |
|--|--------------------|
| Profª. Dra. Ana Christina Brasileiro-Vidal | DGE/UFPE |
| Prof. Dr. Mateus Mondin | DGE/ESALQ-USP |
| Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos | ICB/UFJF |
| Dr. Antônio Vander Pereira | EMBRAPA CNPGL – JF |

Profª. Dra. Lisete Chamma Davide
UFLA
(Orientadora)

**LAVRAS - MG
2010**

A todos os citogeneticistas, apaixonados por cromossomos como eu,
dedico este trabalho!

AGRADEÇO

A Deus, a força maior que nos guia para frente!

Aos meus queridos pais, Eugênio e Luciene, cujo amor e carinho me deram força para seguir em frente e tornar este trabalho possível!

Ao meu esposo e grande amor, Alexandre, que esteve sempre ao meu lado, ajudando-me a superar os obstáculos de cada dia dessa árdua jornada – amo você.

Aos meus irmãozinhos, Rodrigo, Nuno Henrique e Nilo, que mesmo distantes, preenchem minha vida!

Aos meus avôs, Cesídio e Manoel, e minhas avós, Laurinha e Lúcia, pelo amor e incentivo!

Aos meus amigos e familiares que sempre acreditaram em mim!

Aos meus sogros, Sueli e Arnaldo, pelo apoio, carinho, vibração e tudo mais!

Às minhas amigas, Ester (saudades) e Mel, pela amizade, carinho, força, enfim, por tudo de bom e ruim que passamos nesse período!

À minha orientadora, Lisete, responsável pela minha satisfação profissional, pela oportunidade e confiança, acreditando no meu potencial, auxiliando-me nessa caminhada tão difícil!

À Giovana, pelos conselhos, ideias e apoio dispensados desde o início do projeto, que foi tão difícil, até o fim, mesmo que de longe!

Ao Zé, pelos conselhos, amizade, realização do trabalho e por me introduzir à citogenética!

À Gaby, minha querida amiga e companheira de trabalho que esteve ao meu lado em todos os dias dessa difícil jornada de encontrar as metáfases perfeitas e “lindinhas”. Obrigada pela ajuda, adoro você!

Aos companheiros do Laboratório de Citogenética, pelo convívio diário!

Ao Lamartine e a Cidinha, dos Laboratórios de Genética Molecular e Microbiologia, que sempre disponibilizaram os aparelhos para a documentação dos géis.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, pelas ajudas nos assuntos aleatórios, e em especial Dona Ironcina, por sempre se preocupar comigo e torcer pelo meu sucesso!

À Iara, técnica do laboratório de Citogenética, pela amizade e por tornar nosso trabalho possível.

À secretaria da Genética, Helô, que sempre se mostrou pronta a ajudar nos problemas acadêmicos!

À Professora Ana Christina, por me ensinar a técnica de hibridização *in situ* e por toda ajuda e apoio que me deu durante a condução dos experimentos e implementação da metodologia no laboratório, por ter me salvado nos momentos de desespero e pelo incentivo e amizade!

Ao pessoal do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, da UFPE, por me receberem durante meu treinamento em Recife, em especial à Ana Rafaela que esteve me acompanhando arduamente nos meus experimentos.

Ao Saulo pelas boas conversas sobre citogenética e pelos conselhos e ideias trocadas para a realização do trabalho.

Ao Pesquisador Antonio Vander Pereira por disponibilizar os materiais genéticos e reagentes para condução dos experimentos.

Ao Professor Mateus Mondin, por disponibilizar seu tempo para fazer parte da banca!

Aos colegas do curso de Genética que estudaram comigo nesse tempo!

Aos professores, Magno, César, João Bosco, Elaine, Lisete, Giovana, Luciano, Samuel, Wagner e Evaristo, que contribuíram para minha formação!

Às instituições, CAPES, pela bolsa de estudo e FAPEMIG pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À Universidade Federal de Lavras por permitir minha formação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

O capim elefante (*Pennisetum purpureum* Shumack) e o milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] são importantes forrageiras tropicais. A proximidade genética existente entre essas espécies permite a obtenção de híbridos com qualidade forrageira superior aos genitores, os quais são explorados no melhoramento. No entanto, o híbrido triploide é estéril, havendo necessidade de restaurar a fertilidade dos mesmos via duplicação cromossômica. As tentativas de duplicação resultam em plantas hexaploides e mixoploides devido à eliminação cromossômica. Essas plantas constituem genótipos promissores para os programas de melhoramento. A caracterização dos cromossomos dessas espécies e sua identificação na combinação híbrida são de grande interesse, logo, o objetivo do trabalho foi estudar o comportamento genômico de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos. Para tanto, realizou-se bandamento cromossômico, mapeamento de genes de RNAr 18S-5.8S-26S (DNAr 45S) e 5S (DNAr 5S) via hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e caracterizou-se a eliminação cromossômica após hibridação e indução de poliploidia por meio da hibridização *in situ* genômica (GISH). Foram mapeados quatro sítios de DNAr 45S nos genótipos de milheto, capim elefante e híbrido triploide. O DNAr 5S foi observado em dois pares de cromossomos de milheto e um de capim-elefante. Bandas DAPI após desnaturação dos cromossomos com formamida auxiliaram na distinção dos cromossomos de capim-elefante e milheto. As marcas observadas após mapa físico de RNAr 18S-5.8S-26S e 5S e bandamento DAPI permitiram distinguir cinco dos quatorze cromossomos do lote haploide de capim-elefante e quatro dos sete cromossomos do lote haploide de milheto. O idiograma foi proposto para ambas as espécies, bem como para o híbrido. Adicionalmente, a (GISH) permitiu a identificação dos genomas dos parentais que estão sendo eliminados nos híbridos triploides submetidos a duplicação cromossômica. Foi observada grande variação cromossômica entre e dentro as células somáticas dos híbridos analisados. Não houve eliminação preferencial do genoma de um dos parentais. Adicionalmente a eliminação de sequências genômicas após hibridação foi demonstrada por meio de análise citogenética e de citometria de fluxo.

Palavras-chave: Hibridização *in situ*. Mapeamento físico. Alterações genômicas. Eliminação Cromossômica.

GENERAL ABSTRACT

Napier grass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*) are important tropical grass. The first is perennial, has high productive potential, nutrient quality and palatability, while the second is resistant to draught and tolerant to the low fertility of soils. The napier grass is an allotetraploid ($2n=4x=28$) with genomes A`A`BB. The pearl millet is a diploid ($2n=2x=14$) with genomes AA. The interspecific hybrid, resulting from cross between these two species is a triploid ($2n=3x=21$) with genomes AA`B and sterile. Chromosome doubling is used to restore the fertility of the hybrid, so it can be used on breeding programs. The chromosome doubling protocols result in hexaploids ($2n=6x=42$) and mixoploids ($2n=14$ until 42) plants as consequence of chromosome elimination. These plants are potential genotypes for breeding programs. The characterization of chromosomes on these species and their identification on hybrids is of great interest. Then, the identification and the individualization of each chromosome from A, A' and B genomes are important for understanding the chromosome elimination process. The aim of this work was study the genomic behavior of napier grass, pearl millet and their interspecific hybrids. In order to characterize chromosome elimination after hybridization and polyploidy it was used cytogenic tools as chromosome banding, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) mapping rRNA 45S and 5S genes and genomic *in situ* hybridization (GISH). DAPI bands were evident following chromosome desnaturation after formamide treatment. The rRNA genes 45S was mapped on four chromosomes in pearl millet, napier grass and interspecific hybrid. For DNA 5S it was observed four loci in pearl millet and two loci in napier grass. It was possible to distinguish five of fourteen chromosomes from napier grass haploid complement and four of seven chromosomes from pear millet haploid complement. The ideogram was also proposed for napier grass, pearl millet and interspecific hybrid. The GISH allowed to identify the genomes from parentals that were eliminated after chromosome doubling. There was a great variation of chromosome number in and between the hybrids analysed. It was not observed preferential elimination. Additionally elimination of genome sequences was demonstrated.

Keywords: *In situ* hybridization. Physical mapping. Genomic alterations. Chromosome elimination.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Mapeamento das regiões de DNAr 45S em (A) *P. glaucum* ($2n=2x=14$), (B) *P. purpureum* ($2n=4x=28$) e (C) híbrido interespecífico ($2n=3x=21$) (setas). Metáfases coradas em DAPI (A, B e C). Metáfases contra-coradas com DAPI e pseudo-coradas em cinza, sinalizando os sítios de DNAr 45S (A1, B1, C1). Note que para os três genótipos foram encontrados quatro sítios..... 52
- Figura 2 Mapeamento das regiões de DNAr 5S em (A) *P. glaucum* ($2n=2x=14$) e (B) *P. purpureum* ($2n=4x=28$). (A e B) Metáfases coradas em DAPI. (A1 e B1) Metáfases contra-coradas com DAPI e pseudo-coradas em cinza, sinalizando os sítios de DNAr 5S. Note que *P. glaucum* apresentou quatro sítios (A1) e *P. purpureum* apresentou dois sítios (B1) de DNAr 5S..... 53
- Figura 3 Bandamento DAPI após tratamento com formamida em *Pennisetum glaucum* ($2n=2x=14$), milho (A), *Pennisetum purpureum* ($2n=4x=28$), capim-elefante (B) e híbrido interespecífico ($2n=3x=21$). Note todos os cromossomos com bandas centroméricas. Em B está sendo evidenciado o cromossomo dez (X), facilmente distinguível nas metáfases de *P. purpureum*..... 54
- Figura 4 Idiograma contendo marcas de Bandamento CMA, DAPI e regiões de DNAr 45S e 5S de (A) *P. glaucum* ($2n=2x=14$), (B) *P. purpureum* ($2n=4x=28$) e (C) híbrido interespecífico ($2n=3x=21$)..... 55

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Hibridização *in situ* genômica em híbridos de capim-elefante e milho submetidos a duplicação cromossômica. (A, B e C) Metáfases observadas no DAPI com 42 (A), 39 (B) e 38 (C) cromossomos. (A1, B1, C1) Cromossomos de milho hibridizados com sonda genômica: 14 (A1), 13 (B1) e 12 (C1) cromossomos..... 81

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Figura 2 | Hibridização <i>in situ</i> genômica em híbridos de capim-elefante e milho submetidos a duplicação cromossômica. (A, B e C) Metáfases observadas no DAPI com 30 (A), 26 (B) e 14 (C) cromossomos. (A1, B1, C1) Cromossomos de milho hibridizados com sonda genômica: 13 (A1) e 9 (B1 e C1) cromossomos..... | 82 |
| Figura 3 | Hibridização <i>in situ</i> genômica em híbridos de capim-elefante e milho submetidos a duplicação cromossômica. Núcleos interfásicos observadas no DAPI (A) e núcleos interfásicos hibridizados com sonda genômica, mostrando a distribuição do genoma de milho (B)..... | 83 |
| CAPÍTULO 4 | | |
| Figura 1 | Metáfases representativas dos cariótipos de (A) capim-elefante ($2n=4x=28$), (B) milho ($2n=2x=14$) e (C, D) híbrido interespecífico ($2n=3x=21$). Barra = $5\mu\text{m}$ | 110 |
| Figura 2 | Hibridização <i>in situ</i> genômica em híbridos de capim-elefante e milho ($2n=3x=21$). Cromossomos do híbrido corados com DAPI (A e C). Os cromossomos de milho (M) e capim-elefante (C) estão identificados em função da sonda genômica de milho (B, D) que marcou no híbrido os cromossomos pertencentes a este parental..... | 111 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Variação no número cromossômico somático de híbridos de capim-elefante e milho submetidos à indução de duplicação cromossômica..... 79
- Tabela 2 Variação no número cromossômico somático e na frequência de cromossomos eliminados por genoma de capim-elefante e milho nos híbridos interespecíficos submetidos à duplicação cromossômica..... 80

CAPÍTULO 4

- Tabela 1 Morfometria dos cromossomos de capim-elefante (BAG 54 e BAG 63) obtida da média de cinco metáfases. (Crom. = cromossomos; Cti = comprimento total de cada cromossomo; Rbi = relação de braços de cada cromossomo; ICi = Índice centromérico de cada cromossomo; CRi = Comprimento relativo de cada cromossomo; CTLH = comprimento total do lote haploide; CTLD = comprimento total do lote diploide)..... 106
- Tabela 2 Morfometria dos cromossomos de milho (M 36) obtida da média de cinco metáfases. (Crom. = cromossomos; Cti = comprimento total de cada cromossomo; Rbi = relação de braços de cada cromossomo; ICi = Índice centromérico de cada cromossomo; CRi = Comprimento relativo de cada cromossomo; CTLH = comprimento total do lote haploide; CTLD = comprimento total do lote diploide)..... 107
- Tabela 3 Morfometria dos cromossomos dos híbridos triploides entre capim-elefante e milho (BAG 54 x M 36 e BAG 63 x M 36) obtida da média de cinco metáfases. (Crom. = cromossomos; Cti = comprimento total de cada cromossomo; Rbi = relação de braços de cada cromossomo; ICi = Índice centromérico de cada cromossomo; CRi = Comprimento relativo de cada cromossomo; CTLH = comprimento total do lote haploide)..... 108

Tabela 4 Contribuição do Comprimento Total esperado para os cromossomos de cada um dos parentais, capim-elefante (C) e milheto (M) nos híbridos triploides (BAG 54 x M 36 e BAG 63 x M 36). (Crom. = cromossomos; Cti = comprimento total de cada cromossomo; CRi = Comprimento relativo de cada cromossomo; CTLH = comprimento total do lote haploide)..... 109

SUMÁRIO

| | | |
|-----|---|----|
| | CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA..... | 14 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 19 |
| 2.1 | Hibridação interespecífica no melhoramento de capim-elefante..... | 19 |
| 2.2 | Consequências e aplicações da hibridação e poliploidia no melhoramento de plantas..... | 21 |
| 2.3 | Hibridização <i>in situ</i>: aplicações na citogenética e no melhoramento de <i>Pennisetum</i>..... | 27 |
| | REFERÊNCIAS..... | 31 |
| | CAPÍTULO 2 – MAPEAMENTO FÍSICO DOS GENES DE RNAR 45S E 5S BANDAMENTO CROMOSSÔMICO FLUORESCENTE EM CAPIM-ELEFANTE E MILHETO..... | 40 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 43 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 46 |
| 2.1 | Material Genético..... | 46 |
| 2.2 | Obtenção de Metáfases..... | 46 |
| 2.3 | Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente e Bandamento Cromossômico..... | 47 |
| 2.4 | Análises..... | 48 |
| 3 | RESULTADOS..... | 49 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 56 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 62 |
| | REFERÊNCIAS..... | 63 |
| | CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA ELIMINAÇÃO CROMOSSÔMICA EM HÍBRIDOS DE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO (<i>Pennisetum</i> sp. Rich., Poaceae) MEDIANTE HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> GENÔMICA (GISH) | 67 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 70 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 73 |
| 2.1 | Material Genético..... | 73 |
| 2.2 | Análises Citogenéticas..... | 73 |
| 2.3 | Extração do DNA genômico..... | 74 |
| 2.4 | Hibridização <i>in situ</i> genômica (GISH)..... | 74 |
| 3 | RESULTADOS..... | 77 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 84 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 88 |
| | REFERÊNCIAS..... | 89 |
| | CAPÍTULO 4 – ALTERAÇÕES GENÔMICAS APÓS | 93 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| | HIBRIDAÇÃO ENTRE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO (<i>Pennisetum sp.</i> Rich., Poaceae)..... | |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 96 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 98 |
| 2.1 | Material Genético..... | 98 |
| 2.2 | Metodologias Empregadas..... | 98 |
| 2.2.1 | Análise Morfométrica dos Cromossomos..... | 98 |
| 2.2.2 | Análise de Citometria por Fluxo..... | 99 |
| 2.2.3 | Hibridização <i>in situ</i> genômica (GISH)..... | 100 |
| 3 | RESULTADOS..... | 103 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 112 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 117 |
| | REFERÊNCIAS..... | 118 |

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira é uma das mais importantes atividades no setor agropecuário, sendo Minas Geras o maior produtor de leite do país. Considerando que a alimentação dos animais é o componente com maior custo na atividade, existe uma forte demanda por forrageiras mais produtivas, com melhor qualidade nutricional e boa adaptação às diferentes condições ambientais (SOUZA SOBRINHO et al., 2005).

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach) é uma importante forrageira para a pecuária leiteira, sendo utilizado como fonte nutritiva para o gado de leite. Neste sentido, a Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora-MG vem conduzindo um programa de melhoramento do capim-elefante com o objetivo de produzir cultivares melhoradas. Uma das estratégias utilizadas é a produção de híbridos interespecíficos entre o capim-elefante e o milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. No híbrido as características de forragem do capim-elefante como elevada produção de matéria seca, boa palatabilidade, alto valor nutritivo e perenidade, são combinadas com a qualidade de forragem, boa resistência à seca e doenças, tolerância a baixos níveis de fertilidade do solo, produção de sementes não deiscentes e de maior tamanho do milheto (PAIVA, 2006; PEREIRA et al., 2000). A forragem do híbrido é superior à dos parentais com melhor aceitação pelos bovinos do que o próprio capim-elefante

A maior limitação, no entanto, na utilização do híbrido interespecífico entre capim-elefante e milheto é a infertilidade do mesmo, impossibilitando a obtenção de sementes para a implementação de pastagens economicamente viáveis (PEREIRA et al., 2001, 2003). A esterilidade do híbrido ocorre, pois o capim-elefante é uma espécie aloploide com genomas A'A'BB e $2n=4x=28$ cromossomos, enquanto o milheto é uma espécie diploide, com genoma AA e $2n=2x=14$ cromossomos. O híbrido resultante é um triploide, com genomas

AA'B e $2n=3x=21$ cromossomos. Portanto, a meiose do híbrido interpecífico é irregular. Têm-se observado na diacinese dos híbridos a formação de sete bivalentes, relacionados aos genomas A e A', de milho e capim-elefante, respectivamente, e sete univalentes, referentes ao genoma B de capim-elefante. A presença dessas univalentes na meiose resulta na segregação irregular dos cromossomos, o que leva a anormalidades meióticas e conseqüentemente a formação de gametas não viáveis (JAUHAR, 1981; TECHIO et al., 2006). Em função deste pareamento meiótico observado nos híbridos triploides os genomas A e A' são considerados homeólogos.

A fim de restaurar a fertilidade desse híbrido triploide e viabilizar o uso da combinação genética de capim-elefante e milho nos programas de melhoramento, faz-se necessário a duplicação dos cromossomos. Nesse sentido, alguns trabalhos já foram realizados a fim de obter plantas hexaploides (AAA'A'BB com $2n=6x=42$ cromossomos) via indução de duplicação cromossômica (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009a).

O comportamento genômico dos híbridos interespecíficos tem sido caracterizado por diversas técnicas: análise meiótica, contagem do número cromossômico em metáfases mitóticas, análise do ciclo celular e estimativa do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. Nesses estudos, foram observadas alterações meióticas e baixa viabilidade de pólen, além de alterações mitóticas, eliminação de cromossomos e quantidade de DNA abaixo do esperado nos híbridos resultantes (BARBOSA et al., 2007; BUSTAMANTE, 2009; CAMPOS et al., 2009a; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005; TECHIO et al., 2006).

A população de indivíduos hexaploides tem sido submetida a ciclos de seleção e ganhos com relação ao tamanho e viabilidade das sementes tem sido observados (SOUZA SOBRINHO et al., 2008). Inclusive já foram obtidos híbridos pentaploides (AA'A'BB) e tetraploides (AAA'B) resultantes do

cruzamento entre hexaploides induzidos e os parentais capim-elefante e milheto, respectivamente (LEÃO, 2009).

Não obstante, a mixoploidia, decorrente da eliminação cromossômica, tem sido observada com frequência em todas essas combinações híbridas (BARBOSA et al., 2007; BUSTAMANTE, 2009; LEÃO, 2009). Esse fenômeno é comumente observado após os processos de hibridação e poliploidização em função da combinação de dois genomas parentais dentro de um mesmo núcleo (RIDDLE; BIRCHLER, 2003; SALENTIJN et al., 2009).

Nos estudos realizados com híbridos interespecíficos poliploidizados de *Pennisetum* foram observadas plantas mixoploides cujo número cromossômico variou de 14 a 42 nas células dos híbridos 6x, de 20 a 34 nos híbridos 5x e de 16 a 28 nos híbridos 4x (BUSTAMANTE, 2009; LEÃO, 2009). No entanto, ainda não se sabe a qual genoma pertence os cromossomos que estão sendo eliminados e se essa perda ocorre ao acaso ou de forma preferencial. Mesmo mixoploides, esses híbridos têm-se mostrado promissores para uso forrageiro.

O conhecimento do comportamento dos diferentes genomas no processo de eliminação cromossômica poderá ajudar na obtenção de hexaploides estáveis, com 42 cromossomos, bem como na obtenção de linhas de adição (genótipos contendo cromossomos ou segmentos de cromossomos extras) ou de substituição (substituição de cromossomos entre espécies diferentes) (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000). Ademais, o conhecimento de cada um dos cromossomos de capim-elefante e milheto é de extrema importância para viabilizar o uso dos genótipos mixoploides nos programas de melhoramento como linhas de adição ou substituição e para a avaliação do grau de homologia entre os genomas A e A'. Neste sentido, a técnica de hibridização *in situ* genômica (GISH), que utiliza como sonda o DNA genômico de um dos parentais, possibilita a identificação dos cromossomos dos parentais no híbrido interespecífico. Por outro lado, os cromossomos que estão

sendo eliminados podem ser identificados através da utilização de diversos tipos de sondas na hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Essa metodologia permite encontrar marcas que individualizem os cromossomos de cada um dos genomas A, A' e B. Além de auxiliar no estudo da eliminação cromossômica, as técnicas de FISH e GISH podem ser úteis no entendimento de outros fenômenos decorrentes do evento de hibridação e poliploidização, como os rearranjos genômicos. Tanto a eliminação de sequências quanto a reorganização genômica podem ser exploradas como nova fonte de variabilidade genética no melhoramento.

Destarte, o objetivo do presente trabalho é identificar os cromossomos dos parentais capim-elefante e milheto através do mapeamento físico de genes de RNAr 18S-5.8S-26S (DNAr 45S) e 5S (DNAr 5S) e bandamento cromossômico fluorescente, visando caracterizar a eliminação cromossômica e as alterações genômicas após hibridação e indução de poliploidia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Híbridação interespecífica no melhoramento de capim-elefante

O gênero *Pennisetum* é um dos mais importantes da família Poaceae (MARTEL et al., 2004). Esse gênero possui aproximadamente 140 espécies sendo o capim-elefante (*P. purpureum* Schumach) e o milheto [*P. glaucum* (L.) R.Br.], ambas forrageiras, as espécies mais importantes economicamente (HANNA, 1981).

