

**OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS HEXAPLÓIDES E  
ANÁLISE GENÔMICA DE Pennisetum sp. POR  
CITOMETRIA DE FLUXO**

**JOSÉ MARCELLO SALABERT DE CAMPOS**

**2007**

**JOSÉ MARCELLO SALABERT DE CAMPOS**

**OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS HEXAPLÓIDES E  
ANÁLISE GENÔMICA DE *Pennisetum sp.* POR  
CITOMETRIA DE FLUXO**

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

Orientadora

Profa Dra Lisete Chamma Davide

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007

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

Campos, José Marcello Salabert de.

Obtenção de híbridos hexaplóides e análise genômica de *Pennisetum sp.* por citometria de fluxo / José Marcello Salabeert de Campos. -- Lavras : UFLA, 2007.

115 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. Capim elefante. 2. Milheto. 3. Melhoramento de plantas. 4. Citometria de fluxo. 5. Duplicação cromossômica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.2083

**JOSÉ MARCELLO SALABERT DE CAMPOS**

**OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS HEXAPLÓIDES E  
ANÁLISE GENÔMICA DE *Pennisetum sp.* POR  
CITOMETRIA DE FLUXO**

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

APROVADA em 10 de dezembro de 2007

Prof. Lyderson Facio Viccini

UFJF

Prof Sandro Barbosa

UNIFAL

Profa Giovana Augusta Torres

UFLA

Dr. Antônio Vander Pereira

Embrana Gado de Leite



Profa Dra Lisete Chamma Davide

UFLA (Orientador)

Lavras

MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Laerte e Haydee por serem os responsáveis por tudo o que sou na vida, pelo caráter e amor que aprendi com eles. A saudade de vocês é imensa. As árvores morrem, mas deixam dentro de seus frutos a semente de sua vida.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente, guiando os meus passos.

Aos meus pais, Laerte Chaves de Campos e Haydeé Salabert de Campos (in memoriam), minha irmã Ana Paula Salabert de Campos, ao meu sobrinho João Paulo Campos Barquete pela alegria que ele representa na minha vida e a todos os meus familiares.

Ao meu amor Bia, pelo maior presente que ganhei na vida, você. Pelo seu amor, carinho, companhia, risadas, romantismo. Te amo minha linda.

À Professora Lisete Chamma Davide, pela orientação, pela confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos e inúmeras oportunidades de aprendizagem e, acima de tudo, pelo imenso carinho, amizade ao longo desses seis anos de muita conquista.

Ao Professor Lyderson Facio Viccini, por ter despertado em mim o amor pela genética, pelas primeiras oportunidades, pelos ensinamentos não só em ciência, mas na vida. Acima de tudo, pela grande amizade e parceria que neste momento completa 10 anos.

Ao Pesquisador Vander Pereira, pela amizade, pela oportunidade de fazer parte desse projeto apaixonante, pelos ensinamentos.

Ao Professor e “grande amigo” Sandro Barbosa, pela amizade que firmamos em Lavras, pelas idéias e ensinamentos, e pelo imenso companheirismo.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação, na UFLA e na UFJF, em especial aos professores José Eduardo Brasil, Giovana Augusta Torres, Marcelo de Oliveira Santos e Cíntia Marques Coelho que com suas disciplinas, conversas, sugestões e orientações contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao grande amigo Vicente, da Embrapa de Coronel Pacheco, pelo trabalho pesado que tornou possível tudo que conseguimos.

Ao meu braço direito em todos os experimentos, “grande amigo” Caio Césio Salgado, responsável por grande parte do sucesso desses resultados.

A dois grandes amigos em especial, aos quais não cabem em palavras os agradecimentos, Juliane e Osnil, amizades formadas nos primeiros dias de mestrado. Saudade das noites de desespero estudando juntos.

A dois grandes amigos, Gabriel e Felipe pelos anos morando em república, por grandes momentos de muitas risadas, grandes churrascos, discussões de futebol, religião, política e vários outros assuntos (onde eu sempre tinha a razão, rsss). Vocês são dois grandes irmãos que fiz na vida.

Em especial aos amigos Daniel, Fabíola e Patrícia que deram contribuições valiosas na condução dos experimentos, pela amizade e companheirismo.

A “AMIGA”, “IRMÃ” Pâmela Souza Silva. Para você não existem palavras de agradecimento por tantos momentos em que você foi essencial para que eu esteja aqui hoje, não só pelas conquistas de resultados, mas pelo seu carinho, apoio em momentos difíceis. Você é muito especial Pampam.

Ao Caio Alves, do Laboratório de Imunologia da UFJF, pela imensa ajuda na citometria, pela grande amizade e pelos ensinamentos.

Aos amigos que trabalham comigo, Larissa e Leo na UFLA, que me ensinaram muita coisa de como um dia me tornar um orientador, pela satisfação de ver a alegria de vocês quando um experimento dava certo, pela amizade, carinho, por muitos momentos felizes.

A todos os amigos de Laboratório da UFLA: Ana Luíza, Amanda, Caio, Cristiane, Elisa, Fabíola, Fernanda, Fernando, Jeanne, Juliana, Kátia, Larissa F. Andrade, Larissa, Leonardo, Letícia, Patrícia Pierre, Patrícia, Rafael, Rose, Saulo e Soraya e da UFJF: Pâmela, Priciane, Diego, Talita, Bianca, Rodrigo, Paula, Fernanda, Lucas, Letícia, Ana Paula, Camila, Christian, Clara, Joyce, Júnia, Marina, Natália, Joice e Robert.

Aos amigos do Curso de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos funcionários da UFLA e do Departamento de Biologia.

A todos os amigos da UFLA e do Departamento de Biologia.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq e Fapemig pela concessão de recursos para a execução do projeto.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o êxito desse trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1	
1 Introdução Geral.....	1
2 Referencial teórico.....	4
3 Referências Bibliográficas.....	21
CAPÍTULO 2: Estimativa da quantidade de DNA em híbridos interespecíficos entre <i>Pennisetum purpureum</i> e <i>Pennisetum glaucum</i> .....	
Resumo.....	32
Abstract.....	33
1 Introdução.....	34
2 Material e Métodos.....	36
2.1 Material vegetal.....	36
2.2 Citometria de fluxo.....	36
3 Resultados e Discussão.....	39
4 Conclusões.....	47
5 Referências Bibliográficas.....	48
CAPÍTULO 3: Duplicação cromossômica in vitro de híbridos triplóides entre <i>Pennisetum purpureum</i> e <i>Pennisetum glaucum</i> e mudanças genômicas associadas à hibridação.....	
Resumo.....	51
Abstract.....	52
1 Introdução.....	53
2 Material e Métodos.....	55
2.1 Material vegetal.....	55
2.2 Estimativa da quantidade de DNA para os parentais e híbridos.....	56

2.3 Experimentos de duplicação cromossômica in vitro.....	56
2.4 Citometria de fluxo.....	57
2.5 Análise citogenética e de características estomáticas.....	58
2.6 Quantificação de DNA por citometria de fluxo em híbridos triplóides com identificação de parentais para avaliação de eliminação de DNA.....	59
3 Resultados e Discussão.....	61
4 Conclusões.....	77
5 Referências Bibliográficas.....	78
CAPÍTULO 4: Instabilidade genômica associada a hibridação interespecífica e duplicação cromossômica em híbridos entre <i>Pennisetum purpureum</i> e <i>Pennisetum glaucum</i> .....	
Resumo.....	82
Abstract.....	83
1 Introdução.....	84
2 Material e Métodos.....	86
2.1 Material Vegetal.....	86
2.2 Desenvolvimento dos embriões triplóides e análise de estabilidade genômica.....	86
2.3 Tratamentos das sementes triplóides para duplicação cromossômica.....	87
2.4 Citometria de fluxo.....	88
2.5 Análise citogenética.....	89
3 Resultados e Discussão.....	90
4 Conclusões.....	99
5. Referências Bibliográficas.....	100
CAPÍTULO 5: Análise de pólen em <i>Pennisetum</i> por citometria de fluxo.....	
Resumo.....	104
Abstract.....	105
1 Introdução.....	106
2 Material e Métodos.....	107

2.1 Material vegetal e coleta de pólen.....	107
2.2 Análise por citometria de fluxo.....	107
3 Resultados e Discussão.....	109
4 Conclusões.....	114
5 Referências Bibliográficas.....	115

## RESUMO

CAMPOS, José Marcello Salabert. **Obtenção de híbridos hexaplóides e análise genômica de *Pennisetum sp.* por citometria de fluxo.** 2007. 115p. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

No melhoramento de *Pennisetum*, a hibridação interespecífica entre o capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e o milheto (*Pennisetum galucum*) é uma das alternativas para a obtenção de cultivares superiores. Este híbrido (triplóide) apresenta uma grande limitação para o seu uso nos programas de melhoramento, a infertilidade que leva a necessidade de sua propagação vegetativa. A fertilidade pode ser restaurada através da duplicação cromossômica. Essa estratégia torna possível o ingresso dos híbridos hexaplóides nos programas de melhoramento de *Pennisetum*, reunindo características desejáveis nos híbridos e permitindo a sua propagação via sementes. Esta manipulação de ploidia necessita de metodologia para análise em larga-escala das plantas. A citometria de fluxo representa esta tecnologia. A citometria de fluxo é uma técnica que permite a obtenção de medidas físicas e químicas de partículas (células, núcleos, cromossomos e organelas). No melhoramento de plantas, a citometria apresenta um grande número de aplicações. Comparada a análise de ploidia por contagem de cromossomos, a citometria de fluxo oferece um método alternativo, rápido, simples e acurado. Por essas razões, ela tem se tornado um método popular para análise de ploidia, detecção de mixoplóides e aneuplóides, análise de ciclo celular e de polisomatia, análise de grãos de pólen e estimativas do conteúdo de DNA absoluto ou tamanho de genoma. Neste trabalho, a citometria de fluxo foi utilizada para estimar o conteúdo de DNA e ploidia em plantas da população Capileto, com o objetivo de seleção de plantas hexaplóides. Adicionalmente, a técnica foi utilizada para avaliação de ploidia em um experimento de duplicação cromossômica. Nesta análise, 8,5% das plantas foram identificadas como hexaplóides. A confirmação posterior da condição hexaplóide foi realizada por meio de características estomáticas e contagem de cromossomos. Mudanças genômicas associadas com a hibridação interespecífica e alopoliploidização foram observadas. Os dados obtidos sugerem a eliminação de sequências e cromossomos durante a alopoliploidização, que pode representar uma resposta adaptativa programada ao estresse genômico causado pela hibridação e alopoliploidização.

---

Comitê Orientador: Lisete Chamma Davide (Orientadora) – UFLA; Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite

## ABSTRACT

CAMPOS, José Marcello Salabert. **Obtaining hexaploids hybrids and genomic analysis of *Pennisetum* sp. by flow cytometry.** 2007. 115p. Thesis (Doctor of Science in Agronomy/Genetics and Plant Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

In *Pennisetum* breeding, the interespecific hybridization between napiergrass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*) is an alternative to obtain superior cultivars. This hybrid (triploid) presents a great limitation for use in breeding programs, due to the infertility leading to a vegetative propagation. Fertility can be restored through chromosomal duplication. Making possible the used of hexaploid hybrid in *Pennisetum* breeding programs, redeeming desired traits in hybrids and allowing seeds propagation. This ploidy manipulation needs a technique for high-throughput analysis of plants, like flow cytometry. Flow cytometry refers to the measurement of physical and chemical characteristics of particles (cells, nuclei, chromosomes and organelles). In plant breeding, flow cytometry present a wide range of applications. Compared to ploidy measurement by conventional chromosome counting, flow cytometry offers a valuable, rapid, simple, accurate and fairly cheap alternative. For this reason, it has become a popular method for ploidy screening, detection of mixoploidy and aneuploidy, cell cycle analysis, assessment of degree of polysomaty, pollens grains analysis and estimation of absolute DNA content or genome size. In this work, flow cytometry was used for DNA content and ploidy estimation in plants of the Capileto population, with the objective of selecting hexaploid plant. Additionally, the technique was used for ploidy evaluation in chromosome doubling experiment. In this analysis, 8.5% of the plants were determined to be hexaploid. Further confirmation of the hexaploid condition was performed with stomatal morphology and chromosome count. Genomic changes were observed associated with interespecific hybridization and allopolyploidization. The data obtained suggested sequences and chromosome elimination during allopolyploidization, that may represent a programmed adaptative response to genomic stress caused by hybridization and allopolyploidization.

---

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

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

*Pennisetum* é um dos importantes gêneros da família Poaceae, e *Pennisetum purpureum* Schumach (capim-elefante) e *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (milheto) são as espécies mais importantes economicamente. Ambas são utilizadas como forrageiras e o capim-elefante apresenta, como características desejáveis, boa qualidade de forragem e palatabilidade, vigor, perenidade, elevada produção de matéria seca, baixa incidência de pragas e alta eficiência fotossintética. Já o milheto apresenta boa resistência a doenças, tolerância à seca e a baixos níveis de fertilidade do solo, produção de sementes não deiscentes e elevado rendimento de matéria seca.

Uma das estratégias adotadas para o melhoramento dessas espécies é a hibridação interespecífica, que procura reunir nos híbridos características desejáveis de ambas as espécies. Alguns dos híbridos obtidos apresentam melhor qualidade de forragem e melhor aceitação pelos bovinos. Do cruzamento do capim-elefante (tetraplóide com  $2n=4x=28$  cromossomos) com o milheto (diplóide com  $2n=2x=14$  cromossomos) resulta um híbrido triplóide ( $2n=3x=21$  cromossomos). A não existência de pareamento correto entre os cromossomos na meiose desse híbrido resulta na produção de gametas anormais com conseqüente esterilidade para o híbrido, com ausência de produção de sementes. Essas características dificultam o uso desses híbridos nos programas de melhoramento, devido à impossibilidade de realização de cruzamentos e à ausência de produção de sementes, o que torna sua propagação de forma assexuada uma necessidade, onerando a produção de pastagens economicamente viáveis.

A tecnologia citogenética permite a duplicação cromossômica desses híbridos e a obtenção de híbridos hexaplóides ( $2n=6x=42$  cromossomos). Teoricamente, espera-se que esses materiais apresentem meiose regular, com produção de gametas e sementes viáveis. O efeito “gigas”, normalmente

observado em estruturas de plantas poliploidizadas, poderia conduzir a um aumento de tamanho das sementes, o que seria uma vantagem adicional para os hexaplóides, tornando mais fácil a propagação desse material via semente.

A Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG e o Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, há alguns anos trabalham nesse sentido e experimentos já foram conduzidos. Os objetivos desses trabalhos são: avaliação citogenética de acessos de capim-elefante e milho; análise de meiose de híbridos triplóides e hexaplóides e obtenção de híbridos hexaplóides por duplicação cromossômica. Plantas hexaplóides foram obtidas com sucesso em experimentos anteriores, mas a limitação imposta pela citogenética como técnica de avaliação de ploidia tornou os experimentos limitados no número de plantas. A necessidade de técnicas adicionais para avaliação das plantas obtidas nos experimentos de duplicação cromossômica foi essencial e a citometria de fluxo representa essa tecnologia.

A citometria de fluxo foi originalmente desenvolvida no fim dos anos 1950, para contagem e análise de células sanguíneas. A hematologia e a imunologia celular foram, indiscutivelmente, as duas áreas da biologia que impulsionaram o desenvolvimento da tecnologia de citometria de fluxo. No entanto, com a natural evolução técnica e com o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização desse instrumento generalizou-se para outras áreas e para estudos com outras células, como células vegetais e microbianas. No domínio das células vegetais, apesar da utilização da citometria de fluxo ter ocorrido apenas no início dos anos 1980, o número de aplicações tem aumentado continuamente desde então. Hoje em dia, é uma técnica rotineiramente utilizada em vários laboratórios. Apesar de a citometria de fluxo aplicada ao estudo de células e organelas vegetais apresentar ainda algumas limitações, esta técnica permite análises rápidas (em tempo real) do conteúdo de DNA e RNA, da expressão de transgenes e contagem de células, entre outras aplicações. A oportunidade de separar subpopulações de partículas celulares

/subcelulares (cell sorting) aumentou ainda mais o espectro de aplicações desta técnica.

No melhoramento de plantas, a citometria tem sido utilizada com vários objetivos, entre eles: quantificação de DNA nuclear, análise de ploidia, avaliação de poliplóides em experimentos de indução de duplicação cromossômica, detecção de mixoploidia e aneuploidias, análise de ciclo celular, detecção de híbridos interespecíficos e separação de cromossomos para a construção de sondas para mapeamento genômico.

A avaliação de ploidia de plantas oriundas de experimentos de duplicação cromossômica por citometria de fluxo tem sido utilizada em muitos trabalhos.

O objetivo da realização do presente trabalho foi padronizar metodologia de citometria de fluxo para análise genômica com aplicação no melhoramento de *Pennisetum*, com ênfase na análise de ploidia e quantificação de DNA das plantas dos experimentos de duplicação cromossômica, na análise de ciclo celular e de comportamento meiótico. Os resultados aqui discutidos sugerem um horizonte de pesquisas básicas e aplicadas ao melhoramento de *Pennisetum*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Gênero *Pennisetum* e melhoramento

*Pennisetum* é um dos mais importantes gêneros da família Poaceae, subfamília Panicoideae e tribo Paniceae (Martel et al., 2004). O gênero possui aproximadamente 140 espécies (Brunken, 1977) com números cromossômicos básicos de  $x=5, 7, 8$  ou  $9$  (Jauhar, 1981) e níveis de ploidia variando de diploide a octaplóide.

Harlan (1975) divide as espécies de *Pennisetum* em conjuntos gênicos com base em suas relações genéticas e taxonômicas em relação à espécie cultivada, *Pennisetum glaucum* (milheto) que, com as duas espécies, *Pennisetum violaceum* e *Pennisetum molissimum*, são agrupadas em um conjunto gênico primário, com  $2n=2x=14$ . O conjunto gênico secundário é composto pela espécie *Pennisetum purpureum* (capim-elefante), com  $2n=4x=28$ . O conjunto gênico terciário é composto por espécies com números cromossômicos básicos variados ( $x=5, 7, 8$  e  $9$ ) e inclui todas as outras espécies do gênero.

Várias espécies de *Pennisetum* são importantes agronomicamente como forrageiras ou como plantas daninhas (Schmelzer, 1997). Entre essas, o milheto e o capim-elefante são as espécies forrageiras economicamente mais importantes.

O capim-elefante é uma espécie perene, alógama, tetraplóide, com  $2n=4x=28$  cromossomos e constituição genômica A'A'BB (Martel et al., 1996). O potencial produtivo do capim-elefante, associado às outras características forrageiras favoráveis, tais como boa qualidade, palatabilidade, vigor e perenidade, tem estimulado não só o cultivo dessa espécie como também o seu melhoramento genético visando ao desenvolvimento de cultivares melhoradas (S. Sobrinho et al., 2005). O capim-elefante contribui ainda, na pecuária, para o aumento na produção de leite e de carne (Deresz, 1999), sendo uma espécie amplamente difundida por todo o Brasil, cultivada em condições ambientais

bastante divergentes (Pereira et al., 2001). Entretanto, uma das grandes limitações à expansão da área cultivada com capim-elefante é a necessidade do uso da propagação vegetativa, visto que a maioria das cultivares produz sementes minúsculas, deiscentes e de baixo vigor.

A obtenção de cultivares melhoradas é uma necessidade comum a produtores de leite e de carne de todo o país. Entre os atributos desejados, buscam-se cultivares com propagação por meio de sementes, resistência à cigarrinha das pastagens, maior velocidade de crescimento, maior produtividade, melhor qualidade nutricional, tolerância a solos de baixa fertilidade e distribuição mais eqüitativa da produção de matéria seca durante o ano (Pereira et al., 2003).

O milheto é uma espécie anual, alógama, diplóide com  $2n=2x=14$  cromossomos e constituição genômica AA (Martel et al., 1996). O milheto apresenta boa resistência à seca e a doenças, é tolerante a baixos níveis de fertilidade do solo e tem boa produção de sementes não deiscentes (Pereira et al., 2001). Além disso, proporciona elevado rendimento de matéria seca (Andrade & Andrade, 1982). A espécie é também considerada o sexto cereal mais importante, depois do trigo, arroz, milho, cevada e sorgo. No melhoramento do milheto, tem-se procurado por materiais resistentes a doenças, com macho esterilidade, com melhores características forrageiras e apomíticos (Jauhar & Hanna, 1998).

A proximidade genética entre o capim-elefante e o milheto possibilita a obtenção de híbridos entre essas duas espécies com relativa facilidade (S. Sobrinho et al. 2005). Essa estratégia tem sido recomendada para o melhoramento de qualidade forrageira (Hanna, 1999).

Schank et al. (1993) chamam a atenção para o fato de que o desenvolvimento desses híbridos constitui uma das alternativas para melhorar a qualidade forrageira do capim-elefante. Deste cruzamento resulta um híbrido interespecífico triplóide ( $2n=3x=21$  cromossomos), estéril, que,

morfologicamente, assemelha-se ao capim-elefante e apresenta algumas características intermediárias entre as duas espécies parentais (Hanna, 1999). Este cruzamento busca reunir no híbrido características desejáveis do milho, tais como qualidade de forragem, tolerância à seca e resistência a doenças, com as boas características do capim-elefante (Schank et al., 1993). Segundo Jauhar (1981), a forragem desses híbridos interespecíficos teria melhor aceitação pelos bovinos que o próprio capim-elefante.

A Embrapa Gado de Leite desenvolve, há mais de uma década, um programa de melhoramento genético do capim-elefante. Este programa explora a variabilidade genética existente no Banco Ativo de Germoplasma do Capim-Elefante (BAGCE), constituído por clones, populações e cultivares melhoradas de capim-elefante, híbridos triplóides e hexaplóides resultantes do cruzamento do capim-elefante com o milho, acessos de milho e diversas outras espécies selvagens de *Pennisetum*.

A obtenção de híbridos entre o capim-elefante e o milho tem sido uma estratégia usada pelo melhoramento. A esterilidade desses híbridos, devido à sua condição triplóide, tem limitado o seu emprego nos programas de melhoramento e impossibilitado a obtenção de sementes para a implementação de pastagens economicamente viáveis. A restauração da fertilidade desses híbridos permitiria um maior uso dos mesmos nos programas de melhoramento. Essa restauração pode ser alcançada utilizando-se de tecnologia citogenética, com a obtenção de materiais com o número cromossômico duplicado via exposição a agentes antimitóticos, tais como a colchicina. Com a duplicação, obtém-se um híbrido hexaplóide com  $2n=6x=42$  cromossomos.

Por meio da duplicação cromossômica, Hanna (1981) e Hanna et al. (1984) produziram um híbrido hexaplóide com meiose regular, que apresenta sementes maiores e mais vigorosas, quando comparadas as sementes do capim-elefante, facilitando, assim, a sua propagação via sementes.

## 2.2 Duplicação cromossômica como estratégia no melhoramento de plantas

A duplicação cromossômica tem sido utilizada como estratégia no melhoramento de plantas (TABELA 1). Percebe-se ampla variação nos protocolos utilizados com relação aos antimitóticos, concentrações, tempos e formas de exposição e tecidos utilizados para duplicação.

TABELA 1 Protocolos para duplicação cromossômica com aplicação no melhoramento de plantas

Espécie	Antimitótico(s) utilizado(s)	Tecido utilizado para duplicação	Resultados	Métodos de análise de ploidia
<i>Tripsacum dactyloides</i> (Salon & Earle, 1998).	Amiprofosmetil 10, 15 e 20 µM; Colchicina 0,01 e 0,025%	Brotos derivados de calos embriogênicos	Média de 48% de sobrevivência para os tratamentos com Amiprofosmetil. Todas as 14 plantas sobreviventes foram poliploidizadas. Eficiência dos tratamentos com colchicina foi menor.	Citometria de fluxo e citogenética
<i>Citrus sinensis</i> (Zhang et al., 2007).	Colchicina 1000 mg L <sup>-1</sup>	Calos	Nos diferentes tratamentos, 33% das plantas recuperadas foram poliploidizadas. No tratamento em que a colchicina foi autoclavada juntamente com o meio de cultura a eficiência foi maior (54% de plantas foram poliploidizadas)	Citometria de fluxo
<i>Lolium perene</i> (Pasakinskiene, 2000).	Colchicina 0,3%	Cultura de embriões; exposição de brotos	44,2% de sobrevivência de embriões e brotos; 58% das plantas sobreviventes foram poliploidizadas	Citogenética
<i>Lavandula angustifolia</i> (Urwin et al., 2007).	Colchicina 0; 3,6; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 mg L <sup>-1</sup>	Sementes	Colchicina afetou a germinação das sementes (50% de germinação no tratamento de 3,6 mg L <sup>-1</sup> ). 3 plantas poliploidizadas foram recuperadas.	Citometria de fluxo e citogenética

“...continua...”

