



**MICROPROPAGAÇÃO E DUPLICAÇÃO
CROMOSSÔMICA DE HÍBRIDOS TRIPLÓIDES
DE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO**

SANDRO BARBOSA

2004

58518

049972

SANDRO BARBOSA

**MICROPROPAGAÇÃO E DUPLICAÇÃO
CROMOSSÔMICA DE HÍBRIDOS TRIPLÓIDES
DE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO**

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

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA



58518

Orientadora

Profª. Drª. Lisete Chamma Davide

BIBLIOTECA CENTRAL

UFLA

Nº CLAS

T633.171

BAR

MIC

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2004

Nº REGISTRO

58518

DATA

18/01/05

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

Barbosa, Sandro

Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos
triplóides de capim-elefante e milho / Sandro Barbosa. –
Lavras : UFLA, 2004.

119 p. : il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Duplicação cromossômica. 2. Micropropagação. 3. Híbrido
interespecífico. 4. Citogenética. 5. *Pennisetum purpureum*. 6.
Pennisetum glaucum.

I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 633.171
- 633.20823

SANDRO BARBOSA

**MICROPROPAGAÇÃO E DUPLICAÇÃO
CROMOSSÔMICA DE HÍBRIDOS TRIPLÓIDES
DE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO**

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

APROVADA em 04 de Março de 2004

Dr. Antônio Vander Pereira	EMBRAPA
Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto	UFLA
Profa. Dra. Vânia Helena Techio	UnC
Prof. Dr. Juscélio Clemente de Abreu	UNINCOR


Prof.^a. Dr.^a. Lisete Chamma Davide
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

*Aos meus pais, Cecília e Mauro,
a minha irmã, Sarah e
sobrinhas Isabella e Isadora*

OFEREÇO

*A D. Vitória Gomes,
Por acreditar sempre no meu potencial,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade que me concedeu de fazer este curso.

A Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, por propiciarem o desenvolvimento dos meus estudos.

A Professora Dra. Lisete Chamma Davide, pela orientação, pelos ensinamentos e, sobretudo, por ter acreditado no meu potencial permitindo o amadurecimento da minha 'visão de mundo' a respeito da Ciência e da Vida.

Ao Pesquisador Dr. Antônio Vander Pereira, pela co-orientação, amizade, confiança, pelos incansáveis incentivos e a disponibilidade constante.

Ao Professor Dr. José Eduardo Brasil, pela co-orientação, pelas valiosas sugestões e companheirismo.

Aos meus familiares que sempre se fizeram presentes ainda que distantes, seja em pensamentos ou em forma de orações.

Ao meu amigo e cunhado Carlos Augusto pela compreensão, disponibilidade e suporte computacional.

Aos amigos Juscélio e Vânia, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos Cássia, Evaldo, Josiane e Renake, pelas valiosas colaborações na execução deste trabalho.

Aos meus amigos, Cesinha, Cibele, Cristiano Martinoto, Déa, Dú Lambert, Espeto, Gustavo (Vermelho), Juliane, Lívia Tomé, Luciano, Marilú, Nell, Paty, Paulo Schmidt, José Marcelo, Soraya, Tatiana, Tharsio e Tulinho por compartilharmos o dia-a-dia durante o período do doutorado.

Aos meus amigos do GPP - São Benedito e do Projeto Universidades Renovadas - PUR, pela amizade, confiança e incentivo.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela convivência sempre amigável.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	
1 Introdução Geral	1
2 Referencial Teórico	4
2.1 O gênero <i>Pennisetum</i>	4
2.1.1 Caracterização botânico-agronômica de <i>Pennisetum purpureum</i> <i>Pennisetum glaucum</i>	4
2.1.2 Caracterização botânico-agronômica híbridos interespecíficos entre <i>P. purpureum</i> e <i>P. glaucum</i>	5
2.2 Caracterização citogenética de <i>Pennisetum</i>	7
2.2.1 Citogenética de <i>P. purpureum</i> e <i>P. glaucum</i>	9
2.2.2 Citogenética de híbridos entre <i>P. purpureum</i> e <i>P. glaucum</i>	11
2.3 Melhoramento genético e a obtenção de híbridos triploides e hexaploides induzidos de <i>Pennisetum</i>	13
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> e micropropagação para obtenção de explantes	17
2.5 Duplicação cromossômica e avaliação de ploidia	21
2.5.1 Indução de poliploidia	21
2.5.2 Avaliação da ploidia	27
2.5.3 Avaliação da viabilidade do pólen	29
2.5.4 A macho fertilidade em <i>Pennisetum</i>	31
Referências bibliográficas	35
CAPÍTULO 2 – Micropropagação de híbridos triploides de capim- elefante e milheto para obtenção de explantes	49
RESUMO	50
ABSTRACT	51
1 Introdução	52
2 Material e métodos	54
2.1 Material genético	54
2.2 Preparo dos explantes	54
2.3 Tratamentos, delineamento experimental e variáveis avaliadas.....	55
3 Resultados e discussão	57
3.1 Multiplicação de híbridos PMN em diferentes concentrações de BAP....	57
3.1.1 Número de brotações	59
3.1.2 Número de raízes	61
3.1.3 Comprimento do maior broto	64
3.1.4 Produção de matéria seca	66

4 Conclusões	68
Referências bibliográficas	69
CAPÍTULO 3 – Duplicação cromossômica em híbridos triplóides de capim-elefante e milho	72
RESUMO	73
ABSTRACT	74
1 Introdução	75
2 Material e métodos	78
2.1 Material genético	78
2.2 Indução de poliploidia	79
2.2.1 Experimento 1 – Exposição de Meristemas	79
2.2.2 Experimento 2 – Exposição de seedlings <i>in vitro</i>	83
2.2.3 Experimento 3 – Exposição de plântulas <i>in vitro</i>	84
2.2.4 Experimento 4 – Exposição de segmentos caulinares <i>in vitro</i>	86
2.2.5 Experimento 5 – Exposição de seedlings <i>in vivo</i>	87
2.3 Análise citogenética.....	88
2.4 Análise estatística.....	90
3 Resultados	91
3.1 Indução de poliploidia em Meristemas	91
3.2 Indução de poliploidia em seedlings <i>in vitro</i>	92
3.3 Indução de poliploidia em plântulas <i>in vitro</i>	97
3.4 Indução de poliploidia em segmentos caulinares <i>in vitro</i>	99
3.5 Indução de poliploidia em seedlings <i>in vivo</i>	99
4 Discussão	103
5 Conclusões	113
Referências bliográficas	114

CAPÍTULO 1

MICROPROGAÇÃO E DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA DE HÍBRIDOS TRIPLÓIDES DE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO

RESUMO

BARBOSA, Sandro. **Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim-elefante e milheto**. 2004. 119 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.*

Híbridos interespecíficos triplóides ($3x$) obtidos pela combinação do capim-elefante ($2n = 4x = 28$) com o milheto ($2n = 2x = 14$) chegam a superar seus genitores em produção e qualidade forrageira, revelando ser uma alternativa para a obtenção de cultivares superiores, contribuindo para ampliar a produção e rentabilidade da pecuária leiteira. Entretanto, a maior limitação em relação à utilização do híbrido triplóide é a infertilidade, fazendo com que sua propagação ocorra vegetativamente, o que constitui uma barreira para sua utilização nos programas de melhoramento genético do capim-elefante. A restauração da fertilidade pode ser conseguida pela duplicação cromossômica, permitindo que os mesmos voltem aos programas de melhoramento genético, transferindo alelos de características desejadas ao capim-elefante e viabilizando a sua propagação via semente. Objetivando restaurar a fertilidade de híbridos entre capim-elefante e milheto foram utilizadas soluções de colchicina 0,05% e 0,1%, aplicadas em 'seedlings', plântulas e segmentos caulinares cultivados *in vitro* em intervalos de 12 e 24 horas de exposição. 'Seedlings' de diferentes genótipos híbridos cultivados *in vivo* foram submetidos à exposição de 24 horas em solução de 0,05% de colchicina, mesmo tratamento aplicado a meristemas laterais em diferentes períodos de exposição. A duplicação cromossômica foi confirmada através do número cromossômico em células de meristemas de raiz e avaliação da viabilidade polínica por meio de testes de germinação *in vitro*. 'Seedlings' cultivados e tratados *in vitro* apresentaram a melhor resposta ao tratamento de indução de poliploidia em solução de colchicina 0,1% por 24 horas, no qual 38% das plantas sobreviventes apresentaram o conjunto cromossômico duplicado e a fertilidade confirmada pela presença de pólenes viáveis.

* Comitê orientador: Lisete Chamma Davide (orientadora), José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA e Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite.

ABSTRACT

BARBOSA, Sandro. **Micropropagation and chromosomal duplication of elephantgrass and pearl millet triploid hybrids**. 2004. 119 p. Thesis (Doctor of Science in Agronomy) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.*

Interspecific triploid (3x) hybrids, obtained through the combination of elephant-grass ($2n = 4x = 28$) with pearl millet ($2n = 2x = 14$) can overcome their ancestors in production and forage quality. Therefore, they are an alternative to obtain superior cultivars, contributing to increase the production and profit in milk production. However, the greatest limitation of the triploid hybrid is its infertility leading to a vegetative propagation, which is a barrier for its use in elephantgrass genetic improvement programs. Fertility can be restored through chromosomal duplication. This made possible the return of triploid hybrids to elephantgrass genetic improvement programs, transferring alleles with the desired characteristics to the elephantgrass allowing its propagation through seeds. With the objective of restoring fertility of elephantgrass and pearl millet hybrids, 0.05% and 0.1%, solutions of colchicines were applied on seedlings, plantlets and stems segments cultivated *in vitro* at 12 and 24 hours intervals of exposition. Seedlings of different hybrid genotypes cultivated *in vivo* were submitted to 24 hours exposition in 0.05% solution of colchicine, the same treatment applied on lateral meristems in different exposition periods. Chromosomal duplication was confirmed through the chromosomal number in cells of root meristems and evaluation of pollen viability through *in vitro* germination tests. Seedlings that were cultivated and treated *in vitro* presented the best response to the poliploidy induction treatment in 0.1% solution of colchicine for 24 hours, in which 38% of the surviving plants presented a doubled chromosomal group and fertility confirmed by the presence of viable pollens.

* Guidance committee: Lisete Chamma Davide (Major professor), José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA and Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Pennisetum Rich. é um dos mais importantes gêneros da família Poaceae e está distribuído por toda a faixa tropical do planeta. Caracteriza-se por sua alta complexidade e heterogeneidade devido aos inúmeros arranjos taxonômicos propostos e à ampla variabilidade genética descrita em, aproximadamente, 140 espécies (Brunken, 1977; Kativu e Mithen, 1987; Xavier, et al., 1995; Jauhar e Hanna, 1998).

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.) e o milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] são as espécies cultivadas de maior importância econômica e forrageira do gênero. O capim-elefante está entre as espécies de maior eficiência fotossintética, apresentando boa palatabilidade, alto valor nutritivo, perenidade e elevada capacidade de produção e acúmulo de matéria seca de boa qualidade (Pereira et al., 2001). Embora seja amplamente difundida, uma das limitações à expansão da área cultivada com esta espécie, entre os 100 milhões de hectares ocupados por forrageiras cultivadas no Brasil (Pereira et al, 2003), é a necessidade do uso da propagação vegetativa, visto que a maioria das cultivares produz sementes minúsculas, deiscentes e de baixo vigor.

Segundo Pereira et al. (2001), o capim-elefante ainda apresenta pouca disponibilidade de cultivares melhoradas adaptadas às diferentes condições ambientais e sistemas de utilização, especialmente sob pastejo rotativo. A obtenção de variabilidade genética para o melhoramento do capim-elefante pode ser conseguida por meio da hibridação intra e interespecífica, uma vez que essa forrageira tem boa capacidade de combinação genética com outras espécies, especialmente o milheto.

Os programas de melhoramento genético têm se preocupado em explorar o potencial do germoplasma de ambas espécies, com o intuito de desenvolver híbridos e cultivares mais produtivos, visando atender à forte demanda por novas variedades forrageiras que combinem elevada capacidade de produção com alta qualidade (Pereira et al. 2003).

Os híbridos obtidos pelo cruzamento do capim-elefante com o milheto apresentam boas qualidades forrageiras, revelando serem uma alternativa para a obtenção de cultivares superiores e incrementar a produção e a rentabilidade da pecuária leiteira. Entretanto, a infertilidade dos híbridos tem sido apontada como um problema, sendo atribuída à ocorrência de irregularidades meióticas, advindas da condição triplóide (Techio, 2002), limitando o seu emprego no melhoramento genético do capim-elefante e produção de sementes para implementação de pastagens economicamente viáveis.

A restauração da fertilidade pode ser conseguida pela duplicação cromossômica, utilizando colchicina (Krishnaswamy & Raman, 1951 e 1954; Hanna, 1981; Hanna et al., 1984) e outros antimitóticos (Dujardin & Hanna, 1985; Hanna & Dujardin, 1986; Abreu, 2002). O hexaplóide artificial produzido apresenta meiose bastante regular, progênie com alta frequência de pólen e sementes grandes, viáveis e com menor deiscência, quando comparadas às do capim-elefante, viabilizando a propagação via semente.

Embora a literatura relate metodologias de duplicação cromossômica do híbrido triplóide de capim-elefante com milheto (Hanna, 1981 e Hanna et al., 1984), ainda não se conseguiu produzir hexaplóides artificiais utilizando híbridos desenvolvidos no Brasil. Além disso, hexaplóides induzidos foram obtidos apenas a partir de “seedling”, o que não permite uma avaliação prévia do comportamento agrônomo do triplóide, podendo-se duplicar os cromossomos de híbridos sem valor forrageiro. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo adaptar e desenvolver metodologias de duplicação cromossômica,

utilizando os recursos da biotecnologia para restaurar a fertilidade dos híbridos triplóides e contribuir para a obtenção de cultivares superiores que se propaguem via semente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Pennisetum*

Pennisetum é um dos mais representativos gêneros da família Poaceae e da tribo *Paniceae*, é amplamente distribuído pelos trópicos e reúne 140 espécies que, baseadas em caracteres morfológicos, se encontram classificadas em 5 seções: *Eu-pennisetum*, *Heterostachya*, *Brevivalvula*, *Gymnotrix* e *Pennisetum* (Brunken, 1977).

A seção *Pennisetum* reúne as duas espécies economicamente mais importantes do gênero, o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumack) e o milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] (Martel, Ricroch & Sarr, 1996; Schmelzer, 1997).

2.1.1 Caracterização botânico-agronômica de *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*

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

De forma resumida, a espécie pode ser caracterizada como ereta, cespitosa, de porte elevado (mais de 5 m), apresentando folhas invaginantes, largas e compridas (30 a 120 cm), inflorescência tipo panícula e abundante

lançamento de perfilhos aéreos e basais (Bogdan, 1977; Xavier et al., 1995; Pereira et al., 2001).

Apresentando posição taxonômica semelhante ao *P. purpureum* até o nível de seção, o milheto (*P. glaucum*) é uma gramínea anual que apresenta caules eretos medindo de 1 a 3 m de altura e folhas largas, geralmente atingindo de 7 a 110 cm de comprimento e 3 a 8 cm de largura. A inflorescência é uma panícula densa, cilíndrica e terminal, com 10 a 150 cm de comprimento, apresentando, em média, 1500 espiguetas. Os frutos são cariopses variando de globosos a subcilíndricos e as sementes medem, em média, 3 a 4 mm. A espécie é alógama, com florescimento protogínico, o que dificulta a autofecundação. (Bogdan, 1977; Alcântara & Bufarah, 1988; Diz, 1994; Bonamigo, 1999).

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

2.1.2 Caracterização botânico-agronômica de híbridos interespecíficos entre *P. purpureum* e *P. glaucum*

Híbridos interespecíficos triplóides ($3x$) obtidos pelo cruzamento do capim-elefante ($2n = 4x = 28$) com o milheto ($2n = 2x = 14$), denominados PMN (do inglês pearl millet e napiergrass), chegam a superar seus genitores em produção e qualidade forrageira, revelando ser uma alternativa para a obtenção de cultivares superiores contribuindo para ampliar a produção e a rentabilidade da pecuária leiteira (Osgood, Hanna e Tew, 1997; Jauhar & Hanna, 1998).