A proximidade genética, observada pela ocorrência de hibridação natural entre essas duas espécies (HANNA; DUJARDIN, 1986), possibilita a obtenção de híbridos entre capim-elefante e milheto, sendo recomendada para os programas de melhoramento forrageiro (HANNA, 1999). Tal estratégia visa melhorar a qualidade forrageira do capim-elefante reunindo no híbrido as características desejáveis de ambas as espécies: potencial produtivo, palatabilidade, vigor e perenidade do capim-elefante com resistência à seca e as doenças, tolerância a baixos níveis de fertilidade do solo, produção de sementes não deiscentes e maiores e elevado rendimento de matéria seca do milheto (PEREIRA et al., 2001; SCHANK et al., 1993; SOUZA SOBRINHO et al., 2005).

O capim-elefante pertence ao conjunto gênico secundário do gênero, sendo uma espécie perene, alógama, alotetraploide com $2n=4x=28$ cromossomos e conteúdo 2C de DNA igual a 4,59 pg. Já o milheto corresponde ao conjunto gênico primário e é uma espécie anual, alógama, diploide com $2n=2x=14$ cromossomos e conteúdo 2C de DNA igual a 4,71 pg. (MARTEL et al., 1997, 2004).

A constituição genômica do capim-elefante é A'A'BB, enquanto a do milheto é AA. A relação existente entre esses genomas foi estabelecida por

trabalhos que utilizaram a morfologia dos cromossomos metafásicos e ocorrência das configurações dos bivalentes e univalentes na meiose. Os resultados sugerem que os genomas A e A' são homeólogos, enquanto que o genoma B não tem sua origem definida (JAUHAR, 1981; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005, TECHIO et al., 2006).

Do cruzamento entre essas duas espécies são obtidos híbridos triploides estéreis com $2n=3x=21$ cromossomos e genomas AA'B (HANNA; DUJARDIN, 1986). Estudos meióticos mostraram que a esterilidade do triploide se deve a não existência de pareamento correto entre os cromossomos de capim-elefante e milho, resultando na formação de gametas inviáveis (TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006).

Para restaurar a fertilidade do híbrido triploide e viabilizar o uso da combinação genômica de capim-elefante e milho no melhoramento há necessidade de duplicar os cromossomos desse híbrido (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009a). Os híbridos hexaploides ($2n=6x=42$ cromossomos) compõem genótipos promissores para o programa de melhoramento de capim-elefante, pois apresentam qualidades nutritivas superiores às dos parentais (capim-elefante e milho), produzem sementes férteis, maiores, não deiscem e têm melhor aceitação pelos animais (HANNA, 1981; PEREIRA et al., 2001). Além disso, a propagação desses híbridos hexaploides via semente viabiliza a expansão das áreas cultivadas de capim-elefante, trazendo consideráveis contribuições para a pecuária leiteira (SCHANK et al., 1993).

2.2 Consequências e aplicações da hibridação e poliploidização no melhoramento de plantas

O fenômeno da poliploidia é reconhecido como a maior força evolutiva em vegetais (ADAMS; WENDEL, 2005; LEVIN, 2002; STEBBINS, 1950). Vários trabalhos têm relatado as consequências de eventos de hibridação e poliploidização, incluindo perdas no conteúdo de DNA e rearranjos genômicos (COMAI, 2000; KASHKUSH; FELDMAN; LEVY, 2002; LEITCH; BENNETT, 2004). A ocorrência de reorganizações genéticas e epigenéticas é atribuída a conflitos intergenômicos em função da combinação de dois diferentes genomas parentais dentro de um mesmo núcleo (RIDDLE; BIRCHLER, 2003; SALENTIJN et al., 2009).

Entre as alterações/reorganizações observadas após a hibridação estão: a eliminação de sequências de DNA (FELDMAN et al., 1997; LEITCH; BENNETT, 2004; OZKAN; TUNA; ARUMUGANATHAN, 2003; SHAKED et al., 2001); a eliminação de cromossomos (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000; GERMAND et al., 2005; LINDE-LAURSEN; BOTHMER, 1999; RIERA-LIZARAZU; RINES; PHILLIPS, 1996); a ocorrência de rearranjos cromossômicos (PIRES et al., 2004; PONTES et al., 2004; UDALL; QUIJADA; OSBORN, 2005); as alterações epigenéticas como metilação de sequências codantes e não codantes de DNA (LEVY; FELDMAN, 2004; LIU; WENDEL, 2003; LUKENS et al., 2006; OSBORN et al., 2003; SALMON; AINOUCHE; WENDEL, 2005;); o silenciamento gênico (CHEN; PIKAARD, 1997; DOYLE et al., 2008; GAETA et al., 2007; LEE; CHEN, 2001) e a ativação de genes e retrotransposons que alteram a expressão de genes adjacentes (ADAMS; WENDEL, 2005; KASHKUSH; FELDMAN; LEVY, 2002, 2003).

Dentre as alterações genômicas citadas, a eliminação cromossômica é a mais comumente observada. Esse processo é uma alternativa interessante nos programas de melhoramento. A partir da eliminação de cromossomos em híbridos interespecíficos podem-se obter linhas de adição (materiais contendo cromossomos ou partes de cromossomos extras) ou linhas de substituição (substituição de cromossomos entre espécies diferentes) (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000). Se o genoma completo de um dos parentais no híbrido interespecífico for eliminado há a possibilidade de obtenção de haploides. A literatura provê alguns trabalhos que descrevem a eliminação somática parcial ou total de cromossomos de uma das espécies parentais após hibridação na família Poaceae: *Hordeum lechleri* X *H. vulgare* (LINDE-LAURSEN; BOTHMER, 1999), *Avena sativa* X *Zea mays* (RIERALIZARAZU; RINES; PHILLIPS, 1996), *Triticum aestivum* X *H. vulgare* (BADAEVA et al., 2008); *Triticum aestivum* X *Pennisetum glaucum* (GERMAND et al., 2005); *Triticosecale* Wittm X *Triticum aestivum* (PRATAP; SETHI; CHAUDHARY, 2006), *Setaria italica* X *Setaria viridis* (DOUST; KELLOGG, 2006) e *Lolium perenne* × *Festuca pratensis* (GUO; MIZUKAMI; YAMADA, 2005).

Segundo Feldman et al. (1997) e Liu et al. (1996) uma eliminação específica de sequências de DNA ocorre nos primeiros estágios após a hibridação. Nesse contexto, várias hipóteses têm sido desenvolvidas para explicar o processo de eliminação cromossômica em híbridos: inativação dos cromossomos por nucleases (ADAMOWSKI; PAGLIARINI; BATISTA, 1998), formação de fusos multipolares (SUBRAHMANYAM; KASHA, 1973), assincronia na síntese de nucleoproteínas levando à perda de cromossomos com segregação tardia (BENNETT; FINCH; BARCLAY, 1976; LAURIE; BENNETT, 1989), separação espacial de genomas durante a interfase (FINCH; BENNETT, 1983; LINDE-LAURSEN; BOTHMER, 1999) e metáfase

(SCHWARZACHER-ROBINSON et al., 1987), supressão da função do centrômero nos cromossomos eliminados (FINCH; BENNET, 1983; JIN et al., 2004; KIM et al., 2002; MOCHIDA; TSUJIMOTO; SASAKUMA, 2004) e assincronia no tempo do ciclo celular (GUPTA, 1969).

Híbridos de trigo (*Triticum aestivum*) e milheto (*Pennisetum glaucum*) estudados por Germand et al. (2005) apresentaram eliminação cromossômica uniparental (cromossomos de milheto) via formação de micronúcleos, acompanhada de heterocromatização e fragmentação de DNA. A eliminação cromossômica iniciou-se logo após a fertilização, corroborando os resultados anteriores de Laurie e Bennett (1989) e Mochida, Tsujimoto e Sasakuma. (2004). Nesses trabalhos, os cromossomos ou fragmentos eliminados não se alinharam corretamente na metáfase, segregando tardiamente na anáfase e formando micronúcleos. Esses relatos estão de acordo com o mecanismo clássico de formação de micronúcleos: formação de membrana ao redor de cromossomos ou fragmentos perdidos durante a reconstrução da membrana celular no fim da telófase (SCHUBERT; OUD, 1997). Observou-se ainda que os cromossomos de milheto ocupavam uma posição periférica do núcleo interfásico dos híbridos, o que, provavelmente, estava diretamente ligado à eliminação de cromatina também durante a interfase (GERMAND et al., 2005).

Baptista-Giancomelli, Pagliarini e Almeida (2000) e Singh (2002) descreveram algumas alterações que evidenciam o processo de eliminação cromossômica: fragmentação cromossômica, degradação da cromatina, não orientação dos cromossomos na placa metafásica, migração precoce nas metáfases e presença de cromossomos atrasados na anáfase. Todas essas alterações podem levar à formação de micronúcleos nas telófases e prófases como observado no trabalho de Germand et al. (2005).

Nos híbridos de capim-elefante e milheto induzidos à duplicação cromossômica por antimitóticos, a eliminação cromossômica foi um resultado

recorrente. Foi observada grande variação no número cromossômico dos híbridos triploides submetidos à duplicação (BARBOSA et al., 2007; BUSTAMANTE, 2009; CAMPOS et al., 2009a). A confirmação da ploidia após duplicação cromossômica foi realizada através de contagem de cromossomos em células meristemáticas das plantas híbridas e da estimativa da quantidade de DNA das mesmas por citometria de fluxo (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; BUSTAMANTE, 2009; CAMPOS et al., 2009a). O número de plantas hexaploides estáveis com $2n=6x=42$ observado foi pequeno, enquanto a frequência de plantas mixoploides com número cromossômico variando de 14 a 42 foi alta. Esse fenômeno de eliminação cromossômica é comumente observado após os processos de hibridação e poliploidização em função da combinação de dois genomas parentais dentro de um mesmo núcleo (RIDDLE; BIRCHLER, 2003; SALENTIYN et al., 2009). Não se sabe ainda, nesses híbridos de capim-elefante e milho, a qual parental pertencem os cromossomos que estão sendo eliminados e se a perda ocorre ao acaso ou de forma preferencial.

Na avaliação da quantidade de DNA de 105 plantas duplicadas avaliadas, 43 (40,95%) tinham quantidade de DNA compatível a uma planta hexaploide, enquanto o restante tinha quantidade de DNA variável, desde conteúdo $2C$ próximo a um diploide, triploide ou tetraploide, até próximo a um hexaploide, com possibilidade de ocorrência de aneuploidias (CAMPOS, 2007).

Ademais, nesses estudos realizados em *Pennisetum*, várias evidências de alterações genômicas nos híbridos de capim-elefante e milho foram observadas. Nos híbridos triploides, Techio et al. (2006) observaram alterações no comportamento meiótico, tais como: presença de micronúcleos em tétrades, pontes em anáfase, cromossomos com migração precoce nas metáfases I e II e cromossomos com segregação tardia nas anáfases I e II. Anormalidades semelhantes foram observadas por Paiva (2006) em híbridos hexaploides

divergentes quanto ao tempo de duplicação (obtidos recentemente e duplicados a mais de dez anos). Além da presença de micronúcleos, ascensão precoce de cromossomos na metáfase e segregação irregular na anáfase como observado nos híbridos triploides, foi observado ainda pareamento irregular dos cromossomos de capim-elefante e milho na diacinese, formando univalentes. Tais anormalidades afetaram diretamente a fertilidade do pólen pela produção de gametas aneuploides, refletindo em baixas taxas de viabilidade do pólen tanto nos híbridos triploides quanto nos hexaploides (PAIVA, 2006; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006).

Bustamante (2009) avaliou o comportamento mitótico e o conteúdo de DNA em meristemas radiculares nos mesmos hexaploides divergentes quanto ao tempo de indução de duplicação cromossômica avaliados por Paiva (2006). A autora relatou que a mixoploidia se manteve tanto nos híbridos nacionais (mais recentes) quanto nos americanos (duplicados a mais de dez anos). Nos dois grupos também foram observadas alterações no ciclo celular (cromossomos pegajosos, pontes e cromossomos não orientados na metáfase ou perdidos na anáfase) e variação na quantidade de DNA.

Campos et al. (2009a) observaram indícios de perda de DNA, o que sugere a eliminação de sequências genômicas em híbridos hexaploides de capim-elefante e milho. No trabalho, os autores demonstraram, por meio da citometria de fluxo, reduções de 0,08 a 0,16 pg de DNA nos híbridos em relação ao esperado para a média dos parentais, sugerindo uma provável eliminação de sequências genômicas após a hibridação. A quantidade de DNA média para os materiais de capim-elefante avaliados no trabalho foi de 4,54 pg, enquanto para os materiais de milho foi de 4,75 pg. Esses resultados estão de acordo com as quantidades de DNA anteriormente relatadas de 4,59 e 4,71, respectivamente, para o capim-elefante e o milho por Martel et al. (1997). Diante desses resultados, esperava-se uma quantidade de DNA média para os híbridos

triploides de 4,65 pg (valor médio entre os pais), mas os resultados apontaram uma quantidade de DNA média para os híbridos triploides de 4,51 pg, correspondente a uma redução de 3% em relação ao esperado.

Adicionalmente, Leão (2009) observou a ocorrência de mixoploidia em consequência da eliminação cromossômica em combinações genômicas resultantes do retrocruzamento dos híbridos hexaploides com os parentais capim-elefante e milho. Nas combinações genômicas pentaploides (AA'A'BB), resultantes do cruzamento do híbrido hexaploide com o capim-elefante, o número cromossômico variou de 20 a 34. Já nas combinações tetraploides (AAA'B), resultantes do cruzamento do híbrido hexaploide com o milho, a variação foi de 16 a 28 cromossomos. A perda de DNA também foi observada nesse trabalho, variando de 14,71 a 19% nas combinações tetraploides e de 9,25 a 14,45% nas pentaploides.

Mesmo mixoplóides, as populações de plantas obtidas por indução de duplicação cromossômica de híbridos triploides, mostram-se promissoras. Após alguns ciclos de seleção para viabilidade e tamanho de sementes que foram conduzidos nessas populações, foi observado ganho (SOUZA SOBRINHO et al., 2008). Esse fato indica que todos esses fenômenos de eliminação cromossômica e/ou perda de DNA nas diferentes combinações híbridas entre capim-elefante e milho podem gerar genótipos promissores com potencial para uso no programa de melhoramento. Visando a obtenção de linhas de adição ou de substituição nessas combinações híbridas entre capim-elefante e milho é necessária a identificação dos cromossomos dos parentais. Para tanto, podem ser realizados estudos utilizando metodologias que auxiliem na obtenção de mapas físicos dos cromossomos, como as de hibridização *in situ*.

2.3 Hibridização *in situ*: aplicações na citogenética e no melhoramento de *Pennisetum*

O híbrido triploide ($2n=3x=21$ cromossomos) entre capim-elefante e milho apresenta genomas AA'B conforme relatado anteriormente. Desses 21 cromossomos, sete são oriundos do milho e quatorze do capim-elefante. O pareamento cromossômico no híbrido confirma a homeologia do genoma A de milho com o genoma A' de capim-elefante através da observação de 7II e 7I em muitas células e a ausência de trivalentes (JAUHAR, 1981; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005, TECHIO et al., 2006). Há relatos de que os cromossomos 1 a 5 do milho são homeólogos aos cromossomos 1 a 5 do capim-elefante e os cromossomos 6 e 7 do milho são homólogos aos cromossomos 8 e 14 do capim-elefante (PANTULU; RAO, 1982). Adicionalmente, Martel et al. (2004) afirmam que existe grande facilidade de identificar os cromossomos das duas espécies pelo tamanho e forma na placa equatorial, uma vez que os cromossomos de *P. glaucum* são maiores quando comparados com os de *P. purpureum*.

Todas essas afirmações, no entanto, foram feitas com base em observações morfométricas dos cromossomos e/ou pareamento meiótico. Não há relato de marcadores físicos nos cromossomos de capim-elefante e milho que comprovem tal homeologia descrita para os genomas A e A'. Logo, a técnica de hibridização *in situ* é de extrema utilidade no estudo da individualização dos cromossomos dos genomas A, A' e B, que compõe o genoma dos híbridos em questão.

A técnica de hibridização *in situ* (HIS) foi descrita por Pardue e Gall em 1969 e consiste no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA com uma sequência de nucleotídeos complementar situada dentro da célula visando verificar se a célula possui essa sequência e qual sua exata localização. A

sequência de interesse é marcada com uma molécula de fácil visualização (fluorocromos) funcionando como uma sonda que irá hibridizar com a sequência complementar no cromossomo (GUERRA, 2004).

Em função de sua alta especificidade e dos avanços nos protocolos que vem sendo introduzidos nesses últimos anos, a HIS se transformou em uma das técnicas mais elegantes e informativas da citogenética, permitindo estabelecer novos tipos de marcadores cromossômicos para a análise cariotípica comparada. Com a HIS é possível localizar diversos genes e sequências repetitivas ao longo dos cromossomos além de construir mapas físicos detalhados (GUERRA, 2004). As sondas de DNA repetitivo que contêm as sequências de RNAr 18S-5.8S-25S e 5S são as mais comumente utilizadas, auxiliando na diferenciação de cariótipos similares (FREGONEZI et al., 2006).

No gênero *Pennisetum* a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem sido utilizada para determinar regiões cromossômicas associadas à apomixia em *Pennisetum squamulatum* (AKIYAMA et al., 2004; GOEL et al., 2003). O primeiro trabalho realizado nesse sentido foi de Goel et al. (2003). Os autores delimitaram, por meio da FISH, uma região cromossômica hemizigótica associada com a formação de saco embrionário apospórico. Posteriormente, Akiyama et al. (2004) realizaram mapeamento de alta resolução em cromossomos paquitênicos de *P. squamulatum* revelando extensos heteromorfismos cromossômicos em regiões associadas à apomixia. Outros autores fizeram mapeamentos físicos comparativos por meio da FISH estudando regiões específicas em plantas apomíticas (GOEL et al., 2006). Por fim, Akiyama et al. (2006) utilizaram a FISH para identificar citótipos hexaploides e octaploides em populações provenientes de retrocruzamento entre *P. squamulatum* e *P. purpureum* ou *P. glaucum*.

Em híbridos, é possível identificar cada um dos genomas dos parentais através do uso da sonda de DNA genômico. Nesse caso, a HIS é conhecida

como Hibridização *in situ* genômica (GISH) e consiste na marcação do DNA genômico de um dos parentais, permitindo a identificação dos cromossomos desse parental no híbrido natural ou artificial (GUERRA, 2004). A técnica da GISH foi desenvolvida originalmente para demonstrar que os genomas parentais de um híbrido entre *Hordeum chilense* e *Secale africanum* podiam ser reconhecidos durante todo o ciclo celular e que ocupavam diferentes domínios no núcleo interfásico (SCHWARZACHER et al., 1989).

Vários estudos já utilizaram a GISH para identificar genomas de cada um dos parentais nos híbridos assim como para demonstrar a recombinação genômica após introgressão de um ou mais genes/cromossomos. Um exemplo clássico é a introdução de genes de resistência a diversas doenças, localizados no braço curto do cromossomo de centeio, para o genoma do trigo (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 1993).

Adicionalmente, em anfidiplóides parciais de *Triticum aestivum* X *Thinopyrum ponticum*, Brasileiro-Vidal et al. (2005) verificaram a perda de cromossomos no híbrido interespecífico, evidenciando instabilidade mitótica.

O uso da GISH em metáfases de híbridos de capim-elefante e milheto também possibilita a identificação dos genomas parentais e constitui uma ferramenta útil para verificar e estudar a eliminação cromossômica. Bustamante (2009) verificou nos híbridos hexaploides estudados resultados interessantes: alguns híbridos apresentaram bom desempenho em plantios comerciais e produção de sementes viáveis, mesmo tendo tendências a eliminar cromossomos. Nesse caso, o uso da GISH possibilitaria averiguar o grau de introgressão ocorrido nestes híbridos.

Por conseguinte, a possibilidade de utilização de vários tipos de sondas na FISH, como as sondas de DNAr 45S e 5S, permitirá a construção de mapas físicos e a obtenção de marcas individuais para cada cromossomo, possibilitando distingui-los nos híbridos de *Pennisetum*.

Uma vez que não se conhece quais genomas estão sendo preferencialmente eliminados nos híbridos hexaploides instáveis, ou ainda quais os rearranjos genômicos que estão ocorrendo após a hibridação e poliploidização desse material, a hibridização *in situ* é uma ferramenta com grande potencial para auxiliar nesse estudo.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. C. et al. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milheto tratados com agentes antimutogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, Nov. 2006.
- ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; BATISTA, L. A. R. Chromosome elimination in *Paspalum subciliatum* (Notata group). **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 11, n. 5, p. 272-276, Nov. 1998.
- ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. **Trends in Genetics: DNA differentiation & development**, Amsterdam, v. 21, n. 10, p. 539-543, Oct. 2005.
- AKIYAMA, Y. et al. High-resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 134, n. 4, p. 1733-1741, Apr. 2004.
- AKIYAMA, Y. et al. *Pennisetum squamulatum*: is the predominant cytotype hexaploid or octaploid? **Journal of Heredity**, Washington, v. 97, n. 5, p. 521-524, Sept./Oct. 2006.
- BADAEVA, E. D. et al. Analysis of introgression of *Aegilops ventricosa* Tausch. genetic material in a common wheat background using C-banding. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, n. 5, p. 803-811, Sept. 2008.
- BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. Elimination of micronuclei from microspore in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 3, p. 681-684, set. 2000.
- BARBOSA, S. et al. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milheto. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 365-372, set. 2007.

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

BRASILEIRO-VIDAL, A. C. et al. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 2, p. 308-313, jun. 2005.

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

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

CAMPOS, J. M. S. et al. 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. et al. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 101-104, Feb. 2009b.

CHEN, Z. J.; PIKAARD, C. S. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 11, n. 16, p. 2124-2136, Aug. 1997.

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

DOUST, A.; KELLOGG, E. A. Effect of genotype and environment on branching in weedy green millet (*Setaria viridis*) and domesticated foxtail millet (*Setaria italica*) (Poaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 1335-1349, Apr. 2006.

DOYLE, J. J. et al. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 42, p. 443-461, Dec. 2008.

FELDMAN, M. et al. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosome. **Genetics**, Austin, v. 147, n. 3, p. 1381-1387, Nov. 1997.

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

FREGONEZI, J. N. et al. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 1, p. 97-104, mar. 2006.

GAETA, R. T. J. et al. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 11, p. 3403-3417, Nov. 2007.