“TABELA 1, Cont.”

Espécie	Antimitótico(s) utilizado(s)	Tecido utilizado para duplicação	Resultados	Métodos de análise de ploidia
<i>Vitis vinifera</i> (Yang et al., 2006).	Colchicina 0, 10, 20 mg/L	Embriões somáticos obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos	Tratamento de 10 mg/L: sobrevivência média foi de 65% e 0,7% das plantas recuperadas foram poliploidizadas. Tratamento de 20 mg/L: sobrevivência média foi de 46,7% e 2,7% das plantas recuperadas foram poliploidizadas	Citometria de fluxo; citogenética e características estomáticas
<i>Humulus lupulus</i> (Roy et al., 2001).	Colchicina 0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,5%	Meristema apical	Nos tratamentos com 0,01%, 0,05 e 0,10% de colchicina foram recuperadas plantas poliploidizadas (média de 11% das plantas).	Citometria de fluxo e características estomáticas
<i>Humulus lupulus</i> (Skof et al., 2007).	Não utilizado, a poliploidização foi espontânea.	Brotos adventícios	30% das plantas recuperadas foram poliploidizadas.	Citometria de fluxo
<i>Morus alba</i> (Chakraborti et al., 1998).	Colchicina 0,05%, 0,1% e 0,2%	Meristema apical	39,4 % das plantas recuperadas do tratamento com colchicina 0,1% foram poliploidizadas	Citogenética e características estomáticas
<i>Buddleia globosa</i> (Rose et al., 2000*).	Colchicina 0,01%, 0,05% e 0,1%	Secções nodais de brotos apicais	De 29 plantas sobreviventes, 19 foram poliploidizadas	Citogenética
<i>Cattleya intermedia</i> (Silva et al., 2000).	Colchicina 0%, 0,05%, 0,1% e 0,20%	Cultura de meristema	Os tratamentos 0,05 e 0,1 foram os mais efetivos na produção de plantas poliploidizadas	Citogenética e características estomáticas
<i>Zizyphus jujuba</i> (Gu et al., 2005).	Colchicina 0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,1% e 0,3%	Brotos	Nos melhores tratamentos, aproximadamente 5% das plantas recuperadas foram poliploidizadas	Citometria de fluxo; citogenética e características estomáticas
<i>Brachiaria brizantha</i> (Pinheiro et al., 2000).	Colchicina 0,01%, 0,05%, e 0,1%	Segmentos basais	18 (41%) plantas poliploidizadas foram recuperadas do tratamento com colchicina 0,01%	Citometria de fluxo e citogenética

“...continua...”

“TABELA 1, Cont.”

Espécie	Antimitótico(s) utilizado(s)	Tecido utilizado para duplicação	Resultados	Métodos de análise de ploidia
<i>Cucumis melo</i> (Yetisir & Sari, 2003).	Colchicina 0,5%	Plântulas imersas em colchicina; exposição de colchicina a brotos laterais ( <i>in vivo</i> ) e brotos apicais ( <i>in vivo</i> ).	Exposição de brotos apicais foi o tratamento mais efetivo, com 89% das plantas recuperadas poliploidizadas.	Citometria de fluxo e características estomáticas
<i>Miscanthus sinensis</i> (Petersen et al., 2002).	Colchicina 313, 626, 1252 e 2504 $\mu\text{M}$ ; orizalina 30 e 60 $\mu\text{M}$	Brotos, plantas estabelecidas em solo por exposição do sistema radicular; calos	Plantas poliploidizadas foram recuperadas a partir de todos os tratamentos testados. A exposição de calos foi o tratamento mais eficiente.	Citometria de fluxo
<i>Pyrus pyrifolia</i> (Kadota & Niimi, 2002).	Colchicina 0,01%	Brotos	Nos experimentos iniciais, somente mixoplóides foram recuperados. Posteriormente, brotos obtidos dos mixoplóides deram origem a 5 plantas poliploidizadas	Citometria de fluxo e características estomáticas
<i>Bixa orellana</i> (Carvalho et al., 2005).	Colchicina 0, 25, 250 e 1250 $\mu\text{M}$ ; Orizalina 0, 5, 15 e 30 $\mu\text{M}$	Segmentos do hipocótilo ou nós do cotilédone	Plantas poliploidizadas foram recuperadas somente dos tratamentos com nós do cotilédone, sendo a maior frequência no tratamento com orizalina 15 $\mu\text{M}$	Citogenética e características estomáticas
<i>Punica granatum</i> (Shao et al., 2003).	Colchicina 10 $\text{mg L}^{-1}$ ; 5000 $\text{mg L}^{-1}$	Brotos	O tratamento com 10 $\text{mg L}^{-1}$ produziu 20% de plantas poliploidizadas.	Citometria de fluxo e citogenética
<i>Chaenomeles japonica</i> (Stanys et al., 2006).	Colchicina 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,3%, 0,6%, 0,9% e 1,5%; Orizalina 10,20, 30, 40, 50, 144 $\mu\text{M}$	Brotos e cotilédones	Resultados contrastantes entre genótipos. Os melhores resultados com brotos expostos à colchicina foram obtidos com os tratamentos de 0,3% e 0,6% e 20, 30 e 40 $\mu\text{M}$ de orizalina. Com os cotilédones os tratamentos com orizalina foram mais eficientes (25% de plantas poliploidizadas no tratamento de 40 $\mu\text{M}$ ).	Citometria de fluxo e características estomáticas

“...continua...”

“TABELA 1, Cont.”

Espécie	Antimitótico(s) utilizado(s)	Tecido utilizado para duplicação	Resultados	Métodos de análise de ploidia
<i>Colophospermum mopane</i> (Rubuluzo et al., 2007).	Colchicina 0,05%, 0,1% e 1%	Sementes	44% das plantas recuperadas foram poliploidizadas. Os tratamentos eficientes foram 0,05% e 0,1%	Citometria de fluxo
<i>Phlox subulata</i> (Zhang et al., 2007).	Colchicina 0,005%, 0,01%, 0,02% e 0,04%	Brotos	O tratamento mais eficiente foi de 0,005% de colchicina por 20 dias, com 60% das plantas analisadas poliploidizadas	Citogenética
<i>Xanthosoma sagittifolium</i> (Tambong et al., 1998).	Colchicina 1,25 mM e 2,50 mM	Exposição de plântulas	Somente mixoplóides foram recuperados em percentuais de 16,7% e 20%, respectivamente, para os tratamentos de 1,25 e 2,5mM	Citometria de fluxo e citogenética
<i>Rosa chinensis</i> (Zlesak et al., 2005).	Trifluralina 0,086% e 0,0086%; colchicina 0,5%	Meristema apical	Trifluralina 0,086% foi o tratamento mais eficiente para poliploidização (15,26%)	Citogenética; características estomáticas e diâmetro de pólen
Híbridos de <i>Rhododendron</i> (Vänölä, 2000).	Colchicina 0,025% e 0,05%; orizalina 0,001% e 0,005%	Brotos	Os tratamentos com orizalina foram mais eficientes; 18,2% das plantas analisadas foram poliploidizadas no tratamento com orizalina 0,005%, por 24 horas.	Citometria de fluxo
Híbridos de <i>Solanum</i> (Chauvin et al., 2003).	Orizalina 1, 5, 10 mg L <sup>-1</sup>	Meristema apical	O tratamento com 10 mg L <sup>-1</sup> de orizalina foi o mais eficiente (40% de plantas poliploidizadas)	Citometria de fluxo
Híbridos entre <i>Alstroemeria aurea</i> e <i>A. caryophyllaea</i> (Lu & Bridgen, 1997).	Colchicina 0,2%, 0,4% e 0,6%	Brotos e meristemas	41% das plantas foram poliploidizadas nos tratamentos de 0,2% e 0,6% de colchicina. Dessas, 87,5% mantiveram sua ploidia após 1 ano.	Citogenética e características estomáticas
Híbridos entre <i>Syringa vulgaris</i> e <i>S. pinnatifolia</i> (Rose et al., 2000b).	Colchicina 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 1,25; 2,5 mM	Nós subapicais	Os tratamentos entre 0,05 e 0,10 mM foram os mais eficientes em produzir plantas poliploidizadas	Citometria de fluxo e Citogenética

“...continua...”

De modo geral, observa-se que a colchicina é o antimitótico mais utilizado, com concentrações variando de 0,0003% a 1,5%. Diferentes tecidos têm sido utilizados para a indução de duplicação cromossômica e os resultados mais eficientes são alcançados com os protocolos que utilizam exposição a agentes antimitóticos *in vitro*. Com relação aos resultados, a variação em eficiência da técnica também é ampla, com média de 15% a 20% de plantas poliploidizadas. A ocorrência de mixoplóides (material com células com variação na ploidia) é um fenômeno comum, descrito na maioria dos trabalhos.

Em *Pennisetum*, os trabalhos pioneiros para obtenção de materiais com número cromossômico duplicado a partir de híbridos triplóides entre capim-elefante e milho foram desenvolvidos por Hanna (1981) e Hanna et al. (1984). Para materiais nacionais, dois trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Lavras são pioneiros e constituem referências com essa abordagem (Abreu et al., 2006; Barbosa et al., 2007).

Abreu et al. (2006) avaliaram vários protocolos de indução de poliploidia em híbridos triplóides de capim-elefante e milho, variando antimitóticos, concentrações e tempos de exposição de diferentes tecidos vegetais. Os tratamentos foram compostos de colchicina a 50 mg L<sup>-1</sup> e 100 mg L<sup>-1</sup> ou de ciclohexamida 25 mg L<sup>-1</sup>:8-hidroxiquinoleína 300 mg L<sup>-1</sup> (1:1), aplicadas *in vitro* em segmentos nodais e *in vivo* em plântulas e perfilhos com diferentes períodos de exposição. Os tratamentos com colchicina apresentaram melhor efeito sobre as plântulas, enquanto que os tratamentos com ciclohexamida:8-hidroxiquinoleína atuaram melhor sobre os perfilhos. Em todos os materiais recuperados, observou-se mixoploidia, com variação no número cromossômico de 14 a 42 cromossomos. Os autores sugeriram a possibilidade de duplicação cromossômica com posterior eliminação dos cromossomos.

Barbosa et al. (2007) trabalharam no sentido de melhorar a eficiência dos tratamentos de indução de poliploidia em híbridos entre capim-elefante e milho. *Seedlings*, plântulas e segmentos caulinares cultivados *in vitro* foram

tratados com colchicina a 0,05% e 0,10%, aplicada por 12 ou 24 horas. *Seedlings* e meristemas cultivados *in vivo* foram tratados por 24 horas, com colchicina a 0,05%. *Seedlings* cultivados *in vitro* e tratados com colchicina a 0,1%, por 24 horas, tiveram a melhor resposta à indução de poliploidia. Em 38% das plantas sobreviventes, observou-se número cromossômico duplicado ( $2n=6x=42$  cromossomos).

Em ambos os trabalhos, a citogenética foi a única ferramenta utilizada na avaliação de ploidia das plantas obtidas. Essa estratégia representa uma limitação aos experimentos, uma vez que a obtenção de metáfases para contagem cromossômica é um processo trabalhoso e consumidor de tempo. Tal estratégia limita a avaliação de ploidia somente a células em divisão, dificultando a análise de um grande número de células por planta e a avaliação de ploidia de diferentes tecidos dentro de uma planta. Adicionalmente, pelas dificuldades e pelo consumo de tempo, a citogenética dificulta a inclusão de um grande número de plantas nos experimentos, dificultando ou tornando impossível conclusões precisas acerca da eficiência dos tratamentos, uma vez que um número pequeno de plantas por tratamento não permite análise estatística posterior. Entretanto, um grande número de trabalhos de indução de poliploidia limita-se a descrever o número ou o percentual de plantas poliploidizadas obtidas a partir dos tratamentos e a citogenética ainda é extensivamente utilizada como método de avaliação de ploidia.

Dos trabalhos apresentados na Tabela 1, 61,5% utilizaram a citogenética como um dos métodos de avaliação de ploidia. Destes, 50% também utilizaram a citometria de fluxo como método de avaliação de ploidia e, de todos os trabalhos, 69,2% utilizaram a citometria de fluxo. A citometria de fluxo representa uma metodologia refinada, que permite a avaliação de ploidia de um grande número de plantas em um tempo relativamente curto, representando um ganho tecnológico em relação à avaliação de ploidia por tecnologia citogenética. Uma breve descrição das aplicações da citometria de fluxo é feita a seguir.

### 2.3 Aplicações da citometria de fluxo no melhoramento de plantas

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos, organelas) que fluem em uma suspensão líquida (Dolezel, 1997). As partículas em suspensão movem-se emergidas num fluido (tampão de extração) no interior de um capilar dentro de um aparelho denominado citômetro de fluxo (Dolezel, 1997). Essas partículas intersectam uma a uma um feixe de laser ocorrendo um processo de dispersão da luz e ou emissão de fluorescência (Dolezel & Bartos, 2005). A intensidade de dispersão da luz ou da emissão de fluorescência está relacionada com as propriedades das partículas que estão sendo analisadas (Dolezel & Bartos, 2005).

Esse princípio pode ser usado, por exemplo, para medir a quantidade de DNA de uma célula (Dolezel & Bartos, 2005). Em plantas, é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucas gramas de tecido foliar em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (Galbraith et al., 1983). A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA. Tais estimativas apresentam uma série de aplicações, desde a pesquisa básica até o melhoramento de plantas, entre elas, estimação do tamanho do genoma, avaliação de ploidia, detecção de mixoploidia e aneuploidias, avaliação de ciclo celular, estudo de eliminação cromossômica, separação de células, cromossomos ou organelas (Dolezel & Bartos, 2005).

A quantidade de DNA tem sido estudada em vários gêneros de importância econômica e forrageira de Poaceae, como *Zea* (Rayburn et al., 1989), *Pennisetum* (Passos et al., 1994; Martel et al., 1997), *Hordeum* (Vogel et al., 1999), *Oryza* (Buso et al., 2000), *Brachiaria* (Pinheiro et al., 2000) e *Triticum* (Kubalaková et al., 2002).

A quantidade de DNA foi determinada por Martel et al. (1997), para 15

espécies pertencentes aos três conjuntos gênicos de *Pennisetum*, caracterizando a sua variabilidade para todos os números básicos ( $x=5, 7, 8$  e  $9$ ) e diferentes níveis de ploidias. Para este autor, as espécies cultivadas *P. purpureum* e *P. glaucum* apresentam genomas praticamente iguais quanto à quantidade de DNA (4,59 e 4,71 pg, respectivamente), embora apresentem níveis de ploidia, números cromossômicos e morfometria cariotípicas diferentes.

Diversos trabalhos têm utilizado a citometria de fluxo como metodologia rápida de avaliação de ploidia (Tambong et al., 1998; Pinheiro et al., 2000; Rose et al., 2000b; Väinölä, 2000; Roy et al., 2001; Kadota & Niimi, 2002; Petersen et al., 2002; Chauvin et al., 2003; Shao et al., 2003; Yetisir & Sari, 2003; Gu et al., 2005; Stanys et al., 2006; Rubuluza et al., 2007; Skof et al., 2007).

Roux et al. (2003), em um trabalho com banana, demonstraram ser possível a detecção de aneuploidias envolvendo um único cromossomo (monossomia ou trissomia), o que torna a técnica potencialmente útil para o estudo de eliminação cromossômica.

Mizuhiro et al. (2001) trabalharam com citometria na identificação de híbridos somáticos interespecíficos entre *Primula malacoides* e *P. obconica*. Dezoito diferentes linhas com variação no número cromossômico e quantidade de DNA foram obtidas, sendo a eliminação cromossômica responsável por tal variação. A citometria foi também utilizada no acompanhamento dessa eliminação cromossômica até a estabilização da quantidade de DNA.

A citometria de fluxo pode ainda ser utilizada na avaliação de quantidade de DNA em grãos de pólen ou em células meióticas, permitindo a análise de comportamento meiótico e a detecção de polens anormais, auxiliando no estudo de estabilidade meiótica dos híbridos e permitindo a seleção de plantas estáveis. Em trabalhos prévios em que o conteúdo de DNA foi determinado por citometria de fluxo, os núcleos foram isolados dos grãos de pólen diretamente por maceração em lírio, em milho, em *Dendranthema grandiflora* (Bino et al.,

1990), em *Nicotiana sylvestris* (Paepe et al., 1990) e em *Cupressus dupreziana* (Pichot & Maataoui, 2000). Pan et al. (2004) utilizaram tratamentos ultrassônicos para a liberação dos núcleos de polens de *Brassica napus*.

Outros exemplos da aplicação da citometria de fluxo no estudo do comportamento de híbridos interespecíficos ou na indução de duplicação cromossômica podem ser encontrados em diversos trabalhos (Awolaye et al., 1994; Tosca et al., 1995; Geoffriau et al., 1997; Thibault, 1998; Pinheiro et al., 2000; Roy et al., 2001; Petersen et al., 2002).

#### **2.4 Hibridação interespecífica/poliploidia e alterações genômicas**

Após a fertilização interespecífica, os dois diferentes genomas parentais são combinados dentro de um núcleo. Essa nova constituição genômica pode resultar em conflitos intergenômicos, conduzindo a reorganizações genéticas e ou epigenéticas (Riddle & Birchler, 2003). Frequentemente, uma eliminação específica de seqüências de DNA acontece nos primeiros estágios após a hibridação (Liu et al., 1996; Feldman et al., 1997). Na família Poaceae, uma eliminação somática parcial ou total de cromossomos de uma das espécies parentais tem sido descrita em vários trabalhos, como em cruzamentos de *Hordeum lechleri* X *H. vulgare* (Linde-Laursen & von Bothmer, 1999), *Avena sativa* X *Zea mays* (Riera-Lizarazu et al., 1996), *Triticum aestivum* X *H. vulgare* (Barclay, 1975) e *Triticum aestivum* X *Pennisetum glaucum* (Germand et al., 2005).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a eliminação cromossômica em híbridos. Entre elas, diferenças nos tempos de processos essenciais da mitose devido à assincronia da divisão celular (Gupta, 1969); à assincronia na síntese de nucleoproteínas levando à perda de cromossomos com segregação tardia (Bennett et al., 1976; Laurie & Bennett, 1989), à formação de pólos multipolares (Subrahmanyam & Kasha, 1973); à separação espacial dos genomas durante a intérfase (Finch & Bennett, 1983, Linde-Laursen & von

Bothmer, 1999) e na metáfase (Schwarzacher-Robinson et al., 1987); à inativação parental específica de centrômeros (Finch, 1983; Kim et al., 2002; Jin et al., 2004; Mochida et al., 2004) e à degradação de cromossomos por atividade de nucleases hospedeiro-específico (Davies, 1974).

Algumas alterações na mitose são características de eliminação cromossômica, tais como não orientação de cromossomos na metáfase, segregação tardia na anáfase, degradação de cromatina ou fragmentação de cromossomos e a formação de micronúcleos (Singh, 2002).

Na meiose, o mesmo processo de eliminação pode ser evidenciado. Baptista-Giacomelli et al. (2000), trabalhando com *Avena sativa* (aveia), demonstraram a eliminação de cromossomos na meiose via formação de micronúcleos em tétrades. Cromossomos não orientados na metáfase I e ascensão precoce de cromossomos em anáfase I também foram observados, indicativo da existência de eliminação cromossômica segundo os autores.

Germand et al. (2005), trabalhando com híbridos provenientes de cruzamentos entre trigo e milho, observaram eliminação cromossômica uniparental (cromossomos de milho) via formação de micronúcleos, acompanhado de heterocromatinização e fragmentação de DNA. Estudos citológicos anteriores corroboram esse mecanismo de eliminação em estágios iniciais de desenvolvimento embrionário (Kasha & Kao, 1970). Os cromossomos ou fragmentos eliminados não se alinham corretamente na metáfase e segregam tardiamente na anáfase (Laurie & Bennett, 1989). Essas observações são consistentes com o mecanismo clássico de formação de micronúcleos, que envolve a formação de membranas ao redor desses cromossomos ou fragmentos durante o processo de reconstrução da membrana nuclear no final da telófase (Schubert & Oud, 1997).

Segundo Germand et al. (2005), a eliminação cromossômica iniciou-se logo após a fertilização, confirmando o resultado de outros trabalhos prévios (Laurie & Bennett, 1989; Mochida et al., 2004). Neste trabalho, os cromossomos

de milho ocuparam uma posição periférica no núcleo interfásico, o que, provavelmente, estava diretamente ligado à eliminação de cromatina também durante a fase de intérfase.

Adicionalmente, foi observada intensa fragmentação dos cromossomos de milho, explicada, pelos autores, por uma assincronia no processo de replicação do DNA, o que pode levar à ativação do sistema de reparo por quebras de dupla fita e à conseqüente eliminação de fragmentos (Michel, 2000). Essas quebras podem ter sido a causa da observação de cromossomos de milho dicêntricos ou encurtados. Alternativamente, a hibridação pode ativar elementos genéticos móveis e estes causarem alterações cromossômicas estruturais (McClintock, 1984), como as relatadas para alopoliplóides artificiais de *Arabidopsis thaliana* (Comai, 2000) e trigo (Kashkush et al., 2002).

Todas essas modificações, incluindo as mudanças de expressão de genes, mudanças epigenéticas e alterações cariotípicas podem ser entendidas como um ajuste do genoma frente a uma nova situação (Levin, 2002).

A eliminação cromossômica em híbridos interespecíficos é uma ferramenta poderosa nos programas de melhoramento (Baptista-Giacomelli et al., 2000). A eliminação cromossômica diferencial (parcial) tem sido usada na produção de linhas de adição (materiais contendo cromossomos ou partes de cromossomos extras) e linhas de substituição (substituição de cromossomos entre espécies diferentes) (Baptista-Giacomelli et al., 2000). Adicionalmente, a eliminação completa de um dos genomas parentais no híbrido interespecífico permite a obtenção de materiais haplóides.

Em *Avena*, a transferência de genes usando linhas de substituição tem sido aplicada no melhoramento (Forsberg, 1990). Na produção de materiais haplóides, várias técnicas têm sido empregadas no trigo (*Triticum aestivum*) ( $2n=6x=42$ ). Entre elas, a cultura de antera (Orshinsky & Sadasivaiah, 1994; Stober & Hess, 1997) e o uso da eliminação cromossômica após hibridação com *Hordeum bulbosum* (Barclay, 1975; Inagaki & Tahir, 1990), *Hordeum vulgare*

(Jauhar et al., 1991) e *Zea mays* (Bitsch et al., 1998).

Para os cruzamentos envolvendo capim-elefante e milho não existem relatos do estudo de eliminação cromossômica após a fertilização, embora este tipo de hibridação seja uma estratégia comum no melhoramento dessas espécies. Entretanto, os trabalhos que procuraram avaliar o comportamento meiótico desses híbridos evidenciaram algumas alterações, provavelmente associadas com o fenômeno de eliminação cromossômica. São eles: presença de micronúcleos em tétrades, pontes em anáfase, cromossomos com ascensão precoce nas metáfases I e II, e cromossomos com segregação tardia nas anáfases I e II (Hanna, 1981; Jauhar, 1981; Techio et al., 2006).

Do mesmo modo, os eventos de poliploidização estão associados a mudanças genômicas. Estudos com alopoliplóides induzidos em *Brassica* e trigo têm demonstrado que a poliploidização pode levar a uma rápida e extensiva mudança genômica (Song et al., 1995; Feldman et al., 1997; Liu et al., 1998). Em trigo, tem-se demonstrado a eliminação de seqüências curtas não aleatórias do genoma em alopoliplóides recém-sintetizados (Shaked et al., 2001). A citometria de fluxo tem demonstrado uma redução da quantidade de DNA em alopoliplóides em relação à quantidade de DNA esperada pela média dos parentais, sugerindo eliminação de seqüências (Boyko et al., 1984). Entretanto, nestes trabalhos, a quantidade de DNA dos alopoliplóides foi comparada com as quantidades de DNA de seus ancestrais, mas não exatamente com as plantas ancestrais utilizadas nos cruzamentos, dificultando a interpretação dos resultados. Na tentativa de solucionar este problema, Ozkan et al. (2003) trabalharam com híbridos recém-produzidos entre espécies de *Aegilops* e *Triticum*, permitindo a comparação de estimativas das quantidades de DNA com os verdadeiros genitores (plantas utilizadas nos cruzamentos).