Os triplóides podem ser obtidos por polinização manual e propagados vegetativamente ou por meio de sementes híbridas comerciais. Embora apresentem grande variabilidade, a maioria são fêmea e macho estéreis, o que

impede a sua utilização em cruzamentos. A variabilidade morfológica permite selecionar clones superiores que são, então, propagados vegetativamente.

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

Assim como nos genitores, vários atributos têm sido avaliados para caracterização morfológica das progênes triplóides que são consideradas semelhantes ao tetraplóide (Brunken, 1977; Diz, 1994; Hanna, 1999; Pereira et al., 2000; Techio et al., 2002). Sucintamente, os híbridos caracterizam-se por apresentarem plantas com 1,5 a 5 m de altura, produzem de 15 a 20 perfilhos por planta e são não-rizomatosas. As inflorescências podem variar de 20 a 40 cm em comprimento e 1 a 1,5 cm em diâmetro. Os estigmas geralmente estão receptivos, entretanto, as anteras são atrofiadas e raramente são "emitidas". Além disso, muitos óvulos apresentam aborto dos 4 megásporos (mais de 99%) (Hanna, 1981; Diz, 1994; Techio, 2002).

Poucos trabalhos relacionados à caracterização morfofisiológica de hexaplóides induzidos (6x) são encontrados na literatura. Sementes e 'seedlings' de dois genótipos 6x induzidos foram estudados por Diz & Schank (1990) em relação ao tamanho, poder germinativo e desenvolvimento vegetativo. Os autores verificaram que há relação entre o tamanho das sementes e as características produção de perfilhos, comprimento e largura de folhas e peso de matéria seca, sendo as plantas oriundas de sementes grandes mais produtivas. Utilizando os resultados e a progênie das plantas parentais descritas no trabalho anterior, Diz & Schank (1993) ampliaram os conhecimentos sobre o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo dos hexaplóides. Neste segundo trabalho, os autores relatam ter encontrado diferenças genéticas para características reprodutivas, como número de panículas por planta,

comprimento, espessura e florescimento das panículas e produção de sementes, comparando a progênie de sete híbridos hexaplóides. Os resultados confirmaram que plantas provenientes de sementes grandes são mais produtivas. Dados comparativos sobre produção de matéria seca, proteína bruta, fibras e a presença de alguns sais foram apresentados juntamente com a descrição de alguns atributos morfológicos como número de perfilhos, comprimento e largura das folhas foram apresentados por Krishnaswamy & Raman (1954) e Hanna (1981) para híbridos 3x e 6x, mostrando haver grande similaridade entre as duas ploidias híbridas para as características avaliadas. Esse resultado é consonante com Hanna et al. (1984) que consideram híbridos 3x e 6x morfológicamente semelhantes.

2.2 Caracterização citogenética de *Pennisetum*

As espécies pertencentes ao gênero *Pennisetum* constituem um grupo heterogêneo, apresentando diferentes números básicos de cromossomos ($x = 5, 7, 8$ e 9), morfometria cromossômica e genômica variando de acordo com os níveis de ploidia de diplóide a octaplóide.

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

Apesar da considerável importância econômica, existem poucos estudos citogenéticos com espécies de *Pennisetum*. A exceção do milho, para o qual amplas revisões são encontradas na literatura (Burton & Powell, 1968, Jauhar, 1981; Minocha, 1991; Jauhar & Hanna, 1998), para a maioria das espécies, os relatos restringem-se à determinação do número cromossômico. As informações

sobre a citogenética de híbridos intra e interespecíficos, as avaliações das relações de pareamento cromossômico, a análise genômica e outros aspectos citológicos do gênero são limitadas.

O acompanhamento citogenético de diferentes combinações genômicas de *P. purpureum* e *P. glaucum*, híbridos interespecíficos triplóides e aqueles provenientes da duplicação cromossômica, tem sido realizado no Laboratório de Citogenética da UFLA. Mais de 60 acessos, entre eles *P. purpureum* e *P. glaucum*, híbridos interespecíficos 3x e 6x, *P. setosum* e *P. nervosum*, foram identificados por meio do número cromossômico. As descrições dos complementos cromossômicos de cinco famílias constituídas de híbridos *P. purpureum* e *P. glaucum* e de seus genitores permitiram estabelecer as relações cariotípicas entre os genitores, identificar cromossomos parentais no complemento híbrido e classificar os cariótipos quanto à simetria (Barbosa, Davide e Pereira, 2002; Techio et al, 2002; Techio, 2002). O comportamento meiótico e o grau de relacionamento genético entre os genomas de três dessas famílias foram descritos (Techio, 2002). A relação entre a área nuclear, tamanho da placa metafásica e diâmetro do pólen com diferentes níveis de ploidia foi estudada por Assis et al. (2002).

Em relação à duplicação de cromossomos de híbridos 3x, tratamentos utilizados por Abreu (2002) resultaram em mixoplóides, em função da eliminação cromossômica completa ou parcial.

Davide et al. (2003), analisando 'seedlings' obtidos de sementes provenientes da autofecundação de mixoplóides férteis, observaram que 76% das células analisadas mostravam número cromossômico igual a 14, sugerindo que houve estabilização do nível diplóide constituindo uma raça cromossômica a partir de mixoplóides de *Pennisetum*.

2.2.1 Citogenética de *P. purpureum* e *P. glaucum*

O capim-elefante é a espécie alotetraplóide ($2n = 4x = 28$) mais conhecida do gênero *Pennisetum*, apresentando genomas A'A'BB e comportamento diplóide normal (Krishnaswamy & Raman, 1954; Jauhar, 1981; Martel, Richroch & Sarr, 1996; Jauhar & Hanna, 1998; Techio, 2002).

Evidências de várias pesquisas têm mostrado que os cromossomos do genoma A' são homólogos/homeólogos aos do genoma A do milho, enquanto que os cromossomos do genoma B não têm sua origem definida (Krishnaswamy & Raman, 1954; Jauhar, 1981). Para Martel et al. (1997), o emprego de técnicas de hibridização *in situ* genômica (GISH) permitiria testar a origem alotetraplóide ou diplóide de *P. purpureum*, bem como auxiliar na definição da espécie doadora do genoma B.

Segundo Pantulu & Venkateswarlu (1968), estudos sobre a morfologia dos cromossomos no paquíteno mostraram que os cromossomos 1 e 14 do capim-elefante apresentam os organizadores nucleolares e o primeiro mostrou-se 2,7 vezes maior que o último, caracterizando um cariótipo assimétrico. Para Jauhar (1981), o cariótipo do capim-elefante é constituído de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e um acrocêntrico. Com base nestas observações, o cariótipo do capim-elefante foi incluído na categoria 2b da classificação de assimetria proposta por Stebbins (1958).

Barbosa, Davide & Pereira (2002), estudando cinco acessos de capim-elefante do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite (BAGs 54, 63, 65, 75 e 91), relataram a presença de cromossomos metacêntricos. Contudo, foi observado em algumas metáfases, entre os sete primeiros pares de cromossomos, que há pelo menos dois pares submetacêntricos e entre os sete pares restantes ocorre pelo menos um par submetacêntrico; que foram desconsiderados por não estarem presentes em todas as metáfases analisadas.

Este fato, associado à diferença de comprimento relativo ser praticamente o dobro entre o maior e o menor par nos BAGs 54, 65 e 91, sugere a inclusão do cariótipo desses acessos na categoria 2b, de acordo com a classificação de Stebbins (1958). Para os acessos BAGs 63 e 75, devido à relação entre o maior e menor braço ter sido menor que 2:1, o cariótipo enquadra-se na categoria 1a - simétrico.

Essa divergência de resultados confirma a ocorrência de variação intravarietal em *P. purpureum* e permite inferir que as alterações estruturais, como deleções e adições, devem ter contribuído para aumentar ou diminuir a diferença de tamanho entre o maior e o menor cromossomo dos diferentes acessos de capim-elefante (Barbosa, Davide & Pereira, 2002).

A meiose no capim-elefante caracteriza-se pela formação de bivalentes (Jauhar, 1981), que parece ser garantida segundo Techio (2002), pela presença de mecanismos supressores do pareamento homeólogo, semelhante ao identificado no trigo hexaplóide por Sears (1976).

Techio (2002) estudou a meiose nos acessos BAGs 63, 75 e 91. Segundo a autora, a freqüente formação de 14 bivalentes nas diacineses e metáfases I desses acessos confirma que, apesar de ser alotetraplóides, o capim-elefante comporta-se, em termo de segregação cromossômica, como um típico diplóide. Contudo, anormalidades, como a presença de cromossomos pegajosos, núcleos assincrônicos e a formação de micronúcleos na meiose I foram observadas, sendo mais evidentes no BAG 63, que é proveniente da cultura de tecidos.

O milheto é uma espécie diplóide anual com $2n = 2x = 14$ cromossomos e genoma AA, de polinização cruzada, principalmente por causa do seu hábito de floração protogínica (Powell, Hanna & Burton, 1975).

O cariótipo do milheto, tem sido amplamente estudado e divergências em relação à morfometria e à organização do complemento cromossômico são

encontradas (Burton & Powell, 1968; Pantulu & Venkateswarlu, 1968; Jauhar, 1981; Minocha, 1991; Jauhar & Hanna, 1998).

Jauhar (1981) apresentou o cariótipo do milheto como simétrico devido à presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e pelo fato de o maior deles ser 1,5 vez maior que o menor sendo portanto, incluído na categoria 1a de Stebbins (1958). Este mesmo resultado foi verificado por Barbosa, Davide & Pereira (2002) que observaram que, além dos cromossomos do milheto serem metacêntricos e submetacêntricos, a diferença entre o maior e o menor par de cromossomos é 1,6 vezes, classificando também o cariótipo como simétrico.

As avaliações da meiose têm mostrado que o milheto apresenta sete bivalentes e dois quiasmas em cada um, exceto o bivalente nucleolar, que geralmente, apresenta um quiasma (Jauhar, 1981; Jauhar & Hanna, 1998; Techio, 2002).

2.2.2 Citogenética de híbridos entre *P. purpureum* e *P. glaucum*

Os híbridos interespecíficos possuem $2n = 3x = 21$ cromossomos, apresentando os genomas AA'B, dos quais sete são oriundos do diplóide ($2x$) *P. glaucum* e 14 do tetraplóide ($4x$) *P. purpureum*. Vários estudos têm evidenciado a existência de homologia/homeologia entre os sete cromossomos do genoma A' aos sete do genoma A (Jauhar, 1981; Jauhar & Hanna, 1998; Hanna, 1999). A maioria dos cromossomos das duas espécies é facilmente distinguível pelo tamanho e forma na placa equatorial, pois os cinco primeiros cromossomos de *P. glaucum* são de maior tamanho que os de *P. purpureum* (Burton, 1942; Barbosa, Davide & Pereira, 2002).

A maior parte das caracterizações citogenéticas existentes para os híbridos entre capim-elefante e milheto é baseada no comportamento cromossômico durante a meiose (Burton, 1942; Burton & Powell, 1968; Jauhar,

1981; Pantulu & Rao, 1982; Techio, 2002). Contudo, Barbosa, Davide & Pereira (2002), estudando a mitose de híbridos (3x) interespecíficos cedidos pela Embrapa Gado de Leite, verificaram que, com relação ao comprimento relativo, em células somáticas, o maior cromossomo do híbrido chega a ser 2,6 vezes maior que o menor cromossomo. Baseado nesta informação, esses mesmos autores determinaram que os cariótipos dos híbridos analisados incluem-se na categoria 2b de Stebbins (1958) e relataram que, na maioria destes híbridos, foram observados cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Para Barbosa, Davide & Pereira (2002), a contribuição do genitor capim-elefante, em termos de quantidade de DNA, determinada com base no comprimento do lote haplóide (CTLH), é similar àquela fornecida pelo milheto, embora os híbridos, fenotipicamente, assemelhem-se mais ao capim-elefante. De acordo com Gonzalez & Hanna (1984), o genoma B tem um efeito dominante sobre o genoma A em capim-elefante com relação ao tamanho da semente, juvenilidade e características de inflorescência e folha.

Na meiose destes híbridos interespecíficos estéreis, foi observada a formação de pontes, tétrades anormais e aborto de todas as quatro megásporas (Hanna, 1981 e Jauhar, 1981). Techio (2002) realizou uma ampla caracterização meiótica de três híbridos triploides produzidos pela Embrapa Gado de Leite (F94-60-01; F94-52-02 e F94-53), observando 7 bivalentes e 7 univalentes. Também foram encontradas anormalidades relacionadas à segregação irregular dos cromossomos, caracterizada pela presença de cromossomos com ascensão precoce na metáfase I ou retardatários na anáfase I. A autora relatou ainda a ocorrência micronúcleos na telófase II e tétrades, possivelmente como consequência das irregularidades citadas, além de pontes cromossômicas múltiplas nas anáfases I e II, aderência entre cromossomos, fusos tripolares e citomixia.

Por meio do uso de substâncias antimitóticas, como a colchicina pode-se duplicar o conjunto cromossômico do híbrido PMN, restaurando sua fertilidade (Hanna, 1981; Hanna et al., 1984; Dujardin & Hanna, 1985; Hanna & Dujardin, 1986), produzindo um hexaplóide que apresenta megasporogênese e desenvolvimento do saco embrionário normal (Hanna, 1981).

Vários autores citados por Jauhar (1981) descreveram que o híbrido hexaplóide tem uma maior semelhança ao capim-elefante, devido a uma maior contribuição genômica deste e a dominância do genoma B sobre o genoma A. Comentam também que o genoma A de *P. glaucum* e A' de *P. purpureum* são similares no conteúdo gênico. Estes, no hexaplóide, têm um efeito de quatro genomas A, embora a maior semelhança do hexaplóide ao *P. purpureum* demonstre que os genomas A e A' são suficientemente diferentes, apresentando expressões fenotípicas diferentes. Jauhar & Hanna (1998) relatam a possibilidade do genoma B exercer dominância em relação aos genomas A e A' e que, provavelmente, este genoma seria o responsável pela semelhança fenotípica entre o capim-elefante e o híbrido hexaplóide. Krishnaswamy & Raman (1954, 1956) consideram o genoma B dominante, pois alterando-se a proporção do genoma A em relação ao genoma B de 2:1 para 5:1, a manifestação fenotípica do genoma B é maior que a dos genomas A combinados. No híbrido com constituição genômica AAAAA'B, por exemplo, a única dose do genoma B faz com que este se assemelhe mais ao *P. purpureum*. Isso indica que o genoma B foi dominante ou, talvez, epistático sobre as cinco doses do genoma A.

2.3 Melhoramento genético e a obtenção de híbridos triplóides e hexaplóides induzidos de *Pennisetum*

O melhoramento genético de plantas envolve um conjunto de procedimentos, com fundamentação científica, visando à alteração de

características de interesse botânico-agronômicas e à obtenção de cultivares superiores a partir da manipulação da variabilidade genética existente no germoplasma de determinado grupo.

Buscando obter novas combinações gênicas para atender à demanda nacional por cultivares forrageiras superiores, a Embrapa Gado de Leite, desenvolve há mais de uma década um programa de melhoramento genético do capim-elefante. Esse programa visa explorar a variabilidade genética presente em uma das maiores coleções de *Pennisetum* do Brasil. O banco ativo de germoplasma do capim-elefante (BAGCE) é constituído por clones, populações e cultivares melhoradas de *P. purpureum*, raças cromossômicas (triplóides e hexaplóides) resultantes da hibridação entre *P. purpureum* x *P. glaucum*, acessos de *P. glaucum* e diversas outras espécies selvagens de *Pennisetum*.

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

Nos programas de melhoramento genético a manipulação da

variabilidade genética muitas vezes se restringe a cruzamentos intraespecíficos, devido às barreiras existentes em cruzamentos interespecíficos. Nesse sentido, a citogenética tem contribuído na identificação do complemento cromossômico e das relações filogenéticas para a definição da participação dos complementos cromossômicos de diferentes espécies em híbridos interespecíficos. É consenso que a transferência genética ocorrerá mais facilmente entre espécies afins, cujos cromossomos apresentem maior homologia refletindo na obtenção de híbridos viáveis (Techio, 2002).