GERMAND, D. et al. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 9, p. 2431-2438, Sept. 2005.

GOEL, S. et al. Comparative physical mapping of the aposporyspecific genomic region in two apomictic grasses, *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. **Genetics**, Austin, v. 173, n. 1, p. 389-400, May 2006.

GOEL, S. et al. Delineation by fluorescence *in situ* hybridization of a single hemizygous chromosomal region associated with aposporous embryo sac formation in *Pennisetum squamulation* and *Cenchrus ciliaris*. **Genetics**, Austin, v. 163, n. 3, p. 1069-1082, Mar. 2003.

GUERRA, M. **FISH**: conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 176 p.

GUO, Y.; MIZUKAMI, Y.; YAMADA, T. Genetic characterization of androgenic progeny derived from *Lolium perenne* × *Festuca pratensis* cultivars. **New Phytologist**, Cambridge, v. 166, n. 2, p. 455-464, May 2005.

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

HANNA, W. W. Melhoramento do capim-elefante. In: PASSOS, L. P. et al. **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 17-28.

HANNA, W. W. Method of reproduction in napiegrass 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, May 1986.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Molecular cytogenetics biology and applications in plant breeding. In: SUMMER, A. T.; CHANDLEY, A. C. (Ed.). **Chromosomes today**. London: Chapman & Hall, 1993. v. 11, p. 191-198.

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

JIN, W. W. et al. Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic background of oat. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 3, p. 571-581, Mar. 2004.

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. **Genetics**, Austin, v. 160, n. 4, p. 1651-1659, Apr. 2002.

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. **Nature Genetics**, New York, v. 33, n. 1, p. 102-106, Jan. 2003.

KIM, N. S. et al. A microsatellite sequence from the rice blast fungus (*Megnaporthe grisea*) distinguishes between the centromeres of *Hordeum vulgare* and *Hordeum bulbosum* in hybrid plants. **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 1, p. 165-174, Feb. 2002.

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

LEÃO, F. F. **Citogenética e potencial forrageiro de combinações genômicas de capim-elefante e milheto**. 2009. 112 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

LEE, H. S.; CHEN, Z. J. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 12, p. 6753-6758, June 2001.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome downsizing in polyploid plants. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, n. 4, p. 651-663, Aug. 2004.

LEVIN, D. A. **The role of chromosomal change in plant evolution**. New York: Oxford University, 2002.

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

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

LIU, B.; WENDEL, J. F. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 29, n. 3, p. 365-379, Dec. 2003.

LIU, S. C. et al. Genomewide high-resolution mapping by recurrent intermating using *Arabidopsis thaliana* as a model. **Genetics**, Austin, v. 142, n. 1, p. 247-258, Jan. 1996.

LUKENS, L. N. et al. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 140, n. 1, p. 336-348, Jan. 2006.

MARTEL, E. et al. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 249, n. 3/4, p. 139-149, Nov. 2004.

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

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.

OSBORN, T. C. et al. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. **Trends in Genetics: DNA differentiation & development**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 141-147, Mar. 2003.

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

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

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

PARDUE, M. L.; GALL, J. G. Formation and detection of MA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 63, n. 2, p. 378-383, June 1969.

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

PEREIRA, A. V. et al. Tendências do 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, 2003. p. 23-35.

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

PIRES, J. C. et al. Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids (Brassicaceae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, n. 4, p. 675-688, Aug. 2004.

PONTES, O. et al. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis suecica* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 52, p. 18240-18245, Dec. 2004.

PRATAP, A.; SETHI, G. S.; CHAUDHARY, H. K. Relative efficiency of anther culture and chromosome elimination techniques for haploid induction in triticale × wheat and triticale × triticale hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 150, n. 3, p. 339-345, Aug. 2006.

RIDDLE, N. C.; BIRCHLER, J. A. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. **Trends in Genetics: DNA differentiation & development**, 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.

SALENTIJJN, E. M. J. et al. Tetraploid and hexaploid wheat varieties reveal large differences in expression of alpha-gliadins from homoeologous Gli-2 loci. **BMC Genomics**, Austin, v. 10, p. 48, Jan. 2009.

SALMON, A.; AINOUCHE, M. L.; WENDEL, J. F. Genetics and epigenetics consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 1163-1175, Apr. 2005.

SCHANK, S. C. et al. Genetic improvement of napiergrass and hybrids with pearl millet. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 35-40, 1993.

SCHUBERT, I.; OUD, J. L. There is an upper limit of chromosome size for normal development an organism. **Cell**, Cambridge, v. 88, n. 4, p. 515-520, Feb. 1997.

SCHWARZACHER, T. et al. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. **Annals of Botany**, London, v. 64, n. 3, p. 315-324, Sept. 1989.

SCHWARZACHER-ROBINSON, T. et al. Genotypic control of centromere positions of parental genomes in *Hordeum* X *Secale* hybrid metaphases. **Journal of Cell Science**, London, v. 87, n. 2, p. 291-304, Mar. 1987.

SHAKED, H. et al. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 1749-1759, Aug. 2001.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC, 2002. 463 p.

SOUZA SOBRINHO, F. et al. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 9, p. 873-880, set. 2005.

SOUZA SOBRINHO, F. et al. Avaliação do potencial de propagação por sementes de capim-elefante hexaplóide. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 974-977, maio/jun. 2008.

STEBBINS, G. L. **Variation and evolution in plants**. Columbia: University Press, 1950.

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

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Genomic analysis in *Pennisetum purpureum* and *P. glaucum* hybrids. **Caryologia**, Firenze, v. 58, n. 1, p. 28-33, 2005.

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. et al. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 7-12, jan./mar. 2006.

UDALL, J. A.; QUIJADA, P. A.; OSBORN, T. C. Detection of chromosomal rearrangements derived from homeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. **Genetics**, Austin, v. 169, n. 2, p. 967-979, Feb. 2005.

CAPÍTULO 2

MAPEAMENTO FÍSICO DOS GENES DE RNAr 18S-5.8S-26S e 5S E BANDAMENTO CROMOSSÔMICO FLUORESCENTE EM CAPIM-ELEFANTE E MILHETO

RESUMO

O gênero *Pennisetum* está dividido em cinco seções taxonômicas. A seção *Penicillaria* engloba duas forrageiras tropicais, importantes economicamente, *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) com $2n=4x=28$ cromossomos e *Pennisetum glaucum* (milheto) com $2n=2x=14$ cromossomos. A proximidade genética existente entre elas permite a obtenção de híbridos com qualidade forrageira superior aos genitores, os quais têm sido explorados para o melhoramento da qualidade forrageira. Nesse sentido, a caracterização dos cromossomos dessas espécies é importante a fim de auxiliar a identificação dos mesmos quando em combinação híbrida. No presente trabalho foi realizado o mapeamento dos genes de RNAr 18S-5.8S-26S e 5S mediante a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e bandamento cromossômico fluorescente nos cromossomos de capim-elefante, milheto e híbrido interespecífico. Foram observados quatro sítios de DNAr 45S em capim-elefante, milheto e híbrido interespecífico. O DNAr 5S foi localizado em um par cromossômico de capim-elefante e em dois pares de milheto. Bandas DAPI após tratamento com formamida decorrente da FISH foram observadas nas duas espécies e na combinação híbrida. Essas marcas observadas permitiram distinguir cinco dos quatorze cromossomos do lote haploide de capim-elefante e quatro dos sete cromossomos do lote haploide de milheto. O idiograma com essas marcas, caracterizando o início da construção de um mapa físico, foi proposto para capim-elefante, milheto e híbrido.

Palavras-chaves: Bandamento DAPI. Mapeamento físico. Hibridação interespecífica. *Pennisetum*.

ABSTRACT

The current classification of *Pennisetum* includes five taxonomy sections. The section *Penicillaria* includes two important tropical forages, *Pennisetum purpureum* (Napier grass) with $2n=4x=28$ chromosomes and *Pennisetum glaucum* (pearl millet) with $2n=2x=14$ chromosomes. These are genetic related species which can be crossed producing a high quality and high yielding perennial interspecific forage hybrids. Then the characterization of their chromosomes is important, helping the identification of them when they are on the interspecific hybrid. In this work the physical mapping of chromosomes from pearl millet and napier grass was proposed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and chromosome banding methods. The rDNA18S-5.8S-26S was mapped on four loci on pearl millet and napier grass. Consequently, it was also observed four chromosomes with rDNA18S-5.8S-26S on the interspecific hybrid. Additionally, the rDNA 5S was localized at one pair of chromosomes on napier grass and at two pairs of chromosome on pearl millet. After formamide treatment from FISH process, positive DAPI bands were observed on chromosomes from pearl millet, napier grass and hybrids. These markers allowed to individualize some chromosomes of pearl millet and napier grass. It was possible to distinguish five of fourteen chromosomes from napier grass haploid complement and four of seven chromosomes from pear millet haploid complement. The ideogram was also proposed for napier grass, pearl millet and interspecific hybrid.

Keywords: DAPI band. Physical mapping. Interspecific hybrids. *Pennisetum*.

1 INTRODUÇÃO

Pennisetum é um importante gênero da família Poaceae, subfamília Panicoidea e tribo Paniceae (DAHLGREN; CLIFFORD, YEO, 1985). O gênero compreende cerca de 140 espécies com número básico de cromossomos variando de $x=5, 7, 8$ e 9 (JAUHAR, 1981) e ploidia variando de diploide a octoploide (MARTEL et al., 1997). Baseando-se em características morfológicas essas espécies são agrupadas em cinco seções taxonômicas: *Penicillaria*, *Brevivalvula*, *Gymnothrix*, *Heterostachya* e *Eu-Pennisetum* (STAPF; HUBBAR, 1934 citado por MARTEL et al., 2004). A seção *Penicillaria* forma um grupo monofilético que compreende espécies cujo número básico é $x=7$ cromossomos. Dentro dessa seção encontram-se espécies diploides, como o *P. purpureum* (capim-elefante), único representante tetraploide, com $2n=4x=28$ cromossomos, *P. glaucum* (milheto) com $2n=2x=14$ cromossomos e espécies selvagens relacionadas (MARTEL et al., 2004).

Tanto capim-elefante quanto milheto são importantes forrageiras tropicais. O capim-elefante apresenta características de forragem tais como boa qualidade, palatabilidade, vigor e perenidade, as quais são exploradas no desenvolvimento de cultivares melhoradas (SOUZA SOBRINHO et al., 2005). O milheto, por outro lado, apresenta boa resistência à seca e a doenças, é tolerante a baixos níveis de fertilidade do solo, tem boa produção de sementes não deiscantes e produz elevado rendimento de matéria seca (PEREIRA et al., 2001). A proximidade genética existente entre essas duas espécies permite a obtenção de híbridos com qualidade forrageira superior aos genitores. Em função disso, a hibridação interespecífica entre as duas espécies tem sido explorada para o melhoramento da qualidade forrageira (HANNA, 1999).

O maior problema do uso do híbrido interespecífico entre capim-elefante e milheto é a esterilidade causada por sua condição triploide. Nesse sentido, tem-

se induzido a poliploidia nesses híbridos triploides a fim de se produzir plantas com todo complemento cromossômico duplicado, hexaploides ($2n=6x=42$ cromossomos). As tentativas de duplicação cromossômica geram raças cromossômicas hexaploides e mixoploides, as quais apresentam variação no número cromossômico de 14 a 42 (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009a, 2009b). Essas raças cromossômicas, se férteis e com características forrageiras superiores, podem ser de interesse agrônomo.

Tendo em vista a importância agrônoma e econômica dessas espécies na produção de grãos (milheto) e como forrageira de elevado potencial produtivo (capim-elefante e milheto) (PEREIRA et al., 2001), a caracterização dos seus cromossomos a fim de auxiliar a identificação dos mesmos é importante para os estudos realizados em híbridos interespecíficos. No entanto, há uma dificuldade na identificação de cada um dos cromossomos do cariótipo de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos, através da morfologia e localização das regiões satélites, evidenciada pela grande variação encontrada entre os relatos de diferentes autores (BRUNKEN, 1977; JAUHAR, 1981; PANTULU; VENKATESWARLU, 1968).

Uma identificação mais precisa dos cromossomos pode ser realizada por meio de bandamento cromossômico e da utilização de diversos tipos de sondas na hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Essas metodologias permitem encontrar marcas que individualizem os cromossomos de cada um dos parentais. Além disso, a FISH pode ser útil no entendimento de outros fenômenos decorrentes do evento de hibridação e poliploidia, como os rearranjos genômicos, os quais podem originar novas combinações gênicas a serem exploradas no melhoramento genético. Adicionalmente, a obtenção de um mapa físico dos cromossomos dessas espécies através do bandamento cromossômico e da FISH pode auxiliar na identificação de regiões associadas às características agrônomicas de interesse (MARTEL; RICHROCH; SAAR, 1996). Logo, o

objetivo do presente trabalho foi obter marcas nos cromossomos de capim-elefante e milho através do mapeamento dos genes de RNAr 18S-5.8S-26S e 5S e bandamento cromossômico fluorescente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Genético

Estacas de capim-elefante ($2n = 4x = 28$) (BAG 54), sementes de milho ($2n = 2x = 14$) (M 36) e estacas de híbridos interespecíficos triploides ($2n = 3x = 21$) (M 36 x BAG 54) do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, foram usadas como material genético para realização do trabalho.

2.2 Obtenção de Metáfases

As raízes obtidas das estacas (capim-elefante e híbrido interespecífico) e das sementes (milho) foram coletadas e submetidas à solução de 25 mg/L de cicloheximida:300 mg/L de 8-hidroxiquinolina (1:1) por 2:45 h a 4°C. Posteriormente, foram lavadas em água destilada e fixadas em solução de etanol: ácido acético (3:1) como proposto por Techio et al. (2002). As lâminas foram preparadas pelo método de dissociação celular (CARVALHO; SARAIVA, 1997) com maceração enzimática em pectinase-celulase (100U:200U) por 30 min (milho) ou 2:10 h (capim-elefante e híbrido interespecífico) a 37°C em câmara úmida.

A avaliação das lâminas foi realizada em microscópio de luz sob contraste de fase e as melhores metáfases, com cromossomos espalhados e sem citoplasma, foram marcadas. As lâminas foram armazenadas a -20°C até o emprego das metodologias de hibridização *in situ* ou bandamento cromossômico com 4-6-diamidino-2-phenilindole (DAPI).

2.3 Hibridização *in situ* Fluorescente e Bandamento Cromossômico

Mediante a técnica da FISH as sequências de DNAr 45 e 5S foram localizadas. Foi utilizado o protocolo para *Pennisetum* proposto por Akiyama et al. (2004) com algumas modificações.

As lâminas selecionadas e armazenadas no *freezer* foram pré-tratadas para receber a mistura de hibridização. Inicialmente foi realizado um tratamento com ácido acético 60% por 15 min e desidratação em etanol (70-100%), 5 min cada, seguindo secagem das lâminas a 55°C por 30 minutos. Posteriormente as lâminas foram incubadas com RNase (100µg/mL) a 37° por 1 h, seguido de tratamento com proteinase K (10µg/mL) em HCl 10mM a 37° por 20 min e fixação em 4% paraformaldeído em 1x PBS com NaOH 1N. Todas as lavagens entre os tratamentos foram realizadas com 2x SSC. Por fim, as lâminas foram desidratadas em 70-100% de etanol e secas ao ar por no mínimo 1 hora.

A preparação cromossômica foi desnaturada com 100µL de formamida 70% em 2x SSC a 85°C por 1,5 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas em etanol 70-100% gelado (-20°C) para remoção da formamida. A mistura de hibridização foi preparada segundo protocolo de Heslop-Harrison (1991) com 77% de estringência (2-5 ng/µL da sonda, 50% de formamida, 10% de dextran sulfato e 2x SSC, totalizando 5µL da mistura), sendo desnaturada a 75°C por 10 minutos. Após a desnaturação, a mistura foi aplicada sobre a preparação cromossômica deixando-se hibridizar por 40 h a 37°C em câmara úmida.

As lavagens para retirar a sonda não hibridizada foram realizadas com 2x SSC, (duas vezes de 5 min) e 0,1x SSC (duas vezes de 5 min) com 73% estringência, ambas a 42°C. Posteriormente foram realizados banhos em 2x SSC (primeiro no banho a 42°C e segundo retirado do banho e deixado à temperatura ambiente), seguido de lavagens à temperatura ambiente com 2x SSC e 4x SSC

com 0,1% de Tween 20, antes do bloqueio (BSA 5% em 4x SSC + 0,1% de Tween 20 por 30 min).

As sondas DNAr 45S (pTa 71 de *Triticum aestivum*) e 5S [D2 de *Lotus japonicus*, fragmento com aproximadamente 400pb (PEDROSA et al., 2002) utilizadas para a hibridização *in situ* foram marcadas com biotina-16-dUTP ou digoxigenina-11-dUTP através de reação de *nick-translation*. A detecção da digoxigenina (DIG) foi realizada com anti-DIG conjugada com fluoresceína (Roche), emitindo fluorescência verde, enquanto a detecção da biotina foi realizada com avidina conjugada com TRITC (Roche), emitindo fluorescência vermelha. Ambos os anticorpos (anti-dig e avidina) foram aplicados sobre a preparação após lavagem da sonda e incubados por 1 h a 37°C em câmara úmida seguindo de 3 lavagens de 10 min em 4x SSC com 0.1% de Tween 20 a 42°C. As lâminas foram montadas em DAPI (1,5-2 µg/mL) em Vectashield (1:1) e analisadas em Microscópio de Epifluorescência com câmara monocromática refrigerada nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 (DAPI), 490/525 (fluoresceína) e 550/575 (TRITC).

As bandas DAPI, decorrentes do tratamento de desnaturação com formamida, após a FISH, foram avaliadas.

4.4 Análises

Pelo menos cinco metáfases, com os cromossomos espalhados e o mesmo padrão de condensação, foram analisadas em cada procedimento (FISH e bandamento DAPI), e avaliadas quanto aos seguintes parâmetros: presença e ausência de bandas e de sinais de DNAr 45S e 5S. As metáfases foram capturadas e as posições das marcas obtidas foram medidas no programa Image Tool para Windows versão 3.0. A partir dos dados obtidos, o idiograma contendo as marcas cromossômicas, foi construído no programa Adobe Flash CS4 Professional.

3 RESULTADOS

Os sinais do DNAr 45S foram observados em posições subteloméricas do braço curto de dois pares cromossômicos de todos os genótipos avaliados (capim-elefante, milho e híbrido interespecífico).

No capim-elefante foram observados dois pares cromossômicos heteromórficos contendo os genes para DNAr 45S, sendo os cromossomos I e VIII marcados fortemente com a sonda, representando, respectivamente, 30% e 75% do braço curto desses cromossomos (Figura 1A). No milho, a sonda hibridizou fortemente no braço curto do cromossomo VII, compreendendo a 85% do braço cromossômico, apresentando heteromorfismo, já que no cromossomo VI, outro par que apresentou sinal de DNAr 45S, este compreendeu 30% do braço curto (Figura 1B). O híbrido interespecífico apresentou, como esperado, quatro cromossomos com loco de DNAr 45S mapeados próximo ao telômero (cromossomos VI, VIII, IX e XII) (Figura 1C).

No capim-elefante o DNAr 5S foi mapeado em apenas um par cromossômico, localizando-se na região subtelomérica do cromossomo II, compreendendo 50% desse braço (Figura 2A). Já no milho, o gene do RNAr 5S foi localizado em dois pares cromossômicos: (a) na região subtelomérica do braço curto do cromossomo IV, representando 60% do comprimento deste braço cromossômico e (b) na região subtelomérica do cromossomo VI, onde foi observado um fraco sinal da sonda de DNAr 5S, totalizando 80% do comprimento do braço curto (Figura 2B). Para este cromossomo (VI) o gene de rRNA 5S foi localizado adjacente ao DNAr 45S.

Após tratamento com formamida, decorrente da FISH, os cromossomos apresentaram coloração DAPI diferencial, formando bandas cuja variação em número e posição permitiu identificar alguns cromossomos (Figura 3). No capim-elefante, as bandas DAPI observadas após desnaturação com formamida

estavam distribuídas nos quatorze cromossomos, sendo observado quatro tipos de cromossomos, classificados em função da distribuição dessas bandas: (1) banda DAPI no BC e BL, cromossomo V; (2) banda DAPI somente no BC, cromossomos I e II; (3) banda DAPI somente no BL, cromossomos X e XI; (4) banda DAPI somente no centrômero, cromossomos III, IV, VI, VII, VIII, IX, XII, XIII, XIV (Figura 3A). Em milheto, todos os cromossomos apresentaram bandas DAPI proximais. Alguns cromossomos apresentaram bandas teloméricas no braço curto (BC), longo (BL) ou em ambos os braços, sendo identificados três tipos de cromossomos: (1) banda DAPI no BC e BL, cromossomos I, II, III e IV; (2) banda DAPI somente no BC, cromossomo V e (3) banda DAPI somente no centrômero, cromossomos VI e VII (Figura 3B). No híbrido interespecífico, entre os 21 cromossomos, foram observados os quatro tipos de cromossomos descritos para capim-elefante, sendo seis do tipo 1 (banda DAPI no BC e no BL), quatro do tipo 2 (banda DAPI no BC), cinco do tipo 3 (banda DAPI no BL) e seis do tipo 4 (banda DAPI apenas proximal) (Figura 3C).

Os resultados encontrados na FISH referentes ao mapeamento dos genes de RNAr 45S e 5S juntamente com os padrões encontrados para as bandas DAPI⁺ observados após tratamento com formamida permitiram a identificação de alguns cromossomos de capim-elefante e milheto e distinção dos mesmos quando combinados no híbrido interespecíficos, como observado no idiograma apresentado na Figura 4.

No capim-elefante, por ser uma espécie tetraploide, é mais difícil individualizar todos os quatorze pares de cromossomos. Não obstante, observou-se: (a) um loco de DNAr 45S no cromossomo I, metacêntrico, com banda DAPI na região terminal do braço curto; (b) o loco de DNAr 5S no braço curto do cromossomo II, com banda DAPI correspondente a região terminal desse braço cromossômico; (c) cromossomo V, metacêntrico, sendo o único a apresentar banda DAPI proximal e em ambos os braços cromossômicos; (d) cromossomo

VIII, submetacêntrico, apresentando banda DAPI apenas proximal e um sítio de DNAr 45S no braço curto e, (e) cromossomo X, submetacêntrico, com uma banda DAPI forte na região terminal do braço longo (Figura 4A). Os outros nove cromossomos apresentam apenas banda DAPI proximal, sendo necessárias marcas adicionais para individualizá-los.