Reduções de 1,67 até 2,57pg em relação ao esperado foram encontradas para os alopoliplóides, sugerindo também a eliminação de seqüências. Alterações na regulação de expressão de genes também têm sido relatadas como

conseqüências de mudanças na ploidia (Galitski et al., 1999; Lee & Chen, 2001). Em alopoliplóides recentemente produzidos em *Brassica*, trigo e *Arabidopsis*, mudanças nos padrões de metilação dentro de genes e transposons foram observadas (Song et al., 1995; Comai 2000; Shaked et al., 2001). Silenciamento precoce de genes redundantes tem sido documentado. Um exemplo é o fenômeno de dominância nucleolar, em que os genes para rRNA provenientes de um dos parentais são silenciados (Pikaard, 2000).

Com relação ao comportamento de cromossomos na meiose, um pareamento preciso de homólogos não é freqüentemente observado como um evento precoce após a formação de um alopoliplóide. Como conseqüência, um cromossomo, geralmente, pode parar com mais de um cromossomo ou não se parar e segregar tardiamente, levando à freqüente perda de cromossomos (Pikaard, 2001). Estudos com citogenética molecular têm demonstrado que a estabilidade em alopoliplóides é alcançada após uma série de modificações genômicas, tais como eliminação de seqüências, expansão de heterocromatina, translocações e inversões (Pikaard, 2001).

Abreu et al. (2006) e Barbosa et al. (2007) trabalharam com a indução de duplicação cromossômica em híbridos triplóides de capim-elefante e milho e observaram o fenômeno de mixoploidia (material com variação no número cromossômico) na maioria das plantas analisadas. Segundo estes autores, os números cromossômicos variavam de 14 a 42 nas metáfases analisadas. A conclusão foi de que estas variações eram provenientes de eliminação cromossômica. Paralelamente, anormalidades relacionadas à ocorrência de eliminação cromossômica foram observadas, entre elas, anáfases com cromossomos atrasados, cromossomos não orientados na metáfase e formação de micronúcleos (Abreu, 2006).

Entretanto, um estudo detalhado do processo de eliminação cromossômica, com acompanhamento temporal da ploidia e do número cromossômico das plantas não foi realizado, uma vez que este não era o objetivo

de ambos os trabalhos. Não foi demonstrado, todavia, se esta variação no número cromossômico foi devido à eliminação cromossômica antes ou após o processo de indução de poliploidia. Para responder a tal questão, é necessário o acompanhamento das mudanças genômicas ocorridas desde a produção do híbrido triplóide, passando pelo desenvolvimento do embrião e exposição dos explantes aos bloqueadores mitóticos, até a chegada da planta no campo. Adicionalmente, o entendimento e o acompanhamento do processo de eliminação cromossômica representarão uma possibilidade de obtenção de materiais estáveis com números cromossômicos diferentes (linhas de adição e substituição). A avaliação quanto às características agronômicas destes materiais e sua incorporação nos programas de melhoramento poderão representar um ganho considerável. Além disso, o entendimento do que acontece com a ploidia do material durante os procedimentos de indução de poliploidia poderá ser útil na elaboração de uma estratégia para a obtenção de plantas hexaplóides estáveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J.C.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; BARBOSA, S. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.11, p.1629-1635, 2006.
- ANDRADE, J.B.; ANDRADE, P. Produção de silagem do milho. **Boletim de Indústria Animal**, v. 39, n. 2, p.155-165, 1982.
- AWOLEYE, F.; VA DUREN, M.; DOLEZEL, J.; NOVAK, F.J. Nuclear DNA content and *in vitro* induced somatic polyploidization cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding. **Euphytica**, v. 76, p. 195-202, 1994.
- BAPTISTA-GIACOMELLI, F.R.; PAGLIARINI, M.S.; ALMEIDA, J.L. Elimination of micronuclei from microspores in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 3, p. 681-684, 2000.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; ABREU, J.C. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milho. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 365-372, 2007.
- BARCLAY, I.R. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. **Nature**, v. 256, p. 410-411, 1975.
- BENNETT, M.D.; FINCH, R.A.; BARCLAY, I.R. The time rate and mechanism of chromosome elimination in *Hordeum* hybrids. **Chromosoma**, v. 54, p. 175-200, 1976.
- BINO, R.J.; TUYL, J.M.V.; VRIES, J.N.D. Flow cytometric determination of relative nuclear DNA contents in bicellulate and tricellulate pollen. **Annals of Botany**, v. 65, p. 3-8, 1990.
- BITSCH, C.; GRÖGER, S.; LELLEY, T. Effect of parental genotypes on haploid embryo and plantlet formation in wheat x maize crosses. **Euphytica**, v. 103, p. 319-323, 1998.
- BOYKO, E.V.; BADACV, N.S.; MAXIMOV, N.G.; ZELENIN, A.V. Does DNA content change in the course of Triticale breeding? **Cereal Res Com**, v. 12, n. 1-2, p. 99-100, 1984.
- BRUNKEN, J.N. A systematic study of *Pennisetum* sect. *Pennisetum* (Gramineae). **American Journal of Botany**, v. 64, p. 161-176, 1977.

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

CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. *In vitro* induction of polyploid in annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, p. 69-75, 2005.

CHAKRABORTI, S.P.; VIJAYAN, K.; ROY, B.N.; QADRI, S.M.H. *In vitro* induction of tetraploid in mulberry (*Morus alba* L.). **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 799-803, 1998.

CHAUVIN, J.E.; SOUCHET, C.; DANTEC, J.P.; ELLISSÈCHE, D. Chromosome doubling of 2x *Solanum* species by oryzalin: method development and comparison with spontaneous chromosome doubling *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 65-73, 2003.

COMAI, L. Genetic and epigenetic interaction in allopolyploid plants. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 387-399, 2000.

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

DERESZ, F. Capim-elefante manejado em sistema rotativo para produção de leite e carne. In: PASSOS, L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A.V. (Ed.). **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 161-172.

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

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

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

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

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

FORSBERG, R.A. The use of monosomic alien substitution lines in interploidy gene transfer in *Avena*. **Bulgary Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 27-30, 1990.

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

GALITSKI, T.; SALDANHA, A.J.; STYLES, C.A.; LANDER, E.S.; FINK, G.R. Ploidy regulation of gene expression. **Science**, v. 285, p. 251-254, 1999.

GEOFFRIAU, E.; KAHANE, R.; BELLAMY, C.; RANCILLAC, M. Ploidy stability and *in vitro* chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). **Plant Science**, v. 122, p. 201-208, 1997.

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

GU, X.F.; YANG, A.F.; MENG, H.; ZHANG, J.R. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. **Plant Cell Report**, v. 24, p. 671-676, 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 Genetic Cytol.**, v. 11, p. 133-142, 1969.

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

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

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

HARLAN, J.R. Classification of cultivated plants. In: HARLAN, J. R. (Ed.). **Crops and man**.Madison: Wisconsin, 1975. p. 107-121.

IMAGAKI, M.; TAHIR, M. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L., and maize. **Japanese of Journal Breeding**, v. 40, p. 209-216, 1990.

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

JAUHAR, P.P.; RIERA-LIZARAZU, O.; DEWEY, W.G.; GILL, B.S.; GILL, C.F.; CRANE, C.F.; BENNETT, J.H. Chromosome pairing relations among the A, B and D genomes of bread wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 82, p. 441-449, 1991.

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

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

KADOTA, M.; NIIMI, Y. In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 282-286, 2002.

KASHA, K.J.; KAO, K.N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare*). **Nature**, v. 225, p. 874-875, 1970.

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

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

- KUBALAKOVA, M.; VRANA, J.; CIHALIKOVA, J.; SIMKOVA, H.; DOLEZEL, J. Flow karyotyping and chromosome sorting in bread wheat (*Triticum aestivum*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 1362-1372, 2002.
- LAURIE, D.A.; BENNETT, M.D. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat x maize crosses. **Genome**, v. 32, p. 953-961, 1989.
- LEE, H.S.; CHEN, Z. Protein-coding genes are epigenetically regulate in *Arabidopsis* polyploids. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 98, p. 6753-6758, 2001.
- LEVIN, D.A. **The role of chromosomal change in plant evolution**. New York: Oxford University, 2002. 230 p.
- LINDE-LAURSEN, I.; VON BOTHMER, R. Orderly arrangement of the chromosomes whitim barley genomes of chromosome-elimination *Hordeum lechleri* x barley hybrids. **Genome**, v. 42, p. 225-236, 1999.
- LIU, S.C.; KOWALSKI, S.P.; LAN, T.H.; FELDMANN, K. A.; PATERSON, A. H. Genome-wide high-resolution mapping by recurrent intermating using *Arabidopsis thaliana* as a model. **Genetics**, v. 142, p. 247-258, 1996.
- LIU, B.; VEGA, J.M.; FELDMAN, M. Rapid genomic changes in newly synthettized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops* II. Changes in low-copy DNA sequences. **Genome**, v. 41, p. 535-542, 1998.
- LU, C.; BRIDGEN, M. Chromosome doubling and fertility study of *Alstroemeria aurea* x *A. caryophyllaea*. **Eyphytica**, v. 94, p. 75-81, 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**, v. 39, p. 680-687, 1996.
- MARTEL, E.; DE NAY, D.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S.; SARR, S. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **Journal of Heredity**, v. 88, p. 139-143, 1997.
- MARTEL, E.; PONCET, V.; LANY, F.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; LEJUME, B.; SARR, A. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 249, p. 139-149, 2004.

MCCLINTOCK, B. The significance of response of the genomes to challenge. **Science**, v. 226, p. 792-810, 1984.

MICHEL, B. Replication fork arrest and DNA recombination. **Trends Biochem. Sci**, v. 25, p. 173-178, 2000.

MIZUHIRO, M.; ITO, K.; MII, M. Production and characterization of interspecific somatic hybrids between *Primula malacoides* and *P. obconica*. **Plant Science**, v. 161, p. 489-496, 2001.

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

ORSHINSKY, B.R.; SADASIVAIAH, R.S. Effects of media and embryoid induction and plant regeneration from cultured anthers of soft white spring wheats (*Triticum aestivum*). **Plant Science**, v. 102, p. 99-107, 1994.

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

PAEPE, R.D.; KOULOU, A.; PHAM, J.L.; BROWN, S.C. Nuclear DNA content and separation of *Nicotiana sylvestris* vegetative and generative nuclei at various stages of male gametogenesis. **Plant Science**, v. 70, p. 255-265, 1990.

PAN, G.; ZHOU, Y.; FOWKE, L.C.; WANG, H. An efficient method for flow cytometric analysis of pollen and detection of 2n nuclei in *Brassica napus* pollen. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 196-202, 2004.

PASAKINSKIENÉ, I. Culture of embryos and shoot tips for chromosome doubling in *Lolium perene* and sterile hybrids between *Lolium* and *Festuca*. **Plant Breeding**, v. 119, p. 185-187, 2000.

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

PEREIRA, A.V.; VALLE, C.B.; FERREIRA, R.P., MILLES, J.W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C., MELO, I.S., VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Cuiabá. Fundação Mato Grosso, 2001. 1183p.

- PEREIRA, A.V.; S. SOBRINHO, F.; SOUZA, F.H.D.; LÊDO, F.J.S. Tendências do melhoramento genético e produção de sementes forrageiras no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS: melhoramento de plantas e produção de sementes no Brasil, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, MG: UFLA, 2003. p. 36-63.
- PETERSEN, K.K.; HAGBERG, P.; KRISTIANSSEN, K. In vitro chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*. **Plant Breeding**, v. 121, p. 445-450, 2002.
- PICHOT, C.; MAATAOUI, M.E. Unreduced diploid nuclei in *Cupressus dupreziana* A. Camus pollen. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 574-579, 2000.
- PIKAARD, C.S. The epigenetics of nucleolar dominance. **Trends in Genetics**, v. 16, p. 495-500, 2000.
- PIKAARD, C.S. Genomic change and gene silencing in polyploids. **Trends in Genetics**, v. 17, n.12, p. 675-677, 2001.
- PINHEIRO, A.A.; POZZOBON, M.T.; VALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O.; CARNEIRO, V.T.C. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 274-278, 2000.
- RAYBURN, A.L.; AUGER, J.A.; BENZINGER, E.A.; HEPBURN, A.G. Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays*. L. by flow cytometry. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, p. 1179-1183, 1989.
- RIDDLE, N.C.; BIRCHLER, J. A. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. **Trends in Genetics**, v. 19, p. 597-600, 2003.
- RIERA LIZARAZU, O.; RINES, H.W.; PHILLIPS, R.L. Cytological and molecular characterization of oat x maize partial hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 123-135, 1996.
- ROSE, J.B.; KUBBA, J.; TOBUTT, K.R. Induction of tetraploidy in *Buddleia globosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 121-125, 2000a
- ROSE, J.B.; KUBBA, J.; TOBUTT, K.R. Chromosome doubling in sterile *Syringa vulgaris* x *S. pinnatifolia* hybrids by *in vitro* culture of nodal explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 127-132, 2000b

- ROUX, N.; TOLOZA, A.; RADECKI, Z.; ZAPATA-ARIAS, F.J.; DOLEZEL, J. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Report**, v. 21, p. 483-490, 2003.
- ROY, A.T.; LEGGETT, G.; KOUTOULIS, A. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Cell Report**, v. 20, p. 489-495, 2001.
- RUBULUZA, T.; NIKOLOVA, R.V.; SMITH, M.T.; HANNWEG, K. *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 259-261, 2007.
- SALON, P.R.; EARLE, E.D. Chromosome doubling and mode of reproduction of induced tetraploids of eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides* L.). **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 881-885, 1998.
- SCHANK, S.C.; DIZ, D.A.; BATES, D.B.; THOMPSON, K.E. Genetic improvement of napiergrass and hybrids with pearl millet. **Biomass and Bioenergy**, v. 5, p. 35-40, 1993.
- SCHMELZER, G.H. Review of *Pennisetum* section *Brevivalvula* (Poaceae). **Euphytica**, v. 97, p. 1-20, 1997.
- SCHWARZACHER-ROBINSON, T.; FINCH, R.A.; SMITH, J.B.; BENNETT, M.D. Genotypic control of centromere positions of parental genomes in *Hordeum X Secale* hybrid metaphases. **Journal of Cell. Science**, v. 87, p. 291-304, 1987.
- SCHUBERT, I.; OUD, J.L. There is an upper limit of chromosome size for normal development an organism. **Cell**, v. 88, p. 515-520, 1997.
- SHAKED, H.; KASHKUSH, K.; OZKAN, H.; FELDMAN, M.; LEVY, A.A. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploid in wheat. **Plant Cell**, v. 13, p. 1749-1759, 2001.
- SHAO, J.; CHEN, C.; DENG, X. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 241-246, 2003.
- SILVA, P.A.K.X.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, v. 30, p. 105-111, 2000.

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

SKOF, S.; BOHANEK, B.; KASTELEC, D.; LUTHAR, Z. Spontaneous induction of tetraploidy in hop using adventitious shoot regeneration method. **Plant Breeding**, v. 126, p. 416-421, 2007.

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

SONG, K.; LU, P.; TANG, K.; OSBORN, T.C. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implication for polyploid evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 7719-7723, 1995.

STANYIS, V.; WECKMAN, A.; STANIENE, G.; DUCHOVSKIS, P. In vitro induction of polyploidy in japanese quince (*Chaenomeles japonica*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, p. 263-268, 2006.

STOBER, A.; HESS, D. Spike pretreatments, anther culture conditions, and anther culture response of 17 German varieties of spring wheat (*Triticum aestivum*) **Plant Breeding**, v. 116, p. 440-447, 1997.

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

TAMBONG, J.T.; SAPRA, V.T.; GARTON, S. In vitro induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets. **Euphytica**, v. 104, p. 191-197, 1998.

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**, v. 29, p. 353-362, 2006.

TOSCA, A.; PANDOLFI, R.; CITTERIO, S.; FASOLI, A.; SGORBATI, S. Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine and oryzalin in gynogenetic haploids of Gerbera. **Plant Cell Report**, v. 14, p. 455-458, 1995.

TRIBAULT, J. Nuclear DNA amount in pure species and hybrid willows (*Salix*): a flow cytometric investigation. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 157-165, 1998.

URWIN, N.A.R.; HORSNELL, J.; MOON, T. Generation and characterisation of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. **Euphytica**, v. 156, p. 257-266, 2007.

VÄINÖLÄ, A. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. **Euphytica**, v. 112, p. 239-244, 2000.

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

YANG, X.M.; CAO, Z.Y.; AN, L.Z.; WANG, Y.M.; FANG, X.M. 2006. In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Euphytica**, v. 152, p. 217-224, 2006.

YETISIR, H.; SARI, N. A new method for haploid muskmelon (*Cucumis melo* L.) dihaploidization. **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 277-283, 2003.

ZHANG, J; ZHANG, M; DENG, X. Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis*. **Plant Cell and Tissue Organ Culture**, v. 89, n-2-3, p-211-216, 2007.

ZLESAK, D.; THILL, C.A.; ANDERSON, N. Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis minima* (Sims) Voss seedlings. **Euphytica**, v. 141, p. 281-290, 2005.

## CAPÍTULO 2

### ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS ENTRE *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*

## RESUMO

CAMPOS, José Marcello Salabert. Estimativa da quantidade de DNA em híbridos interespecíficos entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*. In:\_\_\_\_\_. **Obtenção de híbridos hexaplóides e análise genômica em *Pennisetum* sp. por citometria de fluxo.** 2007. Cap.2, p.31-49. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

No melhoramento de *Pennisetum*, a hibridação interespecífica entre o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e o milheto (*Pennisetum glaucum*) é uma das alternativas para a obtenção de cultivares superiores. Este híbrido (triplóide) apresenta grande limitação para o seu uso nos programas de melhoramento, que é a infertilidade que leva à necessidade de sua propagação vegetativa. A fertilidade pode ser restaurada por meio da duplicação cromossômica. Essa estratégia torna possível o ingresso dos híbridos hexaplóides nos programas de melhoramento de *Pennisetum*, reunindo características desejáveis nos híbridos e permitindo a sua propagação via sementes. A população hexaplóide Capileto foi desenvolvida pelo programa de melhoramento de *Pennisetum* da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG, Brasil. Contudo, esta população tem apresentado baixa produção e viabilidade de sementes, o que pode estar associado à instabilidade genômica das plantas. O objetivo da realização do presente trabalho foi estimar o conteúdo de DNA e ploidia das plantas da população Capileto por citometria de fluxo. Cento e cinco plantas foram analisadas. Destas, 43 foram determinadas como hexaplóides estáveis. A citometria de fluxo mostrou-se uma ferramenta útil para uma rápida avaliação das plantas. O uso dessas plantas nos programas de melhoramento é um desafio para futuras investigações.

---

Comitê Orientador: Lisete Chamma Davide (Orientadora) – UFPA; Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite

## ABSTRACT

CAMPOS, José Marcello Salabert. DNA content estimation in interspecific hybrids between *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. In:\_\_\_\_\_. **Hexaploids hybrids obtaining and genomic analysis in *Pennisetum sp.* by flow cytometry.** 2007. Chap. 2, p.31-49. Thesis (Doctor of Science in Agronomy/Genetics and Plant Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

In *Pennisetum* breeding, the interspecific hybridization between napiergrass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*) is an alternative to obtain superior cultivars. This hybrid (triploid) presents a great limitation for its use in breeding programs, due to infertility leading to a vegetative propagation. Fertility can be restored through chromosomal duplication. Making possible the use of the hexaploid hybrid in *Pennisetum* breeding programs, redeeming desired traits in hybrids and allowing seeds propagation. The hexaploid Capileto population was developed by the *Pennisetum* breeding program at Embrapa Gado de Leite, in Coronel Pacheco-MG, Brazil. However, this population has been presenting low seeds production and viability, that can be related with genomic instability in the plants. Thus, the objective of the present work was to estimate the DNA content and ploidy of the Capileto plants by flow cytometry. One hundred-five plants were analysed, from which, 43 were determined to be hexaploid. The flow cytometry is a useful tool for rapid screening of plants. The use of these plants in breeding programs offers further challenges for investigations.

---

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

## 1 INTRODUÇÃO

*Pennisetum* é um dos mais importantes gêneros da família Poaceae e as espécies *P. purpureum* (capim-elefante) e *P. glaucum* (milheto) são as mais importantes economicamente, utilizadas como forrageiras (Martel et al., 2004).

O capim-elefante é uma espécie tetraplóide, com  $2n=4x=28$  cromossomos e o milheto uma espécie diplóide, com  $2n=2x=14$  cromossomos (Martel et al., 1996). O melhoramento destas espécies explora a variabilidade existente dentro de cada espécie, entretanto, uma das estratégias utilizadas no melhoramento é a hibridação interespecífica entre o capim-elefante e o milheto. Essa estratégia tem sido recomendada para o melhoramento de qualidade forrageira (Hanna, 1999). Deste cruzamento, resulta um híbrido interespecífico triplóide ( $2n=3x=21$  cromossomos) e estéril. Esta combinação genética procura reunir no híbrido características desejáveis do milheto, tais como qualidade de forragem, tolerância à seca e resistência a doenças, com boas características do capim-elefante (Schank et al., 1993).

A esterilidade desses híbridos triplóides tem limitado o seu emprego nos programas de melhoramento e impossibilitado a obtenção de sementes para a implementação de pastagens economicamente viáveis (Pereira et al., 2001). A restauração da fertilidade desses híbridos permitiria um maior uso dos mesmos nos programas de melhoramento. Essa restauração pode ser alcançada utilizando-se tecnologia citogenética, com a obtenção de materiais com o número cromossômico duplicado via exposição a agentes antimitóticos, tais como a colchicina (Pasakinskiené, 2000). Com a duplicação, obtém-se um híbrido hexaplóide com  $2n=6x=42$  cromossomos.

O programa de melhoramento do capim-elefante desenvolvido pela Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG, vem utilizando híbridos triplóides e hexaplóides induzidos via duplicação cromossômica. A estabilidade

genômica desses híbridos é essencial para o sucesso dos programas de melhoramento. A instabilidade genética e genômica, comumente associadas aos processos de hibridação interespecífica e poliploidização, podem estar associadas a problemas de desenvolvimento e à instabilidade meiótica com, conseqüências para a produção de sementes viáveis (Comai, 2000).

A população de hexaplóides denominada Capileto foi desenvolvida pelo programa de melhoramento da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG. Entretanto, a produção de sementes e a viabilidade das mesmas têm sido baixas para esta população. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a quantidade de DNA e o nível de ploidia de plantas hexaplóides da população Capileto, a fim de selecionar plantas hexaplóides estáveis.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Para a condução dos experimentos, 105 plantas da população Capileto, mantidas no campo experimental da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG, foram selecionadas e identificadas por numeração consecutiva, de C1 até C105. Foram escolhidas as plantas que se destacaram com base no valor forrageiro atribuído ao fenótipo. Esta população foi obtida pela recombinação de populações de plantas hexaplóides e, posteriormente, submetida a três ciclos de seleção. As plantas foram avaliadas quanto à quantidade de DNA e ploidia, por citometria de fluxo.

### 2.2 Citometria de fluxo

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram conduzidas nos Laboratórios de Genética e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para cada planta, três amostras foram avaliadas, com o objetivo de estimar a quantidade de DNA e ploidia em diferentes setores. Para a determinação da quantidade de DNA e ploidia, aproximadamente de 20-30 mg de tecido foliar jovem para cada amostra, juntamente com a mesma quantidade de tecido foliar jovem de *Glycine max* (padrão interno de referência), foram triturados em placa de Petri contendo 1mL de tampão LB01 gelado para a obtenção de suspensão nuclear (Dolezel, 1997). O tecido triturado foi aspirado por meio de duas camadas de gaze e a suspensão nuclear posteriormente filtrada em uma malha de 50 $\mu$ m. À suspensão nuclear foram adicionados 25 $\mu$ L de iodeto de propídio e 2,5 $\mu$ L de RNase. Para cada amostra foram analisados pelo menos 10 mil núcleos.