Segundo Harlan & De Wet (1971), o germoplasma do gênero *Pennisetum* encontra-se dividido em três conjuntos gênicos. O primeiro é constituído por duas espécies diplóides silvestres (*P. mollissimum* e *P. violaceum*) e o milheto (*P. glaucum*, $2n = 2x = 14$). No segundo conjunto gênico, encontra-se o capim-elefante (*P. purpureum*, $2n = 4x = 28$) e, no terceiro grupo, as demais espécies de *Pennisetum*. Embora existam esses grupamentos gênicos e mecanismos biológicos que contribuem para a manutenção dessa estrutura genética, algumas espécies são compatíveis sexualmente. A viabilidade de cruzamentos entre espécies de diferentes conjuntos gênicos é de particular importância para os programas de melhoramento, pois permite a transferência de alelos de interesse para espécies de importância econômica.

Várias possibilidades de cruzamentos entre espécies de *Pennisetum* são encontradas na literatura (Jauhar, 1981; Dujardin & Hanna, 1985; Jauhar & Hanna, 1998; Hanna, 1999; Schanck, 1999), permitindo a criação de genótipos úteis para produção de forragem.

O melhoramento da maioria das características de importância forrageira do capim-elefante pode ser conseguido por meio da exploração da variabilidade existente na própria espécie (melhoramento intravarietal). Porém, considerando a capacidade do capim-elefante de trocar alelos com outras espécies de *Pennisetum*, o programa de melhoramento pode recorrer à utilização de

germoplasma de espécies pertencentes a conjuntos gênicos próximos, tais como o milho (Pereira et al., 2002). Na formação dos híbridos, o milho contribui com caracteres como vigor, resistência à seca e tolerância a doenças, qualidade forrageira e tamanho das sementes, enquanto que a rusticidade, agressividade, perenidade e elevada produtividade de matéria seca são conferidas pelo capim-elefante (Diz, 1994, Jauhar & Hanna, 1998).

Burton (1944) foi o primeiro a descrever sobre o híbrido triplóide proveniente do cruzamento do capim-elefante com o milho. Esse híbrido é considerado o mais importante desse gênero por apresentar produção e qualidade forrageiras similares ou superiores aos seus genitores. O híbrido interespecífico pode ser facilmente produzido por polinização manual e ser propagado vegetativamente ou por meio de sementes comerciais que podem ser produzidas utilizando uma variedade de milho macho estéril citoplasmática (pms) (Osgood, Hanna & Tew, 1997; Jauhar & Hanna, 1998).

Segundo Pereira et al. (1999), híbridos triplóides têm apresentado grande variabilidade para caracteres de importância forrageira, já tendo sido selecionados materiais com 23% de proteína bruta nas folhas, valor este superior à média de 16% encontrada para o capim-elefante. Entretanto, a maior limitação em relação à utilização do híbrido triplóide é a infertilidade, o que constitui uma barreira para o programa de melhoramento genético. O número de cromossomos não balanceados é apontado como a principal causa da esterilidade, pois o híbrido reúne 21 cromossomos pertencentes aos genomas A oriundos do milho e A' e B, do capim-elefante. A restauração da fertilidade desses híbridos permitiria que os mesmos voltassem ao programa de melhoramento genético, transferindo alelos de características desejadas ao capim-elefante.

Nesse sentido, a alternativa para resgatar a fertilidade é promover a duplicação. Hanna (1981) e Hanna et al. (1984) produziram, por meio da exposição de 'seedlings' à solução de colchicina 0,2% e 0,05% por 24 horas,

respectivamente, um híbrido hexaplóide ($2n = 6x = 42$) com meiose regular, que apresenta sementes maiores e vigorosas quando comparadas com as minúsculas sementes de baixo vigor do capim-elefante. Para Schanck (1999), a propagação do híbrido via semente viabilizaria a expansão das áreas cultivadas de capim-elefante trazendo consideráveis contribuições para a pecuária leiteira.

Tratamentos utilizados por Abreu (2002) e Davide et al. (2003) em híbridos interespecíficos provenientes do BAGCE da Embrapa Gado de Leite, resultaram em mixoplóides, em função da eliminação cromossômica completa ou parcial. Até o momento não haviam sido obtidos hexaplóides induzidos via exposição à colchicina ou a outros antimitóticos utilizando híbridos triplóides obtidos em programas de melhoramento nacionais.

Considerando o potencial dessa forrageira e o interesse dos programas de melhoramento do capim-elefante, torna-se premente o estabelecimento de metodologias eficientes de duplicação cromossômica buscando, a partir de híbridos triplóides, que apresentem diferentes combinações genéticas, obter hexaplóides férteis, viáveis e que possam ser propagados via semente.

2.4 Cultivo *in vitro* e micropropagação para obtenção de explantes

As técnicas de cultura de tecidos vegetal têm sido consideradas uma alternativa promissora para a agricultura, pois muitas espécies de importância econômica e propagadas assexuadamente, como morango, batata, banana e plantas ornamentais, têm suas mudas produzidas por técnicas de cultivo *in vitro*.

O cultivo *in vitro* é uma técnica que consiste em isolar qualquer parte da planta (explante) para cultivá-la em condições assépticas, em meio nutritivo artificial (Giles & Friesen, 1994; Pasqual, Hoffman & Ramos, 1997; Vieira & Da-Glória, 2001; Bridgen, 2003). O princípio básico dessa técnica é a totipotência, ou seja, qualquer célula contém toda a informação genética

necessária para a regeneração de uma planta completa (Kerbaudy, 1998). As vias de diferenciação celular envolvidas no desenvolvimento e maturação da planta são determinadas pela natureza constitutiva dos genes herdados e sua expressão é resultante da interação genótipo com ambiente. Nas plantas, a maioria das divisões celulares ocorre nas regiões meristemáticas e o funcionamento dessas regiões pode ser ativado ou suprimido de acordo com os padrões de diferenciação geneticamente controlados e/ou interações ambientais.

Segundo Vieira & Da-Glória (2001), os tecidos meristemáticos são as principais fontes de explantes usadas na clonagem de plantas *in vitro*. A cultura de meristemas tem sido considerada um dos métodos mais rápidos e eficientes na obtenção de plantas saudias. A atividade comercial tem se concentrado na limpeza clonal, procedimento no qual mudas livres de patógenos (vírus, bactérias, micoplasmas e fungos) são produzidas por meio de técnicas como a termoterapia e cultivo de meristemas (Karasawa, 2001). As áreas mais favorecidas por essa tecnologia têm sido a florestal, a horticultura, a fruticultura e a floricultura.

Na cultura de meristemas, deve-se preferir explantes de ápices meristemáticos. O tamanho do isolado deve ser grande o suficiente para permitir um pegamento eficiente e a obtenção de plantas saudáveis (Teixeira & Marbach, 2000). Por outro lado, na cultura nodal, a micropropagação é feita utilizando nós individualizados ou em conjunto e as plantas desenvolvidas são individualizadas e enraizadas (George, 1993).

O sucesso do crescimento, proliferação e manutenção dos explantes isolados por meio da cultura de meristemas requer, além dos cuidados prévios com a planta matriz, assepsia, adequação de meios de cultura e obtenção dos explantes, a padronização de um protocolo que possa ser empregado comercialmente. Para Vieira & Da-Glória (2001), cada espécie ou cultivar deve ser cuidadosamente estudada, pois as exigências na composição do meio de

cultura variam de acordo com a espécie, cultivar e, em alguns, casos com o estado fisiológico, fenológico e nutricional da planta doadora do explante. A propagação dos explantes *in vitro* sofre, ainda, influências da inclusão de reguladores de crescimento, no meio de cultura, utilizados para suprir as deficiências hormonais endógenas (Giles & Friesen, 1994; Ulmasov, Hagen & Guilfoyle, 1999a,b).

A micropropagação consiste em isolar qualquer parte da planta (órgãos, tecidos ou células) e multiplicá-la em meios artificiais e estéreis. O indivíduo resultante desse processo terá a mesma constituição genética daquela planta que lhe deu origem (Krikorian, 1993; Vieira & Da-glória, 2001; Bridgen, 2003).

Grattapaglia & Machado (1998) e Vieira & Da-Glória (2001) dividem o processo de micropropagação em cinco etapas: Etapa 1: compreende a seleção e o tratamento fitossanitário da planta matriz, uma planta típica da espécie, cultivar ou variedade, livre de patógenos; Etapa 2: consiste no estabelecimento de uma cultura asséptica, com um número satisfatório de sobreviventes crescendo *in vitro* sem contaminação; Etapa 3: multiplicação do explante obtido; Etapa 4: individualização da planta. Nessa etapa, se necessário, a planta pode ser transferida para um meio de cultura de enraizamento e alongamento; Etapa 5: aclimatização. Essa fase é imprescindível, pois as plantas que crescem *in vitro* não possuem a camada de cutina que protege contra a evapotranspiração. As plantas que passam por essa etapa adaptam-se gradualmente às condições ambientais, ocorrendo a formação da cutícula nas folhas, impedindo a ocorrência do estresse por desidratação.

Conforme o explante utilizado e a sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida por multiplicação por meio da proliferação de gemas axilares, multiplicação mediante a indução de gemas adventícias, por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo) ou, ainda, por multiplicação via embriogênese. Para promover um rápido aumento no número

de explantes, pode-se fazer o uso de citocininas que promovem a formação de brotações aéreas, os quais são repicados e isolados para formação de novos explantes (Vieira & Da-glória, 2001; Bridgen, 2003; Quisen & Oliveira, 2003).

É importante ressaltar que a propagação é fortemente influenciada pela inclusão de reguladores de crescimento no meio de cultura (Giles & Friesen, 1994), os quais têm como função suprir as deficiências hormonais endógenas dos explantes. Os fitorreguladores são compostos pequenos, de fácil transporte de célula a célula e de múltiplos efeitos os quais podem ser modulados pelo ambiente e estado físico da planta (Teixeira & Marbach, 2000). O etileno, o ácido abscísico (ABA), a zeatina (uma citocinina), o AIA (ácido indolacético) e o ácido giberélico (GA3) são exemplos de cada uma das classes de fitorreguladores naturais isto é, sintetizados pelas células vegetais e, por isso, ditos endógenos (Krikorian, 1993; Vieira & Da-glória, 2001). Os receptores que reconhecem os fitorreguladores e seu modo de ação passaram a ser estudados recentemente (Ulmasov, Hagen & Guilfoyle, 1999a,b), porém, ainda não estão claramente definidos.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o BAP é a citocinina mais potente para promover proliferação de brotações de parte aérea, com a vantagem de ser de baixo custo.

Quando brotos apicais são cultivados em meio contendo citocinina, ocorrem o crescimento e o desenvolvimento de brotos axilares prematuramente, pois as citocininas constituem um grupo de fitorreguladores indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares (Pierik, 1990; Einsert, 1991; Karasawa, 2001).

Vários estudos sobre o efeito das diferentes concentrações dos reguladores de crescimento na produção de brotações são encontrados na literatura para diferentes espécies (Zanette, Pailo & Moraes, 1988; Finch, et al. 1992; Mantell, Mathews & Mckee, 1994; Pasqual, Hoffman & Ramos, 1997;

Vidigal, Passos & Silva, 1998; Karasawa, 2001; Erig, Rossi & Fortes, 2002; Nogueira et al., 2003; Dortzbach et al., 2003).

A capacidade dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* formarem gemas, raízes ou embriões somáticos tem despertado a atenção de pesquisadores devido a sua aplicação prática e importância para o avanço do conhecimento de várias áreas.

As técnicas de cultura de tecidos têm sido ferramentas indispensáveis nas pesquisas de indução de poliploidia. A duplicação cromossômica tem sido obtida com sucesso em várias espécies de plantas expondo à colchicina diferentes materiais botânicos como meristemas (Lyrene & Perry, 1982), células cultivadas em suspensão (Chavedej & Becker, 1984), calos embriogênicos (Leblanc et al., 1995), plântulas cultivadas *in vitro* (Miyoshi & Asakura, 1996) e segmentos caulinares (Pinheiro et al., 2000).

2.5 Duplicação cromossômica e avaliação de ploidia

2.5.1 Indução de poliploidia

A hibridação entre espécies, seguida da poliploidização, é considerada um mecanismo de extrema importância na evolução de muitos grupos vegetais e uma ferramenta estratégica em muitos programas de melhoramento genético.

De acordo com Pagliarini (2001), três tipos de poliplóides podem ser distinguidos segundo a sua origem: 1) autopoliplóides, em que o mesmo genoma básico está presente mais de duas vezes; 2) alopoliplóides, em que diferentes genomas são combinados e cada genoma está presente duas vezes, sendo os genomas geneticamente compatíveis, mas diferenciados com relação ao pareamento meiótico; 3) autoalopoliplóides, em que alguns genomas presentes

mais que em dose dupla (autopoliploides) estão combinados com outros genomas não homólogos, mas geneticamente compatíveis.

Stebbins (1971), Guerra (1989), Pagliarini (2001) e Raven, Evert & Eichhorn (2001) referem-se à hibridização interespecífica entre espécies morfológicamente distintas, seguida da duplicação cromossômica (anfiploidia ou alopoliploidização) como sendo o processo citogenético mais difundido e mais distintivo que afetou a especiação e a evolução das plantas superiores. Stebbins (1971), estima que de 30% a 35% das espécies de fanerógamas têm número de cromossomos gaméticos múltiplos do número básico característico do gênero ao qual elas pertencem.

Implicações genéticas e evolutivas dos poliploides são freqüentemente discutidas, contudo, ainda há poucos estudos sobre sua origem. Segundo DeWet (1980), as duplicações cromossômicas meristemática e zigótica têm sido aceitas como os eventos naturais mais comuns da origem dos poliploides. Entretanto, a origem pode também ocorrer pela não redução de gametas femininos e masculinos (Sybenga, 1992).

A poliploidização pode ocasionar uma série de efeitos morfofisiológicos que podem ampliar o potencial de utilização de uma determinada espécie. Segundo Roth (1984), um dos efeitos imediatos é o aumento do tamanho das células devido ao volume nuclear maior, conduzindo a uma redução do número de divisões celulares durante o desenvolvimento. O conhecido efeito “gigas” encontra-se comumente em órgãos de padrão de crescimento altamente determinado, como flores e sementes.

A indução da poliploidia pode ser realizada por meio de diversas técnicas físicas e químicas amplamente discutidas na literatura. Segundo Guerra (1989), injúrias, choques térmicos e centrifugação estão entre as técnicas físicas mais utilizadas na obtenção de poliploides artificiais. As técnicas químicas utilizam agentes como podofilina, vincalécoblastina (VLB), óxido nítrico

(N₂O), hormônios, herbicidas, ciclohexamida, 8-hidroxiquinoleína e colchicina (Roth, 1984).

Chalak & Legave (1996) e Carvalho (2000) relatam que a colchicina tem sido usada desde 1937, na indução de plantas poliplóides. Em muitas espécies, a colchicina é conhecida por causar efeitos como esterilidade, desenvolvimento anormal e indução de plantas quiméricas, devido a assincronia da divisão celular (Wan, Petolino & Widholm, 1989). Roth (1984) relata alguns dos efeitos tóxicos da colchicina e afirma que a utilização de altas concentrações ou exposição em tempo inadequado podem levar à morte células e plantas e que a tolerância à colchicina varia de acordo com a espécie.

Para Geoffriau et al. (1997), outros agentes, tais como herbicidas antimicrotubulares [orizalina, trifuralina, amiprofosmetil (AMP) e pronamide] têm demonstrado maior especificidade para a tubulina de plantas *in vitro*, do que a colchicina. Segundo Van Tuyt, Meijer & Din (1992), os compostos dinitroanilinas usados como herbicidas têm alta atividade de poliploidização com baixa toxicidade.

Wan et al. (1991) descrevem que os herbicidas orizalina, trifuralina, amiprofosmetil (AMP) e pronamide, aplicados na cultura de calos de antera de milho foram eficientes na indução da poliploidia. No entanto, a orizalina, além de induzir eficientemente a duplicação cromossômica, também afetou a capacidade de regeneração dos calos. Geoffriau et al. (1997) relataram que a proporção de explantes de *Allium cepa* (L.) sobreviventes foi maior nos tratamentos com orizalina do que nos com colchicina. Porém, a orizalina induziu poucos dihaplóides quando comparada com a colchicina.