No milheto, os quatro cromossomos maiores, metacêntricos, apresentam bandas DAPI proximais e na região terminal de ambos os braços cromossômicos, enquanto o quinto cromossomo pode ser facilmente distinguido por apresentar a banda DAPI proximal e uma banda terminal no braço curto. Já o cromossomo metacêntrico VI apresenta um loco de DNAr 45S, fracamente corado no braço curto, localizado adjacente a um loco de DNAr 5S, distinguindo-se do cromossomo submetacêntrico VII, o qual apresenta a região de DNAr no braço curto, representando quase a totalidade do mesmo (Figura 4B).

No híbrido interespecífico é possível distinguir os cromossomos VI e XII, ambos com DNAr, pertencentes ao parental capim-elefante; os quatro primeiros cromossomos (I a IV) com bandas DAPI proximais e na região terminal de ambos os braços cromossômicos como pertencentes ao parental milheto; assim como os cromossomos XIII e IX, com a região de DNAr 45S do parental milheto, sendo nesse último observada uma forte banda DAPI coincidente com a região de DNAr 45S (Figuras 1C e 4C).

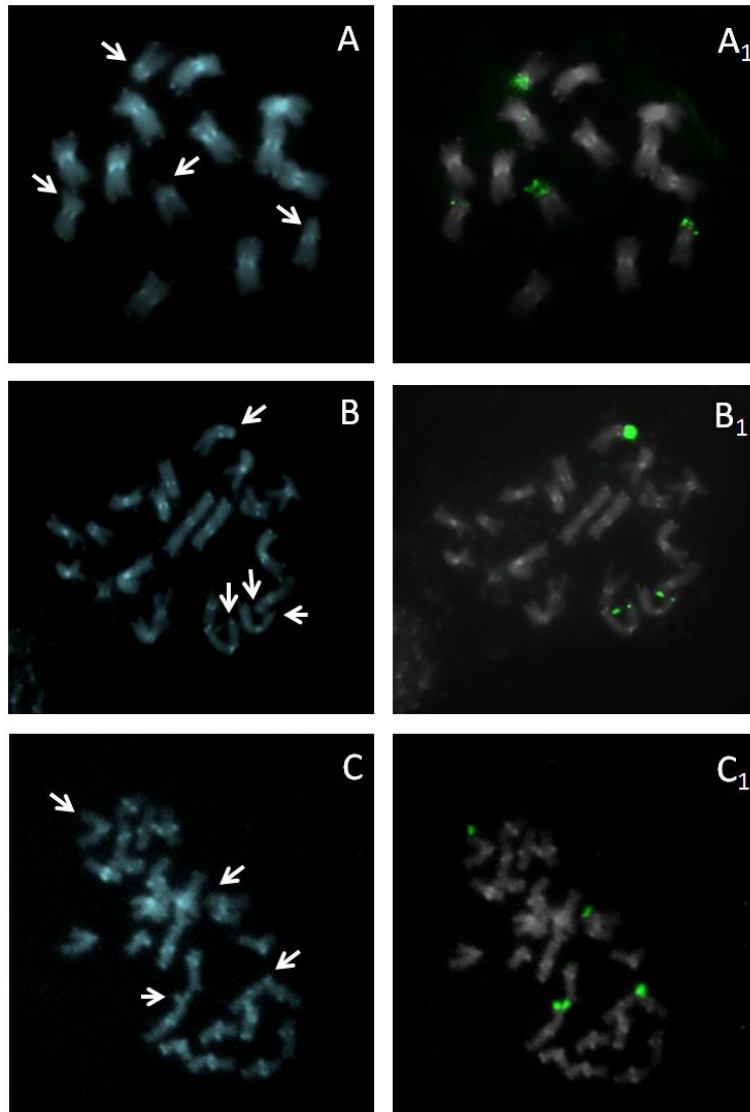


Figura 1 Mapeamento das regiões de DNAr 45S em (A) *P. glaucum* ($2n=2x=14$), (B) *P. purpureum* ($2n=4x=28$) e (C) híbrido interespecífico ($2n=3x=21$) (setas). Metáfase corada em DAPI (A, B e C). Metáfases contra-coradas com DAPI e pseudo-coradas em cinza, sinalizando os sítios de DNAr 45S (A1, B1, C1). Note que para os três genótipos foram encontrados quatro sítios.

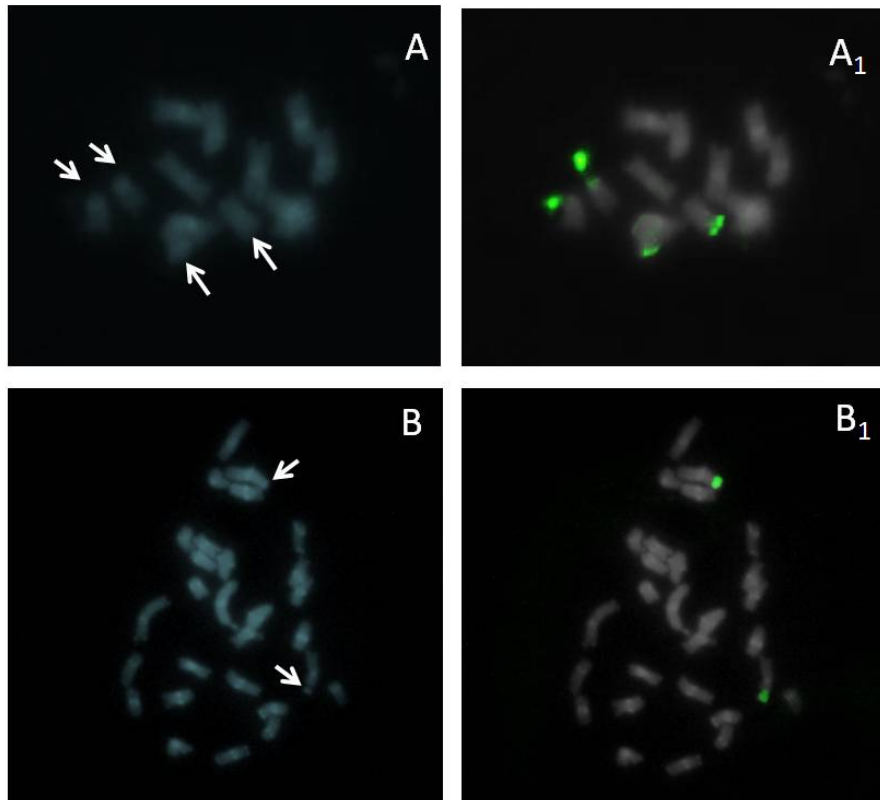


Figura 2 Mapeamento das regiões de DNAr 5S em (A) *P. glaucum* ($2n=2x=14$) e (B) *P. purpureum* ($2n=4x=28$). (A e B) Metáfase corada em DAPI. (A1 e B1) Metáfases contra-coradas com DAPI e pseudo-coradas em cinza, sinalizando os sítios de DNAr 5S. Note que *P. glaucum* apresentou quatro sítios (A1) e *P. purpureum* apresentou dois sítios (B1) de DNAr 5S.

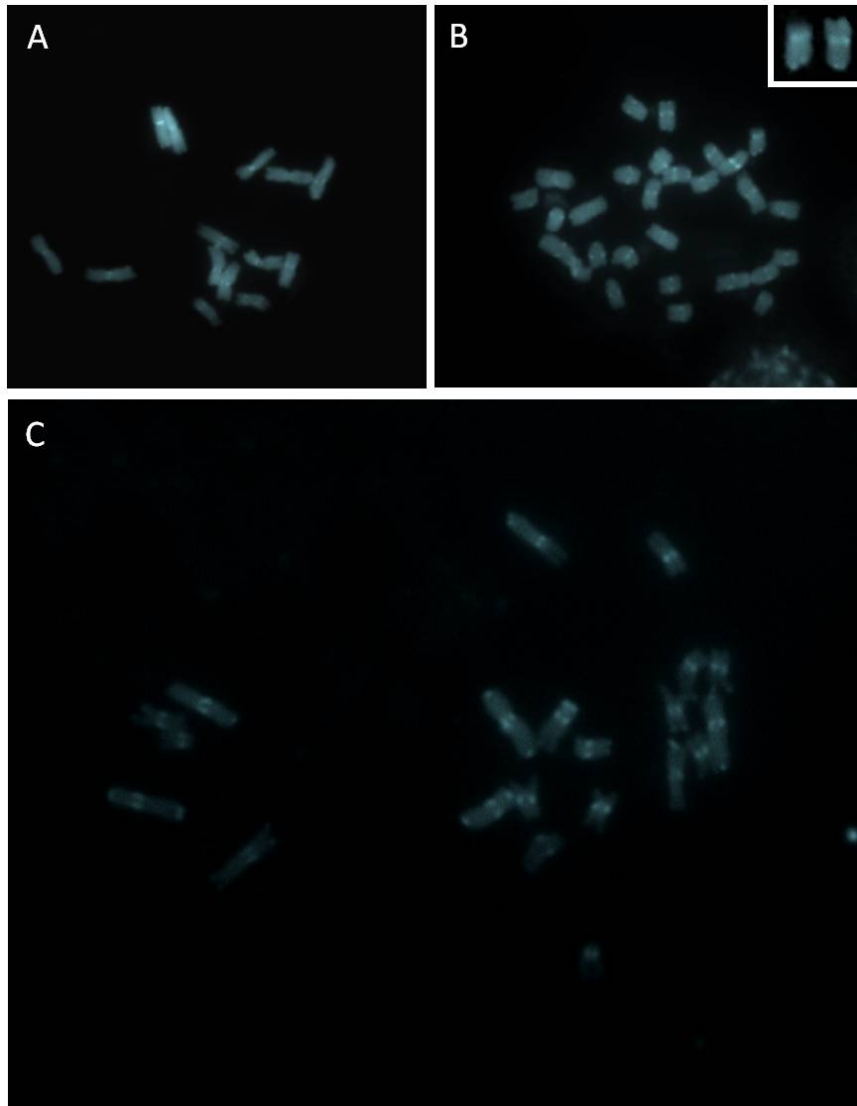


Figura 3 Bandamento DAPI após tratamento com formamida em *Pennisetum glaucum* ($2n=2x=14$), milheto (A), *Pennisetum purpureum* ($2n=4x=28$), capim-elefante (B) e híbrido interespecífico ($2n=3x=21$). Note todos os cromossomos com bandas centroméricas. Em B está sendo evidenciado o cromossomo dez (X), facilmente distinguível nas metáfases de *P. purpureum*.

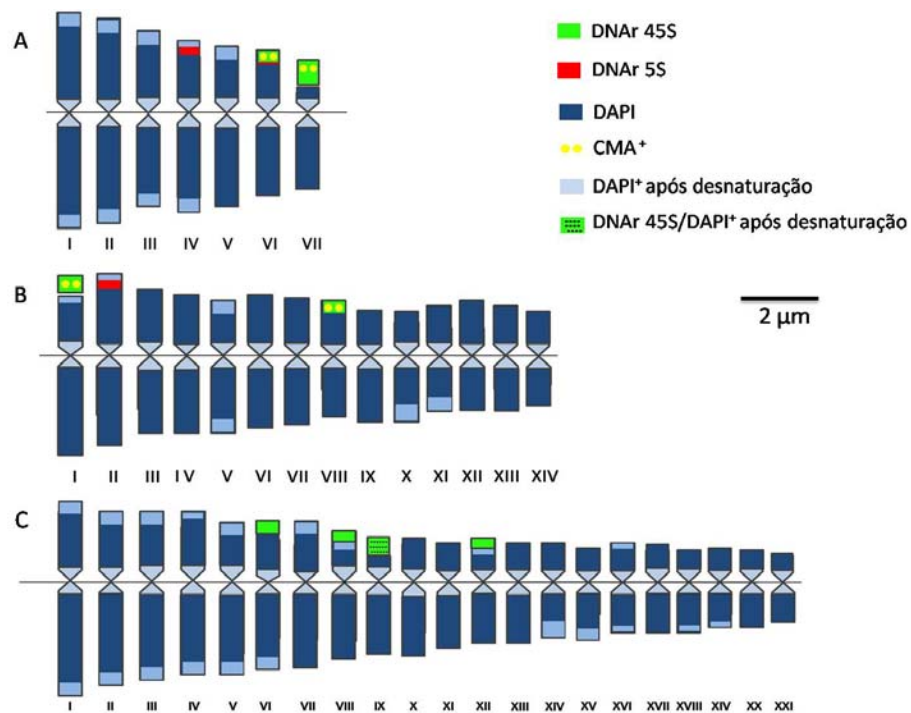


Figura 4 Idiograma contendo marcas de Bandamento CMA, DAPI e regiões de DNAr 45S e 5S de (A) *P. glaucum* (2n=2x=14), (B) *P. purpureum* (2n=4x=28) e (C) híbrido interespecífico (2n=3x=21).

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, o mapeamento físico dos genes de rRNA 18S-5.8S-26S e 5S e o bandamento DAPI foram utilizados para identificar os cromossomos do capim-elefante e milheto e distingui-los na combinação híbrida.

Após tratamento com formamida, usada no processo de desnaturação do DNA realizado durante a hibridização *in situ* fluorescente, foram observadas bandas DAPI bem evidentes nas regiões proximais dos cromossomos de capim-elefante e milheto, além de bandas terminais, distribuídas no braço curto, braço longo ou em ambos os braços cromossômicos. Barros e Silva e Guerra (2009) discutem o significado das bandas DAPI decorrentes dos processos de bandamento C e da hibridização *in situ*. Os autores mostram que essas técnicas citogenéticas evidenciam bandas DAPI, de forma que elas ficam mais brilhantes após a desnaturação dos cromossomos. Em geral as bandas que são geradas correspondem à região de heterocromatina constitutiva, apresentando padrão similar ao observado no bandamento C seguido de coloração com Giemsa (JACOBS; GARDNER; MURRAY, 2000; VANZELA; GUERRA et al., 2000), porém em alguns casos esse padrão pode ser diferente (FREGONEZI et al., 2006).

Pieczarka et al. (2006) afirmam que a desnaturação do DNA após tratamento com formamida melhora a qualidade do bandamento DAPI. Neste caso, o tempo de tratamento com a formamida influencia no padrão de bandas. O tratamento com formamida por um tempo determinado gera um padrão de bandas semelhante ao observado na banda Q, onde os cromossomos são corados com quinacrina. Tratando os cromossomos por um tempo mais prolongado o padrão de bandas é semelhante ao bandamento C, revelando apenas algumas regiões heterocromáticas, enquanto o tratamento de desnaturação por longos períodos altera a estrutura dos cromossomos. Observa-se que o primeiro padrão

de bandamento está relacionado com a composição de bases do DNA, enquanto o último com a estrutura cromossômica revelada após desnaturação (PIECZARKA et al., 2006). No presente trabalho as bandas DAPI observadas após desnaturação são coincidentes com bandas de heterocromatina reveladas após o bandamento C utilizando o hidróxio de bário (PEREIRA et al., dados não publicados).

Barros e Silva e Guerra (2009) também verificaram que as bandas DAPI positivas após o bandamento C ou FISH estão associadas, na maioria das vezes, a heterocromatina rica em AT. Os autores observaram ainda que, na ausência do CMA, que apresenta grande afinidade com regiões ricas em GC, todas as bandas de heterocromatina tendem a corar positivamente com o DAPI. Por outro lado, as bandas observadas após bandamento com cromomicina revelam as mesmas regiões ricas em CG observadas no bandamento CMA/DAPI convencional.

Adicionalmente ao bandamento com fluorocromos, foram mapeadas nos cromossomos de milho e capim-elefante as regiões dos genes de rRNA 18S-5.8S-26S e 5S. Os genes de RNAr 18S-5.8S-26S e 5S são organizados em tandem e localizados na região organizadora do nucléolo (RON). Cada unidade repetida do DNAr 45S é constituída por um região não transcrita, a qual é altamente compactada em regiões heterocromáticas e pelas regiões codificadoras para os três rRNAs que dão origem à constrição secundária observada nos cromossomos metafásicos. Desta forma cada unidade gênica do DNAr da RON é idêntica em sequência (espaçador externo, gene para rRNA 18S, regiões espaçadoras internas, que flanqueiam o gene para o RNAr 5.8S e por último gene para RNAr 26S), apresentando variação em relação ao número de unidade repetitivas (KOO et al., 2002; PIKAARD, 2000). Logo, a intensidade do sinal observado nos cromossomos que possuem a RON, após a hibridização com a sonda para o DNAr 45S, está estritamente relacionada com a quantidade de unidades de repetição (KOO et al., 2002).

Em capim-elefante as duas regiões que hibridizaram com a sonda de DNAr 45S pTa 71 (cromossomo I e VIII) apresentaram-se fortemente marcadas. Em milheto, a sonda hibridizou no cromossomo VII revelando intenso sinal, enquanto o cromossomo VI foi mais fracamente marcado pela sonda, evidenciando que o número de cópias de rDNA no cromossomo VII é maior que o número de cópias de unidades repetitivas de rDNA do que no cromossomo VI.

Em contraste com o DNAr 45S, o gene para o RNAr 5S está mapeado fora da RON, sendo constituído por uma região codificadora de 120pb, flanqueada por sequências espaçadoras de 100 a 700pb. Esse arranjo é repetido inúmeras vezes, formando a região de DNAr 5S (KOO et al., 2002). No capim-elefante tal região foi mapeada no cromossomo II, enquanto no milheto, a sonda marcou fortemente o cromossomo IV e VI de, sendo fortemente e fracamente marcada pela sonda D², respectivamente.

O mapeamento físico utilizando genes de DNAr 45S e 5S já foi realizado em algumas espécies que correspondem ao conjunto gênico primário do gênero *Pennisetum*, incluindo milheto (MARTEL; RICHROCH; SAAR, 1996). Nossos resultados corroboram com os previamente descritos, onde foram observados dois cromossomos com RON em milheto (VI e VII), sendo o cromossomo VI fracamente marcado com a sonda e o VII fortemente marcado (MARTEL; RICHROCH; SAAR, 1996). Esse mesmos autores mapearam o gene de RNAr 5S no cromossomo IV de milheto. Em nosso trabalho o DNAr 5S foi observado no cromossomo IV e no cromossomo VI sendo co-localizado com o gene de RNAr 45S. A marcação da sonda D² no cromossomo VI foi fraca e, provavelmente, impediu a sua detecção em estudos anteriores.

Considerando o número de cromossomos observados com a região DNAr 45S em capim-elefante, milheto e híbrido interespecífico os dados obtidos estão de acordo com os observados por Techio, Davide e Pereira (2006), através da análise meiótica, e por Barbosa, Davide e Pereira (2003), através da

análise morfométrica dos cromossomos. Techio, Davide e Pereira (2006) observaram dois bivalentes associados ao nucléolo avaliando a meiose de capim-elefante. Para milho os autores também observaram dois bivalentes associados ao nucléolo, sendo um deles correspondente ao menor cromossomo. No híbrido interespecífico foram observados de um a três bivalentes associados ao nucléolo, sendo dois o número mais freqüente. Em estudos morfométricos, Barbosa, Davide e Pereira (2003) observaram um ou dois pares de cromossomos de capim-elefante com satélite, dois pares em milho e apenas dois cromossomos com satélite no híbrido. Esses cromossomos satelitados observados por esses autores, corroboram apenas em parte com a posição do DNAr 45S nos cromossomos, mapeada após a FISH.

Para capim-elefante, pertencente ao conjunto gênico secundário do gênero *Pennisetum*, Barbosa, Davide e Pereira (2003) localizaram a RON no cromossomo satelitado I, à semelhança do que foi observado com a FISH, onde a região DNAr 45S foi mapeada nos cromossomos I e VIII. Em milho, dois cromossomos com satélites foram identificados nas metáfases. Pelos dados morfométricos, os satélites estavam localizados no cromossomo I e no cromossomo VII (BARBOSA; DAVIDE; PEREIRA, 2003). A presença de DNAr 45S no cromossomo satelitado I foi observado por Martel, Richroch e Saar (1996) em *P. shweinfurthii* ($2n = 2x = 14$) pertencente ao conjunto gênico terciário do gênero, mas sempre nos cromossomos VI e VII (satelitado) nas espécies diplóides do conjunto primário, como o milho. Adicionalmente, a região de DNAr 45S foi mapeada no híbrido interespecífico de capim-elefante e milho. Foram observados três cromossomos fortemente marcados com a sonda (VI, IX e XII) e um fracamente marcado (VIII) correspondendo aos dois cromossomos com gene de RNAr 18S-5.8S-26S de milho (VIII e IX) e dois de capim-elefante (VI e XII). Esta posição de DNAr 45S no híbrido não

correspondeu a localização das constrições secundárias nos cromossomos II e X do híbrido interespecífico observadas por Barbosa, Davide e Pereira (2003).

No interespecífico foi observado ainda a presença do DNAr 45S no cromossomo IX coincidindo com a posição de uma banda DAPI fortemente corada, referente a região heterocromática. A presença de um gene em uma região altamente heterocromática sugere que ele é transcricionalmente inativo (SUMMER, 2003). A verificação da atividade das RONS pode ser estudada com técnicas como a coloração com nitrato de prata. Nesta técnica, o nitrato de prata cora as proteínas que permanecem associadas ao nucléolo, correspondente a constrição secundária de dado cromossomo na metáfase, evidenciando uma RON que foi ativa na interfase anterior (SUMMER, 2003). Em estudos com bandamento Ag-NOR realizados em híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milho foram observadas quatro cromossomos com RONS ativas em ambos os parentais e apenas dois cromossomos com RONS ativas nos híbridos. Este resultado sugere que pelo menos dois sítios de genes RNAr 18S-5.8S-26S estão localizados em regiões heterocromáticas e são inativos nos híbridos triploides.

A inatividade de RONS quando os genomas de duas espécies são reunidos no núcleo de uma mesma célula híbrida é observada e denominada de dominância nucleolar. As sequências que codificam os genes de RNAr são essencialmente idênticas em espécies que podem intercruciar, desta forma, tendo em vista que os ribossomos formados a partir desses rRNA são indistinguíveis, a dominância nucleolar poderia ser uma consequência dos processos regulatórios que controlam a dosagem efetiva desses genes (PIKAARD, 2000). Logo, a inativação de duas das quatro regiões de DNAr 45S encontradas no híbrido é uma forma de compensação de dosagem gênica. Esses genes podem ser silenciados por diversos mecanismos controladores, dentre eles, mecanismos epigenéticos. Neste caso, as alterações na cromatina, envolvendo reações de

acetilação das proteínas histonas e metilação no DNA, alteram a relação dos fatores de transcrição com a região promotora do gene, inativando-o (PIKAARD, 2000). Estudos nesse sentido podem ser realizados utilizando-se marcadores para metilação e acetilação identificados nas células através de imunolocalização.