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), sendo os histogramas obtidos no software Cell Quest e analisados no software

WinMDI 2.8 (disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*Glycine max*). Os próprios valores estimados de quantidade de DNA foram utilizados para prever e estimar a ploidia dos materiais, com quantidades de DNA esperadas para plantas diplóides, triplóides ou tetraplóides estando no intervalo entre 4,45 e 4,75 pg e para plantas hexaplóides, no intervalo entre 9,09 e 9,66 pg (Figura 1).

As plantas foram classificadas nas categorias a seguir:

1) pico G1 predominante na faixa esperada de quantidade de DNA para uma planta diplóide, triplóide ou tetraplóide;

2) pico G1 predominante na faixa esperada de quantidade de DNA para uma planta hexaplóide. Coeficiente de variação pequeno (menor que 1,19%) e suficiente para supor a inexistência da ocorrência de aneuploidias. Baixa frequência de partículas sub-G1, o que diminui a possibilidade de ocorrência de eliminação cromossômica e a existência de aneuploidias nas células;

3) pico G1 predominante na faixa esperada de quantidade de DNA para uma planta hexaplóide. Coeficiente de variação médio ou grande (acima de 1,19%), o que não exclui a possibilidade de existência de aneuploidias. Média ou alta frequências de partículas sub-G1, o que aumenta a possibilidade de ocorrência de eliminação cromossômica e a existência de aneuploidias nas células.

Somente as plantas incluídas na categoria 2 foram selecionadas como hexaplóides.

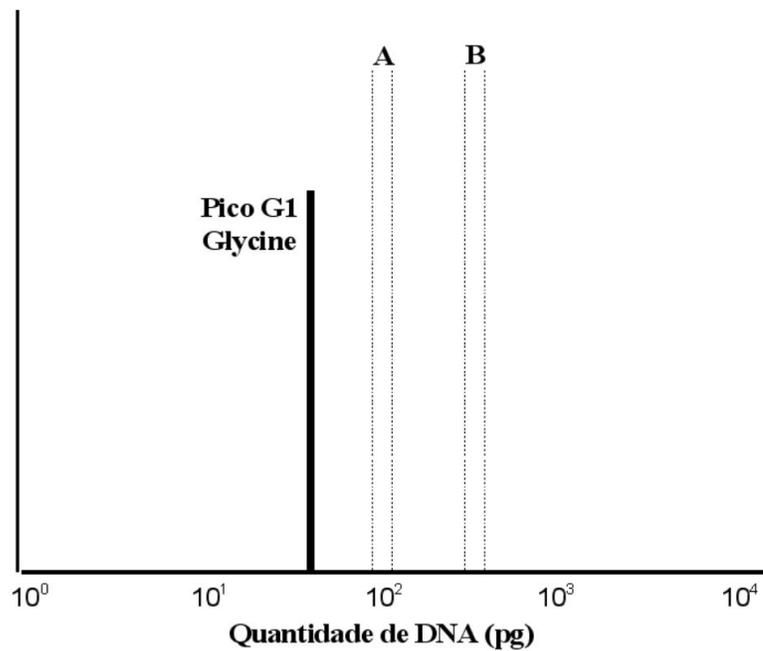


FIGURA 1 O pico G1 do padrão interno de referência (*Glycine max* = 2,50pg de DNA) foi ajustado para o canal 50. Uma planta diplóide, triplóide ou tetraplóide apresenta o seu pico G1 na faixa assinalada por (A), com estimativas da quantidade de DNA entre 4,45 e 4,75pg (entre os canais 89 e 95). Uma planta hexaplóide apresenta o seu pico G1 na faixa assinalada por (B), com estimativas da quantidade de DNA entre 9,09 e 9,66 pg (entre os canais 182 e 193). As posições desses picos na escala logarítmica são demonstradas no histograma.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 105 plantas avaliadas da população Capileto, quanto à quantidade de DNA e ploidia por citometria de fluxo, foram subdivididas em categorias, como mostrado na Figura 2.

Das 105 plantas analisadas, 43 (40,95%) foram identificadas como plantas hexaplóides estáveis (categoria 2). O critério utilizado para esta classificação foi a detecção da maioria dos núcleos dentro do pico G1 das amostras da planta, com uma estimativa da quantidade de DNA dentro da faixa entre 9,09 e 9,66 pg (esperado para uma planta hexaplóide). Adicionalmente, foram consideradas como plantas hexaplóides somente aquelas com picos G1 com coeficientes de variação abaixo de 1,19%, valor que permite supor a inexistência da ocorrência de aneuploidias (células com variação na quantidade de cromossomos). Esse critério é postulado por Dolezel (1997) e baseia-se no percentual médio de cada cromossomo para a quantidade total de DNA. Como uma planta hexaplóide híbrida entre capim-elefante e milho apresenta 42 cromossomos, a contribuição média de cada cromossomo é de 2,38% para a quantidade total de DNA. Se se trabalhasse com picos G1 com coeficientes de variação acima de 2,38%, a perda de um único cromossomo não seria detectada, uma vez que a redução de quantidade de DNA devido a esta perda cairia dentro do próprio coeficiente de variação do pico G1 (Dolezel, 1997).

Trabalhando com a metade da contribuição média de cada cromossomo ( $2,38\%/2 = 1,19\%$  de coeficiente de variação para os picos G1), a perda de um único cromossomo seria detectada pela presença de dois picos justapostos, representando as duas subpopulações celulares com essas variações nas quantidades de DNA (Figura 3).

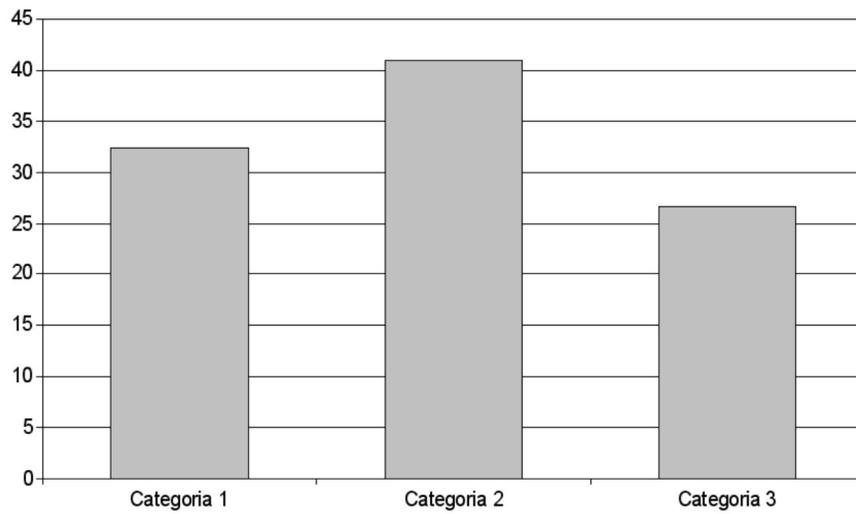


FIGURA 2 Percentual de plantas da população Capileto nas 3 categorias (1 – plantas diplóides, triplóides ou tetraplóides; 2 – plantas hexaplóides com reduzida chance de ocorrência de aneuploidias; 3 – plantas hexaplóides, mas com possibilidade de ocorrência de aneuploidias).

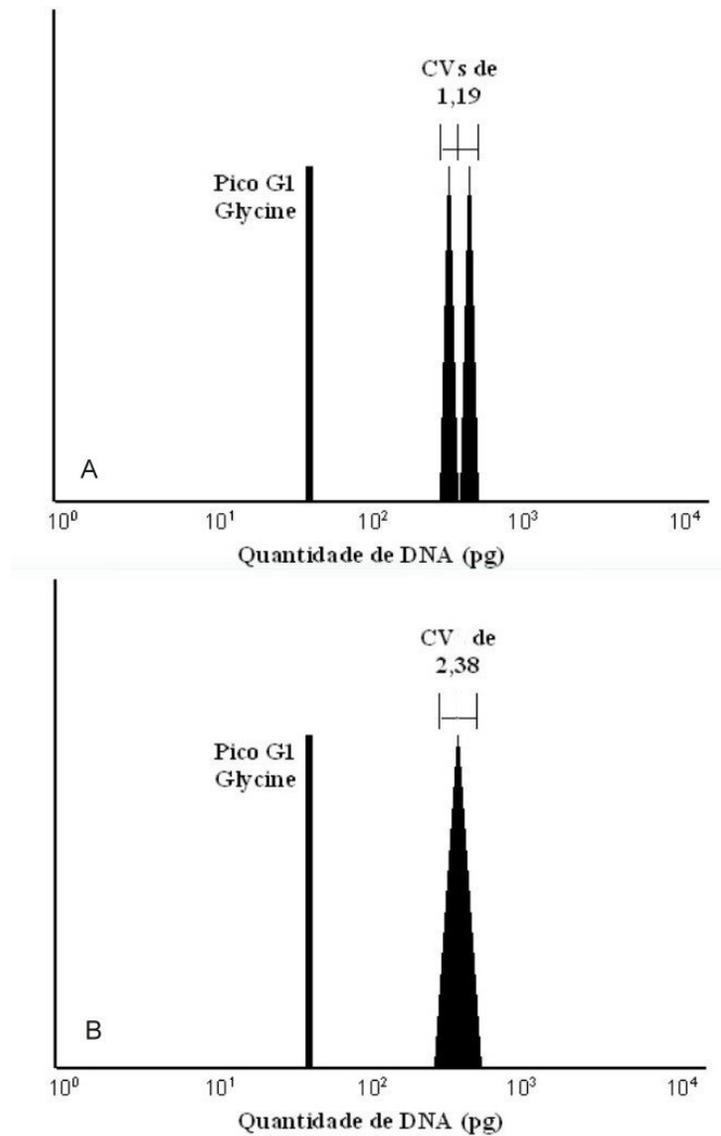


FIGURA 3 Coeficientes de variação em híbridos hexaplóides. Em (A), a presença de dois picos com CVs de 1,19% permite a separação de duas subpopulações celulares com diferenças em apenas um cromossomo ( $2n$  e  $2n-1$ ). Em (B), a presença de um pico com CV de 2,38% não permite a separação das duas subpopulações celulares com diferenças em apenas um cromossomo ( $2n$  e  $2n-1$ ).

Dentro desse critério foram selecionadas 43 plantas hexaplóides (Tabela 1).

TABELA 1 Estimativas das quantidades de DNA para as plantas hexaplóides selecionadas pela análise de citometria de fluxo

Planta	Médias das amostras	Média dos CVs	Planta	Média das amostras	Média dos CVs
C3	9,22	1,13	C65	9,19	0,85
C6	9,17	1,08	C68	9,35	1,07
C8	9,31	1,09	C69	9,28	1,12
C10	9,57	1,15	C70	9,41	1,15
C13	9,30	1,08	C73	9,42	1,13
C14	9,17	1,02	C75	9,26	1,14
C15	9,19	1,07	C76	9,40	1,05
C16	9,39	1,08	C77	9,25	1,14
C17	9,44	1,11	C78	9,27	1,14
C18	9,40	1,14	C80	9,44	1,13
C20	9,30	1,10	C83	9,44	1,17
C30	9,17	1,08	C85	9,32	1,14
C32	9,41	1,06	C87	9,34	1,06
C33	9,39	1,06	C89	9,48	0,99
C44	9,47	1,04	C90	9,18	1,10
C45	9,21	1,06	C92	9,19	0,97
C47	9,21	1,10	C93	9,26	1,05
C51	9,32	1,11	C94	9,16	0,98
C57	9,21	1,06	C98	9,31	0,99
C59	9,40	1,06	C104	9,35	0,96
C61	9,32	1,06	C105	9,18	1,12
C64	9,33	0,98			

As estimativas de quantidade de DNA, considerando a média das três amostras analisadas, variaram entre 9,17 a 9,57pg. Esses resultados estão em concordância com o esperado para a quantidade de DNA de um híbrido hexaplóide entre capim-elefante e milheto, considerando as estimativas de quantidade de DNA descritas por Martel et al. (1997). Segundo estes autores, o capim-elefante apresenta quantidade de DNA de 4,59pg e o milheto de 4,71pg. O híbrido triplóide deveria ter a média entre os parentais, ou 4,65pg, com uma previsão de quantidade de DNA após duplicação cromossômica de 9,30pg.

A variação observada entre 9,17 e 9,57pg para as plantas da população Capileto pode ser explicada por pequenas variações na quantidade de DNA nos parentais (capim-elefante e milheto), uma vez que os materiais analisados por Martel et al. (1997) não são os mesmos analisados neste trabalho. Essas diferenças na quantidade de DNA entre genótipos, populações, linhagens ou cultivares dentro de uma espécie são comuns (Dolezel, 1997). Como não se dispunha das plantas parentais utilizadas nos cruzamentos para a obtenção da população Capileto, não foi possível prever a quantidade exata de DNA esperada para cada planta. Adicionalmente, essa variação pode ser devido a rearranjos genômicos, que comumente ocorrem após eventos de hibridação e poliploidia (Riddle & Birchler, 2003), ou a variações inerentes à própria técnica de citometria de fluxo.

Um exemplo de histograma para uma planta hexaplóide é mostrado na Figura 4.

Para algumas plantas hexaplóides, incluídas na categoria 3, foi observada a existência de vários picos justapostos na faixa esperada para uma planta hexaplóide. Essa observação permitiu supor a existência de células com aneuploidias (variação no número cromossômico) (Figura 5).

Os resultados demonstraram a eficiência da citometria de fluxo na análise rápida de um grande número de plantas para a determinação da quantidade de DNA e ploidia.

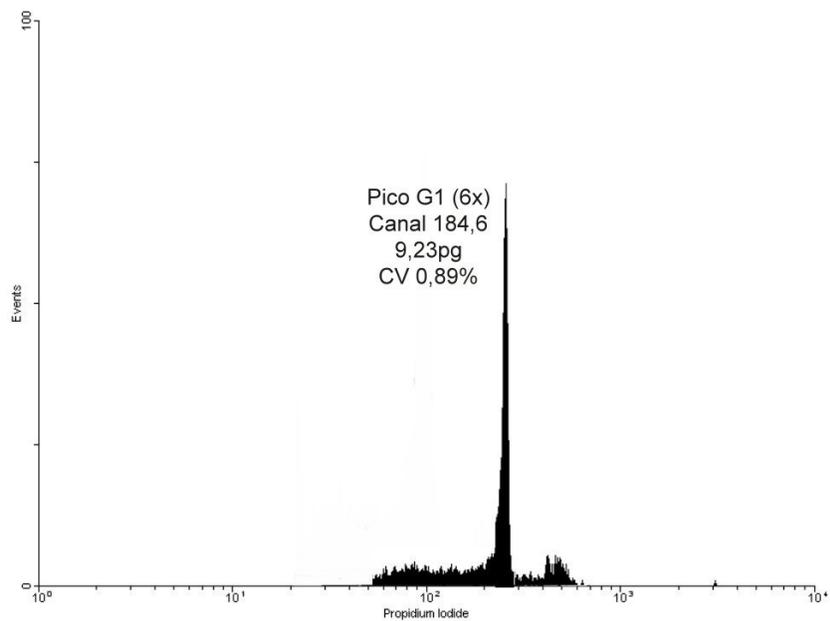


FIGURA 4 Histograma de citometria de fluxo da planta C64. O pico G1 (núcleos 6x) está localizado no canal 184,6, com uma estimativa de quantidade de DNA de 9,23pg (coeficiente de variação = 0,89%). Note a presença de núcleos 12x localizados à frente do pico G1, representando núcleos em G2/M.

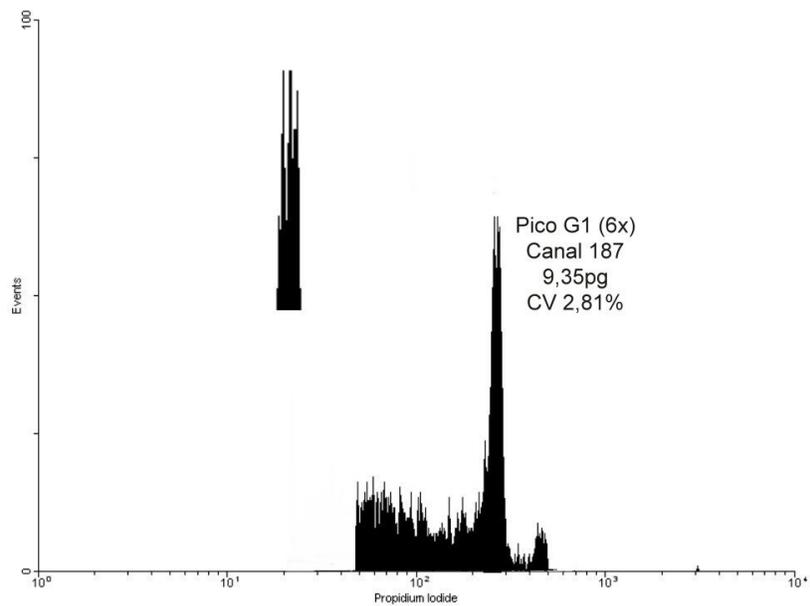


FIGURA 5 Histograma de citometria de fluxo da planta C71. O pico G1 (núcleos 6x) localiza-se na faixa esperada para uma planta hexaplóide (canal 187 = 9,35pg). Entretanto, pode-se observar, no detalhe, a presença de três picos justapostos, provavelmente como diagnóstico da presença de aneuploidias. O coeficiente de variação desse pico foi de 2,81%. Note a presença de um grande número de partículas sub-G1.

Os resultados demonstraram a eficiência da citometria de fluxo na análise rápida de um grande número de plantas para a determinação da quantidade de DNA e ploidia. A análise das 105 plantas foi realizada em somente dois dias de trabalho, demonstrando o potencial da técnica de ser utilizada em larga escala. Uma boa qualidade dos resultados, evidenciada pelos baixos coeficientes de variação (CVs) dos picos G1, possibilitou a seleção de plantas hexaplóides sem a ocorrência de aneuploidias e, em alguns casos, foi possível demonstrar a ocorrência de aneuploidia.

Marie & Brown (1993) chamam a atenção para a importância dos valores de coeficientes de variação para uma boa estimativa da quantidade de DNA. Segundo estes autores, este é um critério elementar para aceitação dos resultados obtidos e coeficientes de variação entre 1%-2% são apontados como resultados de alta qualidade e em torno de 3% como rotina. Galbraith et al. (1983) definem um coeficiente de variação abaixo de 5% como um critério de aceitação para publicações internacionais. Diante desses critérios, os coeficientes de variação obtidos neste trabalho demonstram a qualidade dos resultados obtidos e confiabilidade nas estimativas de quantidade de DNA e ploidia para as plantas da população Capileto.

As 43 plantas selecionadas foram plantadas em uma área experimental isolada na Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, em novembro de 2007, onde serão recombinadas para a obtenção de uma nova população.

A partir de março de 2008 (época de florescimento das plantas), as mesmas serão analisadas por citometria de fluxo para estimar a quantidade de DNA em grãos de pólen e em células meióticas. Adicionalmente, análise meiótica das plantas por citogenética será realizada. Com essas análises, pretende-se estudar o comportamento meiótico dessas plantas, correlacionando-se esses resultados com a produção de sementes das plantas.

#### **4 CONCLUSÕES**

- A citometria de fluxo foi eficiente na análise genômica em híbridos entre capim-elefante e milheto, com a obtenção de resultados com alta qualidade (coeficientes de variação abaixo de 1,19%).
- Os resultados permitiram a seleção de 43 plantas hexaplóides, com ausência de variação na quantidade de DNA entre suas células.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COMAI, L. Genetic and epigenetic interaction in allopolyploid plants. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 387-399, 2000.

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

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

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

MARIE, D., BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biol Cell**, v. 78, p. 41-51, 1993.

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

MARTEL, E.; DE NAY, D.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S.; SARR, A. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **Journal of Heredity**, v. 88, 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**, v. 39, p. 680-687, 1996.

PASAKINSKIENÉ, I. Culture of embryos and shoot tips for chromosome doubling in *Lolium perene* and sterile hybrids between *Lolium* and *Festuca*. **Plant Breeding**, v. 119, p. 185-187, 2000.

PEREIRA, A.V.; VALLE, C.B.; FERREIRA, R.P., MILLES, J.W.  
Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.,  
MELO, I.S., VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e  
melhoramento de plantas**. Cuiabá. Fundação Mato Grosso, 2001. 1183p.

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

SCHANK, S.C.; DIZ, D.A.; BATES, D.B.; THOMPSON, K.E. Genetic  
improvement of napiergrass and hybrids with pearl millet. **Biomass and  
Bioenergy**, v. 5, p. 35-40, 1993.

## CAPÍTULO 3

### DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA *IN VITRO* DE HÍBRIDOS TRIPLÓIDES ENTRE *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum* E MUDANÇAS GENÔMICAS ASSOCIADAS À HIBRIDAÇÃO

## RESUMO

CAMPOS, José Marcello Salabert. Duplicação cromossômica *in vitro* de híbridos triplóides entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*. **In:\_\_\_\_\_Obtenção de híbridos hexaplóides e análise genômica em *Pennisetum sp.* por citometria de fluxo.** 2007. Cap. 3, p.50-80. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Este capítulo descreve um método eficiente de duplicação cromossômica *in vitro* via exposição à colchicina de *seedlings* triplóides de híbridos entre *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) e *Pennisetum glaucum* (milheto), para a produção de híbridos hexaplóides e sua identificação com citometria de fluxo. Empregou-se também análise citogenética e de características estomáticas para análise de ploidia das plantas. Quatrocentos e oitenta explantes triplóides, representando 12 diferentes híbridos, foram esterilizados e transferidos para meio MS contendo colchicina para a indução de duplicação cromossômica. As plantas sobreviventes foram analisadas por citometria de fluxo. Tamanho e frequência dos estômatos foram analisados em todas as plantas identificadas como hexaplóides pela citometria de fluxo e comparados com os de seis plantas triplóides (utilizadas como controle). Análise citogenética foi realizada somente nas plantas identificadas como hexaplóides. Dezesete plantas foram identificadas como hexaplóides pela análise de citometria de fluxo e a confirmação dessa ploidia foi realizada posteriormente pela análise citogenética ( $2n=42$  cromossomos) e pelas características estomáticas. Duplicação cromossômica apresenta uma série de aplicações no melhoramento de *Pennisetum*, como a restauração da fertilidade dos híbridos e aumento no tamanho de sementes de híbridos hexaplóides. Mudanças genômicas associadas aos eventos de hibridação interespecífica e alopoliploidização são discutidas.

---

Comitê Orientador: Lisete Chamma Davide (Orientadora) – UFLA; Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite.

## ABSTRACT

CAMPOS, José Marcello Salabert. Chromosome doubling *in vitro* of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* hybrids. **In: \_\_\_\_\_ Hexaploids hybrids obtaining and genomic analysis in *Pennisetum* sp. by flow cytometry.** 2007. Chap. 3, p.50-80. Thesis (Doctor of Science in Agronomy/Genetics and Plant Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

This chapter describes an efficient *in vitro* method using colchicine-treated triploid *seedlings* of hybrids of napiergrass and pearl millet to produce hexaploid hybrids and their subsequent identification with flow cytometry. It also describes chromosome counting and stomatal morphology used for ploidy plant analysis. Four hundred-eighty triploid explants, representing 12 different hybrids were sterilized and transferred to MS medium to induce chromosome doubling. Surviving plants were analyzed by flow cytometry. From six triploid (controls) and hexaploid plants, the stomata sizes and frequency were analyzed. Chromosome counting was performed only in the plants identified as hexaploids. Seventeen plants were determined to be hexaploids by flow cytometry analysis. Further confirmation of the hexaploid condition was performed with stomatal morphology (stomatal frequency reduction and stomatal length increase in hexaploid plants) and chromosome counting ( $2n=6x=42$ ). Chromosome doubling has numerous applications in the breeding of *Pennisetum*. It can be used to restore fertility of interespecific hybrids and to improve seed size. Genomic changes associated with interespecific hybridization and allopolyploidization are discussed.

---

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

## 1 INTRODUÇÃO

*Pennisetum* é um dos mais importantes gêneros da família Poaceae e as espécies *P. purpureum* (capim-elefante) e *P. glaucum* (milheto) são as mais importantes economicamente, utilizadas como forrageiras (Martel et al., 2004).

O capim-elefante é uma espécie tetraplóide, com  $2n=4x=28$  cromossomos e o milheto uma espécie diplóide, com  $2n=2x=14$  cromossomos (Martel et al., 1996). O melhoramento destas forrageiras explora a variabilidade existente dentro de cada espécie, entretanto, uma das estratégias utilizadas no melhoramento é a hibridação interespecífica entre o capim-elefante e o milheto. Essa estratégia tem sido recomendada para o melhoramento de qualidade forrageira (Hanna, 1999). Deste cruzamento, resulta um híbrido interespecífico triplóide ( $2n=3x=21$  cromossomos) e estéril. Esta combinação genética procura reunir no híbrido características desejáveis do milheto, tais como qualidade de forragem, tolerância à seca e resistência a doenças, com boas características do capim-elefante (Schank et al., 1993).