A literatura revisada por Roth (1984) e Schifino-Wittmann (2000) descreve que as principais variáveis no tratamento com colchicina são: 1) concentração variando de 0,0006% a 3,0%; 2) tempo de exposição à droga variando de uma hora a vários dias; 3) forma de aplicação, desde a imersão de

sementes e embriões ao tratamento local de meristemas em plantas desenvolvidas.

O maior problema da indução via colchicina resulta do fato de a substância só agir efetivamente sobre as células que estão em divisão (Singh, 1993). Desse modo, a poliploidização geralmente não atinge todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixoplóides e quimeras (Abreu, 2002). Em consequência, surge o problema relativo à estabilidade da condição poliplóide. Carvalho (2000) e Pagliarini (2001) relatam que é freqüente os aloploplóides reduzirem a duplicação genética, num processo de reversão parcial ou total à condição diplóide, após alguns ciclos de divisão, principalmente devido à proliferação das células diplóides remanescentes que se multiplicam a taxas superiores àquelas das células poliplóides. Em decorrência dessas dificuldades, tem-se variado bastante a forma de aplicação dos indutores de poliploidia, buscando uma maior eficiência do tratamento (Roth, 1984; Xynias & Roupakias, 2000), bem como variar os tecidos alvos do tratamento (Abreu, 2002).

A duplicação cromossômica tem sido obtida com sucesso em várias espécies de plantas, expondo-se à colchicina diferentes materiais botânicos, como meristemas (Lyrene & Perry, 1982), células cultivadas em suspensão (Chavedej & Becker, 1984, Hansen & Andersen, 1998), 'seedlings' *in vivo* (Swenne, Louant & Dujardin, 1981; Hanna et al., 1984), calos embriogênicos (Dahleen & Joppa, 1992; Leblanc et al., 1995), plântulas cultivadas *in vitro* (Hamill, Smith & Dodd, 1992; Miyoshi & Asakura, 1996) e segmentos caulinares (Pinheiro et al., 2000).

Em Poaceae, o que se tem observado na literatura é que a colchicina tem apresentado bons resultados na poliploidização. DeBuyser & Henry (1980), citados por Chalak & Legave (1996), demonstraram que mais de 54,4% das plantas haplóides de trigo tratadas com colchicina produziram sementes depois

de duplicadas. Metz et al. (1988), estudando o efeito do emprego da colchicina em duas linhagens de trigo, demonstraram que 98% das plantas tratadas produziram sementes. Scharder & Pohler (1985) estudaram o comportamento meiótico de três híbridos do cruzamento de *Hordeum chilense* com triticales, tratados com colchicina e observaram que o número cromossômico dos polihaplóides e anfidiplóides era bastante estável. Em milho, calos tratados com 0,025% a 0,05% de colchicina por 24 horas regeneraram 50% de plantas dihaplóides e aqueles tratados por 72 horas regeneraram 100% de plantas dihaplóides (Wan, Petolino & Widholm, 1989).

Hassawi & Liang (1991), estudando o efeito de três agentes antimitóticos em duas concentrações, demonstraram que a colchicina é mais eficiente do que a trifuralina e a orizalina para induzir a duplicação cromossômica em células de calos de antera de trigo. Segundo os autores, 89% das plantas regeneradas foram tratadas com colchicina e apenas 18,8% e 7,7% de plantas regeneradas foram tratadas com trifuralina e orizalina, respectivamente. Dahleen & Joppa (1992), trabalhando com híbridos de *Hordeum vulgare* e *Elymus canadensis* (centeio selvagem), conseguiram duplicar o número cromossômico de $2n = 21$ para $2n = 42$ em apenas dois clones. Vários outros trabalhos, tais como em sorgo (Sun, Cheng & Liang 1994) e em arroz (Huang, Huang & Liu, 1995), também obtiveram sucesso na poliploidização com o uso da colchicina. Saisingtong et al. (1996) conseguiram a produção de dihaplóides de milho, partindo de culturas de anteras em meio de cultura contendo colchicina.

A literatura traz poucos relatos do uso de colchicina na duplicação cromossômica em plantas forrageiras. Pinheiro et al. (2000) descrevem o procedimento de duplicação cromossômica em clones sexuais diplóides de *Bracharia brizantha*, inoculando 75 segmentos caulinares basais em meios de cultura contendo 0,01%; 0,05% ou 0,1% de colchicina por 48 horas. Os autores obtiveram melhores resultados nos tratamentos com meios suplementados com

0,01%, onde 24% (18 plantas) das 44 plantas (60%) sobreviventes ao tratamento sido confirmados duplicados por citometria de fluxo.

Hanna (1981) e Hanna et al. (1984) obtiveram sucesso na produção de hexaplóides, derivados de 'seedlings' triplóides interespecíficos de capim-elefante com milho, tratados com solução de 0,2% e 0,05% de colchicina por 24 horas, respectivamente. A confirmação da duplicação cromossômica em ambos trabalhos foi dada pela produção de pólen, em 30% dos sobreviventes.

Abreu (2002), com o objetivo de restaurar a fertilidade de híbridos de capim-elefante e milho provenientes do banco de germoplasma da Embrapa – Gado de Leite, expôs 'seedlings', gemas *in vivo* e *in vitro*, sementes e perfilhos aéreos, a soluções de colchicina 0,05% e 0,1% e de ciclohexamida 25mg/L : 8-hidroxiquinoleína 300mg/L (1:1), em diferentes períodos de tempo. Segundo o autor, não houve sobreviventes quando foram tratadas sementes e gemas. A colchicina apresentou melhor efeito sobre 'seedlings', enquanto que ciclohexamida e 8-hidroxiquinoleína (1:1) atuaram melhor sobre perfilhos. Contudo, observou-se apenas a ocorrência de mixoplóides, com células apresentando de 14 a 42 cromossomos em 86,4% das células analisadas; indicando que houve duplicação seguida de eliminação cromossômica, não permitindo a obtenção de um hexaplóide estável.

A literatura mostra que a indução de poliploidia em vegetais é laboriosa. É notória a diversidade de metodologias, principalmente com relação aos tipos e tempos de ação dos indutores, as concentrações e os tecidos alvo, buscando sempre uma maior eficiência do tratamento. Observa-se também que, uma vez conseguida a poliploidização, a frequência de plantas mixoplóides é grande e a proporção de poliplóides estáveis bastante reduzida. Além disso, quando se encontram relatos em que altas frequências de plantas poliplóides são obtidas, estas são, na verdade, dihaplóides. Isso porque a própria condição haplóide favorece a duplicação cromossômica, como no caso de regeneração de plantas

com base no cultivo de anteras de cevada, quando foi possível observar duplicação cromossômica espontânea superior a 92% (Hanson, 1984).

2.5.2 Avaliação da ploidia

A citometria de fluxo está se tornando uma das ferramentas citogenéticas mais usadas para mensurar o conteúdo de DNA de núcleos permitindo avaliar o nível de ploidia, fazer comparações intra e interespecíficas do tamanho nuclear, bem como avaliar o teor de DNA de cada cromossomo do complemento cromossômico de uma espécie (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 1996). Segundo esses mesmos autores, a determinação do teor de DNA nuclear é uma das técnicas mais usuais da citogenética de fluxo. Os núcleos previamente isolados são corados com fluorocromos adequados que se ligam ao DNA emitindo uma fluorescência que é quantificada pelo citômetro de forma equitativa ao conteúdo de DNA nuclear.

O teor de DNA tem sido estudado em vários gêneros de importância econômica e forrageira de Poacea como *Zea* (Rayburn, et al., 1989), *Pennisetum* (Passos, Lambert & Galbraith, 1994; Martel et al., 1997) *Hordeum* (Vogel, Arumuganathan & Jensen, 1999), *Oryza* (Buso et al., 2000), *Brachiaria* (Pinheiro et al., 2000) e *Triticum* (Kubalaková et al., 2002) visando determinar as variações e interrelações intra e interespecíficas associadas ao tamanho do genoma nuclear.

Pinheiro et al. (2000), utilizaram técnicas de citometria de fluxo para determinar o nível de ploidia de plantas diplóide sexual e tetraplóide apomítica de *Brachiaria brizantha*, tetraplóide apomítica de *B. decumbens* e confirmar a duplicação cromossômica de 18 clones sexuais diplóides de *B. brizantha* sobreviventes ao tratamento colchicínico.

O tamanho do genoma nuclear foi determinado 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 ploidia. Para esse autor, as espécies cultivadas *P. purpureum* e *P. glaucum* apresentam genomas praticamente iguais em termos de tamanho (4,59 e 4,71 pg, respectivamente) embora apresentem níveis de ploidia, números cromossômicos e morfometria cariotípicas diferentes (Barbosa, Davide & Pereira, 2003).

A análise do conteúdo de DNA por meio da citometria de fluxo embora eficiente e muito utilizada para a investigação de poliplóides, por produzir resultados confiáveis e facilidade de análise, requer equipamentos caros e sofisticados, além da qualificação profissional para operar o equipamento, o que torna a utilização dessa ferramenta citogenética inviável em muitos centros de pesquisa brasileiros.

A técnica de GISH também tem sido amplamente utilizada como ferramenta confiável e precisa da citogenética molecular na identificação citológica do genoma dos genitores em híbridos interespecíficos ou intergenéricos induzidos. Uma ampla revisão do uso da hibridação genômica *in situ* do DNA dos genitores, na caracterização do genoma de espécies alopoliplóides é apresentada por Benett (1995).

Não foram encontrados, na literatura, relatos do uso de GISH em *Pennisetum*. Contudo, a GISH pode ser uma ferramenta extremamente importante para elucidar a origem do *P. glaucum*, que ainda é controversa; confirmar se o milho constitui o histórico evolutivo do *P. purpureum* e identificar a espécie doadora do genoma B; auxiliar na caracterização cromossômica de híbridos interespecíficos triplóides, hexaplóides e de novas raças cromossômicas obtidas via cruzamento ou induzidas quimicamente e auxiliar na análise genômica, onde se concentram os interesses do melhoramento

genético, pois a estimativa da afinidade genética fornece um indicativo da melhor combinação para troca de alelos entre espécies.

Metodologias alternativas de correlacionar nível de ploidia com a determinação da área nuclear, do tamanho da placa metafásica e diâmetro do pólen foram testadas por Assis et al. (2002) para espécies de *Pennisetum*. Os autores verificaram que o diâmetro do pólen não deve ser utilizado como parâmetro para distinção de ploidias em *Pennisetum* e que a área nuclear discrimina os híbridos triploides dos genitores e hexaploides e o tamanho das placas metafásicas permitem separar apenas *P. glaucum* (2x) de *P. purpureum* (4x).

Embora a citometria de fluxo e a hibridização genômica sejam consideradas ferramentas eficientes e confiáveis, para Roth (1980) e Duren, Morpurgo & Dolezel (1996), o método mais usado, que dispensa grandes investimentos e fornece dados tão confiáveis quanto a citogenética molecular para confirmar se a indução a poliploidia deu certo é o de contagem de cromossomos, ainda que este método possa gerar algumas dificuldades para a investigação em larga escala.

2.5.3 Avaliação da viabilidade do pólen

O conhecimento da fenologia e do comportamento reprodutivo é pré-requisito fundamental para a inclusão bem sucedida de uma espécie em um programa de melhoramento genético.

Dentre as muitas informações que um melhorista pode requisitar da fenologia e do entendimento do comportamento reprodutivo sexual de uma espécie vegetal, a análise da viabilidade do pólen é indispensável, uma vez que ele é o veículo dos cromossomos nos cruzamentos.

A análise da viabilidade polínica pode ser realizada por meio de técnicas de coloração a germinação.

A literatura revisada por Techio (2002) relata que as metodologias de coloração são simples, de baixo custo e rápidas considerando que existe uma correlação viabilidade-coloração, em que a estimativa é dada pela contagem dos pólenes não abortados e abortados que se mostram corados e não corados, respectivamente. Segundo a mesma autora, na literatura não se encontra a descrição de um teste de viabilidade universal com a utilização de um corante específico. A maioria dos trabalhos relata o uso dos corantes nucleares para vários grupos vegetais.

Alexander (1969 e 1980) questiona a utilização desses corantes pelo fato dos pólenes inviáveis não serem corados. Segundo o autor, muitas espécies apresentam pólenes com paredes espessas, mucilaginosas e portadoras de espículas que dificultam a penetração do corante e, conseqüentemente, a sua coloração. Nessa condição, pólenes viáveis podem ser erroneamente classificados como abortados. Esse fato limita o emprego dos corantes nucleares como o carmim acético, na análise da fertilidade masculina de muitas espécies.

A utilização de um corante diferencial à base de verde malaquita e fuccina ácida, em que o pólen inviável cora-se de verde e o viável de vermelho, foi proposta por Alexander (1969 e 1980), facilitando a avaliação da macho fertilidade em muitos grupos de plantas.

A coloração, embora seja um procedimento simples e de baixo custo, não é totalmente confiável, pois pode fornecer uma informação equivocada da viabilidade em determinadas circunstâncias (Techio, 2000). Nesse sentido, pode-se optar pela observação da capacidade germinativa dos grãos de pólen, em razão de ser um caráter que se correlaciona diretamente com a habilidade para a fertilização.

Os testes de viabilidade polínica por germinação podem ser feitos *in vivo* ou *in vitro*.

Na germinação *in vivo* deposita-se o grão de pólen no estigma receptivo. Após algum tempo, o estigma é seccionado para que a contagem do número de tubos polínicos emitidos seja feita. Stanley & Linskens (1974) relatam algumas desvantagens dessa metodologia, do ponto de vista prático, que podem refletir na avaliação da viabilidade. Entre elas se destacam: a incompatibilidade genética entre pólen e pistilo, a não receptividade do estigma e os efeitos da queda de temperatura podendo interferir drasticamente na germinação do pólen *in vivo*.

Outra forma de se avaliar a viabilidade do pólen *in vivo* pode ser feita por meio da sua capacidade de produzir sementes (Schanck, 1999). Contudo, o tempo necessário para as observações é um fator limitante para o seu emprego. Para a maioria das fanerógamas, por exemplo, são necessários de 1 a 3 meses para a produção de sementes (Stanley & Linkens, 1974).

Nos testes de germinação *in vitro*, o pólen é espalhado sobre o meio de cultura que, geralmente, contém sacarose (Cangianni, 1988; Techio, 2002) e a viabilidade é observada por meio da porcentagem de grãos de pólen que emitem tubo polínico. O grão de pólen é considerado viável quando o comprimento do seu tubo polínico é maior do que o seu diâmetro (Shivanna & Rangaswamy, 1982).

2.5.4 A macho fertilidade em *Pennisetum*

A macho fertilidade em *Pennisetum* foi bastante investigada na década de 1970, por meio da diferenciação de pólen abortados e não abortados por corantes nucleares, como o carmin acético (Sree Ramulu, 1968; Sethi, Kalia & Ghai, 1970; Sree Rangasamy, 1972; Sujatha et al. 1989).

Recentemente, Pedrozo et al. (2002) compararam a eficiência dos corantes carmin propiônico,orceína acética e corante de Alexander, utilizando pólenes de 14 acessos de milho, capim-elefante e híbridos triplóides. Segundo os autores, o corante de Alexander mostrou-se mais apropriado para determinar a viabilidade polínica nessas taxa, uma vez que os dois corantes nucleares não evidenciaram a esterilidade do triplóide.

Techio (2002) estimou a viabilidade do pólen para três acessos de milho (M24, M36 e M38), três acessos de capim-elefante (BAG 63, BAG 75 e BAG 91) e três híbridos triplóides (CNPGL94-44-03, CNPGL94-49-06 e CNPGL94-60-01), tanto pela capacidade de coloração dos mesmos pelo corante de Alexander como por meio de testes de germinação *in vitro*. Os testes de coloração evidenciaram que os pólenes dos acessos de milho foram 100% viáveis. Tais resultados foram superiores aos obtidos por Sree Ramulu (1968), Sethi, Kalia & Ghai (1970) e Sujatha et al. (1989), cujos valores variaram de 87% a 97%. Segundo Techio (2002), a máxima viabilidade observada com a coloração pode estar associada ao horário da coleta, padronizada entre 8:30 e 10 horas, quando as anteras começam a se tornar deiscentes, levando a crer que a viabilidade atinja seu ápice nessa fase, apresentando maior disponibilidade de pólenes férteis.