As marcas obtidas com o bandamento DAPI e o mapeamento de genes de RNAr 18S-5.8S-26S e 5S, neste trabalho, auxiliaram a identificação de alguns cromossomos de capim-elefante e milheto e serão utilizadas para a construção do mapa físico, juntamente com outras marcas que já estão sendo obtidas pela equipe de pesquisa como o bandamento C, Ag-NOR e localização de DNA microssatélite. Todas essas informações associadas poderão levar, mais adiante, à localização de genes de interesse em cromossomos específicos dos híbridos de capim-elefante e milheto.

5 CONCLUSÃO

O mapeamento dos genes de RNAr 18S-5.8S-26S e 5S e o bandamento DAPI realizados no presente trabalho permitiram distinguir cinco dos quatorze cromossomos do complemento haploide de capim-elefante e quatro dos sete cromossomos do complemento haploide de milheto. No híbrido interespecífico, o padrão de bandamento DAPI não foi coincidente com o encontrado nos parentais em função de reorganizações genômicas após a hibridação. Nesses híbridos foram identificados os cromossomos com região de DNAr 45S, além dos quatro primeiros do milheto. Ademais, foram evidenciadas algumas alterações no padrão de expressão do gene de RNAr 18S-5.8S-26S após hibridação.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. C. et al. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimutogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, Nov. 2006.

AKIYAMA, Y. et al. High-resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 134, n. 4, p. 1733-1741, Apr. 2004.

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

BARBOSA, S. et al. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milho. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 365-372, set. 2007.

BARROS E SILVA, A. E.; GUERRA, M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 85, n. 2, p. 115-125, Apr. 2010.

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.

CAMPOS, J. M. S. et al. 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. et al. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 101-104, Feb. 2009b.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 110, n. 4, p. 417-420, Dec. 1997.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO P. F. **The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy**. Berlin: Springer, 1985. 520 p.

FREGONEZI, J. N. et al. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 1, p. 97-104, mar. 2006.

HANNA, W. W. Melhoramento do capim-elefante. In: PASSOS, L. P. et al. **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 17-28.

HESLOP-HARRISON, J. S. The molecular cytogenetics of plants. **Journal of Cell Science**, London, v. 100, n. 1, p. 15-21, Sept. 1991.

JACOBS, M. D.; GARDNER, R. C.; MURRAY, B. C. Cytological characterization of heterochromatin and rDNA in *Pinus radiata* and *P. taeda*. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 223, n. 1/2, p. 71-79, Mar. 2000.

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

KOO, D. et al. Karyotype analysis of a Korean cucumber cultivar (*Cucumis sativus* L. cv. Winter Long) using C-banding and bicolor fluorescence in situ hybridization. **Molecules and Cells**, Seoul, v. 13, n. 3, p. 413-418, June 2002.

MARTEL, E. et al. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 249, n. 3/4, p. 139-149, Nov. 2004.

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

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 with rDNA probes. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 4, p. 680-687, Aug. 1996.

PANTULU, J. V.; VENKATESWARLU, J. Morphology of the pachytene chromosomes of *Pennisetum purpureum* Schum. **Genetica**, Grauenhage, v. 39, p. 41-44, 1968.

PEDROSA, A. et al. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicas*. **Genetics**, Austin, v. 161, n. 4, 1661-1672, Aug. 2002.

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

PIECZARKA, J. C. et al. An adaptation of DAPI-banding to fishes chromosomes. **Caryologia**, Firenze, v. 59, n. 1, p. 43-46, 2006.

PIKAARD, C. S. The epigenetics of nucleolar dominance. **Trends in genetics: DNA differentiation & development**, Amsterdam, v. 16, n. 11, p. 495-500, Nov. 2000.

SOUZA SOBRINHO, F. et al. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milheto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 9, p. 873-880, set. 2005.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2003. 287 p.

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. et al. Cytotaxonomy of some species and interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 203-209, jun. 2002.

VANZELA, A. L. L.; GUERRA, M. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 2, p. 453-456, jun. 2000.

CAPÍTULO 3

**ESTUDO DA ELIMINAÇÃO CROMOSSÔMICA EM HÍBRIDOS
DE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO (*Pennisetum sp.* Rich.,
Poaceae) MEDIANTE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* GENÔMICA
(GISH)**

RESUMO

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e o milheto (*Pennisetum glaucum*) destacam-se por sua importância econômica como forrageiras de elevado potencial de produção, sendo cultivadas nas regiões tropicais do planeta e empregadas na obtenção de híbridos interespecíficos em programas de melhoramento genético. No entanto, o maior problema em relação a utilização dos híbridos é a esterilidade causada por sua condição triploide ($2n = 3x = 21$ cromossomos). Logo, tem-se procurado restaurar a fertilidade do híbrido interespecífico por meio da duplicação cromossômica. Alguns protocolos de indução de poliploidia mostraram-se eficientes, produzindo plantas hexaploides, no entanto, frequentemente são observadas plantas mixoploides com células contendo número cromossômico variando de 14 a 42. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi estudar a eliminação cromossômica em híbridos de capim-elefante e milheto submetidos a duplicação cromossômica, utilizando como ferramenta a hibridização *in situ* genômica, a fim de identificar se há eliminação preferencial de cromossomos de um dos parentais após indução de poliploidia. Foi observada grande variação cromossômica entre e dentro as células somáticas dos híbridos analisados. Para dois híbridos (Paraíso e H-89) foi encontrada maior frequência de células com 38 cromossomos, sendo 12 cromossomos de milheto e 26 de capim-elefante. Já nos híbridos H40 e H42 a maioria das células apresentou 28 cromossomos (10 de milheto e 18 de capim-elefante). Foi observado ainda que parte do genoma do milheto distribui-se na periferia do núcleo, enquanto a outra encontra-se em uma região central do núcleo interfásico. Este arranjo sugere uma possível explicação para a aleatoriedade da eliminação dos cromossomos dos parentais.

Palavras-chaves: Poliploidização. Hibridação interespecífica. Mixoploidia. Eliminação cromossômica.

ABSTRACT

Napier grass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*) are important forages with high yielding cultivated on tropical areas. They are crossed in order to produce an interspecific hybrid, used on breeding programs. However, the sterility of this hybrid due to its triploid condition ($2n = 3x = 21$ chromosomes) has been pointed as a difficulty for its use in breeding programs. The fertility of this hybrid can be restored with chromosome doubling. Polyploidy is induced by some methods. Chromosome doubling results in hexaploid hybrids but also, some plants are frequently mixoploids (14 until 42 chromosomes) due chromosome elimination. The objective of this work was to study chromosome elimination in napier grass and pearl millet hybrids after chromosome doubling, using the genomic *in situ* hybridization (GISH) to identify if chromosome elimination is preferential after polyploidy induction. It was observed great chromosome variation between and in somatic cells of the hybrids analyzed. Two hybrids (Paraíso and H-89) had high frequency of cells with 38 chromosomes (12 from pearl millet and 26 from napier grass). In other hybrids (H40 and H42) it was observed high frequency of cells with 28 chromosomes (10 from pearl millet and 18 from napier grass). In the interphasic nucleus the genome of pearl millet is arranged at the periphery but also in a central region of the nucleus. This conformation suggests an explanation for the aleatority nature of chromosome elimination on pearl millet and napier grass hybrids.

Keywords: Polyploidization. Interspecific hybrids. Mixoploidy. Chromosome elimination.

1 INTRODUÇÃO

Pennisetum é um importante gênero da família Poaceae, subfamília Panicoideae (MARTEL et al., 2004). Dentre as espécies do gênero, o capim-elefante (*P. purpureum* Schumach.) e o milheto [*P. glaucum* (L.) R.Br] destacam-se por sua importância econômica como forrageiras de elevado potencial de produção, sendo cultivadas nas regiões tropicais do planeta e empregadas na obtenção de híbridos interespecíficos em programas de melhoramento genético (PEREIRA et al., 2001).

O capim-elefante é uma espécie perene, alógama, tetraploide, com complemento cromossômico de $2n = 4x = 28$ cromossomos e genomas A'A'BB, constituindo o conjunto gênico secundário. O milheto é uma espécie anual, alógama, diploide, com complemento cromossômico de $2n = 2x = 14$ cromossomos e genomas AA, integrando o conjunto gênico primário do gênero. As demais espécies do gênero *Pennisetum* constituem o conjunto gênico terciário (MARTEL et al., 2004; MARTEL; RICHROCH; SAAR, 1996).

A proximidade genética entre o capim-elefante e o milheto possibilita a obtenção de híbridos entre essas duas espécies, que se mostram compatíveis mesmo integrando diferentes conjuntos gênicos e apresentando diferentes níveis de ploidia (MARTEL et al., 2004). Nesse sentido, os programas de melhoramento têm explorado essa possibilidade de combinação interespecífica, a fim de transferir alelos desejáveis do milheto, os quais conferem resistência à seca e produção de sementes grandes, para os genótipos de capim-elefante de importância comercial (HANNA, 1999).

O híbrido interespecífico resultante do cruzamento de capim-elefante e milheto é triploide ($2n = 3x = 21$ cromossomos) e apresenta qualidade forrageira superior aos parentais. Observa-se que ele se assemelha morfológicamente ao capim-elefante, sendo perene, mas que possui algumas características

intermediárias entre as duas espécies parentais. A superioridade do potencial produtivo, vigor e palatabilidade do híbrido é dada pela presença de folhas maiores em maior número, colmos mais desenvolvidos, pelos foliares mais macios e caules menos fibrosos, além de maior produção de matéria seca (HANNA, 1999; PEREIRA et al., 2000; SCHANK et al., 1993).

No entanto, o maior problema em relação à utilização desses híbridos é a esterelidade causada por sua condição triploide. Como os programas de melhoramento visam desenvolver cultivares que possam ser propagadas por meio de sementes, adaptadas a diferentes ecossistemas e sistemas de produção, tem-se procurado restaurar a fertilidade do híbrido interespecífico por meio da duplicação cromossômica (PEREIRA et al., 2003). Para tanto, vários protocolos de duplicação cromossômica têm sido testados, utilizando diferentes tecidos vegetais e diferentes antimitóticos, variando tempo e concentração dos mesmos (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009b).

Com a duplicação dos cromossomos do híbrido triploide, espera-se encontrar plantas hexaploides com $2n = 6x = 42$ cromossomos. Alguns protocolos de indução de poliploidia se mostraram eficientes, produzindo plantas hexaploides, no entanto, frequentemente são observadas plantas mixoploides com células contendo número cromossômico variando de 14 a 42 (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009a, 2009b). A mixoploidia é comum em híbridos interespecíficos e intergenéricos e, segundo Abreu et al. (2006), nos híbridos de capim-elefante e milho é ocasionada por eliminação cromossômica. A eliminação de genomas parentais inteiros é relatada em vários cruzamentos entre espécies da família Poaceae (GERMAND et al., 2005; LINDE-LAURSEN; BOTHMER, 1999; RIERA-LIZARAZU; RINES; PHILLIPS, 1996), sendo comumente utilizados na obtenção de haploides. Por outro lado, a eliminação parcial de cromossomos observada em híbridos interespecíficos, é uma ferramenta valiosa nos programas de

melhoramento genético, tendo potencial para gerar novas variedades híbridas (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000).

Nesse sentido, a mixoploidia observada nos híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milheto submetidos à indução de poliploidia necessita ser melhor compreendida, uma vez que até o momento os trabalhos apenas relatam sua ocorrência, não havendo estudos sobre qual(is) genoma(s) estaria(m) envolvidos na eliminação. Tendo em vista que a hibridação seguida da duplicação cromossômica é uma estratégia comum no melhoramento de capim-elefante, o objetivo do presente trabalho é estudar a eliminação cromossômica em híbridos de capim-elefante e milheto submetidos à duplicação cromossômica, utilizando como ferramenta a hibridização *in situ* genômica, a fim de identificar se há eliminação preferencial de cromossomos de um dos parentais após indução de poliploidia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Genético

Foram avaliados quatro híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milheto, submetidos à duplicação cromossômica *in vitro*. Dentre eles, utilizou-se um genótipo da cultivar comercial Paraíso e três genótipos (H-89, H-40 e H-42) obtidos por indução de poliploidia em híbridos triploides (BARBOSA et al., 2007). Esses genótipos foram fornecidos pela Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

2.2 Análises Citogenéticas

As raízes obtidas de estacas dos híbridos triploides duplicados foram coletadas e submetidas à solução de 25 mg/L de cicloheximida : 300 mg/L de 8-hidroxiquinolina (1:1) por 2:45 h a 4°C, lavadas em água destilada e fixadas em solução de etanol:ácido acético (3:1) (TECHIO et al., 2002). As lâminas foram preparadas pelo método de dissociação celular (CARVALHO; SARAIVA, 1997) com maceração enzimática em pectinase-celulase (100U:200U) por 2:10 h a 37°C em câmara úmida.

Foram avaliadas pelo menos 10 lâminas a partir de um indivíduo da população de cada híbrido. Dentre essas 10 lâminas de 60 a 100 células intactas com metáfases foram hibridizadas para contagem e verificação de eliminação cromossômica. A avaliação das lâminas foi realizada em microscópio de luz (Olympus BX40) sob contraste de fase e as lâminas com metáfases boas e cromossomos espalhados foram armazenadas a -20°C até a utilização na hibridização *in situ* genômica.

2.3 Extração do DNA genômico

O DNA genômico dos parentais capim-elefante e milho foi extraído segundo o protocolo de Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações. O DNA de milho foi utilizado na obtenção da sonda e o DNA de capim-elefante para a obtenção do DNA de bloqueio.

Suscintamente, 200 mg de folhas jovens, foram maceradas em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído com tampão CTAB 2% a 65°C. As proteínas e carboidratos foram removidos com solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado em isopropanol e ressuscitado em água miliQ. O RNA foi removido com tratamento de RNase (10 µg/mL) a 37°C. Foram obtidos de 400 a 800 ng de DNA.

Para preparo do DNA de bloqueio, as amostras foram submetidas a tratamento com autoclave por 15 min, obtendo-se fragmentos de 100 a 500pb. Posteriormente o DNA foi precipitado com etanol e ressuscitado em água miliQ.

2.4 Hibridização *in situ* genômica (GISH)

O DNA genômico obtido, foi marcado com biotina-16-dUTP (DNA de milho) através da reação de *nick-translation* obtendo-se a sonda genômica.

Para o estudo de eliminação cromossômica foi utilizado o protocolo de hibridização *in situ* proposto por Akiyama et al. (2004), com a sonda genômica de milho. As lâminas selecionadas e armazenadas no *freezer* (-20°C) foram pré-tratadas com ácido acético 60% por 15 min e desidratadas em etanol (70-100%), 5 min cada, seguindo secagem a 55°C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com RNase (100 µg/mL) a 37°C por 1 hora, seguido de tratamento com proteinase K (10 µg/mL) em HCl 10 mM a 37°C por 20 min e fixação em

4% paraformaldeído em 1x PBS com NaOH 1 N. Todas as lavagens entre os tratamentos foram realizadas com 2x SSC. Por fim, as lâminas foram desidratadas em 70-100% de etanol e secas ao ar por no mínimo 1 hora.

A preparação cromossômica foi desnaturada com 100 μ L de formamida 70% em 2x SSC a 85°C por 1,5 minuto. Posteriormente as lâminas foram lavadas em etanol 70-100% gelado (-20°C) para remoção da formamida. A mistura de hibridização foi preparada segundo protocolo de Heslop-Harrison (1991) com 77% de estringência [2-5 ng/ μ L da sonda genômica, DNA de bloqueio na proporção de 1:5 (sonda: bloqueio), 50% de formamida, 10% de dextran sulfato e 2x SSC, totalizando 5 μ L da mistura], sendo desnaturada a 75°C por 10 minutos. Após a desnaturação a mistura foi aplicada sobre a preparação cromossômica deixando-se hibridizar por 40 h a 37°C em câmara úmida.

As lavagens para retirar a sonda não hibridizada foram realizadas com 2x SSC, (duas vezes de 5 min) e 0,1x SSC (duas vezes de 5 min) ambas a 42°C, com 73% estringência. Posteriormente foram realizados banhos a temperatura ambiente em 2x SSC e 4x SSC com 0,1% de Tween 20, antes do bloqueio (BSA 5% em 4x SSC + 0,1% de Tween 20 por 30 min).

A sonda do DNA genômico de milho marcada com biotina (BIO) foi detectada com avidina conjugada com fluoresceína. O anticorpo (avidina) foi aplicado sobre a preparação após lavagem da sonda e incubados por 1 h a 37°C em câmara úmida seguindo de 3 lavagens de 10 min em 4x SSC com 0,1% de Tween 20 a 42°C.

Os cromossomos da preparação foram contra corados com DAPI (1,5-2 μ g/mL) em vectashield (1:1) e analisados em Microscópio de Epifluorescência Nikon Eclipse EC400 nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 (DAPI) e 490/525 (fluoresceína). As imagens das metáfases foram obtidas com câmara digital Nikon Colpix e o número de cromossomos de cada

metáfase, assim como o número de cromossomos eliminados de cada um dos parentais, foi avaliado.

Ademais, pelo menos 100 núcleos interfásicos de cada híbrido triploide duplicado (H-89, H-40 e H-42) e da cultivar Paraíso, foram avaliados quanto à localização dos genomas dos parentais para melhor entendimento do fenômeno de eliminação cromossômica.

3 RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os números cromossômicos encontrados nos híbridos triploides duplicados (H-40, H-42 e H-89) e na cultivar Paraíso. Tendo em vista que a cultivar Paraíso foi obtida por duplicação cromossomômica de um híbrido triploide, assim como os demais híbridos avaliados, esperava-se encontrar $2n = 6x = 42$ cromossomos nas células do meristema radicular desses materiais. No entanto, houve grande variação cromossômica entre e dentro as células somáticas desses híbridos (Tabela 1).

O maior intervalo de variação foi observado no híbrido H-89 ($2n = 16$ a 42 cromossomos), enquanto que a menor variação foi observada nas células do híbrido H-40 ($2n = 14$ a 32 cromossomos).

A frequência de células com menos de 21 cromossomos, referente ao número cromossômico do híbrido triploide ($2n = 3x = 21$), foi baixa, apenas 6,3% das mais de 300 células avaliadas em todos os híbridos, assim como a frequência de células com o genoma totalmente duplicado (4,7% do total de células avaliadas). Essas células com $2n = 6x = 42$ cromossomos foram observadas somente no híbrido H-89 e na cultivar Paraíso. Logo, a maior parte das células dos híbridos avaliados perdeu cromossomos de um ou de ambos os parentais (Tabela 2).

Na cultivar Paraíso, 20,5% das células apresentaram $2n = 38$ cromossomos. Dessas células, 40% apresentaram a combinação de 12 cromossomos de milho e 26 cromossomos de capim-elefante (Tabela 2).

No híbrido H-89 o número cromossômico mais frequente também foi de $2n = 38$ (16,7% das células) (Tabela 1). Do total de células avaliadas nesse híbrido, 36,1% apresentaram 12 cromossomos de milho, representando 14% de eliminação do genoma desse parental e, 19,4% das células apresentaram 26 cromossomos de capim-elefante tendo eliminado 7% do genoma do mesmo

(Tabela 2). Para essas células com 26 cromossomos de capim-elefante o número cromossômico nas metáfases variou de $2n = 36$ a 40 cromossomos combinados com 10, 12, 13 ou 14 cromossomos de milho.

Os híbridos H-40 e H-42 não apresentaram células com 42 cromossomos, tendo número máximo de cromossomos igual a 32 e 38, respectivamente (Tabela 1). Nesses dois híbridos, o número cromossômico observado com maior frequência foi $2n = 28$ cromossomos (52,8% das células de H-40 e 33,7% de H-42) (Tabela 2). Em ambos os híbridos, cerca de 50% dessas células com 28 cromossomos, apresentaram a combinação de 10 cromossomos de milho e 18 cromossomos de capim-elefante, sendo observada eliminação de 29% do genoma de milho e 36% do genoma de capim-elefante.

Para cada genótipo avaliado foi observada grande variação nos parâmetros avaliados (Tabela 2). O híbrido triploide duplicado H-42 apresentou a maior perda de genoma de ambos os parentais: 42% do genoma de milho (18,1% das células com 8 cromossomos) e 46% do genoma de capim-elefante (10,8% das células com 15 cromossomos). A cultivar Paraíso, por outro lado, apresentou 17,8% das células com 42 cromossomos tendo complemento totalmente duplicado. Esse foi o único genótipo onde, frequentemente, encontrou-se células no intervalo de 38 a 40 cromossomos (64% das células avaliadas), próximo do esperado para um híbrido hexaploide.

As imagens representativas da variação cromossômica nos híbridos de capim-elefante e milho submetidos à duplicação cromossômica após a hibridização *in situ* genômica, revelando os genomas eliminados nesses híbridos, estão apresentadas nas Figuras 1 e 2.

Considerando todos os híbridos avaliados 23% das células avaliadas apresentaram 10 cromossomos de milho e 18 cromossomos de capim-elefante, representando eliminação de 29% do genoma de capim-elefante e 36% de milho. O número cromossômico mais frequente dessas células foi $2n = 28$

cromossomos. Essa combinação está relacionada com a alta frequência de células com 28 cromossomos nos híbridos H-40 e H-42. Para os outros dois híbridos avaliados, considerando as células com 38 cromossomos, as quais foram observadas em maior frequência, a eliminação cromossômica representou perda de 14% do genoma de milho e 7% do capim-elefante, não havendo, aparentemente, perda preferencial de genoma.

Adicionalmente, o genoma de milho foi utilizado como sonda nos núcleos interfásicos dos híbridos duplicados. Parte do genoma distribuiu-se na periferia do núcleo, próximo do envoltório nuclear, enquanto que parte dele encontra-se em uma região central do núcleo interfásico (Figura 2). Esse arranjo pode ser uma possível sugestão para a aleatoriedade da eliminação dos cromossomos dos parentais observada.