A esterilidade desses híbridos triplóides tem limitado o seu emprego nos programas de melhoramento e impossibilitado a obtenção de sementes para implementação de pastagens economicamente viáveis (Pereira et al., 2001). A restauração da fertilidade desses híbridos permitiria um maior uso dos mesmos nos programas de melhoramento. Essa restauração pode ser alcançada utilizando-se de tecnologia citogenética, com a obtenção de materiais com o número cromossômico duplicado via exposição a agentes antimitóticos, tais como a colchicina (Pasakinskiené, 2000). A colchicina é um alcalóide extensivamente utilizado para duplicação cromossômica e para a indução de poliploidia em plantas (Pasakinskiené, 2000). A técnica de exposição de explantes *in vitro* à colchicina para duplicação cromossômica tem sido utilizada em vários trabalhos (Pasakinskiene, 2000; Kadota & Niimi, 2002; Abreu et al.,

2006; Barbosa et al., 2007; Zhang et al., 2007).

A citogenética e a análise de características estomáticas têm sido usadas para análise de ploidia. Contudo, estes métodos dificultam a avaliação de um grande número de plantas e consomem tempo. A citometria de fluxo representa um ganho tecnológico e tem sido rotineiramente utilizada na análise de ploidia em larga escala, em um grande número de trabalhos (Roy et al., 2001).

Neste capítulo descreve-se um método eficiente de exposição à colchicina *in vitro* de *seedlings* triplóides de híbridos entre capim-elefante e milho para a produção de híbridos hexaplóides e sua identificação por meio da citometria de fluxo. Análise citogenética e de características estomáticas também foi utilizada como método de confirmação de ploidia.

Adicionalmente, a ocorrência de eliminação de seqüências genômicas como mecanismo de resposta após hibridação interespecífica e poliploidia foi avaliada e discutida.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Os híbridos utilizados na condução dos experimentos foram escolhidos com base em uma análise dialélica entre parentais de capim-elefante e milheto (Daher, 2003). Foram escolhidos os híbridos com melhores desempenhos para as características avaliadas. Os cruzamentos para a obtenção dos híbridos foram conduzidos na Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG.

A relação dos híbridos utilizados nos experimentos é mostrada na Tabela 1. Doze híbridos foram utilizados nos experimentos.

TABELA 1 Híbridos entre capim-elefante e milheto utilizados nos experimentos de duplicação cromossômica

Híbridos	Capim-elefante (parental)	Milheto (parental)
1	F94/17	M-36
2	91/27-5	M-31
3	BAG-27	M-36
4	BAG-65	M-35
5	GAG-19	M-59
6	BAG-75	M-59
7	BAG-64	M-64
8	94-7-1	M-40
9	91-2-5	M-29
10	94-28-3	M-27
11	94-9-1	M-27
12	91/25-5	M-31

## **2.2 Estimativa da quantidade de DNA para os parentais e híbridos triplóides**

A quantidade de DNA foi determinada por citometria de fluxo (ver metodologia, ítem 2.4) para os híbridos envolvidos nos experimentos de indução de duplicação cromossômica, para cinco parentais de capim-elefante (BAG 27, BAG 65, BAG 19, BAG 75 e BAG 64) e para todos os parentais de milheto.

Para os híbridos triplóides e os parentais de milheto, foram utilizados, para análise de citometria de fluxo, tecidos foliares, obtidos a partir de germinação de sementes em placa de Petri. Para os parentais de capim-elefante foram utilizados tecidos radiculares obtidos a partir de enraizamento de estacas. Para cada material analisado, foram avaliados 3 indivíduos (3 plantas) e 3 amostras por indivíduo. Análise de variância e o teste de Scott e Knott ( $p < 0,05$ ) foram empregados para estimar significâncias entre os híbridos, entre parentais do capim-elefante e entre os parentais do milheto.

## **2.3 Experimentos de duplicação cromossômica *in vitro***

Os experimentos de duplicação cromossômica foram conduzidos nos Laboratórios de Citogenética e Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras. As sementes triplóides foram esterilizadas em álcool etílico 70%, por 1 minuto e solução de hipoclorito de sódio:água (1:1), por 15 minutos, sendo posteriormente lavadas em 3 baterias de água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS.

*Seedlings* com 60 dias de cultivo *in vitro* foram selecionados para os tratamentos de indução de duplicação cromossômica. A parte aérea, 1,5cm acima do coleto, foi cortada, assim como o sistema radicular, 2,0cm abaixo, constituindo o explante que foi submetido ao tratamento com colchicina. Os explantes foram mergulhados até a altura do coleto, em soluções de colchicina 0,10%, por 24 horas (Barbosa et al., 2007). Para cada híbrido, foram tratados 40 explantes. Após os tratamentos com colchicina, os explantes foram lavados em 3

baterias de água destilada autoclavada e inoculados em meio MS livre de colchicina. Após 60 dias de cultivo *in vitro*, as plantas sobreviventes foram aclimatadas até sua manutenção final em vasos acondicionados em casa de vegetação. A análise de ploidia das plantas obtidas foi realizada por meio de citometria de fluxo (ver metodologia, item 2.4), em plantas com idade de 6 a 8 meses. Para a confirmação de ploidia foi utilizada ainda a análise citogenética e de características estomáticas (ver metodologia, item 2.5).

#### **2.4 Citometria de fluxo**

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram conduzidos nos Laboratórios de Genética e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para a determinação da quantidade de DNA e ploidia, aproximadamente 20-30 mg de tecido foliar jovem para cada amostra, juntamente com a mesma quantidade de tecido foliar jovem de *Glycine max* (padrão interno de referência), foram triturados em placa de Petri contendo 1mL de tampão LB01 gelado para a obtenção de suspensão nuclear (Dolezel, 1997). O tecido triturado foi aspirado através de duas camadas de gaze e a suspensão nuclear posteriormente filtrada em uma malha de 50µm. À suspensão nuclear foram adicionados 25µL de iodeto de propídio e 2,5µL de RNase. Para cada amostra foram analisados pelo menos 10 mil núcleos.

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), sendo os histogramas obtidos no software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.8 (disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*Glycine max*) como mostrado a seguir:

$$\text{Amostra (planta) DNA 2C (pg)} = \frac{\text{Canal do pico G1 da amostra}}{\text{Canal do pico G1 do padrão}} \times \text{Conteúdo de DNA padrão (2,50pg)}$$

Para as plantas identificadas como hexaplóides, seis amostras adicionais foram analisadas, com o objetivo de analisar diferentes setores foliares da planta.

Para a confiabilidade dos resultados de citometria foram utilizados somente histogramas com coeficientes de variação abaixo de 3% (Dolezel, 1997).

## 2.5 Análise citogenética e de características estomáticas

As análises foram conduzidas nos Laboratórios de Citogenética da Universidade Federal de Lavras e Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para a análise citogenética das plantas hexaplóides identificadas pela citometria de fluxo, estacas coletadas das mesmas foram expostas a soluções aquosas para enraizamento. As raízes foram tratadas em solução de 8-hidroxiquinoleína 0,002M, por 8 horas, em temperatura de 4°C, posteriormente lavadas em água destilada e fixadas em solução de ácido acético : metanol (1:3). As lâminas foram preparadas pela técnica de secagem ao ar, com maceração enzimática das raízes em Pectinase 20%:celulase 2% por 5 horas e hidrolisadas em HCl, a 60°C, por 10 minutos. Após o preparo, as lâminas foram coradas com Giemsa.

Para a análise cariotípica das metáfases com 42 cromossomos, foram utilizadas medidas de comprimento relativo dos cromossomos, como mostrado abaixo, sendo essas medidas obtidas para cada par cromossômico:

$$\text{Comprimento relativo do braço curto} = \frac{\text{Comprimento do braço curto}}{\text{Comprimento total do lote haplóide}}$$

$$\text{Comprimento relativo do braço longo} = \frac{\text{Comprimento do braço longo}}{\text{Comprimento total do lote haplóide}}$$

$$\text{Comprimento relativo do cromossomo} = \frac{\text{Comprimento do cromossomo}}{\text{Comprimento total do lote haplóide}}$$

As características estomáticas (tamanho e frequência de estômatos) foram avaliadas para as plantas previamente identificadas como hexaplóides pela citometria de fluxo e para seis plantas triplóides obtidas via germinação de sementes triplóides (controle).

## **2.6 Quantificação de DNA por citometria de fluxo em híbridos triplóides com identificação de parentais para avaliação de eliminação de DNA**

Um experimento adicional foi realizado para avaliar a ocorrência de eliminação de seqüências de DNA após a hibridação entre materiais de capim-elefante e milheto. Com este objetivo, foram realizados cruzamentos recíprocos entre os materiais 91-2-5 (capim-elefante) x M-60 (milheto) e 93-4-2 (capim-elefante) x M-27 (milheto). As quantidades de DNA foram estimadas para as plantas parentais e para dez plantas (de cada tipo de cruzamento) obtidas por germinação de sementes triplóides. As quantidades de DNA das plantas híbridas triplóides foram comparadas com o esperado para cada híbrido, de acordo com a média da quantidade de DNA entre as plantas parentais. Análise de variância foi empregada para a comparação entre as médias esperadas e observadas. O esquema utilizado para comparar as quantidades de DNA estimadas por citometria de fluxo é demonstrado a seguir (foram utilizados os dados do cruzamento ♀ 91-2-5 X ♂ M-60 para exemplificar).

O valor de 4,64 (valor esperado para o híbrido) foi comparado com o valor observado para o híbrido a partir da análise de 9 plantas híbridas (divididas em 3 repetições de 3 plantas).

Planta parental capim-elefante (3 repetições obtidas da média de 3 análises)	X	Planta parental milheto (3 repetições obtidas da média de 3 análises)	-----> Esperado para o híbrido
Rep 1 – 4,54		Rep 1 – 4,70	-----> $(4,54 + 4,70)/2 = 4,62$
Rep 2 – 4,57		Rep 2 – 4,73	-----> $(4,57 + 4,73)/2 = 4,65$
Rep 3 – 4,57		Rep 3 – 4,73	-----> $(4,57 + 4,73)/2 = 4,65$
Média – 4,56		Média – 4,72	Média = 4,64

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As quantidades de DNA estimadas pela citometria de fluxo para os parentais de capim-elefante e milheto são mostradas na Tabela 2. A média de quantidade de DNA para os parentais de capim-elefante foi de  $4,54 \pm 0,021$  pg e, para os parentais de milheto, foi de  $4,75 \pm 0,017$  pg, não havendo diferenças estatísticas entre os parentais, para ambas as espécies (Scott e Knott,  $p < 0,05$ ).

TABELA 2 Quantidades de DNA (pg) para os parentais de capim-elefante e milheto

Parentais capim-elefante	Indivíduos			Média dos indivíduos (pg)	Coeficiente de variação médio
	1	2	3		
BAG-27	4,53	4,50	4,52	4,52 <sup>a</sup>	2,31
BAG-65	4,52	4,58	4,61	4,57 <sup>a</sup>	1,29
BAG-19	4,52	4,59	4,49	4,53 <sup>a</sup>	1,98
BAG-75	4,52	4,47	4,56	4,52 <sup>a</sup>	2,21
BAG-64	4,57	4,53	4,52	4,54 <sup>a</sup>	2,11
Parentais milheto	Indivíduos			Média dos indivíduos (pg)	Coeficiente de variação médio
	1	2	3		
M-36	4,75	4,74	4,75	4,75 <sup>a</sup>	1,98
M-31	4,78	4,77	4,79	4,78 <sup>a</sup>	2,27
M-35	4,72	4,75	4,76	4,74 <sup>a</sup>	2,34
M-59	4,77	4,78	4,70	4,75 <sup>a</sup>	2,45
M-64	4,71	4,71	4,74	4,72 <sup>a</sup>	2,21
M-40	4,72	4,74	4,78	4,75 <sup>a</sup>	2,34
M-29	4,78	4,75	4,75	4,76 <sup>a</sup>	2,56
M-27	4,75	4,70	4,78	4,74 <sup>a</sup>	2,35

\*Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Martel et al. (1997), que haviam descrito quantidades de DNA para o capim-elefante e o milho de 4,59 e 4,71pg, respectivamente. Exemplos de histogramas de citometria de fluxo obtidos para os parentais de capim-elefante e milho, são mostrados na Figura 1.

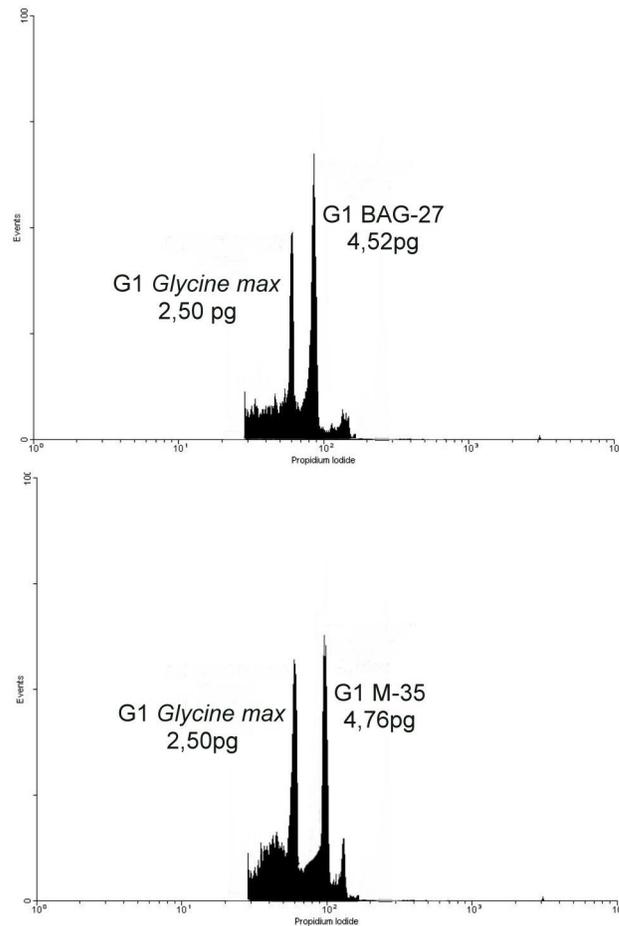


FIGURA 1 Quantidade de DNA dos parentais BAG-27 (capim-elefante) e M-35 (milho). O pico G1 de *Glycine max* foi ajustado para o canal 50. O pico G1 do BAG-27 posicionou-se no canal 90,6 (4,53pg) e o pico G1 do M-35 no canal 95 (4,75pg).

As quantidades de DNA dos híbridos triplóides são mostradas na Tabela 3 e variaram entre 4,48 e 4,55 pg de DNA, não existindo diferença estatística entre os híbridos (Scott e Knott,  $p < 0,05$ ).

Para os cinco híbridos triplóides nos quais foi possível prever a quantidade de DNA como a média dos parentais, essas quantidades estão abaixo do esperado (Tabela 4). A redução foi, em média, de 0,13pg (2,8%). Entretanto, as plantas dos parentais analisadas não foram as mesmas utilizadas nos cruzamentos e diferenças na quantidade de DNA entre plantas podem ter sido responsáveis por essa diferença entre o esperado e o observado, além de variações inerentes à própria técnica de citometria de fluxo.

TABELA 3 Quantidades de DNA (pg) para os híbridos triplóides utilizados nos experimentos de duplicação cromossômica

Híbrido		Indivíduos			Média dos indivíduos (pg)	Coeficiente de variação médio
Capim-elefante	Milheto	1	2	3		
F94/17	M-36	4,49	4,50	4,50	4,50 <sup>a</sup>	1,23
91/27-5	M-31	4,51	4,52	4,50	4,51 <sup>a</sup>	1,21
BAG-27	M-36	4,48	4,54	4,51	4,51 <sup>a</sup>	1,56
BAG-65	M-35	4,47	4,48	4,52	4,49 <sup>a</sup>	1,78
BAG-19	M-59	4,53	4,52	4,53	4,53 <sup>a</sup>	2,11
BAG-75	M-59	4,48	4,50	4,45	4,48 <sup>a</sup>	1,79
BAG-64	M-64	4,62	4,52	4,51	4,55 <sup>a</sup>	1,89
94-7-1	M-40	4,52	4,52	4,56	4,53 <sup>a</sup>	1,54
91-2-5	M-29	4,48	4,49	4,54	4,50 <sup>a</sup>	2,23
94-28-3	M-27	4,53	4,46	4,52	4,50 <sup>a</sup>	2,56
94-9-1	M-27	4,52	4,47	4,52	4,50 <sup>a</sup>	2,43
91/25-5	M-31	4,50	4,52	4,52	4,51 <sup>a</sup>	1,11

\* As médias entre híbridos (na vertical), seguidas por uma mesma letra, não diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

TABELA 4 Previsão das estimativas de quantidade de DNA dos híbridos triplóides, segundo a média dos parentais envolvidos nos cruzamentos X estimativas das quantidades de DNA dos híbridos triplóides

Parentais (capim- elefante x milheto)	Quantidades de DNA (pg)	Previsão da quantidade de DNA dos híbridos (pg)	Quantidade de DNA (pg) observada para os híbridos	Redução na quantidade de DNA em relação ao esperado
BAG-27	4,52			
M-36	4,75	4,64	4,51	0,13pg (2,8%)
BAG-65	4,57			
M-35	4,74	4,66	4,49	0,17pg (3,6%)
BAG-19	4,53			
M-59	4,75	4,64	4,53	0,11pg (2,4%)
BAG-75	4,52			
M-59	4,75	4,64	4,48	0,16pg (3,4%)
BAG-64	4,54			
M-64	4,72	4,63	4,55	0,08pg (1,7%)

Para os 480 explantes tratados, 200 plantas sobreviventes foram recuperadas e avaliadas por citometria de fluxo (Tabela 5). Destas, 17 plantas foram determinadas como hexaplóides (8,5%), 115 como mixoplóides (57,5%) e 68 como triplóides (34%) (Tabela 5).

A análise complementar de seis amostras para as plantas determinadas como hexaplóides confirmou esta condição para os diferentes setores foliares dentro de cada planta.

Pelos dados da Tabela 6 é possível observar a distribuição de células com diferentes ploidias nos três grupos de plantas (triplóides, mixoplóides e hexaplóides). As plantas triplóides apresentam um pequeno percentual de núcleos com a quantidade 6x de DNA, que representam os núcleos no final da

fase S ou na fase G2 do ciclo celular. Similarmente, os mixoplóides e os hexaplóides apresentam um pequeno percentual de núcleos com a quantidade 12x de DNA (Tabela 6). Os hexaplóides foram recuperados em 9 dos 12 híbridos utilizados nos experimentos de indução de duplicação cromossômica (Tabela 5).

TABELA 5 Plantas hexaplóides induzidas a partir de híbridos triplóides de capim-elefante e milheto após tratamento com colchicina

Híbridos		Explantos tratados	Sobrevivência de explantes (%)	Plantas recuperadas		
Capim-elefante	Milheto			Triplóides	Mixoplóides	Hexaplóides
F94/17	M-36	40	22 (55%)	10 (45,5%)	11 (50,0%)	1 (4,5%)
91/27-5	M-31	40	24 (60%)	8 (33,3%)	14 (58,3%)	2 (8,3%)
BAG-27	M-36	40	18 (45%)	5 (27,8%)	13 (72,2%)	0 (0,0%)
BAG-65	M-35	40	17 (42,5%)	6 (35,3%)	10 (58,8%)	1 (5,9%)
GAG-19	M-59	40	20 (50%)	12 (60,0%)	7 (35,0%)	1 (5,0%)
BAG-75	M-59	40	11 (27,5%)	3 (27,3%)	7 (63,6%)	1 (9,1%)
BAG-64	M-64	40	2 (5%)	2 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
94-7-1	M-40	40	13 (32,5%)	10 (76,9%)	1 (7,7%)	2 (15,4%)
91-2-5	M-29	40	24 (60%)	7 (29,2%)	14 (58,3%)	3 (12,5%)
94-28-3	M-27	40	16 (40%)	2 (12,5%)	12 (75,0%)	2 (12,5%)
94-9-1	M-27	40	7 (17,5%)	2 (28,6%)	5 (71,4%)	0 (0,0%)
91/25-5	M-31	40	26 (65%)	1 (3,8%)	21 (80,8%)	4 (15,4%)

TABELA 6 Distribuição de células com diferentes ploidias nos três grupos de plantas (triplóides, mixoplóides e hexaplóides) avaliadas por citometria de fluxo

	Sub-G1	Núcleos 3x	Núcleos 6x	Núcleos 12x
Triplóides	14,0%	70,2%	15,8%	0%
Mixoplóides	11,2%	49,8%	31,2%	7,8%
Hexaplóides	17,6%	0%	68,9%	12,5%

O maior percentual de sobrevivência dos explantes tratados (65%) e de recuperação de hexaplóides (15,4%) foi observado para o híbrido 91/25-5 (capim-elefante) X M-31 (milheto).

Exemplos de histogramas de citometria de fluxo representativos para plantas triplóides, mixoplóides e hexaplóides são mostrados na Figura 2. A confirmação de ploidia das plantas identificadas como hexaplóides pela citometria de fluxo foi realizada por meio de análise de características estomáticas (tamanho e frequência de estômatos). Diferenças significativas para essas características foram observadas entre as plantas hexaplóides e triplóides (Tabela 7).

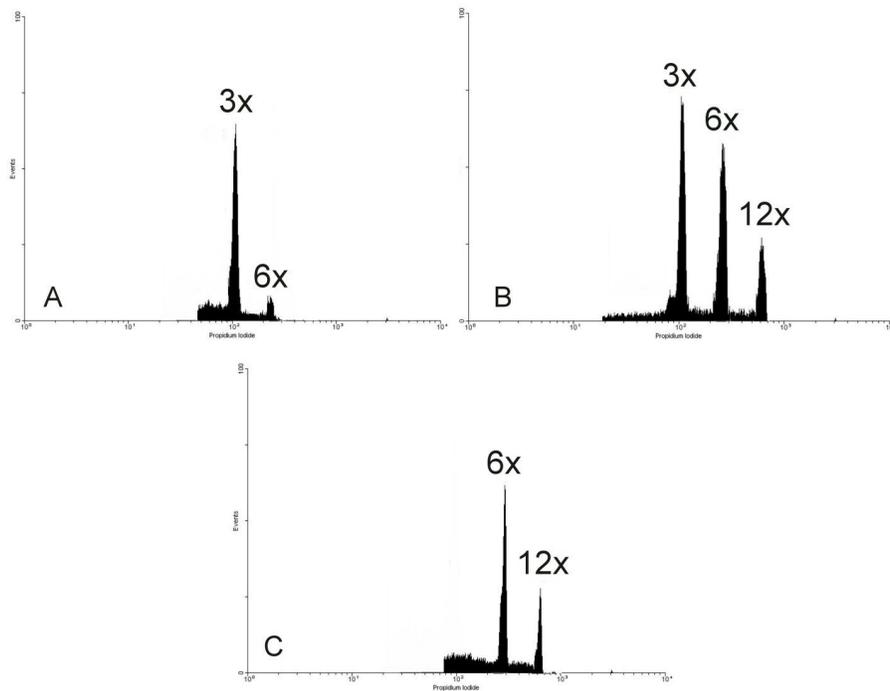


FIGURA 2 Histogramas de citometria de fluxo. (A) Planta triplóide contendo células 3x e 6x; (B) planta mixoplóide contendo células 3x, 6x e 12x; (C) planta hexaplóide contendo células 6x e 12x.

Para a frequência de estômatos (por  $\text{mm}^2$ ), foram observadas reduções de, aproximadamente, 48,83% e 44,83% (respectivamente para as epidermes abaxial e adaxial), nas plantas hexaplóides, em comparação com as plantas triplóides (Tabela 7 e Figura 3). Considerando todas as medidas estomáticas avaliadas (comprimentos polar e equatorial de estômatos das epidermes abaxial e adaxial), os estômatos das plantas hexaplóides são, aproximadamente, 1,52 vezes maiores do que os observados em plantas triplóides (Tabela 7; Figura 3).