As frequências de pólenes funcionais determinadas por Techio (2002) para os genótipos 75 e 91 de capim-elefante foram aproximadamente de 99% e para o BAG 63 foi de 71,7%. Sujatha et al. (1989) mencionaram 78% de fertilidade para o capim-elefante, enquanto que, nos trabalhos de Sethi, Kalia & Ghai (1970) e Sree Rangasamy (1972), essa taxa foi de 61,8% e 95%, respectivamente.

Os híbridos interespecíficos entre o capim-elefante e o milho, por sua condição triplóide e as irregularidades meióticas amplamente discutidas na literatura, são macho e fêmea estéreis (Jauhar, 1981; Jauhar & Hanna, 1998).

Contudo, resultados de Sethi, Kalia & Ghai (1970) e Sree Rangasamy (1972) para viabilidade polínica obtida com corantes nucleares apontam de 2% a 5% de fertilidade para os híbridos entre o milho e capim-elefante. Techio (2002) relata que os resultados obtidos pelos métodos de coloração e germinação *in vitro* demonstraram a total esterilidade dos genótipos triplóides analisados, revelando que a combinação dos genótipos parentais não refletiu em graus variáveis de fertilidade, embora eles apresentassem diferentes frequências de irregularidades meióticas.

Em relação à germinação *in vitro*, trabalhos conduzidos por Ayyangar & Rao (1935), Chaudhury & Shivanna (1986) e Techio (2002) mostraram uma queda acentuada na taxa de viabilidade dos grãos de pólen do milho quando comparada com aquelas obtidas por meio de coloração.

Os acessos de milho avaliados por Techio (2002) exibiram uma baixa frequência de pólenes funcionais variando de 6% para o M 24 a 47,6% para o M 36. Esses resultados foram de encontro àqueles obtidos por Ayyangar & Rao (1935). Segundo esses autores, os grãos de pólen do milho e de espécies de *Sorghum* e *Andropogon* plasmolisam e não germinam em meio de cultura. Chaudhury & Shivanna (1986) descreveram também para milho, uma taxa reduzida de pólenes germinados *in vitro*, cuja frequência foi de 57,6%, 18,1% e 12% para três amostras.

Segundo Techio (2002), para germinação *in vitro*, o capim-elefante exibiu um comportamento similar ao do milho com uma frequência muito baixa de pólenes viáveis variando de 3,6% para o BAG 91 a 39,4% para o BAG 75. Aken'ova & Chheda (1970) descreveram, para o capim-elefante, uma taxa de 54,3% de viabilidade que se manteve por mais de um dia, sob diferentes temperaturas de armazenamento e umidade relativa de 90% a 100%.

De acordo com Stanley & Linsken (1974), uma das explicações para esse comportamento dos pólenes de *Pennisetum* em condições *in vitro* é o fato de

que a maioria dos grãos de pólen de gramíneas perde a viabilidade rapidamente. Portanto, é possível que após a coleta, os grãos de pólen tenham deteriorado rapidamente pela exposição às condições ambientais mostrando-se incapazes de emitir tubo polínico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. C. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos.** 2002. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.
- AKEN'OVA, M. E.; CHHEDA, H. R. Effects of storage on viability of elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pollen. **The Nigerian Agricultural Journal**, Ibadan, v. 7, n. 1, p. 111 – 114, 1970.
- ALCÂNTARA, P. B.; BUFARAH, G. **Plantas forrageiras - gramíneas e leguminosas.** São Paulo:Nobel, 1988. 162p.
- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, Baltimore, v. 44, n. 2, p. 117 – 122, 1969.
- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v. 55, n. 1, p. 13 – 118, 1980.
- ASSIS, J. C.; PEDROSO, C. A.; BARBOSA, S.; TCHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Determinação do nível de ploidia em *Pennisetum* spp.: área nuclear, tamanho da placa metafásica e diâmetro do pólen. In: 48º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2002, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia, Setor Genética Vegetal/Citogenética - CDron**, 2002.
- ASSIS, J. C.; BARBOSA, S.; PEDROSO, C. A.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Eficiência de Cruzamentos entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*. In: 49º Congresso Brasileiro de Genética, 2003, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia**, p. 643, 2003.
- AYYANGAR, G. N. R.; RAO, V. P. Pollen dummy. **Current Science**, Bangalore, v. 19, p. 315, 1935.
- BARBOSA, S., DAVIDE, L. C. & PEREIRA, A. V. Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* Schumack x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n.1, p.23 – 26, jan./fev. 2003.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals Botany**, London, v. 76, n. 3, p. 113 – 176, Sept. 1995.

BRIDGEN, M. Micropropagation of ornamental plants. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, p. 13 – 14, 2003.

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

BONAMIGO, L. A. A cultura do milho no Brasil, implantação e desenvolvimento no cerrado. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE MILHETO, 1999, Planaltina. **Anais...** Planaltina, p. 31 – 65, 1999.

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

BURTON, G. W.; POWELL, J. B. Pearl millet breeding and cytogenetics. **Advances in agronomy**. New York: Academic, v. 20, p. 49 – 89, 1968.

BURTON, G. W. A cytological study of some species in the Tribe Paniceae. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 29, p. 335 – 361, 1942.

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*. **Boletim de Pesquisa**, 10 – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília : 44p. 2000.

CANGIANI, S. M. P. Extração e armazenamento de pólen de *Eucalyptus camaldulensis*. In: _____. **Circular Técnica**. Instituto de pesquisa e estudos florestais, n. 162, 1988.

CARVALHO, J. F. R. P. **Análise cariotípica e indução *in vitro* de poliploidia em urucum (*Bixa orellana* L.)** 2000, 124p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Lavras - MG.

CHALAK, L.; LEGAVE, J. M. Oryzalin combined with adventitious regeneration for an efficient chromosome doubling of trihaploid kiwi fruit. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, p. 97 – 100, 1996.

CHAUDHURY, R.; SHIVANNA, K. R. Studies on pollen storage of *Pennisetum typhoides*. **Phytomorphology**, New Dehli, v. 36, p. 211 – 218, 1986.

CHEVADEJ, S.; BECKER, H. Influence of colchicine treatment on chromosome number and growth rate of tissue cultures of *Valeriana Wallichii* DC. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Amsterdam, v. 3, n. 3, p. 265 – 272, 1984.

DAHLEEN, L. S.; JOPPA, L. R. Hybridization and tissue culture of *Hordeum vulgare* x *Elymus canadensis*. **Genome**, Ottawa, v. 35, n. 3, p. 1045 – 1049, 1992.

DAVIDE, L. C.; BARBOSA, S.; ASSIS, J. C.; PEDROSO, C. A.; PEREIRA, A. V. Obtenção de Raça Cromossômica a Partir de Mixoplóides de *Pennisetum*. In: 49º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2003, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, p. 690, 2003.

DE WET, J. M. J. Origins of polyploids. In: LEWIS, W. H. **Polyploidy biological relevance**. New York : Plenum, p. 3 – 16, 1980.

DIZ, D. A.; SCHANK, S.C. Seed and seedling characterization of pearl millet x napiergrass hexaploid hybrids. **Soil and Crop Science of Florida**, v 50, p. 26 – 28, 1990.

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

DORTZBACH, D.; FOGAÇA, L. A.; CLAUDMANN, A. D.; PEDROTTI, E. L. Cultura *in vitro* de *Agnathus umbellatus* em diferentes concentrações de BAP. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, p. 165, 2003.

DUJARDIN, M; HANNA, W. W. Cytology and reproductive behavior of pearl millet-napiergrass hexaploids x *Pennisetum squamulatum* trispecific hybrids. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 75, n. 5, p. 382 – 384, 1985.

DURNAM, D. M.; GELINAS, R.; MYERSON, D. Detection of species specific chromosomes in somatic cell hybrids. **Somatic Cell Molecular Genetics**. v. 11, n. 6, p. 571 – 577, 1985.

DUREN, M. V.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. **Euphytica**, Wageningen, v. 88, n. 1, p. 25-34, 1996.

EINSERT, J.W. Woody plant micropropagation with cytokinins. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry 17: High-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer-Verlag, p. 190 – 201, 1991.

ERIG, A. C.; ROSSI, A.; FORTES, G. R. L. 6-Benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira – preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 765-770, 2002.

FINCH, R. P.; BASET, A. SLAMET, I. H. COCKING, E. C. *In vitro* shoot culture of wild oryzae and other grass species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 30, n.1, p. 31 – 39, 1992.

GEOFFRIAUX, E.; KAHANE, R.; BELLAMY, C.; RANCILLAC, M. Ploidy stability and *in vitro* chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). **Plant Science**, Clare, v. 122, n. 2, p. 201 – 208, 1997.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. England: exetetics, 1993. 574p.

GILES, K. L.; FRIESEN, R. D. Micropropagation. In: SHARGOOL, P. D.; NGO, T. T. **Biotechnological applications of plant culture**. Boca Raton: CRC Press: p. 111 – 128, 1994.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. A.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, v. 1, p. 183 – 260, 1998.

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

HAMILL, S. D.; SMITH, M. K.; DODD, W. A. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 40, n. 6, p. 887 – 896, 1992.

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

- HANNA, W. W.; GAINES, T. P.; GONZALEZ, B.; MONSON, W. G. Effect of ploidy on yield and quality of pearl millet x napier grass hybrids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 76, n. 6, p. 969 – 971, 1984.
- HANNA, W. W.; DUJARDIN, M. Citogenetic of *Pennisetum schweinfurthii* Pilzer and its hybrids with pearl millet. **Crop Science**, Madison, v. 26, n. 3, p. 499 – 553, 1986.
- HANNA, W. W.; Melhoramento do Capim-elefante. In: PASSOS, L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A.V. (ed) **Biologia e Manejo do Capim-elefante**. Juiz de Fora, Embrapa – Gado de Leite, p. 17 – 28, 1999.
- HANSEN, N. P. J., ANDERSEN, S. B. *In vitro* chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) **Euphytica**, Dordrecht, v. 88, n. 2, p. 159 – 164, 1996.
- HANSON, M. R. Anther and pollen culture. In: SINK, K. C. **Petunia**. Berlin: Springer-Verlag, p. 139 – 150, 1984.
- HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, Utrecht, v.20, p. 509 – 517, 1971.
- HARTHMANN, O. E. L.; JACQUES, A. V. A.; TERMIGNONI, R. R. Avaliação agrônômica de plantas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), regeneradas *in vitro*. Qualidade de forragem. In: XXXV REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 32, 1998, Brasília. **Anais...** Brasília : SBZ, p. 53 – 55, 1998.
- HASSAWI, D. S.; LIANG, G. H. Antimitotic agents: effects on double haploid production in wheat. **Crop Science**, v. 31, p. 723 – 726, May/June 1991.
- HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Flow cytometry and chromosome sorting. In: FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. (ed) **Plant Chromosomes**. New York, p. 85 – 106, 1996.
- HIZUME, M.; OHGIKU, A.; TANAKA, A. Chromosome banding in the genus *Pinus* I. Identification of chromosomes in *Pinus nigra* by fluorescent banding method. **The Botanical Magazine of Tokyo**, Tokyo, v. 102, p. 25 – 36, 1989a.

HIZUME, M.; OHGIKU, A.; TANAKA, A. Chromosome banding in the genus *Pinus* II. Interspecific variation of fluorescent banding patterns in *Pinus densiflora* and *Pinus thunbergii*. **The Botanical Magazine of Tokyo**, Tokyo, v. 102, n. 1065, p. 37 – 46, 1989b.

HUANG, H. J.; HUANG, D. Q.; LIU, L. X. Induction and heredity of somatic autotetraploids. **Guandong Agricultural Sciences**, Guangdon, v. 1, n. 1, p. 9 – 12, 1995.

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

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

JOHNSON, R.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 2. Ed. International edition, Prentice-Hall, 607 p. 1988.

KARASAWA, M. M. G. **Re vigoramento de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) submetidas à termoterapia e cultura de tecidos**. 2001. 135p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

KATIVU, S.; MITHEN, R. *Pennisetum* in southern Africa. **FAO/IBPGR. Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v.73/74, p.1 – 8, 1987.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. A.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, v. 2, p. 519 – 531, 1998

KONZEN, P. A.; SILVA, X. M.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Indução e identificação de poliploides em *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) através de técnicas *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 105-111, 2000.

KRIKORIAN, A. D. Propagación clonal *in vitro*. In: Roca, W. M.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos e aplicações**. Cali: CIAT, p. 95 – 126, 1993.

KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V. S. Cytogenetical studies in the interspecific hybrid of *Pennisetum typhoides* x *P. purpureum* Schumach. **Proc. Lst. Science Workers Conference. Departamento Agriculture Madras**, p. 43 – 71, 1951.

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

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

LEBLANC, O.; HERNANDEZ, M.; BELLO, S.; GARCIA, V.; BERTAUD, J.; SAVIDAN, Y. Chromosome doubling in *Tripsacum*: The production of artificial, sexual tetraploid plants. **Plant Breeding**, Berlin, v. 114, n. 3, 226 – 230, 1995.

LYRENE, P. M.; PERRY, J. L. Production and selection of blueberry polyploids *in vitro*. **Journal Heredit, Cary**, v. 73, n. 5, p. 377 – 378, 1982.

MANTELL, S. H. MATTHEWS, J. A. MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Tradutores: AZEVEDO, J. L.; MARGARIDA, L. R. A.; VELLO, P.; VELLO, N. A. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344p.

MARTEL, E.; RICHROCH, A.; SAAR, A. Assessment of genome organization among diploid species ($2n=2x=14$) belonging to primary and tertiary gene pools of pearl millet using fluorescent *in situ* hybridization with rDNA probes. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 4, p.680 – 687, 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. **The Journal of Heredity, Cary**, v. 88, n. 2, p. 139 – 143, 1997.

METZ, S. G.; SHARMA, H. C.; ARMSTRONG, T. A.; MASCIA, P. N. Chromosome doubling and aneuploidy in anther-derived plants from two winter wheat lines. **Genome**, Ottawa, v. 30, n. 2, p. 177 – 181, 1988.

MINOCHA, J. L. Pearl Millet Cytogenetics. In: GUPTA, P. K.; TSUCHIVA. **Chromosome engineering in plants genetics**, Amsterdam: Elsevier, p. 599 – 611, 1991.

MIYOSHI, K.; ASAKURA, N. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*). **Plant Cell Report**, New York, v. 16, n. 2, p. 1 – 5, 1996.

NANNETTI, D. C. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação de *Heliconia* sp.** Lavras: ESAL, 1994. 106p. (Dissertação de Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; SANTOS, B. R.; NAVES, V. C.; MARTINOTTO, C.; ABBADE, L. C. Efeito de 6-Benzilaminopurina (BAP) na indução de brotações a partir de segmentos nodais de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, p. 105, 2003.

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

PAGLIARINI, M. S. Citogenética aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, p.871 – 910; 2001.

PALOMINO, G. Genome analysis of Mexican flora. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 921 – 924, 2000.

PANTULU, J. V.; VENKATESWARLU, J. Morphology of pachytene chromosome of *Pennisetum purpureum* Schum. **Genética**, Graenhage, v. 39, p. 41 – 44, 1968.

PASQUAL, M.; HOFFMAN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159p.

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

PEDROSO, C. A.; SOUZA, T. M.; DAVIDE, L. C.; TECHIO, V. H.; PEREIRA, A. V. Estimativa da viabilidade de pólen em *Pennisetum* spp.. In: CONGRESSO DA PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 10, 2002, Lavras. **Programas e Resumos...** Lavras: UFLA / CAPES, 2002. In: CD-ROM.

PEDROSO, C. A.; BARBOSA, S.; ASSIS, J. C.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Viabilidade polínica por meio da germinação *in vitro* em diferentes níveis de ploidia e em híbrido sintético de *Pennisetum*. In: 49º Congresso Brasileiro de Genética, 2003, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, p.644, 2003.

PEREIRA, A. V.; Germoplasma e diversidade genética do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* schum.). In: PASSOS, L. P.; CARVALHO, L. A.; MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A. V. (Ed.) **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora : Embrapa – Gado de Leite, p. 1 – 16, 1999.