Tabela 1 Variação no número cromossômico somático de híbridos de capim-elefante e milho submetidos à indução de duplicação cromossômica.

| Híbridos 3X duplicados | Nº de metáfases avaliadas | Variação | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| | | cromossômica somática (2n) | Moda (%) |
| Paraíso | 73 | 18 a 42 | 38 (20,5%) |
| H-40 | 108 | 14 a 32 | 28 (52,8%) |
| H-42 | 83 | 18 a 38 | 28 (33,7%) |
| H-89 | 63 | 16 a 42 | 38 (16,7%) |

Tabela 2 Variação no número cromossômico somático e na frequência de cromossomos eliminados por genoma de capim-elefante e milho nos híbridos interespecíficos submetidos à duplicação cromossômica.

| Híbridos 3X duplicados | Nº crom. mais frequente (%)* | Variação do nº crom. Milheto | Variação do nº crom. Capim | % de Variação da perda genômica Milheto | % de Variação da perda genômica Capim |
|---------------------------------------|---|---|---|--|--|
| Paráíso | 36 (15,1%) | 9 - 13 | 23 - 27 | 7,1 - 35,7 | 3,6 - 17,9 |
| | 38 (20,5%) | 10 - 14 | 24 - 28 | 0,0 - 28,6 | 0,0 - 14,3 |
| | 40 (19,2%) | 12 - 14 | 26 - 28 | 0,0 - 14,3 | 0,0 - 7,1 |
| | 42 (17,8%) | 14 | 28 | 0,0 | 0,0 |
| H-89 | 30 (13,9%) | 9 - 14 | 16 - 21 | 0,0 - 35,7 | 25,0 - 42,8 |
| | 38 (16,7%) | 12 - 14 | 24 - 26 | 0,0 - 14,3 | 7,1 - 14,3 |
| H-42 | 24 (10,8%) | 6 - 10 | 14 - 18 | 28,6 - 57,1 | 35,7 - 50,0 |
| | 26 (18,1%) | 5 - 12 | 14 - 21 | 14,3 - 64,3 | 25,0 - 50,0 |
| | 27 (7,2%) | 8 - 11 | 16 - 19 | 21,4 - 42,8 | 32,1 - 42,8 |
| | 28 (33,7%) | 6 - 12 | 16 - 22 | 14,3 - 57,1 | 21,4 - 42,8 |
| H-40 | 26 (15,7%) | 8 - 12 | 14 - 18 | 14,3 - 42,8 | 35,7 - 50,0 |
| | 27 (7,4%) | 7 - 11 | 16 - 20 | 21,4 - 50,0 | 28,6 - 42,8 |
| | 28 (52,8%) | 5 - 14 | 14 - 23 | 0,0 - 64,3 | 17,8 - 50,0 |

*Representa o percentual de células observadas, em relação ao total de células de um dado genótipo.

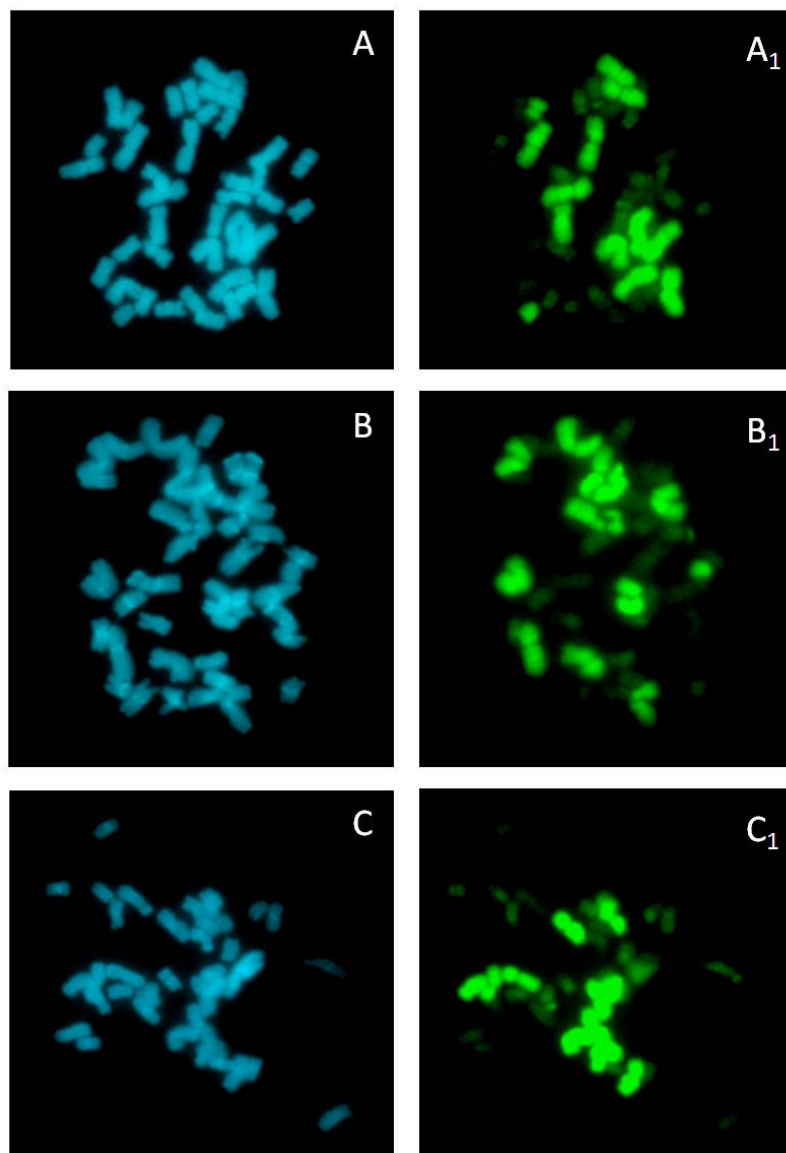


Figura 1 Hibridização *in situ* genômica em híbridos de capim-elefante e milho submetidos à duplicação cromossômica. (A, B e C) Metáfases observadas no DAPI com 42 (A), 39 (B) e 38 (C) cromossomos. (A1, B1, C1) Cromossomos de milho hibridizados com sonda genômica: 14 (A1), 13 (B1) e 12 (C1) cromossomos.

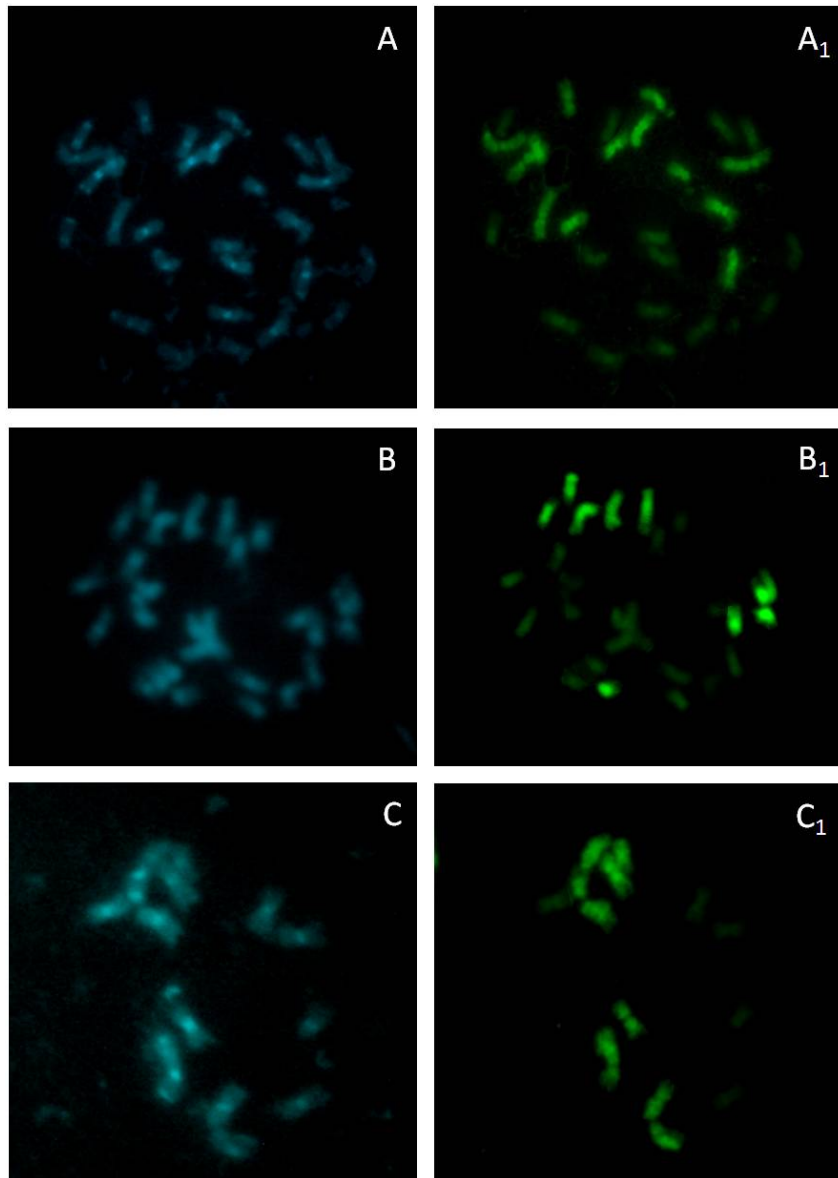


Figura 2 Hibridização *in situ* genômica em híbridos de capim-elefante e milho submetidos à duplicação cromossômica. (A, B e C) Metáfases observadas no DAPI com 30 (A), 26 (B) e 14 (C) cromossomos. (A1, B1, C1) Cromossomos de milho hibridizados com sonda genômica: 13 (A1) e 9 (B1 e C1) cromossomos.

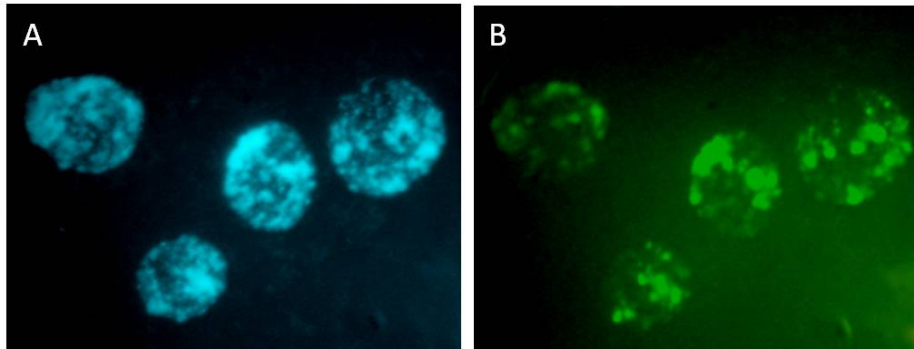


Figura 3 Hibridização *in situ* genômica em híbridos de capim-elefante e milho submetidos à duplicação cromossômica. Núcleos interfásicos observados no DAPI (A) e núcleos interfásicos hibridizados com sonda genômica, mostrando a distribuição do genoma de milho (B).

4 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados representam o primeiro relato a respeito da identificação dos genomas eliminados após hibridação e duplicação cromossômica em híbridos interespecíficos de capim-elefante e milho. A mixoploidia observada nesses híbridos é um fenômeno bastante comum e já foi descrita em vários trabalhos (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; BUSTAMANTE, 2009).

Abreu et al. (2006) observaram células mixoploides, apresentando entre 14 até 42 cromossomos, indicando que houve duplicação seguida de eliminação cromossômica, após testes com diferentes soluções e concentrações de bloqueadores do ciclo celular. Os autores sugerem também que a eliminação cromossômica nesses híbridos tem controle nuclear, e que se expressa quando diferentes proporções genômicas são produzidas nos híbridos. Adicionalmente, Barbosa et al. (2007) obtiveram plantas hexaploides férteis e plantas mixoploides com 14 a 42 cromossomos, ficando novamente demonstrado que a duplicação ocorre, mas em geral é seguida de eliminação do genoma de um ou de ambos os parentais. Campos et al. (2009b) induziram a poliploidia nos híbridos de capim-elefante e milho via embriogênese somática. Neste trabalho, a mixoploidia também foi relatada através da estimativa da quantidade de DNA, via citometria de fluxo. Foram observadas células com quantidade de DNA variando de 3x a 12x. Estas células 12x representam células na fase G2 da interfase, oriundas de células hexaploides.

A eliminação dos cromossomos observada nos híbridos triploides submetidos à duplicação foi confirmada pelas aberrações cromossômicas observadas em células somáticas. Bustamante (2009) observou alterações no ciclo celular de híbridos de *Pennisetum* submetidos à indução de poliploidia, tais como: cromossomos pegajosos, pontes e cromossomos não orientados na

metáfase ou perdidos na anáfase. Adicionalmente Campos (2007) observou a presença de micronúcleos durante o desenvolvimento de híbridos triploides além de anormalidades cromossômicas em plantas hexaploides, após induzida a duplicação cromossômica, relacionadas ao efeito aneuploidizante da colchicina. A formação de micronúcleos observados na telófase e prófase, de fato, pode ser resultado das alterações observadas no ciclo celular (SINGH, 2002), tendo em vista que os micronúcleos são formados por cromossomos ou fragmentos que são envolvidos pela membrana nuclear reconstruída no final da telófase (SCHUBERT; OUD, 1997).

Bustamante (2009) avaliou ainda a quantidade de DNA em folhas e em raízes em híbridos de capim-elefante e milho que divergiam quanto ao tempo de indução de duplicação cromossômica (duplicação induzida a mais de dez anos e recém sintetizada) na tentativa de entender a variação no número cromossômico em uma escala temporal e em tecidos específicos. Foi demonstrado comportamento semelhante nos dois grupos avaliados, não sendo encontrado nenhum híbrido estável, tendo em vista que todos apresentaram mixoploidia em células meristemáticas. Além disso, foi constatado que não há variação no conteúdo de DNA entre os tecidos (raízes e folhas) de um mesmo híbrido.

Todos esses trabalhos relatam a ocorrência de mixoploidia após a indução de duplicação cromossômica em híbridos de capim-elefante e milho, em função da eliminação cromossômica. O aparecimento dessas células aneuploides observadas em híbridos interespecíficos e intergenéricos é dada como causa da enorme variação cromossômica que tem sido observada nesses casos. Os cromossomos podem ser eliminados do núcleo do híbrido em função de vários mecanismos: genéticos que controlam as proporções genotípicas nas plantas híbridas (SALENTIJN et al., 2009); diferença no tempo do ciclo celular das duas espécies (GUPTA, 1969) e efeito aneuploidizante da colchicina

(CARPETA et al., 2006; SCHOENLEIN et al., 2003;). Nesse último caso a eliminação não é controlada geneticamente, podendo ser aleatória.

O processo de eliminação cromossômica tem sido extensivamente estudado em híbridos interespecíficos com o objetivo de obter plantas haploides, que posteriormente possam ter o complemento cromossômico duplicado, produzindo linhagens duplo-haploides ou na obtenção de linhas de adição (materiais contendo cromossomos ou segmentos de cromossomos extras) ou substituição (substituição de cromossomos entre espécies diferentes), quando ocorre a eliminação diferencial (parcial) dos cromossomos de um dos parentais (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000; GERMAND et al., 2005; LINDE-LAURSEN; BOTHMER, 1999).

Os resultados deste trabalho a respeito da eliminação cromossômica dos parentais nos híbridos interespecíficos duplicados entre capim-elefante e milho, mostraram que não há eliminação cromossômica uniparental, como observada por Germand et al. (2005) nos cruzamentos de trigo e milho, nem mesmo eliminação preferencial, onde o genoma de um dos parentais estaria sendo eliminado com maior frequência em todos os materiais avaliados.

A proporção genômica dos parentais nas plantas mixoploides, através do uso de sonda genômica de milho, revelou que dois dos genótipos avaliados apresentam frequências altas de células com 28 cromossomos que corresponde ao número cromossômico do parental capim-elefante. Com esses resultados pode-se sugerir que essas plantas tenderam a se estabilizar com 28 cromossomos, nos quais 18 são frequentemente do parental capim-elefante e 10 do parental milho. Ademais, nos outros híbridos avaliados foram observadas células com um número cromossômico próximo do hexaploide esperado, demonstrando que há plantas que tendem a se estabilizar perdendo menos cromossomos.

Segundo Jauhar (1981) os cromossomos do genoma B de capim-elefante têm maior probabilidade de serem eliminados nos híbridos interespecíficos do que os cromossomos do genoma A'. Esse fato pode ser relacionado com a homeologia relatada entre os genomas A de milho e A' de capim-elefante em função do pareamento meiótico (JAUHAR, 1981; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005, 2006).

Não obstante, os resultados apresentados não permitem afirmar qual(is) dos genoma(s) do capim-elefante está (ão) sendo eliminado(s), nem mesmo quais os cromossomos que sempre permanecem na combinação híbrida. Para tanto são necessários estudos que permitam identificar cada um dos cromossomos, verificando aqueles que são responsáveis pelas características agrônomicas de interesse, observadas nos híbridos. Estudos nesse sentido estão em andamento.

5 CONCLUSÃO

Realizou-se o primeiro estudo sobre a identificação dos cromossomos parentais eliminados nos híbridos mixoploides resultantes do cruzamento de capim-elefante e milheto, seguido de indução de duplicação cromossômica. A eliminação cromossômica é casual, podendo ser encontradas as mais diversas combinações cromossômicas entre os híbridos em questão.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. C. et al. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, Nov. 2006.

AKIYAMA, Y. et al. High-resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 134, n. 4, p. 1733-1741, Apr. 2004.

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

BARBOSA, S. et al. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milho. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 365-372, set. 2007.

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

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

CAMPOS, J. M. S. et al. 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. et al. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 101-104, Feb. 2009b.

CARPETA, A. D. et al. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. **Protoplasma**, New York, v. 227, n. 2/4, p. 147-155, May 2006.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 110, n. 4, p. 417-420, Dec. 1997.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v. 19, p. 11-15, 1987.

GERMAND, D. et al. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 9, p. 2431-2438, Sept. 2005.

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

HANNA, W. W. Melhoramento do capim-elefante. In: PASSOS, L. P. et al. **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 17-28.

HESLOP-HARRISON, J. S. The molecular cytogenetics of plants. **Journal of Cell Science**, London, v. 100, n. 1, p. 15-21, Sept. 1991.

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

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

MARTEL, E. et al. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 249, n. 3/4, p. 139-149, Nov. 2004.

MARTEL, E.; RICHROCH, A.; 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 with rDNA probes. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 4, p. 680-687, Aug. 1996.

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

PEREIRA, A. V. et al. Tendências do 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, 2003. p. 23-35.

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

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.

SALENTIJN, E. M. J. et al. Tetraploid and hexaploid wheat varieties reveal large differences in expression of alpha-gliadins from homoeologous Gli-2 loci. **BMC Genomics**, Austin, v. 10, p. 48, Jan. 2009.

SCHANK, S. C. et al. Genetic improvement of napiergrass and hybrids with pearl millet. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 35-40, 1993.

- SCHOENLEIN, P. V. et al. Radiation therapy depletes extrachromosomally amplified drug resistance genes and oncogenes from tumor cells via micronuclear capture of episomes and double minute chromosomes. **International Journal of Radiation Oncology**, New York, v. 55, n. 4, p. 1051-1065, Mar. 2003.
- SCHUBERT, I.; OUD, J. L. There is an upper limit of chromosome size for normal development an organism. **Cell**, Cambridge, v. 88, n. 4, p. 515-520, Feb. 1997.
- SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC, 2002. 463 p.
- TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Genomic analysis in *Pennisetum purpureum* and *P. glaucum* hybrids. **Caryologia**, Firenze, v. 58, n. 1, p. 28-33, 2005.
- 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. et al. Cytotaxonomy of some species and interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 203-209, jun. 2002.

CAPÍTULO 4

ALTERAÇÕES GENÔMICAS APÓS HIBRIDAÇÃO ENTRE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO (*Pennisetum sp.* Rich., Poaceae)

RESUMO

O capim-elefante e milheto são forrageiras tropicais pertencentes ao gênero *Pennisetum*. A variabilidade existente dentro de cada uma dessas espécies é explorada no melhoramento de forragens, assim como a hibridação interespecífica entre elas. A hibridação interespecífica é um fenômeno que pode levar a conflitos intergenômicos ocasionando a eliminação de sequências genômicas. O objetivo do presente trabalho foi estudar as alterações genômicas decorrentes da hibridação interespecífica entre capim-elefante e milheto através de técnicas de citogenética e citometria de fluxo que permitiram avaliar a morfometria dos cromossomos dessas espécies, o conteúdo de DNA e as proporções genômicas dos parentais no híbrido. Foi observado que capim-elefante e milheto apresentaram tamanhos cromossômicos sobrepostos e que o híbrido apresentou cromossomos com comprimento menor do que o esperado. Adicionalmente, comparando o híbrido com os parentais foi possível identificar perda do conteúdo de DNA e alteração na relação dos genomas parentais no núcleo híbrido. Os resultados demonstram que ocorrem perdas de sequências de DNA após hibridação interespecífica entre capim-elefante e milheto.

Palavras-chaves: Híbridos interespecíficos. Morfometria cromossômica. Citometria de Fluxo. Hibridização *in situ*.

ABSTRACT

The napier grass and pearl millet are tropical forages from genus *Pennisetum*. The variability in those species is used on breeding programs of forages, as well as on the production of interspecific hybrids. Hybridization is a phenomenon that leads intergenomics conflicts, following genomic sequences elimination. Then, this work aimed to study the genomic alterations after interspecific hybridization of pearl millet and napier grass using cytogenetics and flow cytometry tools. These methods allowed the evaluation of chromosome morfometry, DNA content and genomic ratio in pear millet, napier grass and hybrids. It was observed that pearl millet and napier grass have chromosome with superposed size. The hybrid presents chromosomes smaller than expected, leading cariotypes alterations, as observed. Additionally, comparing parentals and hybrids DNA content it was demonstrated loss of DNA content. It was also observed changes on pearl millet and napier grass genome ratio in hybrid nucleus. It was concluded, with these results, that pearl millet and napier grass hybrid lost genomic sequences as consequence of hybridization.

Keywords: Interspecific hybridids. Chromosome morfology. Flow Cytometry. *In situ* hybridization.

1 INTRODUÇÃO

O capim-elefante e milheto são duas forrageiras pertencentes ao gênero *Pennisetum* (MARTEL et al., 2004). A variabilidade existente dentro de cada uma dessas espécies é explorada no melhoramento genético, assim como a hibridação interespecífica entre elas. Esta estratégia de obtenção de híbridos entre as duas espécies é recomendada para o melhoramento da qualidade forrageira (HANNA, 1999).

O capim-elefante é um aloploiploide com $2n = 4x = 28$ cromossomos, e genomas A'A'BB, sendo alógama e perene. O milheto é um diploide com $2n = 2x = 14$ cromossomos e genomas AA, sendo anual (MARTEL et al., 1997). O híbrido resultante é um triploide com $2n = 3x = 21$ cromossomos, estéril. Esse híbrido tem sido explorado nos programas de melhoramento de *Pennisetum*, pois permite reunir características favoráveis de ambos os parentais. Nele, a elevada produção de matéria seca, boa palatabilidade, alto valor nutritivo e perenidade do capim-elefante são combinados com a qualidade de forragem, boa resistência à seca e doenças, tolerância a baixos níveis de fertilidade do solo, produção de sementes não deiscentes e de maior tamanho do milheto, gerando genótipos superiores aos parentais (HANNA, 1999; PEREIRA et al., 2000).