TABELA 7 Características estomáticas em plantas triplóides e hexaplóides

Plantas	Frequência ( $\text{mm}^2$ )		Comprimento polar ( $\mu\text{m}$ )		Comprimento equatorial ( $\mu\text{m}$ )	
	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
Triplóides	109,57 <sup>a</sup>	89,30 <sup>a</sup>	32,33a	31,58a	19,10a	19,31a
Hexaplóides	56,07 <sup>b</sup>	49,27 <sup>b</sup>	47,03b	44,04b	32,42b	30,26b

\* As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste F, ANOVA).

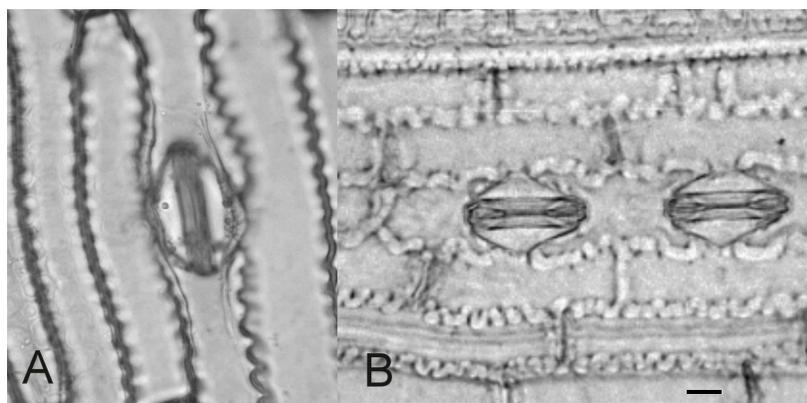


FIGURA 3 Estômatos de plantas hexaplóides (A) e triplóides em (B). Barra =  $10\mu\text{m}$ .

Estas relações (redução na frequência e aumento de tamanho de estômatos) com a poliploidização têm sido observadas em outras espécies (Silva et al., 2000; Gu et al., 2005). Este trabalho mostra que as características estomáticas diferem entre plantas triplóides e hexaplóides, e que este método, por ser simples e rápido, pode ser usado em larga escala para a avaliação de ploidia das plantas de *Pennisetum*.

Quando a citometria é disponível, ela pode ser considerada como uma tecnologia refinada de análise de ploidia. Como são necessárias apenas pequenas quantidades de tecido foliar (20-30mg), a análise de ploidia das plantas pode ser realizada precocemente, ainda no estágio *in vitro*, reduzindo a população de plantas mantidas *in vitro* ou que serão aclimatizadas e mantidas em casa de vegetação (Dolezel, 1997).

Por outro lado, a citogenética é um método demorado, o que dificulta a análise de um grande número de plantas. Entretanto, ela apresenta algumas vantagens, como a possibilidade de identificação de aneuploidias, o que, na maioria das vezes, é impossível pela técnica de citometria de fluxo.

Neste trabalho, a análise citogenética foi realizada em 7 das 17 plantas identificadas como hexaplóides, e o número cromossômico foi confirmado como  $2n=6x=42$  cromossomos (Figura 4). Na tentativa de identificar os cromossomos parentais de milho e de capim-elefante na metáfase apresentada na Figura 4, foi realizada análise de cariótipo. Para este objetivo, foram utilizadas medidas de comprimento relativo dos cromossomos, que não são influenciadas pelo grau de condensação. As medidas são apresentadas na Tabela 8. Os sete pares de cromossomos maiores foram considerados os de milho e os demais de capim elefante. Essa identificação baseou-se na informação que ambas as espécies possuem genomas de tamanhos iguais, embora apresentem números cromossômicos diferentes (14 para o milho e 28 para o capim elefante).

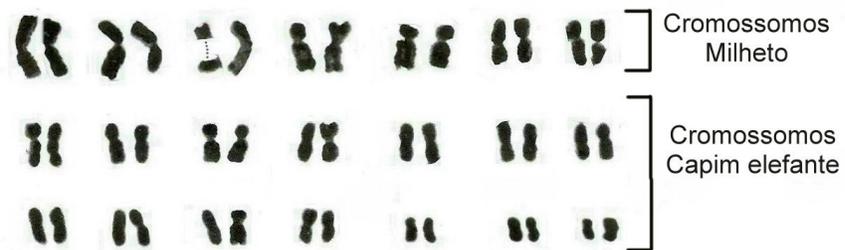
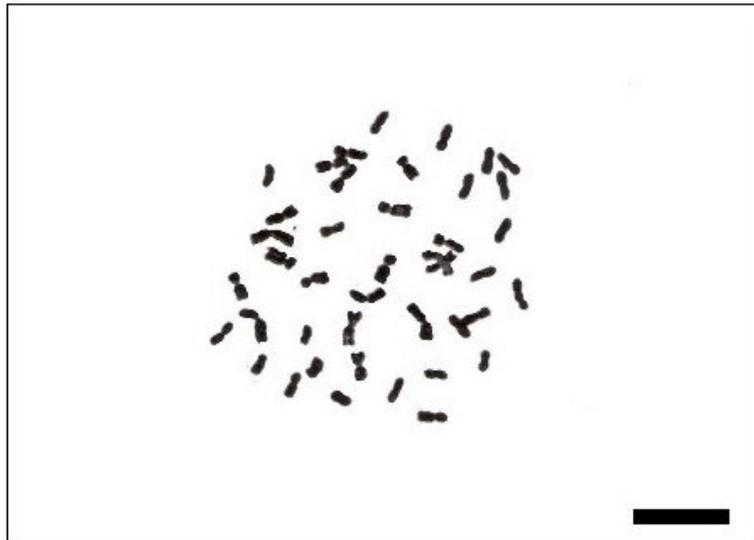


FIGURA 4 (A) Metáfase mitótica com  $2n=6x=42$  cromossomos de uma planta hexaplóide; (B) cariograma. Barras =  $10\mu\text{m}$ .

TABELA 8 Comprimentos relativos dos cromossomos da metáfase apresentada na FIGURA 4.

Par cromossômico	Comprimento relativo do braço curto	Comprimento relativo do braço longo	Comprimento total relativo
1	3,46%	3,65%	7,11%
2	2,92%	3,65%	6,57%
3	2,92%	3,28%	6,20%
4	2,74%	3,28%	6,02%
5	1,82%	3,46%	5,28%
6	2,55%	2,73%	5,28%
7	2,55%	2,55%	5,10%
8	1,86%	3,10%	4,96%
9	1,82%	2,92%	4,74%
10	2,01%	2,55%	4,56%
11	2,07%	2,44%	4,51%
12	2,01%	2,44%	4,45%
13	1,79%	2,55%	4,34%
14	2,12%	2,22%	4,34%
15	2,01%	2,19%	4,20%
16	1,82%	2,37%	4,19%
17	1,82%	2,19%	4,01%
18	1,91%	1,91%	3,82%
19	1,64%	2,01%	3,65%
20	1,46%	1,86%	3,32%
21	1,46%	1,82%	3,28%

Barbosa et al (2003) trabalhou com análise cariotípica de acessos de capim-elefante e milheto e os híbridos triplóides oriundos dos cruzamentos destes parentais. Foram analisados cinco acessos de capim-elefante (BAG 54, BAG 63, BAG 65, BAG 75 e BAG 91) e cinco acessos de milheto (M 24, M35,

M36, M38, M44). Os comprimentos relativos de cada cromossomo dentro desses acessos são mostrados na Tabela 9 (dados adaptados a partir de Barbosa et al., 2003). Os resultados demonstram a utilidade do uso de medidas relativas na análise cariotípica, podendo-se observar que não existem grandes variações no comprimento relativo de cada cromossomo entre os acessos. Os desvios padrões obtidos a partir da média dos comprimentos relativos para cada cromossomo variaram entre 0,04% e 0,40%, para os cromossomos dos acessos de capim-elefante e entre 0,16 e 0,47%, para os cromossomos dos acessos de milho. Essas medidas demonstram não existir variação cariotípica entre os acessos de capim-elefante e entre os de milho analisados neste trabalho, quando se utilizam medidas relativas dos cromossomos.

Com essas medidas disponíveis pode-se prever a contribuição média para o total de DNA de cada cromossomo de capim-elefante e de milho, quando eles são reunidos em um híbrido triplóide. Para efetuar este cálculo, é preciso saber o percentual de contribuição de cada espécie parental para o tamanho de genoma total do híbrido. Segundo Martel et al. (1997), o capim-elefante apresenta um genoma com 4,59pg de DNA e o milho, 4,71pg de DNA. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram uma média de 4,53pg para o genoma de capim-elefante e 4,75pg para milho (Tabela 2).

Adicionalmente, Barbosa et al. (2003) já haviam demonstrado, pela medida CTLH (comprimento total do lote haplóide), que os parentais de capim-elefante contribuíam, em média, com 28,09 $\mu$ m e os de milho, com 28,36 $\mu$ m. Todas essas informações permitem observar que o capim-elefante e o milho apresentam tamanhos de genoma bastante similares, embora números cromossômicos diferentes.

Diante disso pode-se prever que o comprimento relativo dos cromossomos do capim-elefante e do milho reunidos nos híbridos triplóides seria a metade dos valores apresentados na Tabela 9. Estes dados encontram-se na Tabela 10.

TABELA 9 Comprimentos relativos dos cromossomos em acessos de capim-elefante e milho (Dados de Barbosa et al., 2003).

Capim-elefante	BAG 54	BAG 63	BAG 65	BAG 75	BAG 91	Média dos acessos
Cr. 1	10,70%	10,18%	10,85%	10,06%	10,58%	10,47% ± 0,33
Cr. 2	8,71%	8,90%	9,33%	9,24%	9,75%	9,18% ± 0,40
Cr. 3	8,71%	8,35%	8,21%	8,26%	8,14%	8,33% ± 0,22
Cr. 4	7,76%	7,76%	7,70%	8,04%	7,71%	7,79% ± 0,14
Cr. 5	7,57%	7,38%	7,52%	7,52%	7,28%	7,45% ± 0,12
Cr. 6	7,24%	7,19%	7,27%	7,22%	7,17%	7,22% ± 0,04
Cr. 7	6,84%	6,59%	7,02%	6,92%	6,95%	6,86% ± 0,17
Cr. 8	6,69%	6,70%	6,83%	6,77%	6,74%	6,75% ± 0,05
Cr. 9	6,58%	6,61%	6,58%	6,62%	6,42%	6,56% ± 0,08
Cr. 10	6,40%	6,35%	6,33%	6,43%	6,31%	6,36% ± 0,05
Cr. 11	6,18%	6,22%	6,00%	6,17%	6,02%	6,12% ± 0,10
Cr. 12	5,84%	6,03%	6,00%	5,91%	5,84%	5,92% ± 0,08
Cr. 13	5,51%	5,83%	5,50%	5,68%	5,74%	5,65% ± 0,14
Cr. 14	5,26%	5,48%	4,95%	5,16%	5,30%	5,23% ± 0,19
Milho	M 24	M 35	M 36	M 38	M 44	Média dos acessos
Cr. 1	16,88%	16,49%	17,57%	16,80%	17,51%	17,05% ± 0,47
Cr. 2	16,51%	16,12%	16,45%	16,28%	16,44%	16,36% ± 0,16
Cr. 3	14,98%	15,41%	15,56%	15,33%	15,02%	15,26% ± 0,25
Cr. 4	14,51%	14,56%	13,60%	14,38%	14,33%	14,28% ± 0,35
Cr. 5	14,11%	13,50%	13,50%	13,64%	13,74%	13,70% ± 0,25
Cr. 6	12,09%	12,67%	12,41%	12,22%	12,60%	12,39% ± 0,24
Cr. 7	10,91%	11,19%	10,49%	11,31%	10,34%	10,85% ± 0,38

Cr. = Cromossomo.

Na Tabela 10 as medidas relativas previstas são comparadas com as medidas esperadas.

TABELA 10 Previsão dos comprimentos relativos dos cromossomos de capim-elefante e milho nos híbridos triplóides e hexaplóides e comparação entre esses valores e os observados a partir de uma metáfase com  $2n=6x=42$  cromossomos.

Capim-elefante	Média dos acessos (Valores da Tabela 9)	Previsão do comprimento relativo dos cromossomos no híbrido 3x ou 6x	Comprimento relativo observado para a metáfase hexaplóide da Tabela 8
Cr. 1	10,47	5,23	4,96
Cr. 2	9,18	4,59	4,74
Cr. 3	8,33	4,16	4,56
Cr. 4	7,79	3,89	4,51
Cr. 5	7,45	3,72	4,45
Cr. 6	7,22	3,61	4,34
Cr. 7	6,86	3,43	4,34
Cr. 8	6,75	3,37	4,20
Cr. 9	6,56	3,28	4,19
Cr. 10	6,36	3,18	4,01
Cr. 11	6,12	3,06	3,82
Cr. 12	5,92	2,96	3,65
Cr. 13	5,65	2,82	3,32
Cr. 14	5,23	2,61	3,28

Milho	Média dos acessos (Valores da Tabela 9)	Previsão do comprimento relativo dos cromossomos no híbrido 3x ou 6x	Comprimento relativo observado para a metáfase hexaplóide da Tabela 8
Cr. 1	17,05	8,52	7,11
Cr. 2	16,36	8,18	6,57
Cr. 3	15,26	7,63	6,20
Cr. 4	14,28	7,14	6,02
Cr. 5	13,70	6,85	5,28
Cr. 6	12,39	6,19	5,28
Cr. 7	10,85	5,42	5,10

Cr. = Cromossomo.

Para todos os cromossomos do complemento haplóide de milho e para o cromossomo 1 do complemento haplóide de capim-elefante há uma redução do comprimento relativo, observado em relação ao esperado. A redução média dos comprimentos relativos desses cromossomos foi de 14,91%. Barbosa et al (2003) também verificou essa redução do CTLH dos híbridos triplóides em relação à quantidade esperada pela soma dos CTLHs dos parentais envolvidos nos cruzamentos. A redução média observada foi de 15,31%.

Essas observações sugerem a ocorrência de eliminação de seqüências no genoma dos híbridos triplóides, responsável pela diminuição do genoma em relação a quantidade de DNA esperada. Embora sejam observados 21 cromossomos na análise citogenética dos híbridos triplóides ou 42 cromossomos na análise citogenética dos híbridos hexaplóides, alguns dos cromossomos são mais curtos do que o esperado. Os dados apresentados na Tabela 10 sugerem que essa redução seja devido à eliminação de seqüências em todos os cromossomos de milho e no par número 1 de capim-elefante. Os dados citogenéticos obtidos por Barbosa et al. (2003), em comparação com a metáfase apresentada na Figura 4, sugerem reduções de 14,91% e 15,31%, mas os dados de quantidade de DNA apresentados na Tabela 4 mostram uma redução média entre os híbridos de 2,8%. Essa diferença para os percentuais de redução entre os dados cariotípicos e de citometria de fluxo não necessariamente reflete uma contradição. As relações entre os locais onde essas seqüências são eliminadas com os padrões de organização da cromatina podem explicar essas diferenças observadas entre as técnicas.

A ocorrência desse tipo de eliminação de seqüências tem sido relatada como uma das alterações genômicas em decorrência de eventos de hibridação interespecífica seguida de poliploidização (para discussão, ver item 2,4 Hibridação interespecífica/poliploidia e alterações genômicas, no Referencial Teórico).

No cruzamento entre o capim-elefante (genomas A'A'BB) com o milho

(genomas AA), o híbrido triplóide passa a reunir os genomas AA'B. Aparentemente, a eliminação de seqüências acontece nos genomas do milho e em um dos cromossomos do capim-elefante, permitindo supor que essa eliminação acontece dentro dos genomas do tipo A. Essa informação vem corroborar os dados disponíveis na literatura, que demonstram a eliminação de seqüências que entram em conflito genômico no momento em que são reunidas em um alopoliplóide (Boyko et al., 1984; Shaked et al., 2001; Ozkan et al., 2003).

Aparentemente seqüências homólogas/homeólogas entre os genomas A e A' geram esse “conflito genômico”, sendo eliminadas como um mecanismo de ajuste genômico para estabilidade posterior dos híbridos. Vale ressaltar que os dados obtidos por meio de citometria de fluxo e análise citogenética demonstram indícios de que esse processo de eliminação ocorre nos híbridos entre capim-elefante e milho, mas não prova definitivamente a sua ocorrência. Esses indícios demonstram uma nova fronteira aberta nos estudos envolvendo híbridos de capim-elefante e milho com o uso de marcadores moleculares, como microssatélites e de citogenética molecular (*Genomic in situ hybridization*, GISH), para a identificação de seqüências eliminadas.

Embora as evidências, todos os dados discutidos se baseiam na comparação de resultados obtidos entre materiais diferentes ou na comparação de dados de híbridos com seus parentais, mas nos quais as plantas avaliadas nos parentais não eram as mesmas utilizadas nos cruzamentos. Um experimento adicional foi realizado com controle dos parentais envolvidos na formação dos híbridos e as quantidades de DNA obtidas por citometria de fluxo. Os dados são apresentados na Tabela 11. De acordo com o esquema apresentado no material e métodos, item 2.6, foi possível comparar as previsões de quantidade de DNA dos híbridos triplóides com o observado para os mesmos por análise de variância. Em todos os cruzamentos observou-se significância estatística entre as quantidades de DNA observada e esperada.

TABELA 11 Previsão das estimativas de quantidade de DNA dos híbridos triplóides segundo a média dos parentais envolvidos nos cruzamentos X estimativa das quantidades de DNA dos híbridos triplóides

Parentais (capim-elefante x milheto)	Quantidades de DNA (pg)	Previsão da quantidade de DNA dos híbridos (pg)	Quantidade de DNA (pg) observada para os híbridos	Redução na quantidade de DNA em relação ao esperado
♀ 91-2-5	4,56	4,64a	4,36b	0,28pg (6,0%)
♂ M-60	4,72			
♂ 91-2-5	4,52	4,65a	4,42b	0,23pg (4,9%)
♀ M-60	4,78			
♀ F93-4-2	4,48	4,62a	4,40b	0,22pg (4,8%)
♂ M-27	4,76			
♂ F93-4-2	4,48	4,625a	4,48b	0,145pg (3,1%)
♀ M 27	4,77			

\* As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si (análise de variância).

Os resultados confirmam a possibilidade de eliminação de seqüências, com valores de quantidade de DNA para os híbridos triplóides com uma redução em média de 4,7%. Os resultados dos cruzamentos recíprocos são similares e reduções na quantidade de DNA em comparação ao esperado foram observadas em todos os cruzamentos, não parecendo ser influenciado pelo sexo dos parentais.

A duplicação cromossômica e a obtenção dos híbridos hexaplóides apresentam uma série de aplicações no melhoramento de *Pennisetum*, como a restauração da fertilidade dos híbridos e a produção de sementes maiores, o que pode tornar a propagação desses híbridos via semente uma realidade.

#### 4 CONCLUSÕES

- A exposição de *seedlings* triplóides *in vitro* à solução de colchicina 0,10% é um método eficiente na recuperação de plantas hexaplóides híbridas entre capim-elefante e milheto.
- A citometria de fluxo e a análise de características estomáticas são técnicas simples e rápidas, com utilidade na avaliação em larga escala de plantas oriundas de experimentos de duplicação cromossômica.
- Os dados de citometria de fluxo, aliados à análise cariotípica, evidenciam a ocorrência de eliminação de seqüências após a hibridação entre capim-elefante e o milheto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J.C.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; BARBOSA, S. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimutagênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.11, p.1629-1635, 2006.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; ABREU, J.C. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milho. **Bragantia**, v.66, n.3, p. 365-372. 2007.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V. Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* Schumack x *Pennisetum glaucum* L. Hybrids and their parents. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p. 23-26, 2003.
- BOYKO, E.V.; BADACV, N.S.; MAXIMOV, N.G.; ZELENIN, A.V. Does DNA content change in the course of Triticale breeding? **Cereal Res Com**, v. 12, n. 1-2, p. 99-100, 1984.
- DAHER, R.F. **Cruzamentos dialélicos entre capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e milho (*Pennisetum glaucum*) e suas relações com a divergência genética**. 2003. 125 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 38, p. 285-302, 1997.
- GU, X.F., YANG, A.F.; MENG, H.; ZHANG, J.R. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 671-676, 2005.
- HANNA, W.W. Melhoramento do capim-elefante. In: PASSOS, L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E.; PEREIRA, A.V. (Ed.). **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p.17-28.
- KADOTA, M.; NIIMI, Y. In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 282-286, 2002.

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**, v. 39, p. 680-687, 1996.

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

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

PASAKINSKIENÉ, I. Culture of embryos and shoot tips for chromosome doubling in *Lolium perene* and sterile hybrids between *Lolium* and *Festuca*. **Plant Breeding**, v. 119, p. 185-187, 2000.

PEREIRA, A.V.; VALLE, C.B.; FERREIRA, R.P., MILLES, J.W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C., MELO, I.S., VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Cuiabá: Fundação Mato Grosso, 2001. 1183p.

ROY, A.T.; LEGGETT, G.; KOUTOULIS, A. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 489-495, 2001.

SCHANK, S.C.; DIZ, D.A.; BATES, D.B.; THOMPSON, K.E. Genetic improvement of napiergrass and hybrids with pearl millet. **Biomass and Bioenergy**, v. 5, p. 35-40, 1993.

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

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

ZHANG, J; ZHANG, M; DENG, X. Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis*. **Plant Cell and Tissue Organ Culture**, v.89, p. 211-216, 2007.

## CAPÍTULO 4

INSTABILIDADE GENÔMICA ASSOCIADA À HIBRIDAÇÃO  
INTERESPECÍFICA E DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM  
HÍBRIDOS ENTRE *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*

## RESUMO

CAMPOS, José Marcello Salabert. Instabilidade genômica associada à hibridação interespecífica e duplicação cromossômica em híbridos entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*. In:\_\_\_\_\_. **Obtenção de híbridos hexaplóides e análise genômica em *Pennisetum* sp. por citometria de fluxo**. 2007. Cap. 4, p.81-102p. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

No melhoramento de *Pennisetum*, a hibridação interespecífica entre o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e o milheto (*Pennisetum galucum*) é uma das alternativas para a obtenção de cultivares superiores. Este híbrido (triplóide) apresenta uma grande limitação para o seu uso nos programas de melhoramento. Trata-se da infertilidade, que leva à necessidade de sua propagação vegetativa. A fertilidade pode ser restaurada por meio da duplicação cromossômica. Essa estratégia torna possível o ingresso dos híbridos hexaplóides nos programas de melhoramento de *Pennisetum*, reunindo características desejáveis nos híbridos e permitindo a sua propagação via sementes. Mudanças genômicas têm sido associadas aos eventos de hibridação interespecífica e alopoliploidização. Eliminação de cromossomos e seqüências tem sido relatada como a mais freqüente alteração. Este capítulo investiga as alterações relacionadas à hibridação interespecífica e à alopoliploidização em híbridos de *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*. Os resultados obtidos por citometria de fluxo e análise citogenética sugerem a ocorrência de eliminação de seqüências após hibridação, durante o desenvolvimento dos embriões triplóides. Uma alta freqüência de micronúcleos durante o desenvolvimento dos embriões triplóides confirma esta hipótese. Para os experimentos de duplicação cromossômica, sementes foram expostas à solução de colchicina nas concentrações de 0%, 0,05%, 0,10% e 0,15%, nos tempos de 12, 24 e 36 horas. A sobrevivência dos *seedlings* diminui com o aumento da concentração de colchicina e do tempo de exposição. O maior percentual de recuperação de plantas hexaplóides foi observado no tratamento com colchicina 0,05%, por 12 horas (16,5% de plantas hexaplóides). Pela análise citogenética das plantas hexaplóides observaram-se anormalidades cromossômicas relacionadas ao efeito aneuploidizante da colchicina. Essas anormalidades levam à eliminação de cromossomos e ao aparecimento de células aneuplóides. Os efeitos da colchicina sobre a ploidia das células e na indução de anormalidades cromossômicas são discutidos.