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

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

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

PEREIRA, A. V.; SOBRINHO, F. S.; SOUZA, F. H. D.; LÊDO, F. J. S. Tendências do melhoramento genético e produção de sementes de forrageiras no Brasil. In: VII Simpósio sobre atualização em Genética e Melhoramento de Plantas. Tema: “Melhoramento de Plantas e produção de sementes no Brasil”, Lavras, 2003. **Anais...** Lavras – MG: UFLA, 2003.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990, 326p.

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**, New York, v.19, n. 3, p.274 – 278, 2000.

POGGIO, L.; CONFALONIERE, V.; COMAS, C.; GONZALEZ, G.; NARANJO, C. A. Evolutionary relationships in the genus *Zea*: analysis of repetitive sequences used as cytological FISH and GISH markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 1021 – 1027, 2000.

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

QUISEN, R. C.; OLIVEIRA, C. L. Cultivo *in vitro* de *Acacia mangium*. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, p. 269, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. 728 p.

RAYBURN, A. L.; AUGER, J.A.; BENZINGER, E. A.; HEPBURN, A.G. Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 40, n. 220, p. 1179 – 1183, 1989.

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

ROTH, P. S. **Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake**. 1984. 79 p. Dissertação (Mestrado em Genética de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba - SP.

SAISINGTONG, S.; SCHMID, J. E.; STAMP, P.; BÜTER, B. Colchicine mediated chromosome doubling anther culture of maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, n. 8, p. 1017 – 1023, 1996.

- SÁNCHEZ-MÓRAN, E.; BENAVENTE, E.; ORELLANA, J. Analysis of karyotypic stability of homoeologous-pairing (ph) mutants in allopolyploid wheats. *Chromosoma*, New York, v. 110, n. 5, p. 371 – 377, 2001.
- SCHANK, S. C.; CHYNOWETH, D. P. Napier grass genotypes as biomass and (or) forage. *Tropical Agriculture*. Trinidad, v. 60, n.1, p. 83 – 87, 1993.
- SCHANK, S. C.; HANNA, W.W. Usage of *Pennisetum* in Florida and the tropics. *Proceedings International Conference on Livestock in the Tropical*, Gainsville, p. 1 – 13, 1995.
- SCHANCK, S. C.; Propagação vegetativa e sexual do capim-elefante. In: PASSOS, L. P.; CARVALHO, L. A.; MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A. V. (Ed.) *Biologia e manejo do capim-elefante*. Juiz de Fora : Embrapa – Gado de Leite, p. 1 – 16, 1999.
- SCHARDER, O.; POHLER, W. Seed set from a colchicines treated trigenic hybrid of the cross *Hordeum chilense* (2x) x *triticale* (6x). *Cereal Research Communications*, Szegecl, v. 13, p. 63 – 69, 1985.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T. The cytogenetics and evolution of forage legumes from Rio Grande do Sul: a review. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 4, n. 23, p. 989 – 995, 2000.
- SCHMELZER, G. H. Review of *Pennisetum* section *Brevivalvula* (Poaceae). *Euphytica*, Dordrecht, v.97, n.1, p.1 – 20, 1997.
- SEARS, E. R. Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Annual Review in Genetics*, Palo Alto, v. 10, p. 31 – 51, 1976.
- SEIXAS, L. F. Z. Avaliação do potencial de propagação através de sementes dos cultivares Mott e Cameroon de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). 1996. 82 p. (Tese de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). UNESP: Jaboticabal – SP.
- SETHI, G. S.; KALIA, H. R.; GHAI, B. S. Cytogenetical studies of three interspecific hybrids between *Pennisetum typhoides* Staf and Hubb. and *P. purpureum* Schum. *Cytologia*, Tokyo, v. 35, n. 1, p. 96 – 101, 1970,
- SHIBATA, F.; HISUME, M. The identification and analysis of the sequences that allow the detection of *Allium cepa* chromosomes by GISH in the allodiploid *A. wakegi*. *Chromosoma*, New York, v. 111, n. 3, p. 184 – 191, 2002.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen biology**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. 119 p.

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

SREE RAMULU, K. Meiosis and fertility in derivatives of amphiploid *Pennisetum*. **Caryologia**, Firenze, v. 21, n. 2, p. 147 – 156, 1968.

SREE RAMULU, k. Cytomorphology of the progeny of a raw allopolyploid in *Pennisetum*. **Cytologia**, Tokio, v. 36, n. 6, p. 652 – 668, 1971.

SREE RANGASAMY, S. R. Cytological studies on diploid and polyploidy taxa of the genus *Pennisetum* Rich. **Genetica**, Dordrecht, v. 43, p. 257 – 273, 1972.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen biology biochemistry management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307 p.

STEBBINS, G. L. Longevity, habitat, release of genetic variability in the higher plants. **Cold Spring Symposium Quantitative Biology**, Bungtown, v. 23, p. 365 – 387, 1958.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Reading: Addison Wesley, 215 p., 1971.

SUJATA, D. M.; MANGA, V.; SUBBA RAO, M. V.; MURTY, J. S. R. Meiotic studies in some species of *Pennisetum* (L.) Rich. (Poaceae). **Cytologia**, Tokyo, v. 54, n. 6, p. 641 – 652, 1989.

SWENNE, A.; LOUANT, B.; DUJARDIN, M. Induction par la colchicine de formes altotetraploides chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). **Agronomy Tropical**, v. 36, p. 134 – 141, 1981.

SUN, Y; CHENG, S. Q.; LIANG, G. H. Induction of autotetraploid plants of *Sorghum versicolor*. **Cytologia**, Tóquio, v. 59, n. 1, p. 109 – 114, 1994.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 496p.

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

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

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Análise meiótica em um híbrido entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*. In: ENCONTRO MINEIRO DE GENETICISTA, 6., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 24 p. 2001.

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

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

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S. Fitohormônios. **Universa**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 101 – 132, 2000.

ULMASOV, T.; HAGEN, G. GUILFOYLE, T. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 5844 – 5849, 1999a.

ULMASOV, T.; HAGEN, G. GUILFOYLE, T. Dimerization and DNA binding of zuxin response factors. **Plant Journal**, Amsterdam, v. 19, p. 309 – 319, 1999b.

VAN TUYL, J. M.; MELJER, B.; DIN, M. P. The use of oryzalin as na alternative for colchicine *in vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. **Acta Horticulturae**, v. 325, p. 625 – 630, 1992.

VIDIGAL, M. C.; PASSOS, L. P.; SILVA, J. L. O. Conservação *in vitro* do germoplasma de capim-elefante por meio da micropropagação de meristemas axilares. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 379 – 385, 1998.

VIEIRA, M. L. C.; DA-GLÓRIA, B. A. Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, p.911 – 938; 2001.

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

WAN, Y.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, p. 889 – 892, 1989.

WAN, Y.; DUNCAN, D. R.; RAYBURN, A. L.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. The use of anti-microtubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 81, p. 205 – 211, 1991.

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

XYNIAS, I. N.; ROUPAKIAS, D. G. Primary triticales production from indigenous genetic material with desirable agronomic traits. **Journal of Genetics and Breeding**, Rome, v. 54, n. 4, p. 277 – 282, 2000.

ZANETTE, F.; PAILO, W. N.; MORAES, A. Obtenção de mudas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. var. *napier*) por cultura de meristemas. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 10, n. 1-2, p. 175 – 177, 1988.

CAPÍTULO 2

MICROPROPAGAÇÃO DE HÍBRIDOS TRIPLÓIDES DE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO

RESUMO

BARBOSA, Sandro. **Micropropagação de híbridos triplóides de capim-elefante e milho.** 2004. 119 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.*

Capim-elefante e o milho são espécies cultivadas e sexualmente compatíveis. O híbrido resultante do cruzamento dessas espécies apresenta boas qualidades forrageiras, revelando ser uma alternativa para a obtenção de cultivares superiores. Entretanto, a infertilidade dos híbridos tem sido apontada como um problema, limitando o seu emprego no melhoramento genético do capim-elefante. A restauração da fertilidade pode ser conseguida pela duplicação cromossômica, utilizando antimetabólitos em materiais botânicos obtidos por cultura de tecidos. O objetivo deste trabalho foi quantificar o efeito de diferentes concentrações de BAP durante a fase de multiplicação *in vitro* de híbridos triplóides de capim-elefante e milho. O delineamento experimental inteiramente casualizado foi composto por fatorial 2 x 4 x 2, sendo dois genótipos (CNPGL2000-65-227 e CNPGL 94-60-01) e quatro concentrações de Benzilaminopurina (0,0; 4,4; 8,8 e 17,76 μM), em dois ciclos de cultivo de 45 dias de cultivo *in vitro*. Nos dois ciclos foram avaliados número e comprimento de brotações, número de raízes e no segundo ciclo de cultivo peso de matéria seca da parte aérea e sistema radicular. O maior número de brotações, com média de 9,67 brotações/explante foi obtido na concentração 11,85 μM de BAP para o híbrido CNPGL2000-65-227, no primeiro ciclo de cultivo. O maior número de raízes foi obtido para o híbrido CNPGL 94-60-01, no segundo ciclo de cultivo com média de 11,20 raízes por explante em meio isento de BAP. O meio isento do fitorregulador proporcionou explantes com as maiores alturas para o híbrido CNPGL2000-65-227, atingindo a média de 25,58 cm na primeira avaliação. O maior peso seco de parte aérea, 0,59 g, foi obtido para o híbrido CNPGL2000-65-227 em 8,50 μM de BAP; o maior peso seco de raízes 0,07 g foi obtido em meio isento de BAP para os dois genótipos estudados. Os resultados para número e comprimento de brotações e número de raízes neste trabalho indicam que esta metodologia é altamente vantajosa para obtenção de explantes em experimentos de indução de poliploidia *in vitro*.

* Comitê orientador: Lisete Chamma Davide (orientadora), José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA e Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite.

ABSTRACT

BARBOSA, Sandro. **Micropropagation of elephantgrass and pearl millet triploid hybrids**. 2004. 119 p. Thesis (Doctor of Science in Agronomy) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.*

Elephantgrass and pearl millet are cultivated and sexually compatible species. The hybrid that results from crossing these species presents good forage qualities, being an alternative to obtain superior cultivars. However, the hybrids are infertile, which limits their use in the elephantgrass genetic plant breeding. Fertility can be restored through chromosomal duplication, using anti-mitotics in botanic material obtained through tissue culture. The objective of this work was to quantify the effect of different concentrations of BAP during the *in vitro* multiplication phase of elephantgrass and pearl millet triploid hybrids. The experimental design completely randomized in a was 2 x 4 x 2 factorial scheme. Treatment were two genotypes (CNPGL2000-65-227 and CNPGL94-60-01) and four concentrations of BAP (0.0; 4.4; 8.8 and 17.76 μM), in two chiming cycles of 45 days of *in vitro* cultivation. Two evaluations were performed for number and size of shoots and number of roots. In the second chiming cycle the dry matter of aerial part and root systems were evaluated. The greatest increase in number of shoots, with an average of 9.67 sprouts/explant, was obtained at 11.85 μM of BAP for the CNPGL2000-65-227 hybrid in the first chiming cycle. The greatest number of roots was obtained for the CNPGL94-60-01 hybrid in the second chiming cycle, with an average of 11.20 roots per explant in a media without BAP. The media without plant regulator provided the greatest heights of explants for the CNPGL2000-65-227 hybrid, achieving an average of 25.58 cm at the first evaluation. The greatest aerial part dry matter weight, 0.59 g, was obtained for the CNPGL2000-65-227 hybrid in 8.50 μM of BAP; the greatest root dry matter weight, 0.07 g, was obtained in media without BAP for both genotypes. The results for number and size of shoots and number of roots of this work indicate that this methodology is very beneficial to obtain explants for *in vitro* poliploidy induction experiments.

* Guidance committee: Lisete Chamma Davide (Major professor), José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA and Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite.

1 INTRODUÇÃO

O uso das técnicas de cultura de tecidos tem sido um instrumento valioso na obtenção de plantas, visando aumento da produtividade e o melhor entendimento dos princípios básicos relacionados com a bioquímica fisiológica e o desenvolvimento de plantas (Bridgen, 2003).

As técnicas de cultivo *in vitro* e micropropagação têm sido amplamente utilizados como ferramentas em áreas como a florestal, horticultura, fruticultura e floricultura. A atividade comercial tem se concentrado na limpeza clonal, procedimento no qual mudas livres de patógenos (vírus, bactérias, micoplasmas e fungos) são produzidas através de técnicas como a termoterapia e cultivo de meristemas (Karasawa, 2001).

A micropropagação consiste em isolar qualquer parte da planta (órgãos, tecidos ou células) e multiplicá-la em meios artificiais e estéreis. O indivíduo resultante desse processo terá a mesma constituição genética àquela planta que lhe deu origem (Krikorian, 1993; Vieira & Da-glória, 2001, Bridgen, 2003).

Conforme o explante utilizado e a sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida por multiplicação através da proliferação de gemas axilares, multiplicação mediante a indução de gemas adventícias, por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo), ou ainda por multiplicação via embriogênese. Para promover um rápido aumento no número de explantes, pode-se fazer o uso de citocininas que promovem a proliferação de brotações as quais são repicados e isolados para formação de novos explantes (Teixeira & Marbach, 2000).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), benzilaminopurina é a citocinina mais potente para promover a proliferação de brotações de parte aérea, com a vantagem de ser de baixo custo. Quando brotos apicais são

cultivados em meio contendo citocinina, ocorre o crescimento e o desenvolvimento de brotos axilares prematuramente, pois as citocininas constituem um grupo de fitorreguladores indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares (Pierik, 1990; Einsert, 1991; Karasawa, 2001).

O efeito de diferentes concentrações de BAP e outros reguladores de crescimento na produção de brotações tem sido amplamente investigado para diferentes espécies (Zanette, Pailo & Moraes, 1988; Finch et al., 1992; Nannanetti, 1994; Mantell, Mathews, Mckee, 1994; Pasqual, Hoffman & Ramos, 1997; Vidigal, Passos & Silva, 1998; Karasawa, 2001; Erig, Rossi & Fortes, 2002; Nogueira, et al., 2003, Tarré et al., 2003), bem como seu efeito na produção de raízes e no desenvolvimento e crescimento *in vitro* dos explantes (Teixeira & Marbach, 2003; Dortzbach et al., 2003, Lemos et al., 2003).

O objetivo deste experimento foi definir a concentração da citocinina BAP que proporcionasse o maior número de brotações, número de raízes e altura do explante principal, *in vitro*, de híbridos triplóides de capim-elefante e milheto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Para condução dos experimentos, foram utilizados os híbridos de capim-elefante e milho CNPGL94-60-01 e CNPGL2000-65-227, obtidos pelo programa de melhoramento da Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco – MG, cujo nível de ploidia triplóide foi averiguado por Assis, et al. (2003).

2.2 Preparo dos explantes

Sementes dos híbridos CNPGL94-60-01 e CNPGL2000-65-227 foram desinfestadas em álcool etílico 70% durante um minuto. Em seguida, foram mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio e água destilada (1 : 1) e agitadas por 15 minutos, sendo posteriormente enxaguadas três vezes em água destilada estéril, em ambiente asséptico. Após essa etapa, o material foi colocado sobre papel absorvente, em placa de Petri, para retirar o excesso de água. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 15 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

Após 45 dias de cultivo, os seedlings obtidos foram repicados descartando o sistema radicular abaixo do coleto. A parte aérea teve a maioria das lâminas foliares que protegem o segmento caulinar retiradas, de modo a reduzir o tamanho deste fragmento de caule para aproximadamente 0,5 cm de diâmetro e 2 cm de comprimento (Figura 1), constituindo os explantes.

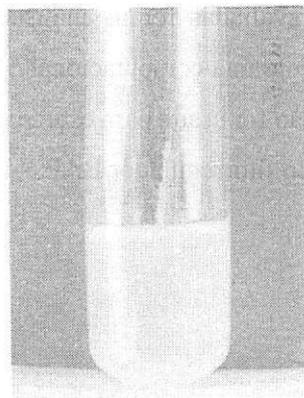


FIGURA 1 Segmento caulinar de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro e 2 cm de comprimento, constituindo o explante.

2.3 Tratamento, delineamento experimental e variáveis avaliadas

Explantes secundários, individualizados com 2 cm de comprimento, foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com 4 concentrações de BAP (0,0; 4,44; 8,88 e 17,76 μM) para multiplicação e produção de novos explantes. Foram realizados dois ciclos de cultivo a cada 45 dias.