A hibridação e a poliploidia são processos que exercem grande força evolutiva nos vegetais (GRANT 1981; LEVIN, 2002; OTTO; WHITTON 2000; STEBBINS, 1950). A estabilização de híbridos e poliploides como espécies, no entanto, depende de rearranjos genômicos ou de alterações epigenéticas e da expressão gênica. Esses mecanismos permitem que os diferentes genomas sejam distribuídos de forma harmônica, co-habitando o mesmo núcleo (KASHKUSH; FELDMAN; LEVY, 2002; RIDDLE; BIRCHLER, 2003; SALENTEJIN et al., 2009). O processo evolutivo seguido de aloploidização tem sido associado à

conversão gênica, translocação cromossômica, perdas, ganhos, redução e amplificação de sequências de DNA (LIM et al., 2004).

Trabalhos realizados com híbridos naturais e sintéticos demonstram que a nova constituição genômica, decorrente da hibridiação, pode resultar em conflitos ocasionando eliminação de sequências de DNA (FELDMAN et al., 1997; LEITCH; BENNETT, 2004; SHAKED et al., 2001), eliminação de cromossomos (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIRA, 2000; GERMAND et al., 2005; LINDE-LAURSEN; BOTHMER, 1999; RIERA-LIZARAZU; RINES; PHILLIPS, 1996), rearranjos cromossômicos (PIRES et al., 2004; PONTES et al., 2004; UDALL; QUIJADA; OSBORN, 2005), alterações epigenéticas como metilação de sequências codantes e não codantes de DNA (LEVY; FELDMAN, 2004; LIU; WENDEL, 2003; LUKENS et al., 2006; OSBORN et al., 2003; SALMON; AINOUCHE; WENDEL, 2005), silenciamento gênico (CHEN; PIKAARD, 1997; DOYLE et al., 2008; GAETA et al., 2007; LEE; CHEN, 2001) e ativação de genes e retroelementos que alteram a expressão de genes adjacentes (ADAMS; WENDEL, 2005; KASHKUSH; FELDMAN; LEVY, 2002, 2003).

Os híbridos triploides sintéticos, neo-poliploides, resultantes do cruzamento de capim-elefante e milheto, apresentaram indícios de alterações genômicas, como observado por Campos et al. (2009). Os autores evidenciaram a ocorrência de eliminação de sequências genômicas avaliando o conteúdo de DNA dos parentais e dos híbridos por citometria de fluxo. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi estudar as alterações genômicas decorrentes da hibridação interespecífica entre capim-elefante e milheto utilizando técnicas de citogenética e citometria de fluxo para avaliar a morfometria dos cromossomos dessas espécies, o conteúdo de DNA e as proporções genômicas dos parentais no híbrido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Genético

Para análise das alterações genômicas após hibridação interespecífica entre capim-elefante e milheto, gerando híbridos triploides, duas famílias obtidas pelo programa de melhoramento da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, foram utilizadas. São elas: 1) BAG-54 (capim-elefante) x M-36 (milheto) e 2) BAG-63 (capim-elefante) x M-36 (milheto).

2.2 Metodologias Empregadas

As avaliações foram realizadas através da análise morfométrica dos cromossomos, análise do conteúdo de DNA via citometria de fluxo e hibridização *in situ* genômica.

2.2.1 Análise Morfométrica dos Cromossomos

As raízes obtidas de plântulas resultantes de estacas e/ou de sementes de capim-elefante, milheto e híbrido interespecífico, foram coletadas e submetidas à solução de 25 mg/L de cicloheximida:300 mg/L de 8-hidroxiquinolina (1:1) por 2:45 h a 4°C. Posteriormente foram lavadas em água destilada e fixadas em solução de etanol:ácido acético (3:1) como proposto por Techio et al. (2002). As lâminas foram preparadas pelo método de dissociação celular (CARVALHO; SARAIVA, 1997) com maceração enzimática em pectinase-celulase (100U:200U) por 2:10 h (capim-elefante e híbrido interespecífico) ou 30 min (milheto) a 37°C em câmara úmida.

As lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5% por 3 min e avaliadas em microscopia de luz. A imagem de pelo menos 15 metáfases de cada genótipo, com cromossomos espalhados e centrômero bem definido, foi obtida em microscópio Leica acoplado a uma câmera digital. As imagens foram digitalizadas através do programa Optronics®.

A morfometria dos cromossomos foi obtida através da análise do tamanho total dos cromossomos (CT), tamanho dos braços cromossômicos (comprimento do braço curto – BC, e comprimento do braço longo – BL), relação entre braços ($RB = BL/BC$), índice centromérico ($IC = BC \times 100/CT$), comprimento relativo dos cromossomos [$CR = (BC+BL)/CT$] e comprimento total do lote haploide ($CTLH = \sum CT_i$). A classificação dos cromossomos foi realizada segundo Levan, Fredga e Souberg (1964).

Para evitar grandes variações de condensação nas metáfases analisadas e consequente influência sobre as medidas cariotípicas obtidas, foi realizado um ranqueamento onde apenas as 5 metáfases com morfologia bem definida e grau de condensação semelhante, baseado no comprimento total do lote haploide, foram utilizadas na análise de alterações genômicas apresentadas. Os dados morfométricos foram obtidos no programa Image Tool para Windows versão 3.0.

2.2.2 Análise de Citometria de Fluxo

O conteúdo de DNA dos parentais, capim-elefante e milheto, e do híbrido interespecífico foi analisado por citometria de fluxo de acordo com a metodologia descrita por Campos et al. (2009), adaptada a partir de Dolezel e Bartos (2005). Para estimativa da quantidade de DNA nuclear três amostras de cada genótipo (milheto M-36, capim-elefante BAG 54 e BAG 63 e híbridos triploides BAG 54 x M36 e BAG 63 x M36) foram avaliadas.

Para cada genótipo, as três amostras foram coletadas de diferentes setores foliares. Aproximadamente de 20-30 mg de tecido foliar jovem das plantas analisadas juntamente com o mesmo peso de tecido foliar de *Glycine max* (padrão interno de referência – 2,50 pg) foram triturados na presença de 1 mL de tampão de liberação de núcleos LBO1 (DOLEZEL; BARTOS, 2005). A solução foi coletada com auxílio de uma pipeta e filtrada previamente em gaze e posteriormente em uma tela com poros de 40 µm de espessura, sendo coletada em um tubo de poliestireno. À suspensão de núcleos foram adicionados 25 µL de uma solução de iodeto de propídeo (1 mg/mL) e 5 µL de RNase. As amostras foram armazenadas na geladeira a 4° C e analisadas em até 1 a 2 h após o preparo. Para cada amostra, pelos menos 10 mil núcleos foram analisados. A análise foi realizada em um citômetro FacsCalibur (BD). Os histogramas foram obtidos no *software Cell Quest* e analisados no *software WinMDI* e foram obtidas as estimativas da quantidade de DNA das plantas.

2.2.3 Hibridização *in situ* genômica (GISH)

Para detectar as proporções genômicas de cada um dos parentais nos híbridos, cinco metáfases do híbrido BAG 54 x M 36, obtidas a partir de preparações citogenéticas como descrito no item 4.2, foram hibridizadas com sonda genômica de milho. Os cromossomos de milho identificados nas metáfases foram medidos no programa Image Tool para Windows versão 3.0, assim como os cromossomos obtidos de metáfases de cada um dos parentais. O comprimento total dos cromossomos dos parentais e destes no híbrido foram utilizados para comparar as proporções dos genomas de capim-elefante e milho no núcleo híbrido.

O protocolo de hibridização *in situ* genômica utilizado foi adaptado de Akiyama et al. (2004). O DNA genômico total de milho, utilizado como sonda

genômica foi marcado através da reação de *nick-translation* conforme instruções do fabricante (Nick Translation System, Invitrogen).

As lâminas armazenadas no *freezer* (-20°C) contendo as metáfases do híbrido em questão foram pré-tratadas com ácido acético 60% por 15 min e desidratadas em etanol (70-100%), 5 min cada, seguindo secagem a 55°C. Posteriormente as lâminas foram incubadas com RNase (100 µg/mL) a 37° (C?) por 1 hora, seguido de tratamento com proteinase K (10 µg/mL) em HCl 10mM a 37°(C?) por 20 min e fixação em 4% paraformaldeído em 1x PBS com NaOH 1N. Todas as lavagens entre os tratamentos foram realizadas com 2x SSC. Por fim, as lâminas foram desidratadas em 70-100% de etanol e secas ao ar por no mínimo 1 hora.

A preparação cromossômica foi desnaturada com 100 µL de formamida 70% em 2x SSC a 85°C por 1,5 minuto. Posteriormente as lâminas foram lavadas em etanol 70-100% gelado (-20°C) para remoção da formamida. A mistura de hibridização foi preparada segundo protocolo de Heslop-Harrison (1991) com 77% de estringência (2-5 ng/µL da sonda genômica, DNA de bloqueio na proporção de 1:5 (sonda:bloqueio), 50% de fomamida, 10% de dextran sulfato e 2x SSC, totalizando 5 µL da mistura), sendo desnaturada a 75°C por dez minutos. Após a desnaturação a mistura foi aplicada sobre a preparação cromossômica deixando-se hibridizar por 40 h a 37°C em câmara úmida.

As lavagens para retirar a sonda não hibridizada foram realizadas com 2x SSC, (duas vezes de 5 min) e 0,1x SSC (duas vezes de 5 min) ambas a 42°C, com 73% estringência. Posteriormente foram realizados banhos a temperatura ambiente em 2x SSC e 4x SSC com 0,1% de Tween 20, antes do bloqueio (BSA 5% em 4x SSC + 0,1% de Tween 20 por 30 min).

A sonda do DNA genômico de milho marcada com biotina (BIO) foi detectada com avidina conjugada com fluoresceína. O anticorpo (avidina) foi

aplicado sobre a preparação após lavagem da sonda, e incubados por 1 h a 37°C em câmara úmida seguindo de três lavagens de 10 min em 4x SSC com 0,1% de Tween 20 a 42°C.

Os cromossomos da preparação foram contra corados com DAPI (1,5-2 µg/mL) em vectashield (1:1) e analisados em Microscópio Epifluorescente Nikon Eclipse EC400 nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 (DAPI) e 490/525 (fluoresceína). As imagens das metáfases dos híbridos assim como as imagens das metáfases dos parentais, simplesmente coradas com DAPI, foram obtidas com câmara digital Nikon Colpix.

3 RESULTADOS

Os resultados da análise morfométrica dos cromossomos dos parentais capim-elefante (BAG 54 e BAG 63) e milheto (M-36) e de seus híbridos interespecíficos (BAG 54 x M 36 e BAG 63 x M 36) estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. Imagens representativas dos genótipos em questão são apresentadas na Figura 1.

De um modo geral, entre os parentais, o capim-elefante ($2n = 4x = 28$), apresenta cromossomos menores, com tamanhos variando de 2,21 a 4,68 μm (BAG 54) ou 2,42 a 4,77 μm (BAG 63) (Tabela 1). No milheto ($2n=2x=14$) os cromossomos são maiores, apresentando comprimento total de 3,41 a 5,42 μm (Tabela 2). O comprimento total do lote haploide (CTLH) do capim-elefante foi de 44,05 μm (BAG 54) e 46,02 μm (BAG 63), enquanto no milheto foi de 31,57 μm . Por outro lado, foi observado que o capim-elefante apresenta em média 4,54 pg de DNA (Tabela 1), enquanto o milheto apresenta 4,75 pg de DNA nas células somáticas (Tabela 2).

Nos híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milheto (Tabela 3) foi observada variação no comprimento total dos cromossomos de 1,85 a 5,14 μm (BAG 54 x M 36) ou 2,48 a 5,34 μm (BAG 63 x M36) e CTLH de 65,39 e 72,86 μm , respectivamente. A quantidade de DNA nas células somáticas desses híbridos foi de 4,5 pg.

Para os dois parâmetros avaliados (CTLH e conteúdo 2C de DNA) os híbridos interespecíficos apresentaram valores menores do que o esperado, quando comparado com a média dos parentais (Tabela 4).

No híbrido BAG 54 x M 36 esperava-se encontrar cromossomos com comprimento variando de 2,21 a 5,42 μm , apresentando CTLH de 75,62 μm e conteúdo 2C de DNA de 4,64 pg. Já para o híbrido BAG 63 x M36 era esperado o mesmo conteúdo 2C de DNA (4,64 pg) e que o comprimento dos

cromossomos variasse entre 2,42 a 5,42 μm , apresentando CTLH de 77,60 μm . Nesse sentido, observou-se que em média os híbridos apresentaram CTLH 13,53% (BAG 54 x M36) ou 6% (BAG 63 x M36) menor do que o esperado. Considerando o conteúdo de DNA, para ambos os híbridos, foi observada uma perda de 3%, equivalente a 0,14 pg (comparações entre Tabelas 3 e 4).

O capim-elefante, BAG 54, apresentou os cromossomos V, XI e XIV submetacêntricos, enquanto o BAG 63 apresentou os cromossomos IV, XI e XIV submetacêntricos. Os demais cromossomos, para ambos os genótipos (BAG 54 e BAG 63), foram classificados como metacêntricos (Tabela 1). O milho apresentou os cinco primeiros cromossomos metacêntricos (IC variando de 40 a 50) e os dois últimos cromossomos submetacêntricos (IC variando de 25 a 40) (Tabela 2). Desse modo, esperava-se encontrar no híbrido interespecífico pelo menos cinco cromossomos submetacêntricos, sendo dois provenientes do milho e três do capim-elefante. Observou-se, no entanto, a combinação de 14 cromossomos metacêntricos com sete cromossomos submetacêntricos no híbrido BAG 54 x M 36, e 17 cromossomos metacêntricos, três cromossomos submetacêntricos e um cromossomo acrocêntrico, no híbrido BAG 63 x M 36 (Tabela 3). Essa alteração na forma cariotípica observada para o híbrido reflete possíveis alterações que ocorreram após hibridação.

A fim de entender a redução no tamanho dos cromossomos, conteúdo de DNA nos híbridos, e, conseqüentemente, na forma cariotípica do híbrido interespecífico, foi realizada a hibridação *in situ* genômica (GISH) em células do híbrido BAG 54 x M36 identificando os cromossomos de milho, a partir da utilização de sonda genômica desse parental. A partir de cromossomos dos parentais observados em metáfases coradas com DAPI esperava-se encontrar uma proporção de 1:0.9 do genoma de capim-elefante para o genoma de milho, tendo em vista que em média foi observado CTLD de 64,79 μm para capim-elefante e 58,63 μm para milho na coloração com DAPI. Não obstante,

foi observado nas metáfases de híbridos avaliadas uma proporção média de 1:0.7, correspondente a 48,42 μm dos cromossomos de capim-elefante para 33,33 μm dos cromossomos de milho (Figura 2).

A alteração na proporção dos genomas nos híbridos observada reflete a perda no conteúdo de DNA após a hibridação. Essa perda foi quantificada em torno de 22% considerando as proporções genômicas observadas (1:0.7) e esperadas (1:0.9) no híbrido.

Tabela 1 Morfometria dos cromossomos de capim-elefante (BAG 54 e BAG 63) obtida da média de cinco metáfases. (Crom. = cromossomos; Cti = comprimento total de cada cromossomo; Rbi = relação de braços de cada cromossomo; ICi = Índice centromérico de cada cromossomo; CRi = Comprimento relativo de cada cromossomo; CTLH = comprimento total do lote haploide; CTLD = comprimento total do lote diploide).

| Crom. | <i>BAG 54</i> | | | | <i>BAG 63</i> | | | |
|------------------------------|---------------|--------------|-------|-------|------------------------------|------|--------------|------|
| | Cti | Rbi | ICi | CRi | Cti | Rbi | ICi | CRi |
| I | 4,68 | 1,51 | 40,28 | 10,66 | 4,77 | 1,17 | 46,00 | 9,95 |
| II | 4,41 | 1,24 | 44,67 | 10,06 | 4,54 | 1,05 | 48,77 | 9,67 |
| III | 3,72 | 1,29 | 43,83 | 8,50 | 3,72 | 1,16 | 46,23 | 8,44 |
| IV | 3,35 | 1,22 | 45,25 | 7,64 | 3,56 | 1,61 | 38,32 | 7,84 |
| V | 3,20 | 1,59 | 38,85 | 7,33 | 3,37 | 1,17 | 46,01 | 7,22 |
| VI | 3,09 | 1,15 | 46,51 | 7,06 | 3,31 | 1,12 | 47,09 | 7,18 |
| VII | 3,10 | 1,44 | 41,81 | 7,08 | 3,22 | 1,17 | 46,09 | 6,87 |
| VIII | 2,95 | 1,17 | 46,25 | 6,75 | 3,08 | 1,19 | 45,67 | 6,67 |
| IV | 2,84 | 1,36 | 42,77 | 6,50 | 2,98 | 1,33 | 42,94 | 6,63 |
| X | 2,70 | 1,49 | 41,27 | 6,18 | 2,87 | 1,22 | 44,95 | 6,51 |
| XI | 2,62 | 1,26 | 44,46 | 5,99 | 2,76 | 1,20 | 45,54 | 6,03 |
| XII | 2,50 | 1,57 | 39,43 | 5,70 | 2,70 | 1,57 | 38,87 | 5,99 |
| XIII | 2,40 | 1,45 | 41,86 | 5,49 | 2,60 | 1,32 | 43,16 | 5,67 |
| XIV | 2,21 | 1,70 | 38,20 | 5,06 | 2,42 | 1,63 | 38,06 | 5,33 |
| CTLH = 44,05 | | CTLD = 88,10 | | | CTLH = 46,02 | | CTLD = 92,04 | |
| Conteúdo 2C de DNA = 4,53 pg | | | | | Conteúdo 2C de DNA = 4,55 pg | | | |

Tabela 2 Morfometria dos cromossomos de milho (M 36) obtida da média de cinco metafases. (Crom. = cromossomos; Cti = comprimento total de cada cromossomo; Rbi = relação de braços de cada cromossomo; ICi = Índice centromérico de cada cromossomo; CRi = Comprimento relativo de cada cromossomo; CTLH = comprimento total do lote haploide; CTLD = comprimento total do lote diploide).

| M 36 | | | | |
|------------------------------|------------|--------------|-------------|-------------|
| Crom. | Cti | Rb i | IC i | CR i |
| I | 5,42 | 1,21 | 45,37 | 17,13 |
| II | 5,12 | 1,36 | 42,75 | 16,22 |
| III | 4,77 | 1,31 | 43,49 | 15,10 |
| IV | 4,68 | 1,48 | 40,53 | 14,82 |
| V | 4,34 | 1,49 | 40,21 | 12,93 |
| VI | 3,83 | 1,87 | 34,86 | 12,17 |
| VII | 3,41 | 1,98 | 33,52 | 10,64 |
| CTLH = 31,57 | | CTLD = 63,14 | | |
| Conteúdo 2C de DNA = 4,75 pg | | | | |

Tabela 3 Morfometria dos cromossomos dos híbridos triploides entre capim-elefante e milho (BAG 54 x M 36 e BAG 63 x M 36) obtida da média de cinco metafases. (Crom. = cromossomos; Cti = comprimento total de cada cromossomo; Rbi = relação de braços de cada cromossomo; ICi = Índice centromérico de cada cromossomo; CRi = Comprimento relativo de cada cromossomo; CTLH = comprimento total do lote haploide).

| Crom. | Híbrido (BAG 54 x M36) | | | | Híbrido (BAG 63 x M36) | | | |
|-------|------------------------------|------|-------|------|------------------------------|------|-------|------|
| | Cti | Rb i | IC i | CR i | Cti | Rb i | IC i | CR i |
| I | 5,14 | 1,10 | 47,58 | 7,67 | 5,34 | 1,64 | 37,83 | 7,97 |
| II | 4,74 | 1,33 | 42,92 | 7,07 | 5,04 | 1,02 | 49,60 | 7,52 |
| III | 4,58 | 1,27 | 44,05 | 6,84 | 4,84 | 1,18 | 45,87 | 7,22 |
| IV | 4,32 | 1,00 | 50,00 | 6,44 | 4,48 | 1,55 | 39,29 | 6,69 |
| V | 4,27 | 1,27 | 44,13 | 6,37 | 4,22 | 1,32 | 43,13 | 6,30 |
| VI | 3,84 | 1,74 | 36,56 | 5,73 | 4,08 | 1,65 | 37,75 | 6,09 |
| VII | 3,76 | 1,57 | 38,92 | 5,62 | 3,92 | 1,09 | 47,96 | 5,85 |
| VIII | 3,38 | 1,83 | 35,33 | 5,04 | 3,62 | 1,45 | 40,88 | 5,40 |
| IX | 3,03 | 1,07 | 48,25 | 4,52 | 3,44 | 1,05 | 48,84 | 5,13 |
| X | 2,92 | 1,21 | 45,26 | 4,36 | 3,32 | 1,13 | 46,99 | 4,96 |
| XI | 2,73 | 1,53 | 39,53 | 4,08 | 3,08 | 1,08 | 48,05 | 4,60 |
| XII | 2,62 | 1,32 | 43,09 | 3,91 | 3,06 | 1,07 | 48,37 | 4,57 |
| XIII | 2,56 | 1,80 | 35,77 | 3,82 | 3,04 | 1,24 | 44,74 | 4,54 |
| XIV | 2,44 | 1,38 | 42,11 | 3,64 | 2,88 | 1,32 | 43,06 | 4,30 |
| XV | 2,34 | 1,47 | 40,54 | 3,50 | 2,84 | 1,09 | 47,89 | 4,24 |
| XVI | 2,34 | 1,52 | 39,64 | 3,49 | 2,82 | 1,47 | 40,43 | 4,21 |
| XVII | 2,22 | 1,42 | 41,28 | 3,31 | 2,66 | 1,02 | 49,62 | 3,97 |
| XVIII | 2,19 | 1,27 | 44,04 | 3,26 | 2,62 | 1,15 | 46,56 | 3,91 |
| XIV | 2,14 | 1,61 | 38,32 | 3,20 | 2,54 | 3,10 | 24,41 | 3,79 |
| XX | 1,98 | 1,18 | 45,92 | 2,96 | 2,54 | 1,23 | 44,88 | 3,79 |
| XXI | 1,85 | 1,41 | 41,49 | 2,75 | 2,48 | 1,00 | 50,00 | 3,70 |
| | CTLH = 65,39 | | | | CTLH = 72,86 | | | |
| | Conteúdo 2C de DNA = 4,51 pg | | | | Conteúdo 2C de DNA = 4,49 pg | | | |