---

Comitê Orientador: Lisete Chamma Davide (Orientadora) – UFLA; Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite

## ABSTRACT

CAMPOS, José Marcello Salabert. Genomic instability associated with interespecific hybridization and chromosome duplication in *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* hybrids. In:\_\_\_\_\_. **Hexaploids hybrids obtaining and genomic analysis in *Pennisetum sp.* by flow cytometry.** 2007. Chap. 4, p.81-102. Thesis (Doctor of Science in Agronomy/Genetics and Plant Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

In *Pennisetum* breeding, the interespecific hybridization between napiergrass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*) are an alternative to obtain superior cultivars. This hybrid (triploid) presents a great limitation for use in breeding programs. Due to infertility, leading to a vegetative propagation. Fertility can be restored through chromosomal duplication. Making possible the use of the hexaploid hybrids in *Pennisetum* breeding programs, redeeming desired traits in hybrids and allowing its propagation through seeds. Genomic changes has been associated to interespecific hybridization and allopolyploidization events. Chromosome and sequences elimination has been recorded the most frequent alterations. This chapter investigates the alterations related to interespecific hybridization and allopolyploidization in *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* hybrids. The results obtained by flow cytometry and cytogenetic analysis suggest the occurrence of sequences elimination after hybridization, during the development triploid embryous. High frequency of micronuclei during triploid embryous confirms this hypothesis. For chromosome doubling experiments, seeds were exposed to colchicine solutions at 0, 0.05, 0.10, 0.15% in 12, 24 and 36h. Seedlings surviving decreased with increasing colchicine concentration and time exposure. The highest hexaploid recovery was observed at 12h treatment in 0.05% colchicine (16.5% of hexaploids plants). By cytogenetic analysis of hexaploids plants we notice chromosome abnormalities related to the aneuploidy effect of colchicine. These abnormalities lead to the chromosome elimination and the appearance of aneuploidy cells. The colchicine effects on cell ploidy and induction of chromosome abnormalities are discussed.

---

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

## 1 INTRODUÇÃO

*Pennisetum* é um dos mais importantes gêneros da família Poaceae e as espécies *P. purpureum* (capim-elefante) e *P. glaucum* (milheto) são as mais importantes economicamente, utilizadas como forrageiras (Martel et al., 2004).

O capim-elefante é uma espécie tetraplóide, com  $2n=4x=28$  cromossomos e o milheto uma espécie diplóide, com  $2n=2x=14$  cromossomos (Martel et al., 1996). O melhoramento destas forrageiras explora a variabilidade existente dentro de cada espécie, entretanto, uma das estratégias utilizadas no melhoramento é a hibridação interespecífica entre o capim-elefante e o milheto. Essa estratégia tem sido recomendada, por muitos autores, para o melhoramento de qualidade forrageira (Hanna, 1999). Deste cruzamento, resulta um híbrido interespecífico triplóide ( $2n=3x=21$  cromossomos) e estéril. Esta combinação genética procura reunir no híbrido características desejáveis do milheto, tais como qualidade de forragem, tolerância à seca e resistência a doenças com boas características do capim-elefante (Schank et al., 1993).

A esterilidade desses híbridos triplóides tem limitado o seu emprego nos programas de melhoramento e impossibilitado a obtenção de sementes para a implementação de pastagens economicamente viáveis (Pereira et al., 2001). A restauração da fertilidade desses híbridos permitiria um maior uso dos mesmos nos programas de melhoramento. Essa restauração pode ser alcançada utilizando-se de tecnologia citogenética, com a obtenção de materiais com o número cromossômico duplicado via exposição a agentes antimitóticos, tais como a colchicina (Pasakinskiené, 2000). A colchicina é um alcalóide extensivamente utilizado para duplicação cromossômica e para a indução de poliploidia em plantas (Pasakinskiené, 2000).

Uma série de alterações genômicas tem sido associada com os eventos de hibridação interespecífica e alopoliploidização. A eliminação de seqüências

de DNA ou de cromossomos tem sido relatada como consequência da reunião de dois genomas de origem diferentes em um híbrido em vários trabalhos (Liu et al., 1996; Riera-Lizarazu et al., 1996; Linde-Laursen & von Bothmer, 1999; Germand et al., 2005). Algumas alterações na mitose são características da ocorrência dessa eliminação cromossômica, tais como não orientação de cromossomos na metáfase, segregação tardia na anáfase, degradação de cromatina ou fragmentação de cromossomos e formação de micronúcleos (Singh, 2002). Na meiose, o mesmo processo de eliminação pode ser evidenciado (Baptista-Giacomelli et al., 2000). Outros trabalhos têm demonstrado a eliminação de seqüências curtas não aleatórias do genoma (Schaked et al., 2001; Ozkan et al., 2003).

Em híbridos envolvendo espécies de *Pennisetum*, os estudos dessas modificações genômicas são raros. Techio et al. (2006) relataram a ocorrência de irregularidades meióticas em híbridos triplóides entre capim-elefante e milheto. Alterações, como migração precoce de cromossomos, segregação irregular, micronúcleos e formação irregular do fuso, podem estar relacionadas com o processo de eliminação de cromossomos. Germand et al. (2005), trabalhando com híbridos provenientes do cruzamento entre trigo e milheto, observaram eliminação cromossômica uniparental (cromossomos de milheto) via formação de micronúcleos. Abreu (2006) e Barbosa (2007), trabalhando com duplicação cromossômica em híbridos entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*, relataram variação no número cromossômico de metáfases como consequência de eliminação cromossômica após a alopoliploidização.

O objetivo do presente trabalho foi investigar as alterações genômicas associadas aos eventos recentes de hibridação interespecífica e alopoliploidização em híbridos entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

Dois híbridos, F91-2-5 (capim-elefante) X M-60 (milheto) e F93-4-2 (capim-elefante) X M-27 (milheto), foram escolhidos para a condução dos experimentos. Esta escolha baseou-se em avaliações prévias desses híbridos em uma análise dialélica (S. Sobrinho et al., 2005). Os cruzamentos foram realizados na Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG e os experimentos conduzidos nos Laboratórios de Genética e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, em Juiz de Fora, MG.

### **2.3 Desenvolvimento dos embriões triplóides e análise de estabilidade genômica**

As sementes triplóides foram obtidas por meio dos cruzamentos parentais, utilizando o parental do capim-elefante como doador de pólen e o parental de milheto como fêmea. As sementes em desenvolvimento foram coletadas com 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a polinização. Para análise de estabilidade genômica, os embriões e as raízes obtidas a partir dessas sementes foram investigados por citometria de fluxo e citogenética (ver itens 2.4 e 2.5 da metodologia).

Com 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a polinização, 9 embriões foram excisados das sementes, constituindo 3 repetições obtidas da média de 3 embriões. Nove embriões foram analisados por citogenética e nove por citometria de fluxo. Antes das análises, as sementes foram pré-expostas em água destilada, por 12 horas, para ativação do ciclo celular. Na análise citogenética, foi quantificado o percentual de micronúcleos como medida indireta da ocorrência de eliminação de seqüências ou cromossomos. Na análise de citometria de fluxo, foi quantificado o conteúdo de DNA. Os resultados foram

avaliados por análise de variância e teste de Scott e Knott ( $p < 0,05$ ).

Um outro grupo de sementes, com idades de 20, 25 e 30 dias após a polinização, foi germinado em placa de Petri para coletas de raízes para análise citogenética. As sementes com 10 e 15 dias após polinização não germinaram, não permitindo a coleta de raízes. Alterações citogenéticas envolvidas com instabilidade genômica foram quantificadas, tais como: pontes cromossômicas, fragmentos, c-metáfases, anáfases multipolares, segregação tardia, não orientação na metáfase e micronúcleos. Os tratamentos para análise citogenética também consistiram de três repetições obtidas da média de análise de três lâminas. Como controle, foram utilizadas raízes coletadas a partir dos parentais. Os resultados foram avaliados por análise de variância e teste de Scott e Knott ( $p < 0,05$ ).

### **2.3 Tratamentos das sementes triplóides para duplicação cromossômica**

Sementes triplóides foram esterilizadas em etanol 70%, por 2 minutos e solução de hipoclorito de sódio 100%, por 10 minutos, lavadas em 3 baterias de água destilada, secadas cuidadosamente e submetidas aos tratamentos com colchicina em placa de Petri. As sementes foram tratadas em solução de colchicina, nas concentrações de 0%, 0,05%, 0,10% e 0,15%, durante 12, 24 e 36 horas. Após os tratamentos, foram lavadas em seis baterias de água destilada. As sementes foram pré-expostas em água destilada por 12 horas antes dos tratamentos com colchicina. Para cada tratamento, foram utilizadas 30 sementes (3 repetições de 10 sementes).

Após os tratamentos das sementes, os *seedlings* foram mantidos em placa de Petri para crescimento por 5 dias e, posteriormente, transferidos para copos plásticos contendo vermiculita, sendo mantidos por 30 dias, quando foi realizada análise por citometria de fluxo. A sobrevivência dos *seedlings* foi avaliada aos 30 dias, por análise de variância e teste de Scott e Knott ( $p < 0,05$ ).

O tratamento com colchicina 0,05%, por 12 horas, no qual foi

recuperado o maior percentual de plantas hexaplóides, foi repetido para coleta de raízes e folhas, com 12, 24, 36, 48 e 60 horas após os tratamentos com colchicina. As raízes foram submetidas à análise citogenética para avaliação de alterações cromossômicas (as mesmas variáveis analisadas anteriormente). Para cada tratamento, foram analisadas 9 lâminas (3 repetições de 3 lâminas). As variáveis foram analisadas por análise de variância e teste de Scott e Knott ( $p < 0,05$ ). As folhas foram submetidas à análise por citometria de fluxo.

#### 2.4 Citometria de fluxo

Para a determinação da quantidade de DNA e ploidia, aproximadamente de 20-30 mg de tecido foliar jovem para cada amostra, juntamente com a mesma quantidade de tecido foliar jovem de *Glycine max* (padrão interno de referência), foram triturados em placa de Petri contendo 1mL de tampão LB01 gelado para a obtenção de suspensão nuclear (Dolezel, 1997). O tecido triturado foi aspirado por meio de duas camadas de gaze e a suspensão nuclear posteriormente filtrada em uma malha de 50 $\mu$ m. À suspensão nuclear foram adicionados 25 $\mu$ L de iodeto de propídio e 2,5 $\mu$ L de RNase. Para cada amostra foram analisados, pelo menos, 10 mil núcleos.

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), sendo os histogramas obtidos no software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.8 (disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*Glycine max*), como mostrado a seguir:

$$\text{Amostra (planta) DNA 2C (pg)} = \frac{\text{Canal do pico G1 da amostra}}{\text{Canal do pico G1 do padrão}} \times \text{Conteúdo de DNA padrão (2,50pg)}$$

Para confiabilidade dos resultados de citometria, foram utilizados somente histogramas com coeficientes de variação abaixo de 3%.

### **2.5 Análise citogenética**

Para análise citogenética, as raízes e os embriões foram fixados em solução de ácido acético:metanol (1:3). As lâminas foram preparadas pela técnica de secagem ao ar, com maceração enzimática em Pectinase 20%:celulase 2%, por 4 horas para as raízes e 6 horas para os embriões, sendo posteriormente hidrolisadas em HCl, 60°C, por 10 minutos. Após o preparo, as lâminas foram coradas com Giemsa.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de estabilidade genômica, durante o desenvolvimento dos embriões triplóides, são mostrados na Tabela 1.

Os resultados demonstraram que as quantidades de DNA dos embriões triplóides aos 10 dias após a polinização estão próximas às quantidades esperadas para a condição triplóide, não existindo diferença estatística em relação ao esperado. Essa quantidade de DNA reduz-se com o desenvolvimento do embrião e reduções significativas foram observadas, a partir de 20 dias, para o híbrido F91-2-5 X M-60 e, já a partir de 15 dias, para o híbrido F93-4-2 X M-27 (Scott e Knott,  $p < 0,05$ ). As reduções nas quantidades de DNA, entre 10 e 30 dias após a polinização, são de 6,07% e 4,58%, respectivamente, para os cruzamentos F91-2-5 X M-60 e F93-4-2 X M-27. Esses resultados corroboram as observações anteriores de que a eliminação de seqüências ocorre nesses híbridos como resposta à reunião de diferentes genomas numa nova condição.

TABELA 1 Estimativa da quantidade de DNA (pg) e frequência de micronúcleos em embriões triplóides

Dias após a polinização	Quantidade de DNA (pg)		% micronúcleos	
	F91-2-5 X M-60	F93-4-2 X M-27	F91-2-5 X M-60	F93-4-2 X M-27
DNA (pg)*	4,64a	4,62a	-	-
10	4,60a	4,58a	9,71a	6,78a
15	4,55a	4,50b	10,30a	6,56a
20	4,45b	4,44c	17,28b	12,23b
25	4,40b	4,39c	23,14c	25,64c
30	4,32c	4,37c	12,15d	14,32b

\* Corresponde à quantidade de DNA esperada para o híbrido triplóide, segundo a média dos parentais. As médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si (Scott e Knott,  $p < 0,05$ ).

A análise citogenética dos embriões não permitiu a observação de metáfases para a contagem dos cromossomos, impossibilitando a contagem de 21 cromossomos e a confirmação de eliminação de seqüências e não de cromossomos. Entretanto, a análise citogenética revelou a presença de micronúcleos, alteração relacionada à eliminação de seqüências ou cromossomos. Os percentuais de micronúcleos nos embriões aumentaram entre 10 e 25 dias, com diferenças significativas a partir de 20 dias, para ambos os cruzamentos (Scott e Knott,  $p < 0,05$ ). Com 30 dias, os percentuais de micronúcleos, em ambos os cruzamentos, reduziram. Os resultados sugerem que a eliminação de seqüências acontece, então, durante o desenvolvimento do embrião triplóide, predominantemente entre 15 e 25 dias após a polinização.

Germand et al. (2005) sugerem um mecanismo pelo qual seqüências ou cromossomos de milho são eliminados em embriões híbridos obtidos pelo cruzamento de milho com trigo (Figura 1).

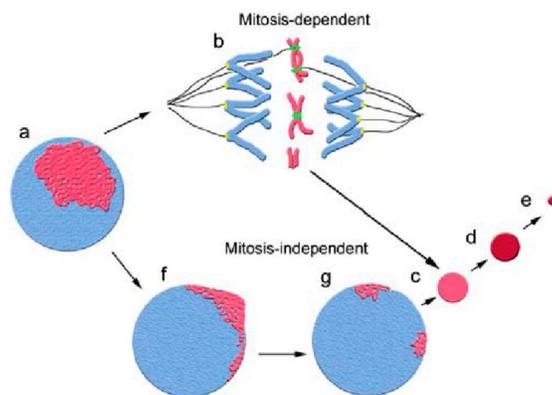


FIGURA 1 Eliminação de cromossomos ou DNA interfásico após eventos de hibridação interespecífica. DNA interfásico (a) condensa-se nos cromossomos (b) que, durante a anáfase, podem se segregar tardiamente e serem eliminados via micronúcleos (c, d, e). Numa outra via, seqüências de DNA que ocupam a periferia do núcleo (f) são eliminadas via extravasamento de cromatina ("budding of chromatin") levando à formação também de micronúcleos (c, d, e) (Adaptada a partir de Germand et al., 2005).

A formação do que esses autores chamam de “*budding of chromatin*” ou extravasamento de cromatina dos núcleos interfásicos parece estar relacionado à eliminação de seqüências nos híbridos entre milho e capim-elefante.

Na análise citogenética realizada nas células embrionárias, a presença desses *budds* foi detectada (dados não quantificados) (Figura 2).

Os resultados das análises citogenéticas a partir de raízes coletadas em embriões com 20, 25 e 30 dias são mostrados na Tabela 2.

Para todas as variáveis analisadas, somente micronúcleos apresentam significâncias em relação ao controle, com percentuais, em média, 191X maiores do que os observados no controle. Entre dias, não se observaram significâncias para a variável micronúcleo. A não observação principalmente de segregação tardia e de não orientação de cromossomos na metáfase sugere que a eliminação de cromossomos não ocorre, mas somente a eliminação de seqüências do genoma.

A eliminação de seqüências parece iniciar-se logo após a fertilização e acontece durante o desenvolvimento das sementes e do embrião.

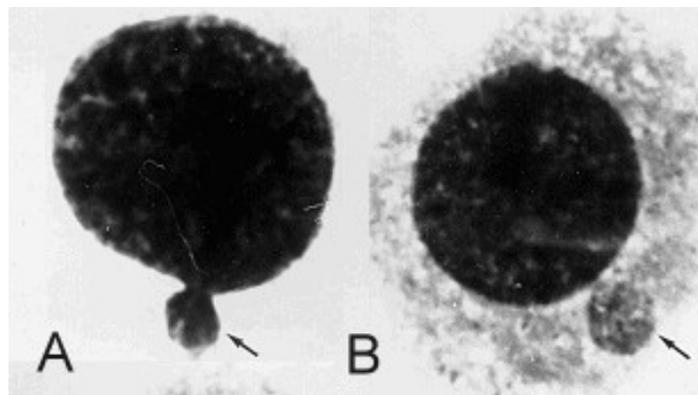


FIGURA 2 Formação de micronúcleos. Em (A) evidencia-se o extravasamento de cromatina nuclear que leva à formação de micronúcleos (B).

TABELA 2 Percentual de alterações citogenéticas observadas em raízes coletadas a partir de sementes triplóides entre capim-elefante e milho.

Alterações	Controle*	F91-2-5 X M-60			F93-4-2 X M-27		
		20 dias	25 dias	30 dias	20 dias	25 dias	30 dias
Pontes	0,02a	0,03a	0,06a	0,04a	0,04a	0,05a	0,06a
Fragmentos	0	0	0	0	0	0	0
c-metáfases	0,04a	0,09a	0,12a	0,11a	0,08a	0,08a	0,15a
Anáfase multipolar	0	0	0	0	0	0	0
Segregação tardia	0	0	0	0	0	0	0
Não orientação metáfase	0	0	0	0	0	0	0
Micronúcleos	0,02a	3,5b	4,3b	1,8b	4,5b	5,6b	3,2b

\* Controle = Médias das alterações observadas em raízes dos parentais. As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Scott e Knott,  $p < 0,05$ ).

Germand et al. (2005) utilizaram a técnica de GISH para localização dos genomas de milho e trigo nas células interfásicas do embrião híbrido. Os autores demonstraram que a cromatina parental de milho localizava-se na periferia nuclear, posição relacionada com a sua eliminação. Essa pode ser uma estratégia útil para demonstrar, no futuro, a eliminação de seqüências do genoma A, predominantemente oriundos do genoma de milho nos híbridos entre capim-elefante e milho.

O mecanismo detalhado pelo qual a cromatina é extravasada através do núcleo permanece desconhecido (Germand et al., 2005). Em moscas do gênero *Sciara*, nas quais a eliminação de seqüências é um processo regulado e que está associado à diferenciação celular, o extravasamento de cromatina durante a intérfase é acompanhado por um acúmulo de retículo endoplasmático e mitocôndrias no local, o que é compatível com a síntese de membranas, pré-requisito para a formação dos micronúcleos (Perondine & Ribeiro, 1997). Nestas

moscas, diferenças nas acetilações das histonas H3 e H4 e metilação das histonas H3 parecem ser as candidatas para direcionar os locais de eliminação de seqüências. Esses padrões, possivelmente, direcionam endonucleases que fragmentam o genoma (Goday & Ruiz, 2002).

Os resultados de sobrevivência dos *seedlings* e a análise de citometria dos mesmos após os tratamentos com colchicina e indução de duplicação cromossômica são mostrados na Tabela 3.

De modo geral, percebe-se uma redução no percentual de sobrevivência dos *seedlings* com o aumento da concentração de colchicina e com o aumento do tempo de exposição. Para todos os tratamentos com colchicina, observa-se diferença estatística em relação aos controles (Scott e Knott,  $p < 0,05$ ). Os tratamentos com 36 horas de exposição à colchicina afetam drasticamente a sobrevivência dos *seedlings*. Com relação aos cruzamentos, maior sobrevivência foi observada para o híbrido F91-2-5 X M-60, embora análise estatística para os percentuais de sobrevivência entre os híbridos não tenha sido realizada.

Com relação às plantas recuperadas, os hexaplóides foram detectados nos tratamentos com colchicina 0,05% e 0,10%, nos tempos de 12 e 24 horas. A eficiência foi maior no tratamento de 0,05%, por 12 horas (17,6% das plantas para o híbrido 91-2-5 X M-60 e 15,5% das plantas para o híbrido F93-4-2 X M-27).

Caperta et al. (2006) discutem os efeitos da colchicina em induzir poliploidização em células de centeio (*Secale cereale*). Diferenças nos efeitos sobre o citoesqueleto são observadas para concentrações baixas (utilizadas para o bloqueio de divisão celular e obtenção de metáfases) e altas (utilizadas nos experimentos de indução de poliploidia). Segundo os autores, concentrações baixas impedem a formação de microtúbulos, bloqueando as células em metáfase, mas posteriormente conduzindo à morte celular.

TABELA 3 Resultados dos experimentos de indução de duplicação cromossômica em sementes triplóides entre capim-elefante e milho via exposição a colchicina

Colchicina (%)	Tempo exposição	Sobrevivência após 30 dias		Triplóides (%)		Mixoplóides (%)		Hexaplóides (%)	
		Hb 1*	Hb 2*	Hb 1*	Hb 2*	Hb 1*	Hb 2*	Hb 1*	Hb 2*
0%	12h	96,6a	94,5a	100	100	0	0	0	0
	24h	95,8a	95,6a	100	100	0	0	0	0
	36h	91,6a	95,6a	100	100	0	0	0	0
0,05%	12h	79,1b	66,3b	13,7	21,2	68,7	63,3	17,6	15,5
	24h	67,5c	49,2c	18,5	10,5	70,4	78,9	11,1	10,6
	36h	4,3f	0e	50	0	50	0	0	0
0,10%	12h	62,5c	35,6d	32,0	29,0	56,0	60,0	12,0	11,0
	24h	48,3d	11,2d	23,8	50	68,4	50	7,8	0
	36h	3,0f	0e	0	0	100	0	0	0
0,15%	12h	8,3e	0e	0	0	100	0	0	0
	24h	0g	0e	0	0	0	0	0	0
	36h	0g	0e	0	0	0	0	0	0

Hb1 – F91-2-5 X M-60; Hb2 – F93-4-2 X M-27. As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Scott e Knott,  $p < 0,05$ ).

Já as concentrações altas impedem a formação dos microtúbulos essenciais para a anáfase e induzem o aparecimento de uma estrutura formada por uma tubulina variante que permite que as células retornem à intérfase sem a ocorrência de morte celular, com conseqüente aparecimento de células com número cromossômico duplicado. Os autores ressaltam o tempo de exposição a essas altas concentrações, que parece ser um fator essencial para o sucesso do procedimento. Tempos de exposição curtos são os mais adequados.

Ainda os mesmos autores trabalharam com duas concentrações, 0,02% e 0,2% (utilizadas como concentrações baixa e alta). Os melhores efeitos observados na concentração de 0,2% são consistentes com os resultados

observados neste trabalho e em vários outros, nos quais concentrações de colchicina na faixa de 0,05% a 0,10% são eficientes na indução de duplicação cromossômica. O trabalho de Caperta et al. (2006) sugere, então, que um aumento dessas concentrações para 0,2%, com a diminuição do tempo de exposição (2 horas e meia a 4 horas) pode contribuir para uma maior eficiência na obtenção de poliplóides. Estes testes para os híbridos entre capim-elefante e milho deverão ser realizados futuramente.

Os resultados de alterações citogenéticas após poliploidização no tratamento de 0,05% de colchicina (12 horas) são apresentados na Tabela 4. Se a eliminação de cromossomos fosse uma resposta para aloploidização das células, esperaria-se um aumento de frequências de alterações mitóticas relacionadas com eliminação cromossômica após o aparecimento das primeiras células poliploidizadas. As primeiras células com conteúdo de DNA 6x aparecem 12 horas após o tratamento com colchicina. Deveríamos esperar, então, que as alterações citogenéticas aumentassem de frequência a partir de 24 horas após o aparecimento dessas células. Os resultados observados na Tabela 4 não sustentam essa hipótese.

TABELA 4 Percentual de alterações citogenéticas nas raízes coletadas em *seedlings* em desenvolvimento (com 12, 24, 36, 48 e 60 horas) após tratamento com colchicina 0,05%, por 12 horas.

Alterações	12h	24h	36h	48h	60h
Pontes	0,13a	0,15a	0,16a	0,02a	0,21a
Fragmentos	0a	0a	0a	0a	0a
c-metáfases	5,55a	2,11b	1,12c	0,15c	0,02d
Anáfase multipolar	7,54a	2,11b	0,06c	0d	0d
Segregação tardia	5,43a	4,21b	1,20c	0,07d	0,06d
Não orientação metáfase	6,54a	3,21b	2,11c	1,18c	0,06d
Micronúcleos	1,12a	12,31b	21,23c	18,13c	12,21b

As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Scott e Knott,  $p < 0,05\%$ ).