Os materiais foram avaliados ao final de cada ciclo de cultivo (45 dias) quanto ao número de brotações emitidas, número de raízes, comprimento do maior broto, sendo o peso de matéria seca da parte aérea e radicular avaliados apenas ao final do segundo ciclo.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições, sendo que os tratamentos foram dispostos em um esquema fatorial 2 x 4 x 2, constituído por dois híbridos de capim-elefante x milheto (PMN), quatro concentrações do fitorregulador BAP e dois ciclos de cultivo de 45 dias. Cada parcela (unidade experimental) foi constituída por 5 tubos de ensaio, com um explante por tubo, totalizando para cada tratamento 30 tubos de ensaio.

As características avaliadas foram analisadas com base na média das parcelas, utilizando-se o programa computacional SISVAR versão 2.0 (Ferreira, 2000). A análise de regressão foi usada para estudar as respostas dos híbridos em função das concentrações do fitorregulador BAP.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Multiplicação de híbridos PMN em diferentes concentrações de BAP

O fitorregulador BAP mostrou-se bastante eficiente em promover brotações múltiplas, sendo os resultados da análise de variância das avaliações nos dois ciclos de cultivo apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Diferenças significativas foram observadas entre as concentrações de BAP para todos os parâmetros avaliados nas duas avaliações. Na primeira avaliação, houve diferença significativa entre os dois híbridos para todas as características. A significância da interação concentração x híbrido para as características número de brotações e número de raízes indica que os híbridos mostraram padrão de resposta diferenciada em função das concentrações de BAP.

Na segunda avaliação, houve diferença entre os híbridos para número de brotações, comprimento do maior broto e peso seco de parte aérea. Nesta mesma avaliação, houve interação significativa entre concentração x híbrido apenas para número de brotações.

Tabela 1 Resumo da análise de variância para número de brotações, número de raízes e comprimento do maior broto dos híbridos PMN em quatro concentrações de BAP, no primeiro ciclo de cultivo. UFLA. Lavras – MG, 2004.

FV	GL	Quadrado Médio		
		Número de Brotações	Número de Raízes	Comprimento do maior broto
Concentração (C)	3	88,48**	92,65**	342,12**
Híbrido (H)	1	63,94**	40,33*	288,61**
C x H	3	14,14**	88,54**	7,29 ns
Erro	40	2,45	7,25	12,15
CV (%)		31,36	53,08	21,59

** : diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F; * : diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F; ns: diferença não significativa pelo teste de F.

TABELA 2 Resumo das análises de variância para número de brotações, número de raízes e comprimento do maior broto dos híbridos PMN em quatro concentrações de BAP, no segundo ciclo de cultivo. UFLA. Lavras – MG, 2004.

FV	GL	Quadrado Médio					
		Número de Brotações	Número de Raízes	Comprimento do maior broto	Peso seco da parte aérea	Peso seco da raiz	
Concentração (C)	3	43,29**	179,89**	256,10**	0,1684**	0,0111**	
Híbrido (H)	1	46,61**	0,60ns	175,95**	0,2549**	0,0003ns	
C x H	3	9,29**	13,54ns	22,49ns	0,0178ns	0,0003ns	
Erro	40	1,79	6,53	13,60	0,0085	0,0007	
CV (%)		33,11	52,67	25,89	25,99	68,17	

** : diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F; ns: diferença não significativa pelo teste de F

3.1.1 Número de Brotações

A proliferação de brotações foi expressiva nas duas avaliações para os dois híbridos estudados quando os meios de cultura foram suplementados com BAP. Segundo Teixeira & Marbach (2000), o BAP tem como função promover a divisão celular nas plantas promovendo a proliferação de brotações de parte aérea.

No primeiro ciclo de cultivo, o maior número de brotações obtido para os híbridos CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 foi 9,67 e 6,15 em 11,85 e 9,55 μM de BAP (Figura 2), respectivamente. Já na segunda avaliação estes números foram 7,38 brotos/explante em 11,8 μM de BAP para o híbrido CNPGL2000-65-227 e 4,45 brotações em 8,95 μM de BAP para o CNPGL-94-60-01 (Figura 3).

O crescimento e o desenvolvimento prematuro de brotos axilares foram observados quando brotos apicais foram cultivados em meio suplementado com a citocinina, pois esta constitui uma classe de fitorregulador indispensável para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares (Einsert, 1991; Mantell, Mathews & Mckee, 1994; Grattapaglia & Machado, 1998; Teixeira & Marbach, 2000).

Zanette, Pailo & Moraes (1988) obtiveram média de 8 brotações por explante de capim-elefante cv. Napier, após um período de 25 a 35 dias, em meio de cultura com 1 mg/L de BAP; 0,01 mg/L de ANA (ácido naftalenoacético) e 0,1 mg/L de ácido giberélico.

Karasawa (2001) estudando o efeito de diferentes dosagens de BAP associado a consistência do meio na multiplicação de brotações para três cultivares de capim elefante, observou que os maiores números de brotos/explante secundário foram conseguidos no meio sólido, onde a cultivar

Mineiro apresentou 9,4 brotações em 6,14 μM de BAP, a cv. Taiwan A-147, 9,5 brotos em 7,21 μM de BAP e a cv. Pioneiro, 8,7 brotações em 6,2 μM de BAP.

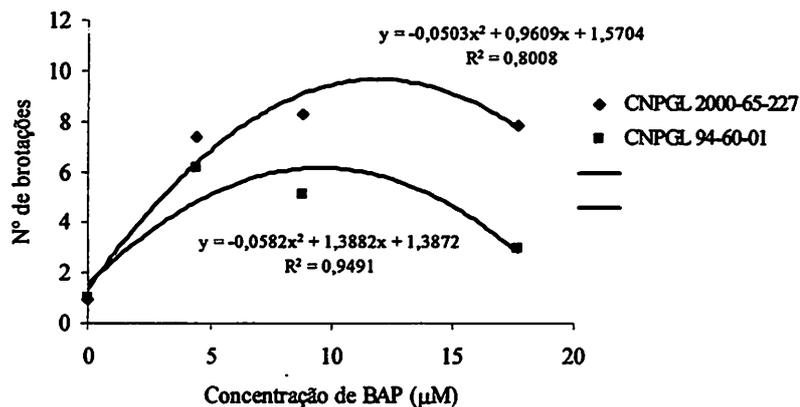


Figura 2 Representação gráfica e equações de regressão para o número de brotos dos híbrdos CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 em função das diferentes concentrações de BAP, no primeiro ciclo de cultivo.

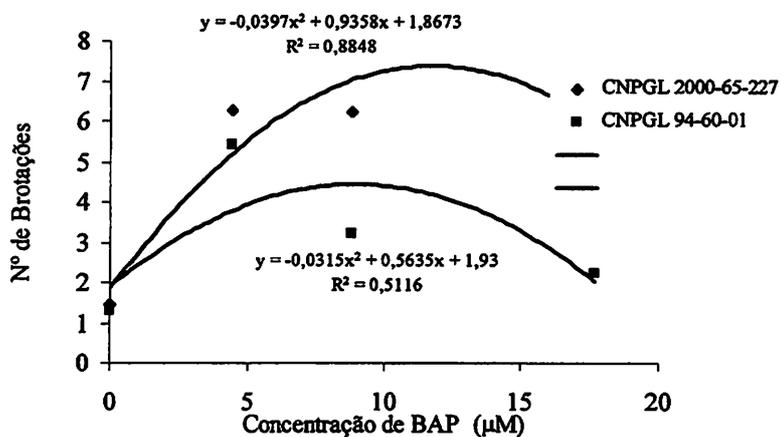


Figura 3 Representação gráfica e equações de regressão para o número de brotos dos híbrdos CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 em função das diferentes concentrações de BAP, no segundo ciclo de cultivo.

Nogueira et al. (2003), estudando o efeito do BAP na indução de brotações do Murici-pequeno observaram diferenças significativas para todas as variáveis estudadas em diferentes concentrações de BAP. O maior número de brotações nessa espécie foi observada em 2 mg/L de BAP. O mesmo foi observado por Pereira et al. (2003) para *Brassocattleya pastoral* x *Laeliocattleya*.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a importância do genótipo e a eficiência das diferentes concentrações do fitorregulador BAP, aos 45 dias de idade, para produção de brotos múltiplos, originando valores próximos àqueles observados na literatura para capim-elefante e outras espécies (Zanette, Pailo & Moraes, 1988; Karasawa, 2001).

3.1.2 Número de raízes

Neste trabalho, a suplementação do meio de cultura com BAP reduziu drasticamente o número de raízes quando foram utilizadas concentrações superiores a 8,8 μM de BAP. Tal efeito do BAP sobre o sistema radicular foi observado também por Karasawa (2001) em cultivares de capim-elefante.

No primeiro ciclo de cultivo, o híbrido CNPGL2000-65-227 exibiu uma curva de emissão de raízes/explante ajustada pela regressão quadrática, com um número máximo de raízes estimado em 6,82 em 0,0 μM de BAP. Para o CNPGL94-60-01 esses valores foram de 8,25 raízes em 5,11 μM de BAP (Figura 4). Na segunda avaliação, esses valores foram de 8,04 raízes para o híbrido CNPGL2000-65-227 e 11,20 para o CNPGL94-60-01, em 0,0 μM de BAP (Figura 5).

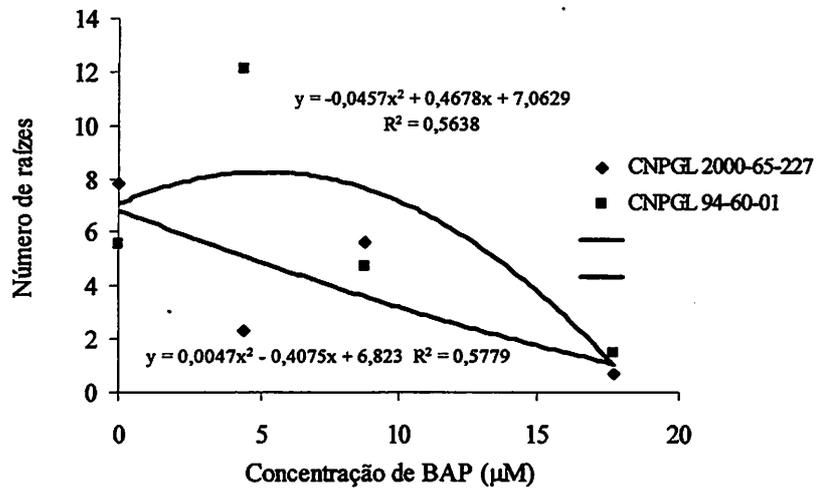


Figura 4 Representação gráfica e equações de regressão para o número de raízes dos híbridos CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 em função das diferentes concentrações de BAP, no primeiro ciclo de cultivo.

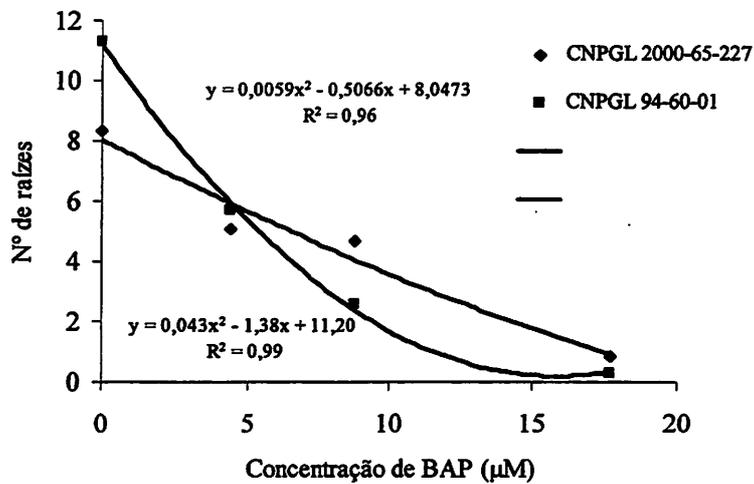


Figura 5 Representação gráfica e equações de regressão para o número de raízes dos híbridos CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 em função das diferentes concentrações de BAP, no segundo ciclo de cultivo.

Teixeira e Marbach (2000) relataram que as citocininas, dependendo da concentração podem promover ou inibir a iniciação e o crescimento de raízes. Segundo esses autores, ainda que a literatura seja deficitária em relatos sobre o efeito do BAP sobre o sistema radicular pode-se levar em consideração que em altas concentrações esta citocinina tem efeito inibitório sobre o crescimento das raízes.

Observando o comportamento do número de raízes por explante em função da concentração de BAP para os dois híbridos, observa-se que nas concentrações mais elevadas houve uma drástica redução no número de raízes, com tendência de inibição do crescimento e desenvolvimento desse órgão em dosagens superiores a 17,76 μM de BAP.

Nannanetti (1994) verificou que a maior produção de raízes de *Heliconia* sp era observada em meios sem suplementação com BAP. Nogueira et al. (2003) e Dortzbach (2003) relatam que a maior proliferação de raízes foi observada em meios suplementados com concentrações inferiores a 0,5 mg/L de BAP para as espécies *Byrsonima intermedia* e *Agapanthus umbellatus*. Zanette, Pailo & Moraes (1988) obtiveram 85% de enraizamento do capim-elefante cv. Napier ao utilizarem meio de cultura suplementado com 22,20 μM de BAP. Essa concentração é superior àquela utilizada por Karasawa (2001), 6,68 μM de BAP; na qual obteve o maior número de raízes para cv. Pioneiro em meio líquido, bem como superior a 5,11 μM de BAP, observado neste trabalho para o híbrido CNPGL94-60-01.

Finch et al. (1992) observaram comportamento diferenciado das espécies de arroz silvestre e outras gramíneas em relação ao enraizamento, mostrando variações na suplementação desde 0,0 até 10,8 μM de BAP. Esse mesmo comportamento foi observado para palma forrageira doce por Lemos et al. (2003), que observaram o enraizamento dos explantes em diferentes dosagens de BAP.

3.1.3 Comprimento do maior broto

A altura dos explantes nos dois híbridos PMN mostraram comportamento semelhante nos dois ciclos de cultivo, diminuindo à medida que aumentou a concentração do fitorregulador (Figuras 6 e 7). As maiores alturas ajustadas pela regressão quadrática na primeira avaliação foram 25,58 cm para o híbrido CNPGL2000-65-227 e 19,58 cm para o CNPGL94-60-01; no segundo ciclo de cultivo estas medidas foram 21,09 cm para CNPGL2000-65-227 e 17,28 cm CNPGL94-60-01. Estes resultados foram obtidos em meio isento de BAP nas duas avaliações.

Nannetti (1994) estudando o comportamento de crescimento e multiplicação de explantes de *Heliconia* sp. relata que a maior altura do explante principal atingia 6,4 cm quando se empregava a concentração de 22,20 μM de BAP. Contrapondo esse resultado, a literatura revisada por Teixeira & Marbach (2000) relata que altas dosagens do fitorregulador BAP tendem a promover uma redução expressiva do alongamento dos explantes, tendo em vista que as citocininas pertencem a grupo de reguladores de crescimento que afetam mais a divisão celular do que o alongamento.

Segundo Mantell, Matthews & Mckee (1994), as brotações apicais têm maior crescimento quando cultivadas em meio de cultura isento do fitorregulador, apresentando inibição do crescimento apical quando citocinina é acrescentada ao meio de cultura. Cerqueira (1999) verificou que as plantas mais altas de *Tridax procumbens* L. (erva-de-touro) encontravam-se nas concentrações de BAP mais próximas de zero. Essas observações são congruentes àquelas feitas por Dortzbach et al. (2003) em estudos com *Agapanthus umbellatus* e Nogueira et al. (2003) para o Murici-pequeno, para as quais explantes mais altos foram obtidos em meios com suplementação abaixo de 0,5 μM de BAP ou isentos de BAP.