Tabela 4 Contribuição do Comprimento Total esperado para os cromossomos de cada um dos parentais, capim-elefante (C) e milho (M) nos híbridos triploides (BAG 54 x M 36 e BAG 63 x M 36). (Crom. = cromossomos; Cti = comprimento total de cada cromossomo; CRi = Comprimento relativo de cada cromossomo; CTLH = comprimento total do lote haploide).

| Híbrido Esperado (BAG 54 x M36) | | | Híbrido Esperado (BAG 63 x M36) | | |
|--|------------|------------|--|------------|-------------|
| Crom. | Cti | CRi | Crom. | Cti | CR i |
| I- M | 5,42 | 7,16 | I- M | 5,42 | 6,98 |
| II- M | 5,12 | 6,78 | II- M | 5,12 | 6,60 |
| III- M | 4,77 | 6,31 | III- M | 4,77 | 6,15 |
| IV- M | 4,68 | 6,19 | I- C | 4,77 | 6,14 |
| I- C | 4,62 | 6,11 | IV- M | 4,68 | 6,04 |
| II- C | 4,35 | 5,75 | II- C | 4,54 | 5,85 |
| V- M | 4,34 | 5,73 | V- M | 4,34 | 5,59 |
| VI- M | 3,83 | 5,06 | VI- M | 3,83 | 4,93 |
| III- C | 3,51 | 4,64 | III- C | 3,82 | 4,93 |
| VII- M | 3,41 | 4,51 | IV- C | 3,56 | 4,59 |
| IV- C | 3,39 | 4,48 | VII- M | 3,41 | 4,40 |
| V- C | 3,28 | 4,34 | V- C | 3,37 | 4,34 |
| VI- C | 3,24 | 4,28 | VI- C | 3,31 | 4,27 |
| VII- C | 3,12 | 4,13 | VII- C | 3,22 | 4,15 |
| VIII- C | 2,94 | 3,89 | VIII- C | 3,08 | 3,97 |
| IV- C | 2,78 | 3,68 | IV- C | 2,98 | 3,85 |
| X- C | 2,65 | 3,50 | X- C | 2,87 | 3,70 |
| XI- C | 2,64 | 3,49 | XI- C | 2,76 | 3,56 |
| XII- C | 2,6 | 3,44 | XII- C | 2,70 | 3,48 |
| XIII- C | 2,55 | 3,37 | XIII- C | 2,60 | 3,35 |
| XIV- C | 2,38 | 3,15 | XIV- C | 2,42 | 3,12 |
| CTLH = 75,62 | | | CTLH = 77,60 | | |
| Conteúdo 2C de DNA = 4,64 pg | | | | | |

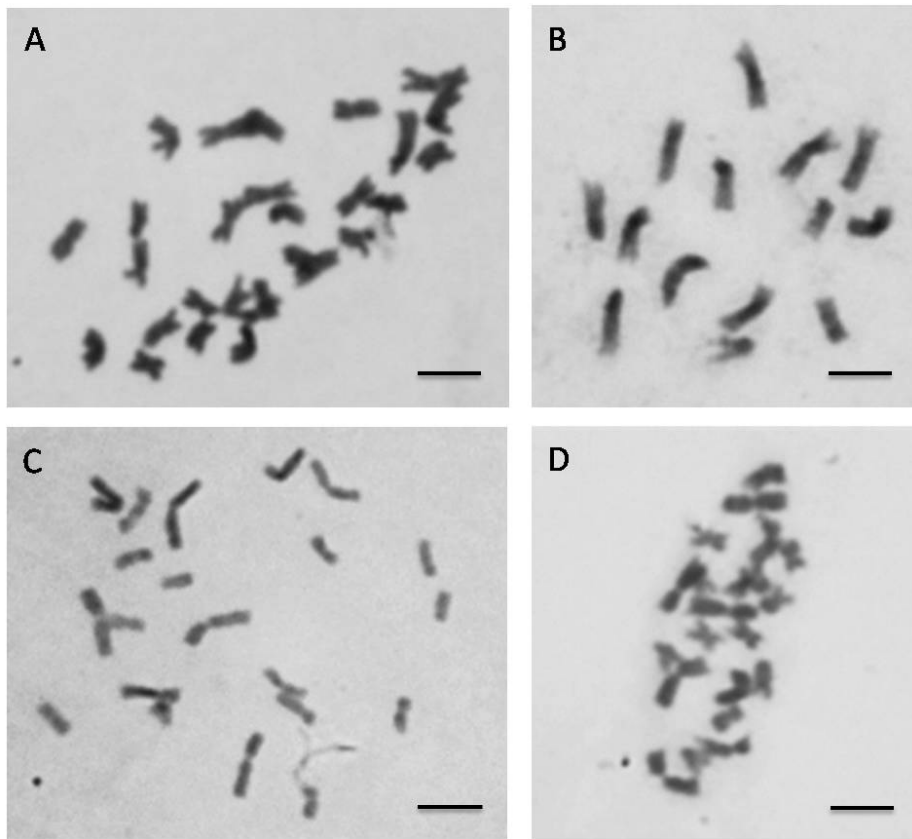


Figura 1 Metáfases representativas dos cariótipos de (A) capim-elefante ($2n=4x=28$), (B) milho ($2n=2x=14$) e (C, D) híbrido interespecífico ($2n=3x=21$). Barra = 5 μm .

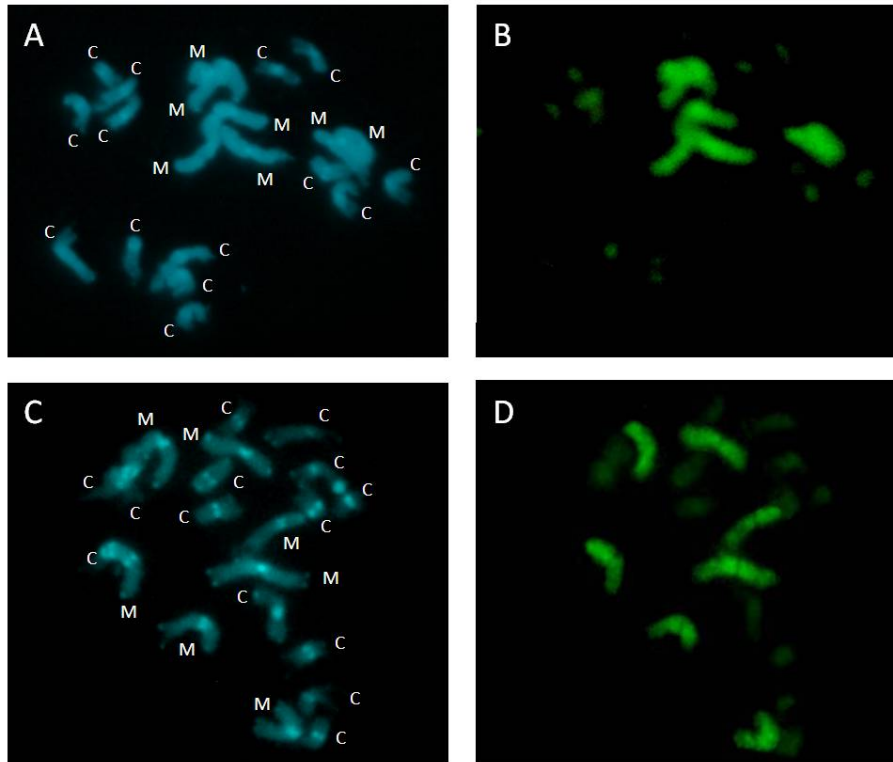


Figura 2 Hibridização *in situ* genômica em híbridos de capim-elefante e milheto ($2n=3x=21$). Cromossomos do híbrido corados com DAPI (A e C). Os cromossomos de milheto (M) e capim-elefante (C) estão identificados em função da sonda genômica de milheto (B, D) que marcou no híbrido os cromossomos pertencentes a esse parental.

4 DISCUSSÃO

Para realização do estudo das alterações genômicas decorrentes da hibridação entre capim-elefante e milho a morfometria dos cromossomos dessas espécies foi obtida a partir de duas famílias (BAG 54 x M 36 e BAG 63 x M 36).

O capim-elefante e milho formam um grupo monofilético dentro do gênero *Pennisetum* apresentando número básico $x = 7$ (MARTEL et al., 2004). Um estudo citogenético dos cromossomos de capim-elefante, milho e híbrido triploide foi realizado anteriormente por Barbosa, Davide e Pereira (2003). Nesse estudo, os autores avaliaram a morfometria dos cromossomos em cinco acessos de cada um dos genótipos em questão. Foi observado entre os acessos avaliados um CTLH médio de 28,11 μm para capim-elefante, 28,56 μm para milho e 47,69 μm para o híbrido interespecífico. Seus resultados são corroborados pelo estudo de Martel et al. (2004) que afirmaram que os cromossomos de capim-elefante apresentam a metade do tamanho dos cromossomos de milho em razão da quantidade de DNA por lote cromossômico (representado pelo número básico x) de 1,15 pg e 2,36 pg de DNA, respectivamente para capim-elefante e milho. Uma vez que o capim-elefante é tetraploide ($4x$) e o milho diploide ($2x$), a quantidade de DNA por célula somática ($2C$) dessas espécies é próxima a 4,59 pg e a 4,71 pg, respectivamente (MARTEL et al., 1997). No presente trabalho, a estimativa da quantidade de DNA de capim-elefante e milho foi de 4,54 pg e 4,75 pg, respectivamente, corroborando com o que foi relatado anteriormente (MARTEL et al., 1997, 2004).

Os resultados observados em relação à análise citogenética diferem daqueles relatados por Barbosa, Davide e Pereira (2003). Observou-se que o CTLH médio 45,03 μm para capim-elefante, de 31,57 μm para milho, e

69,13µm para o híbrido interespecífico. Os comprimentos médios dos cromossomos variaram de 2,3 a 4,7 µm para capim-elefante e de 3,4 a 5,4 µm para milheto. Esses resultados demonstraram que, os cromossomos de capim-elefante não apresentaram a metade do comprimento total dos cromossomos do milheto, como sugerido por Martel et al. (2004) e, de acordo com a variação cromossômica relatada na literatura: 3,06 a 4,86 µm para milheto e 1,47 a 2,94 µm para capim-elefante (BARBOSA; DAVIDE; PEREIRA, 2003).

Apesar de ser esperado que os cromossomos de capim-elefante sejam menores que todos os cromossomos de milheto em função da proximidade do conteúdo de DNA dessas duas espécies e das diferentes ploidias (4x para capim-elefante e 2x para milheto), quando é avaliada a combinação dos genomas dessas duas espécies no híbrido interespecífico observa-se cromossomos marcados com sonda genômica de milheto com comprimento semelhante aos cromossomos não marcados, pertencentes ao capim-elefante (Figura 2). Esse fato pode ser observado até mesmo em metáfases simplesmente corada com Giemsa, onde se destacam cinco cromossomos grandes, sete cromossomos pequenos e nove cromossomos intermediários que se confundem em tamanho, demonstrando que alguns cromossomos de capim-elefante e milheto apresentam comprimentos semelhantes (Figura 1C e 1D).

A observação dessa semelhança de tamanho de cromossomos de capim-elefante e milheto aqui apresentada é corroborada com dados de localização de DNAr 45S nesses três genótipos. O milheto apresenta sítios de DNAr 45S no sexto e sétimo cromossomo, enquanto o capim-elefante apresenta esse sítio localizado nos cromossomos I e VIII (dados apresentados no capítulo 2). Se os cromossomos de capim-elefante fossem equivalentes a metade dos cromossomos de milheto, quando combinados no híbrido interespecífico deveriam ser encontrados os sete primeiros cromossomos pertencentes ao milheto e os quatorze restantes pertencentes ao capim-elefante. Desse modo, os cromossomos

que teriam que apresentar a região de DNAr 45S seriam o sexto, sétimo, oitavo e décimo quinto cromossomo do híbrido, referentes aos cromossomos VI e VII do milho e I e VIII do capim-elefante. No entanto, o DNAr 45S está localizado nos cromossomos VI, VIII, IX e XII, sendo o cromossomo VI correspondente ao cromossomo I de capim-elefante e o cromossomo IX correspondente ao cromossomo VII de milho (dados apresentados no capítulo 2). Desse modo alguns cromossomos de ambas as espécies apresentaram tamanho semelhantes. Tal proximidade e semelhança em relação ao tamanho dos cromossomos foi observada por Barbosa, Davide e Pereira (2003), onde o menor cromossomo de milho se assemelha, em tamanho, aos cromossomos I e II de capim-elefante.

Adicionalmente foram observadas alterações na proporção dos genomas de capim-elefante e milho quando combinados no híbrido interespecífico. Essa alteração foi evidenciada pela proporção dos genomas identificados no híbrido após a hibridização *in situ* genômica (esperada – 1:0.9, observada – 1:0.07) e pela diferença no CTLH observado (69,13 μm) e esperado (76,61 μm), refletindo a perda de sequências de DNA após hibridação. Além disso, o aumento de cromossomos submetacêntricos nos híbridos e a observação de um cromossomo acrocêntrico sugerem que há perda de DNA nos braços de alguns cromossomos ou rearranjos genômicos como inversão. Essas alterações observadas não foram a mesma nos híbridos avaliados, indicando que as mudanças nos complementos não seguiram o mesmo padrão em todos os híbridos entre capim-elefante e milho.

A maior parte dos estudos realizados em relação às consequências genéticas da hibridação é baseada em cruzamentos realizados entre plantas cultivadas (algodão, trigo, *Nicotiana*, *Brassica*, *Hordeum*, entre outras) e em plantas modelos como a *Arabidopsis* (BOWERS et al., 2003; CHEN et al., 2004; SIMILLION et al., 2002; VISION; BROWN; TANKSLEY, 2000). Em alguns trabalhos encontrados na literatura a perda de sequências de DNA e as

alterações no padrão de expressão gênica foram observadas após eventos de hibridação (CHEN; PIKAARD, 1997; DOYLE et al., 2008; OZKAN; LEVY; FELDMAN, 2001; OZKAN; TUNA; ARUMUGANATHAN, 2003).

Resultados semelhantes ao encontrado neste trabalho foram demonstrados por Ozkan, Tuna e Arumuganathan (2003), através da estimativa da quantidade de DNA via citometria de fluxo, em híbridos recém sintetizados de *Aegilops* e *Triticum*. Os autores observaram uma redução na quantidade de DNA em relação ao esperado (média dos parentias envolvidos nos cruzamentos) entre 5 a 7% do tamanho do genoma, totalizando 2 pg do conteúdo 2C de DNA em uma célula somática. Adicionalmente eles observaram que essas alterações no tamanho do genoma ocorreram logo na primeira geração de anfidiplóides, revelando a rapidez do evento. Eles sugeriram que essas alterações não aditivas no tamanho do genoma observadas após alopoliploidização representam uma resposta adaptativa pré-programada ao estresse genômico causado pela hibridação, a qual teria função de estabilizar o genoma da nova célula.

Outros exemplos de não aditividade no tamanho do genoma foram observados para *Triticum* (LIU; VEJA; FELDMAN, 1998) e *Aegilops* (SHAKED et al., 2001). Ma, Fang e Gustafson (2004) e Ma e Gustafson (2006) demonstraram que em híbridos de *Triticum-Secale*, 97% das sequências codificantes de *Triticum* permaneceram no alopoliploide após 15 a 35 gerações, enquanto somente 61,6% das sequências de *Secale* foram conservadas.

Em *Pennisetum*, Campos (2007) observaram alta frequência de micronúcleos durante o desenvolvimento de embriões triploides de capim-elefante e milho, sugerindo a ocorrência de perdas de sequências de DNA após hibridação.

Além de possíveis perdas nas sequências de DNA, os híbridos de capim-elefante e milho apresentaram alteração na expressão de alguns genes. Isso foi constatado quando se observou o número de regiões organizadoras do nucléolo

(RON) ativas e o número de regiões com os genes de RNAr 18S-5.8S-26S. Tanto capim-elefante, milho e híbrido interespecífico possuem quatro sítios de DNAr 45S (dados apresentados no capítulo 2), no entanto, no híbrido foram observadas apenas duas regiões ativas após bandamento Ag-NOR. Isso evidencia a inativação de duas RONS em função do efeito de compensação de dosagem. A inativação dos genes de DNAr é observada em plantas híbridas, principalmente em alopóliploides como *Triticum* e outras Triticeas (NEVES et al., 1997). Guillén et al. (2004) apontam as alterações nos padrões de metilação do DNA como tendo importante papel na inativação das RONS. De fato, alterações epigenéticas (alterações na cromatina em função de metilação e acetilação do DNA e de histonas) são apontadas como o mecanismo principal de regulação da expressão de genes de RNAr mediante a dominância nucleolar observada em híbridos interespecífico (PIKAARD, 2000).

Estudos que evidenciam que o híbrido apresenta alteração no padrão de expressão gênica dos genes de RNAr estão sendo desenvolvidos assim como estudos que permitam detectar alterações na cromatina e rearranjos genômicos. Trabalhos nesse sentido são importantes para auxiliar no entendimento das alterações cariotípicas e genômicas após hibridação e poliploidização em híbridos de *Pennisetum*.

5 CONCLUSÃO

Os cromossomos de capim-elefante e milheto apresentam tamanhos semelhantes. Observaram-se perdas de sequências genômicas após hibridação interespecífica entre capim-elefante e milheto por meio do tamanho dos cromossomos, do conteúdo de DNA e das alterações cariotípicas nos híbridos quando comparados com os parentais.

REFERÊNCIAS

ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. **Trends in Genetics: DNA differentiation & development**, Amsterdam, v. 21, n. 10, p. 539-543, Oct. 2005.

AKIYAMA, Y. et al. High-resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 134, n. 4, p. 1733-1741, Apr. 2004.

BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. Multiple anaphase bridges on meiosis in Brazilian oats (*Avena sativa* L.). **Nucleus**, Calcuta, v. 43, n. 1/2, p. 58-63, June 2000.

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

BOWERS, J. E. et al. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. **Nature**, London, v. 422, n. 6930, p. 433-438, Mar. 2003.

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

CAMPOS, J. M. S. et al. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 101-104, Feb. 2009.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 110, n. 4, p. 417-420, Dec. 1997.

CHEN, Z. J. et al. The development of an Arabidopsis model system for genome-wide analysis of polyploidy effects. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, n. 4, p. 689-700, Aug. 2004.

CHEN, Z. J.; PIKAARD, C. S. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 11, n. 16, p. 2124-2136, Aug. 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. et al. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 42, p. 443-461, Dec. 2008.

FELDMAN, M. et al. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosome. **Genetics**, Austin, v. 147, n. 3, p. 1381-1387, Nov. 1997.

GAETA, R. T. J. et al. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 11, p. 3403-3417, Nov. 2007.

GERMAND, D. et al. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 9, p. 2431-2438, Sept. 2005.

GRANT, V. **Plant speciation**. 2nd. ed. New York: Columbia University, 1981.

GUILLÉN, A. K. Z. et al. Transcriptional repression mechanisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpanzees. **Chromosome Research**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 225-237, Apr. 2004.

HANNA, W. W. Melhoramento do capim-elefante. In: PASSOS, L. P. et al. **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 17-28.

HESLOP-HARRISON, J. S. The molecular cytogenetics of plants. **Journal of Cell Science**, London, v. 100, n. 1, p. 15-21, Sept. 1991.

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. **Genetics**, Austin, v. 160, n. 4, p. 1651-1659, Apr. 2002.

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. **Nature Genetics**, New York, v. 33, n. 1, p. 102-106, Jan. 2003.

LEE, H. S.; CHEN, Z. J. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 12, p. 6753-6758, June 2001.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome downsizing in polyploid plants. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, n. 4, p. 651-663, Aug. 2004.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SOUBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, Lund, v. 52, n. 2, p. 201-220, Dec. 1964.

LEVIN, D. A. **The role of chromosomal change in plant evolution**. New York: Oxford University, 2002.

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

LIM, K.Y. et al. Genome evolution in allotetraploid *Nicotiana*. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, n. 4, p. 599-606, Aug. 2004.

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

LIU, B.; VEGA, J. M.; FELDMAN, M. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low-copy coding DNA sequences. **Genome**, Ottawa, v. 41, n. 4, p. 535-542, Aug. 1998.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 29, n. 3, p. 365-379, Dec. 2003.

LUKENS, L. N. et al. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 140, n. 1, p. 336-348, Jan. 2006.

MA, X. F.; FANG, P.; GUSTAFSON, J. P. Polyploidization-induced genome variation in triticales. **Genome**, Ottawa, v. 47, n. 5, p. 839-848, Oct. 2004.

MA, X. F.; GUSTAFSON, J. P. Timing and rate of genome variation in triticales following allopolyploidization. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 8, p. 950-958, Aug. 2006.

MARTEL, E. et al. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 249, n. 3/4, p. 139-149, Nov. 2004.

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

NEVES, N. et al. Nucleolar dominance in triticales: control by unlinked genes. **Chromosome Research**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 125-131, Feb. 1997.

OSBORN, T. C. et al. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. **Trends in Genetics: DNA differentiation & development**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 141-147, Mar. 2003.

OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 34, p. 401-437, Dec. 2000.

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

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

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

PIKAARD, C. S. The epigenetics of nucleolar dominance. **Trends in genetics: DNA differentiation & development**, Amsterdam, v. 16, n. 11, p. 495-500, Nov. 2000.

PIRES, J. C. et al. Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids (Brassicaceae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, n. 4, p. 675-688, Aug. 2004.

PONTES, O. et al. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis suecica* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 52, p. 18240-18245, Dec. 2004.

RIDDLE, N. C.; BIRCHLER, J. A. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. **Trends in Genetics: DNA differentiation & development**, 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.

SALENTIJJN, E. M. J. et al. Tetraploid and hexaploid wheat varieties reveal large differences in expression of alpha-gliadins from homoeologous Gli-2 loci. **BMC Genomics**, Austin, v. 10, p. 48, Jan. 2009.

SALMON, A.; AINOUCHE, M. L.; WENDEL, J. F. Genetics and epigenetics consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 1163-1175, Apr. 2005.

SHAKED, H. et al. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 1749-1759, Aug. 2001.

SIMILLION, C. et al. The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 21, p. 13627-13632, Oct. 2002.

STEBBINS, G. L. **Variation and evolution in plants**. Columbia: University Press, 1950.

TECHIO, V. H. et al. Cytotaxonomy of some species and interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 203-209, jun. 2002.

UDALL, J. A.; QUIJADA, P. A.; OSBORN, T. C. Detection of chromosomal rearrangements derived from homeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. **Genetics**, Austin, v. 169, n. 2, p. 967-979, Feb. 2005.

VISION, T. J.; BROWN, D. G.; TANKSLEY, S. D. The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v. 290, n. 5499, p. 2114-2117, Dec. 2000.