Para todas as variáveis analisadas, observaram-se reduções em suas frequências a partir de 24 horas após o tratamento com colchicina, exceto para micronúcleos.

A explicação parece estar na hipótese de que essas alterações ocorrem em decorrência do efeito da colchicina sobre organização do citoesqueleto. Tal efeito, comumente denominado de efeito aneuploidizante (Carpeta et al., 2006), está associado à ocorrência de alterações citogenéticas, como c-metáfases, anáfases multipolares, segregação tardia, não orientação na metáfase e micronúcleos. Com o passar do tempo (tempo de recuperação), após a exposição da colchicina, este efeito dilui-se e, por isso, observaram-se reduções nos percentuais dessas alterações. Cabe, então, aqui, distinguirmos entre um processo de eliminação cromossômica, controlado geneticamente e que está associado à reunião de dois genomas diferentes, como descrito para muitos híbridos (Barclay, 1975; Riera-Lizarazu et al., 1996; Linde-Laursen & von Bothmer, 1999; Germand et al., 2005) de um processo de eliminação cromossômica, devido a efeitos aneuploidizantes da colchicina.

A segunda hipótese parece explicar o que acontece nos híbridos entre capim-elefante e milheto. Carpeta et al. (2006) chamam a atenção para o fato de que a frequência dessas alterações na mitose é maior em baixas concentrações de colchicina do que em altas concentrações, quando ambas são aplicadas em tempos de exposição curtos. O uso de uma concentração um pouco maior de colchicina (ao redor de 0,2%), em tempos de exposição curtos (2 a 6 horas), pode ser uma estratégia útil nos futuros experimentos de indução de duplicação cromossômica nos híbridos de *Pennisetum*. Espera-se, com esses tratamentos, que um maior número de células sofra poliploidização e consiga retornar à intérfase sem os efeitos aneuploidizantes e tóxicos associados à colchicina.

A observação desses efeitos da colchicina sobre as células, provavelmente, é a explicação para o surgimento de células com variação no número cromossômico e para os resultados de Abreu et al. (2006) e de Barbosa

et al. (2007), que encontraram variações numéricas em metáfases (14 a 42 cromossomos). Tal variação surge no momento de exposição à colchicina, tornando a planta resultante do experimento uma quimera de células contendo aneuploidias.

Alguns trabalhos têm demonstrado a relação entre o tamanho dos micronúcleos com a quantidade de DNA eliminada pela célula e transportada pelos micronúcleos (Carpeta et al., 2006; Germand et al., 2005). Schoenlein et al. (2003), analisando os tamanhos de micronúcleos induzidos por radiação e colchicina, constaram que os micronúcleos induzidos por colchicina eram 8,78 vezes maiores do que os induzidos por radiação. A explicação é que a colchicina é responsável, devido ao seu efeito aneuploidizante, pela eliminação de cromossomos inteiros, enquanto que a radiação que induz quebras de DNA leva à eliminação de fragmentos menores.

Diante dessa teoria, os micronúcleos observados neste trabalho, durante o desenvolvimento dos embriões triplóides, deveriam ser menores do que os observados pelo efeito da colchicina sobre as células. A análise de diâmetro de 23 micronúcleos observados nos embriões triplóides e de 19 micronúcleos observados após tratamento com colchicina confirma esta teoria. A relação de tamanho, considerando a média em ambas as situações, é de 12,31 vezes (tamanho médio dos micronúcleos por exposição à colchicina/tamanho médio dos micronúcleos nos embriões triplóides). Essas observações suportam a teoria de que seqüências menores são eliminadas nos embriões e cromossomos inteiros são eliminados devido ao efeito aneuploidizante da colchicina.

Os resultados aqui apresentados auxiliam no entendimento das modificações genômicas associadas aos eventos de hibridação e poliploidização em híbridos de capim-elefante e milheto. O entendimento dessas alterações visa, futuramente, melhorar os protocolos de indução de poliploidia nesses híbridos, procurando-se eficiência em larga-escala para a obtenção de plantas úteis ao melhoramento.

#### 4 CONCLUSÕES

- Eliminação de seqüências de DNA com diminuição da quantidade de DNA acontece durante os primeiros estágios de desenvolvimento embrionário triplóide, após a hibridação entre o capim-elefante e o milheto.
- A colchicina exibe um efeito aneuplodizante sobre as células dos explantes triplóides tratados durante os experimentos de indução de duplicação cromossômica. Este efeito parece estar associado, mais tarde, à observação de um grande número de células com variação no número cromossômico observado nas plantas recuperadas dos experimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J.C.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; BARBOSA, S. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1629-1635, 2006.
- BAPTISTA-GIACOMELLI, F.R.; PAGLIARINI, M.S.; ALMEIDA, J.L. Elimination of micronuclei from microspores in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 681-684, 2000.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; ABREU, J.C. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milho. **Bragantia**, v. 66, p. 365-372, 2007..
- BARCLAY, I.R. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. **Nature**, v. 256, p. 410-411, 1975.
- CAPERTA, A.D.; DELGADO, M.; RESSUREIÇÃO, F.; MEISTER, A.; JONES, R.N.; VIEGAS, W.; HOUBEN, A. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. **Protoplasma**, v. 227, p. 147-155, 2006.
- DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 38, p. 285-302, 1997.
- GERMAND, D.; RUTTEN, T.; VARSHNEY, A.; RUBTSOVA, M.; PRODANOVIC, S.; BRÜB, C.; KUMLEHN, J.; MATZK, F.; HOUBEN, A. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. **Plant Cell**, v. 17, p. 2431-2438, 2005.
- GODAY, C., AND RUIZ, M.F. Differential acetylation of histones H3 and H4 in paternal and maternal germline chromosomes during development of sciarid flies. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 4765-4775, 2002.
- HANNA, W.W. Melhoramento do capim-elefante. In: PASSOS, L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E.; PEREIRA, A.V. (Ed.). **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p.17-28.

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

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

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**, v. 39, p. 680-687, 1996.

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

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

PASAKINSKIENÉ, I. Culture of embryos and shoot tips for chromosome doubling in *Lolium perenne* and sterile hybrids between *Lolium* and *Festuca*. **Plant Breeding**, v. 119, p. 185-187, 2000.

PEREIRA, A.V.; VALLE, C.B.; FERREIRA, R.P.; MILLES, J.W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C., MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Cuiabá: Fundação Mato Grosso, 2001. 1183p.

PERONDINI, A.L.P.; RIBEIRO, A.F. Chromosome elimination in germ cells of *Sciara* embryos. Involvement of the nuclear envelope. **Invertebr. Reprod. Dev.**, v. 32, p. 131-141, 1997.

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

SCHANK, S.C.; DIZ, D.A.; BATES, D.B.; THOMPSON, K.E. Genetic improvement of napiergrass and hybrids with pearl millet. **Biomass and Bioenergy**, v. 5, p. 35-40, 1993.

SCHOENLEIN, P.V.; BARRET, J.T.; KULHARYA, A.; DOHN, M.R.; SANCHEZ, A.; HOU, D.Y.; MCCOY, J. 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**, v. 55, p. 1051-1065, 2003.

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

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

S. SOBRINHO, F.; PEREIRA, A.V.; LEDO, F.I.S.; BOTREL, M.A.; OLIVEIRA, J.S.; XAVIER, D.S. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milheto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 873-880, 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**, v. 29, p. 353-362, 2006.

## CAPÍTULO 5

### ANÁLISE DE PÓLEN EM *Pennisetum* POR CITOMETRIA DE FLUXO

## RESUMO

CAMPOS, José Marcello Salabert. Análise de pólen em *Pennisetum* por citometria de fluxo. In: \_\_\_\_\_. **Obtenção de híbridos hexaplóides e análise genômica em *Pennisetum sp.* por citometria de fluxo.** 2007. Cap.5, p.103-115. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Um método simples e confiável foi desenvolvido para isolamento de núcleos de polens de *Pennisetum purpureum*, *Pennisetum glaucum* e seus híbridos hexaplóides para análise de DNA por citometria de fluxo. Os núcleos foram isolados dos polens por maceração direta ou tratamento ultrasônico. Os núcleos isolados e posteriormente filtrados em uma tela de náilon foram úteis para análise por citometria de fluxo. Os tratamentos ultra-sônicos foram otimizados e o método é eficiente para a preparação de muitas amostras. Somente o pico 1C, representando células haplóides, foi detectado a partir dos núcleos isolados de *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*. No híbrido hexaplóide, variação no conteúdo de DNA dos núcleos foi observada, sugerindo instabilidade meiótica.

---

Comitê Orientador: Lisete Chamma Davide (Orientadora) – UFLA; Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite.

## ABSTRACT

CAMPOS, José Marcello Salabert. **Pollen analysis in *Pennisetum* by flow cytometry**. In: \_\_\_\_\_. **Hexaploids hybrids obtaining and genomic analysis in *Pennisetum sp.* by flow cytometry**. 2007. Chap.5, p.102-114. Thesis (Doctor of Science in Agronomy/Genetics and Plant Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A simple and reliable method was developed for isolating pollen nuclei from *Pennisetum purpureum*, *Pennisetum glaucum* and their hexaploid hybrids for DNA analysis using flow cytometry. The nuclei were released from pollen by directly chopping or ultrasonic treatments. The isolated nuclei following filtration through nylon mesh were suitable for flow cytometric analysis. Ultrasonic treatment was optimized and the method is effective and suitable for the preparation of many samples. Only a single 1C peak representing the haploid DNA level was detected in nuclei isolated from *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. In the hexaploid hybrid, the DNA content variation of nuclei was observed, suggesting meiotic instability.

---

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

## 1 INTRODUÇÃO

A análise de quantidade de DNA nuclear por citometria de fluxo tem sido usada com várias aplicações em plantas, entre elas a diferenciação de níveis de ploidia e a comparação de tamanhos de genoma (Galbraith 1990). Um pré-requisito para o sucesso da técnica é o isolamento de núcleos intactos a partir dos tecidos vegetais analisados (Dolezel, 1997). O método mais comum utilizado para liberação dos núcleos é a trituração dos tecidos em um tampão de lise e os tecidos mais utilizados são folhas e raízes (Pan et al., 2004).

Poucos trabalhos descrevem a avaliação por citometria de fluxo de núcleos isolados a partir de grão de pólen. Em trabalhos anteriores, em que o conteúdo de DNA nuclear foi determinado por citometria de fluxo, os núcleos foram isolados dos grãos de pólen por maceração direta, em lírio, milho e *Dendranthema grandiflora* (Bino et al. 1990), *Nicotiana sylvestris* (Paepe et al. 1990) e *Cupressus dupreziana* (Pichot & Maataoui 2000). Outros trabalhos têm utilizado choques osmóticos em tampões hipotônicos para a liberação dos núcleos (Russel 1986; Dupuis et al. 1987; Zhou 1988). Pan et al. (2004) utilizaram tratamentos ultra-sônicos para a liberação dos núcleos de grãos de pólen de *Brassica napus*.

Em *Pennisetum*, a avaliação de quantidade de DNA de grãos de pólen pode ser útil na avaliação de estabilidade meiótica de híbridos obtidos em programas de melhoramento. Neste capítulo, avaliam-se a eficiência de duas metodologias para isolamento de núcleos de pólen em *Pennisetum* e a análise de quantidade de DNA por citometria de fluxo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal e coleta de pólen

As inflorescências foram coletadas em duas plantas do BAG-64 (capim-elefante), uma planta do M-64 (milheto) e uma planta híbrida entre capim-elefante e milheto, identificada como hexaplóide pela citometria de fluxo (planta oriunda dos experimentos apresentados no capítulo 3, cruzamento 91/25-5 x M-31). Essas plantas são mantidas no campo experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. As anteras foram dissecadas em lâmina na presença do tampão de extração de núcleos para citometria de fluxo, LBO1 (Dolezel, 1997). A solução de polens foi coletada com auxílio de uma seringa e transferida para um microtubo. Para a liberação dos núcleos dois métodos, foram testados:

- Maceração mecânica dos grãos de pólen em tampão LBO1;
- Tratamento ultrasônico – os tratamentos consistiram de pulsos de 30 segundos, separados por pausas de 5 segundos (por 5 minutos ou 10 minutos).

Para cada planta, foi preparada uma única amostra de polens, que foi subdividida, após homogeneização, em nove alíquotas que foram analisadas pelos dois métodos testados. O objetivo dessa homogeneização foi padronizar a quantidade de pólen em todas as análises, essencial para a comparação da eficiência das técnicas para a liberação dos núcleos.

Os experimentos de preparo das amostras de grãos de pólen foram conduzidos no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora, em Juiz de Fora, MG.

### 2.2 Análise por citometria de fluxo

Após os protocolos de liberação dos núcleos, as amostras foram filtradas em uma malha de 50 $\mu$ m. À suspensão nuclear foram adicionados 25 $\mu$ L de iodeto

de propídio e 2,5µL de RNase. Para cada amostra, foram analisados pelo menos 10 mil núcleos, sendo quantificados o conteúdo de DNA e os tamanhos dos núcleos analisados (análise de FSC – *Forward scatter*). A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), sendo os histogramas obtidos no software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.8 (disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA nuclear (pg) dos polens foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 de *Glycine max* (utilizado neste caso, como padrão de referência “externo”), como mostrado a seguir:

$$\text{Amostra (planta) DNA 2C (pg)} = \frac{\text{Canal do pico G1 da amostra}}{\text{Canal do pico G1 do padrão}} \times \text{Conteúdo de DNA padrão (2,50pg)}$$

Os experimentos de citometria de fluxo foram conduzidos nos Laboratórios de Genética e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, em Juiz de Fora, MG.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para quantidade de núcleos obtidos pelos métodos analisados por citometria de fluxo dos grãos de pólen em *Pennisetum* são apresentados na Tabela 1.

As comparações entre os métodos devem ser realizadas dentro de cada planta, uma vez que, entre plantas, não existe padronização da quantidade de polens. De modo geral, observa-se que, no tratamento ultra-sônico por 10 minutos (pulsos de 30 segundos separados por pausas de 5 segundos), ocorre maior liberação de núcleos (em médias de 4.333 e 4.847 núcleos. para as plantas 1 e 2 do BAG 64; 6.254 núcleos para a planta do M 64 e 3.493 núcleos para a planta hexaplóide). O método de maceração mecânica não apresentou grande eficiência, com poucos núcleos liberados. Os resultados de quantificação de DNA para os núcleos dos grãos de pólen são mostrados na Tabela 2.

Para as plantas do BAG 64 e do M 64, os métodos empregados não interferem na estimativa da quantidade de DNA, não havendo diferença estatística entre as estimativas (Tabela 2). Para a planta hexaplóide, a análise estatística não foi realizada, uma vez que existe ampla variação nas estimativas de quantidade de DNA entre os grãos de pólen, provavelmente pela existência de instabilidade meiótica nesta planta. Exemplos de histogramas para as plantas 1 do BAG 64, para a planta do M 64 e para a planta hexaplóide são mostrados na Figura 1.

A análise de FSC (Forward Scatter) revelou um tamanho uniforme para os núcleos dos grãos de pólen, para as plantas de capim-elefante e milheto, sendo os núcleos de milheto ligeiramente maiores (3,56% maiores).

TABELA 1 Eficiência dos métodos testados (número de núcleos obtidos a partir dos grãos de pólen e analisados por citometria de fluxo)

Método	Amostra	BAG 64 (capim-elefante)		M 64	Hexaplóide
		Planta 1	Planta 2	(Milheto) Planta 1	Planta 1
Maceração mecânica	Amostra 1	103	213	101	104
	Amostra 2	156	367	56	54
	Amostra 3	231	231	49	38
Ultrassom 5 minutos	Amostra 1	1256	2345	1654	2567
	Amostra 2	1457	2456	1654	2345
	Amostra 3	1567	2654	1234	1476
Ultrassom 10 minutos	Amostra 1	4321	3789	6543	3215
	Amostra 2	3789	5432	5432	3499
	Amostra 3	4890	5321	6789	3765

TABELA 2 Quantidade de DNA (pg) para os núcleos obtidos de grãos de pólen em *Pennisetum*

Métodos	BAG 64 (capim-elefante)		M 64	Hexaplóide
	Planta 1	Planta 2	Planta 1	Planta 1
Maceração mecânica	2,27pg a	2,28pg a	2,37pg a	3,23 – 5,43pg
Ultrassom 5 minutos	2,31pg a	2,26pg a	2,32pg a	2,91 – 5,20pg
Ultrassom 10 minutos	2,30pg a	2,31pg a	2,35pg a	2,89 – 5,67pg

\* Média das quantidades de DNA estimadas pelas três amostras analisadas

\* Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Para os núcleos dos grãos de pólen da planta hexaplóide, a variação de tamanho é grande (existindo um coeficiente de variação de 32,23%) (Figura 2).

Os resultados demonstram que as plantas de capim-elefante e milheto apresentam estabilidade meiótica, com polens normais ( $n$ ), com quantidade de DNA correspondendo à metade de uma célula somática (considerando a quantidade de DNA  $2n$  para capim-elefante de 4,54 e para milheto 4,75pg, dados apresentados no capítulo 3). Não foram detectados polens não reduzidos.

Para a planta hexaplóide, a variação na quantidade de DNA foi grande, com polens variando de 2,89 a 5,67pg. O valor esperado para polens normais de uma planta hexaplóide com estabilidade meiótica seria em torno de 4,60-4,70 pg (correspondente à quantidade 3X de DNA). Valores abaixo e acima desse esperado foram observados, sugerindo a formação de gametas aneuplóides devido à instabilidade meiótica.

Com este trabalho procurou-se padronizar uma metodologia para análise de núcleos de grãos de pólen de *Pennisetum* por citometria. As primeiras tentativas com os protocolos padrões de citometria que utilizam maceração mecânica não conduziram a bons resultados, pois poucos núcleos foram isolados. Pan et al. (2004) relatam as dificuldades de obtenção de núcleos de *Brassica napus* por estes métodos, devido à parede espessa dos grãos de pólen.

Assim como no trabalho de Pan et al. (2004), os tratamentos ultrassônicos utilizados neste trabalho foram mais eficientes na obtenção dos núcleos. Pan et al. (2004) descrevem algumas vantagens desse método, como: (1) é um método simples, que não requer procedimentos manuais, como maceração mecânica para a obtenção dos núcleos; (2) é um método reproduzível, desde que as condições de ultra-som possam ser controladas; (3) é um método eficiente para o preparo de muitas amostras; (4) as preparações são livres de “*debris*” e os histogramas apresentam baixos *backgrounds*. A otimização desses protocolos permitirá, futuramente, a análise dos grãos de pólen das plantas hexaplóides produzidas via duplicação cromossômica, como as plantas selecionadas e discutidas no Capítulo 2. A identificação de plantas com meiose regular é o objetivo principal dessas análises.

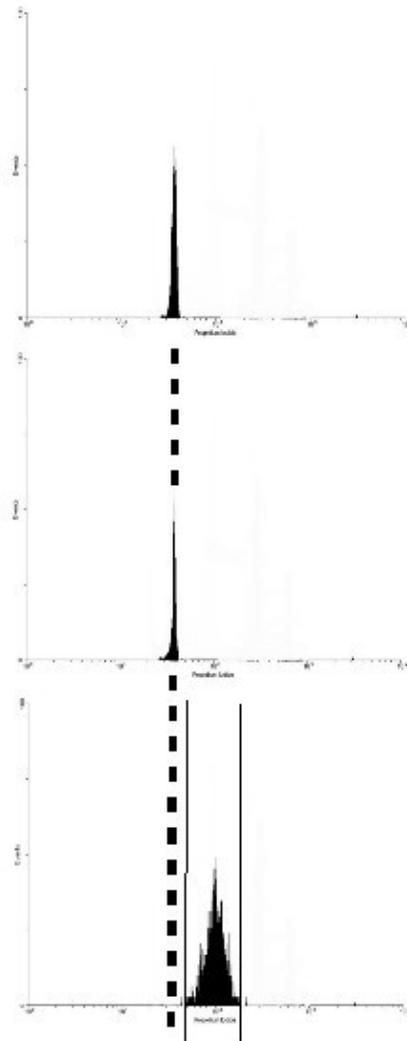


FIGURA 1 Histogramas de quantidade de DNA em grãos de pólen. (A) Planta de capim-elefante do BAG 64; (B) planta de milho do M 64; (C) planta hexaplóide. A linha tracejada representa a posição de 2,30 e 2,35pg e as linhas cheias os limites de 2,89 e 5,67 pg.

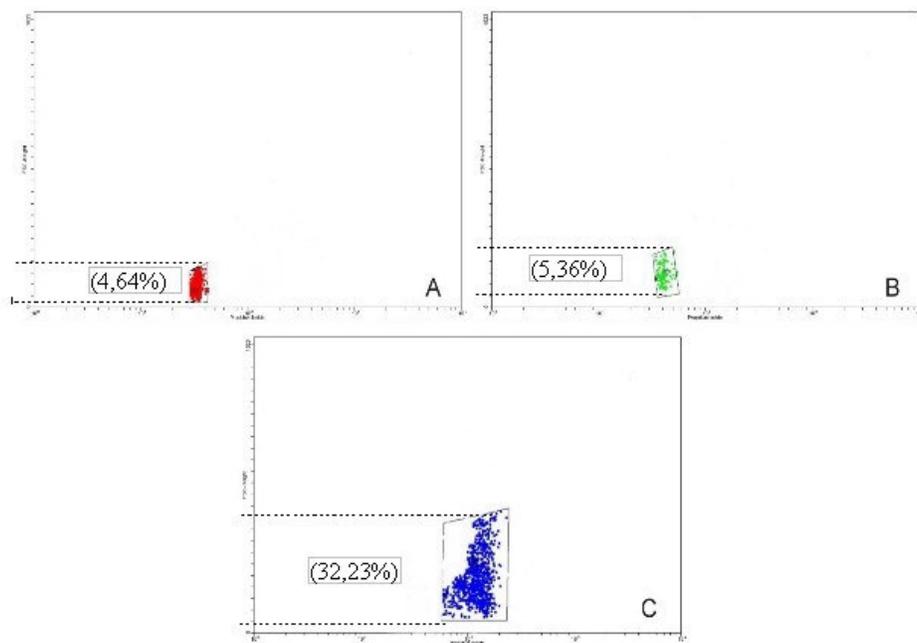


FIGURA 2 Análise de tamanho dos núcleos dos grãos de pólen (eixo vertical). (A) Planta de capim-elefante do BAG 64; (B) planta de milho do M 64; (C) planta hexaplóide. As linhas tracejadas marcam a variação no tamanho dos núcleos dos grãos de pólen (variação entre parenteses). Note que os núcleos de milho são ligeiramente maiores.

#### **4 CONCLUSÕES**

- O tratamento ultra-sônico, por 10 minutos, dos grãos de pólen foi eficiente para a liberação dos núcleos e sua posterior análise para a quantificação de DNA por citometria de fluxo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BINO, R.J.; TUYL, J.M.V.; VRIES, J.N.D. Flow cytometric determination of relative nuclear DNA contents in bicellulate and tricellulate pollen. **Ann. Bot.**, v. 65, p. 3-8, 1990.

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

DUPUIS, I.; ROECKEL, P.; MANTHYS-ROCHON, E.; DUMAS, C. Procedure to isolate sperm cells from corn (*Zea mays* L.) pollen grains. **Plant Physiology**, v. 85, p. 876-878, 1987.

GALBRAITH, D.W. Flow cytometry analysis of plant genomes. **Methods Cell Biol.**, v.33, p. 549-562, 1990..

PAEPE, R.D.; KOULOU, A.; PHAM, J.L.; BROWN, S.C. Nuclear DNA content and separation of *Nicotiana sylvestris* vegetative and generative nuclei at various stages of male gametogenesis. **Plant Science**, v.70, p. 255-265, 1990.

PAN, G.; ZHOU, Y.; FOWKE, L.C.; WANG, H. An efficient method for flow cytometric analysis of pollen and detection of 2n nuclei in *Brassica napus* pollen. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 196-202, 2004.

PICHOT, C.; MAATAOUI, M.E. Unreduced diploid nuclei in *Cupressus dupreziana* A. Camus pollen. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 574-579, 2000.

RUSSEL, S.D. Isolation of sperm cells from the pollen of *Plumbago zeylanica*. **Plant Physiology**, v. 81, p. 317-319, 1986.

ZHOU, C. Isolation and purification of generative cells from fresh pollen of *Vicia faba* L. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 107-110, 1988.