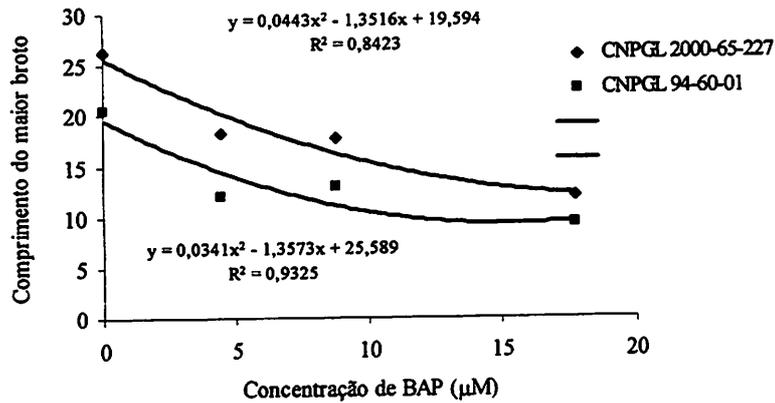


Figura 6 Representação gráfica e equações de regressão para comprimento do maior broto dos híbridos CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 em função das diferentes concentrações de BAP, no primeiro ciclo de cultivo.

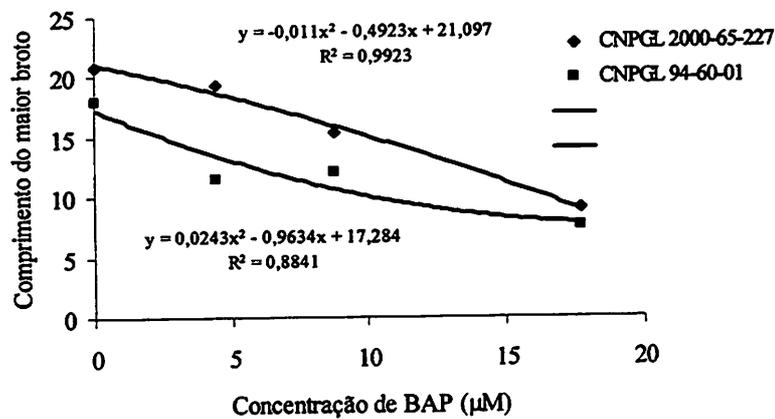


Figura 7 Representação gráfica e equações de regressão para comprimento do maior broto dos híbridos CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 em função das diferentes concentrações de BAP, no segundo ciclo de cultivo.

Vidigal, Passos & Silva (1998), estudando a perda de vigor do capim-elefante, observaram que algumas cultivares apresentavam maior crescimento em meio de cultura isento de fitorregulador; entretanto, algumas cultivares apresentaram maior crescimento quando cultivadas em meio suplementado com 0,125 μM de ANA. Já Karasawa (2001), relata que as maiores alturas dos explantes de três cultivares de capim-elefante foram estimadas no meio isento do fitorregulador, sendo de 6,08; 5,2 e 5,62 cm, respectivamente, para as cvs. Mineiro, Taiwan A-147 e Pioneiro no meio de cultura sólido.

Os resultados deste trabalho mostraram uma redução de crescimento na altura dos explantes à medida que a concentração de BAP no meio de cultura foi aumentada e que as maiores alturas dos explantes foram obtidas em meio de cultura isento de fitorregulador, sendo consonante com a literatura (Mantell, Matthews & Mckee, 1994; Cerqueira, 1999; Teixeira & Marbach, 2000; Karasawa, 2001; Dortzbach et al., 2003; Nogueira et al., 2003).

3.1.4 Produção de matéria seca

Os híbridos CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 apresentaram diferença significativa para produção de matéria seca da parte aérea, sendo o maior peso 0,59 g obtido para o híbrido CNPGL2000-65-227 em 8,5 μM de BAP e 0,36 g para o CNPGL94-60-01 em 7,57 μM de BAP (Figura 8). Já para o peso de matéria seca do sistema radicular estes números foram 0,076 g para o híbrido CNPGL2000-65-227 e 0,077 g para o CNPGL-94-60-01 (Figura 9) em 0,0 μM de BAP, não havendo portanto, diferença significativa entre genótipos para esse parâmetro.

Na literatura revisada, não foi encontrada referência para peso de matéria seca para parte aérea e sistema radicular em capim-elefante em cultivo *in vitro*.

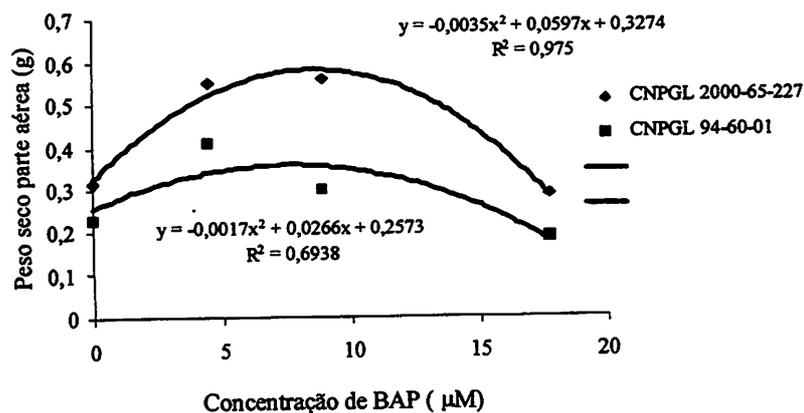


Figura 8 Representação gráfica e equações de regressão para peso de matéria seca da parte aérea dos híbridos CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 em função das diferentes concentrações de BAP, no primeiro ciclo de cultivo.

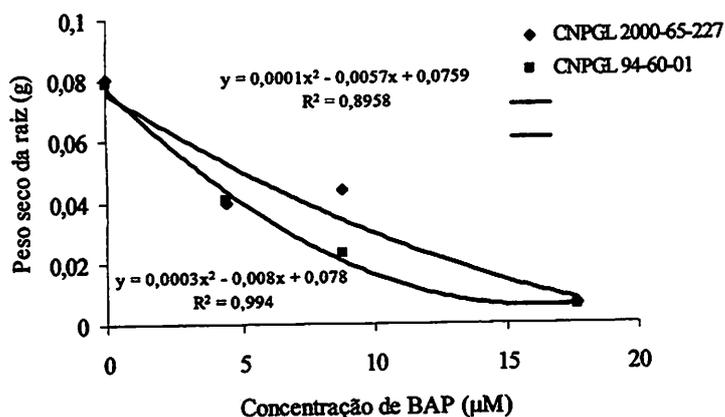


Figura 9 Representação gráfica e equações de regressão para peso de matéria seca do sistema radicular dos híbridos CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 em função das diferentes concentrações de BAP, no segundo ciclo de cultivo.

4 CONCLUSÕES

1. As diferentes concentrações do fitorregulador BAP foram eficientes em produzir brotações, tendo em vista que na sua ausência, a formação de novas brotações laterais foi nula.

2. Uma redução drástica da emissão e crescimento de raízes foi verificada à medida que se aumentavam as concentrações de BAP, embora o enraizamento tenha sido observado mesmo na presença de BAP.

3. O uso do fitorregulador afetou negativamente o crescimento das brotações, sendo as brotações mais altas observadas em meio de cultura isento de BAP.

4. Concentrações mais elevadas de BAP exerceram influência positiva na produção de matéria seca de parte aérea enquanto meios isentos do fitorregulador BAP favoreceram a obtenção de maiores valores maiores de matéria seca para o sistema radicular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRIDGEN, M. Micropropagation of ornamental plants. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2003, Lavras. *Anais...* Lavras, p. 13 – 14, 2003.
- CERQUEIRA, E. S. **Propagação e calogênese *in vitro* em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal.** Lavras: UFLA, 1999. 81 p. (Dissertação de Mestrado)
- DORTZBACH, D.; FOGAÇA, L. A.; CLAUDMANN, A. D.; PEDROTTI, E. L. Cultura *in vitro* de *Agnathus umbellatus* em diferentes concentrações de BAP. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2003, Lavras. *Anais...* Lavras, p. 165, 2003.
- ENISERT, J.W. Woody plant micropropagation with cytokinins. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry 17: High-tech and micropropagation I.** Berlin: Springer-Verlag, p. 190 – 201, 1991.
- ERIG, A. C.; ROSSI, A.; FORTES, G. R. L. 6-Benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira – preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 765-770, 2002.
- FERREIRA, D. F. **Programa de análise estatística SISVAR – 2000.**
- FINCH, R. P.; BASET, A. SLAMET, I. H. COCKING, E. C. *In vitro* shoot culture of wild oryzae and other grass species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 30, n.1, p. 31 – 39, 1992.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. A.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, v. 1, p. 183 – 260, 1998.
- KARASAWA, M. M. G. **Revigoração de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) submetidas à termoterapia e cultura de tecidos.** 2001. 135p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

KRIKORIAN, A. D. Propagación clonal *in vitro*. In: Roca, W. M.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos e aplicações**. Cali: CIAT, p. 95 – 126, 1993.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. O.; ARAUJO FILHO, J. T.; BARROS, Z. S. Micropropagação da palma forrageira doce (*Napolea cochenillifera*). In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, p. 85, 2003.

MANTELL, S. H. MATTHEWS, J. A. MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Tradutores: AZEVEDO, J. L.; MARGARIDA, L. R. A.; VELLO, P.; VELLO, N. A. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473 – 497, 1962.

NANNETTI, D. C. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação de *Heliconia* sp.** Lavras: ESAL, 1994. 106p. (Dissertação de Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; SANTOS, B. R.; NAVES, V. C.; MARTINOTTO, C.; ABBADE, L. C. Efeito de 6-Benzilaminopurina (BAP) na indução de brotações a partir de segmentos nodais de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, p. 105, 2003.

PASQUAL, M.; HOFFMAN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159p.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990, 326p.

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S. Fitohormônios. **Universa**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 101 – 132, 2000.

TERRÉ, E.; BALZANA, B.; CARNEIRO, L. A. MANSUR, E.; Micropropagação de *Neoregelia marmorata*, uma espécie ornamental de Bromeliaceae. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, p. 141, 2003.

VIDGAL, M. C.; PASSOS, L. P.; SILVA, J. L. O. Conservação *in vitro* do germoplasma de capim-elefante por meio da micropropagação de meristemas axilares. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 379 – 385, 1998.

VIEIRA, M. L. C; DA-GLÓRIA, B. A. Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, p.911 – 938; 2001.

ZANETTE, F.; PAILO, W. N.; MORAES, A. Obtenção de mudas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. var. *napier*) por cultura de meristemas. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 10, n. 1-2, p. 175 – 177, 1988.

CAPÍTULO 3

DUPLIÇÃO CROMOSSÔMICA DE HÍBRIDOS TRIPLÓIDES DE CAPIM-ELEFANTE E MILHETO

RESUMO

BARBOSA, Sandro. **Duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim-elefante e milheto**. 2004. 119 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.*

Com o objetivo de duplicar o complemento cromossômico de híbridos triplóides de capim-elefante e milheto e restaurar a sua fertilidade permitindo que os mesmos pudessem voltar aos programas de melhoramento genético transferindo alelos de características desejadas ao capim-elefante e viabilizando a sua propagação via semente, tornando a implementação de pastagens economicamente viáveis, ‘seedlings’, plântulas e segmentos caulinares cultivados *in vitro* foram tratados com soluções de colchicina 0,05% e 0,1% aplicadas em intervalos de 12 e 24 horas de exposição. ‘Seedlings’ de diferentes genótipos híbridos cultivados *in vivo* e meristemas de dois híbridos interespecíficos foram submetidos à exposição de 24 horas em solução de 0,05% de colchicina. A duplicação cromossômica foi confirmada através do número cromossômico em células de meristemas de raiz e avaliação da viabilidade polínica por meio de testes de germinação *in vitro* e produção de sementes. ‘Seedlings’ cultivados e tratados *in vitro* apresentaram a melhor resposta ao tratamento de indução de poliploidia em solução de colchicina 0,1% por 24 horas, no qual 38% das plantas sobreviventes apresentaram o conjunto cromossômico duplicado e a fertilidade confirmada pela presença de pólenes viáveis.

* Comitê orientador: Lisete Chamma Davide (orientadora), José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA e Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite.

ABSTRACT

BARBOSA, Sandro. Chromosomal duplication of elephantgrass and pearl millet triploid hybrids. 2004. 119 p. Thesis (Doctor of Science in Agronomy) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.*

The objective of this study was to double the chromosome complement of elephantgrass and pearl millet triploid hybrids and to restore their fertility. This strategy could allow their use in genetic improvement programs transferring alleles with the desired characteristics to the elephantgrass and making viable its propagation through seeds. Seedlings, plantlets and stems segment cultivated *in vitro* were treated with 0.05% and 0.1% solutions of colchicines applied at intervals of 12 and 24 hours of exposure. Seedlings of different hybrid genotypes cultivated *in vivo* and meristems of two inter-specific hybrids were submitted to 24 hours exposure in 0.05% solution of colchicines. Chromosomal duplication was confirmed through the chromosome counting in root meristems and evaluation of pollen viability through *in vitro* germination and seed production tests. Seedlings cultivated and treated *in vitro* presented the best response to the polyploidy induction treatment in 0.1% solution of colchicine for 24 hours, in which 38% of the surviving plants presented a doubled chromosomal group and fertility confirmed by the presence of viable pollens.

* Guidance committee: Lisete Chamma Davide (Major professor), José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA and Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite.

1 INTRODUÇÃO

O germoplasma do gênero *Pennisetum* Rich. é caracterizado por sua ampla variabilidade genética descrita em, aproximadamente, 140 espécies (Brunken, 1977; Kativu & Mithen, 1987; Xavier, et al., 1995; Jauhar & Hanna, 1998).

Entre as espécies de *Pennisetum*, o milheto (*P. glaucum*) destaca-se economicamente como cereal e forrageira e o capim-elefante (*P. purpureum*) como reconhecida forrageira de alta qualidade e palatabilidade (Pereira et al., 2001). O milheto é anual, alógama com $2n = 2x = 14$ e genoma AA e integra o conjunto gênico primário juntamente com outras duas espécies silvestres diplóides. O capim-elefante é perene, alógama com $2n = 4x = 28$ e genomas A'A'BB e compõe o conjunto gênico secundário. O terceiro conjunto é constituído pelos demais taxa (Harlan & De Wet, 1971 e Martel, Ricroch & Sarr, 1996).

O capim-elefante é amplamente cultivado por todo o Brasil. Entretanto, uma das limitações à expansão da área cultivada de capim-elefante é a necessidade do uso da propagação vegetativa, visto que a maioria das cultivares produz sementes de baixo vigor (Pereira et al., 2001 e Pereira et al., 2003). Uma solução econômica para este problema é o desenvolvimento de cultivares superiores, adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas e propagadas via sementes. Desprezando-se as diferenças genotípicas para produção e qualidade da forragem, a propagação por meio de sementes apresenta como vantagens maior facilidade de colheita, armazenamento e transporte, maior rapidez e facilidade no plantio e menor gasto de mão-de-obra, resultando em menor custo de implantação das pastagens (Pereira et al., 2003).

A obtenção de cultivares propagadas por sementes, bem como de porte baixo, melhor adaptadas ao sistema de pastejo, e com maior resistência às cigarrinhas das pastagens tem sido o principal objetivo do melhoramento do capim-elefante (Pereira et al., 2003). A principal estratégia adotada pelo melhoramento dessa espécie têm sido a hibridação. Além da exploração das combinações entre os acessos de capim-elefante existentes nos bancos de germoplasma, o melhoramento aproveita a facilidade de cruzamento entre essa espécie e o milheto para a obtenção de híbridos interespecíficos com melhor qualidade forrageira (Jauhar & Hanna, 1998; Hanna, 1999; Schanck, 1999; Pereira et al., 2001).

A primeira descrição sobre o híbrido interespecífico de capim-elefante e milheto foi feita por Burton (1942). Esse híbrido é considerado o mais importante desse gênero por apresentar produção e qualidade forrageiras similar ou superiores aos seus genitores (Jauhar, 1981, Jauhar & Hanna, 1998). O híbrido de capim-elefante e milheto é um triplóide estéril com $2n = 3x = 21$ cromossomos e genoma AA'B, que pode ser propagado vegetativamente. Entretanto, a esterilidade desse híbrido torna-se uma barreira para os programas de melhoramento do capim-elefante e produção de sementes para implementação de pastagens, economicamente viáveis.

A restauração da fertilidade pode ser conseguida pela duplicação cromossômica, utilizando colchicina (Krishnaswamy & Raman, 1951 e 1954; Hanna, 1981; Hanna et al., 1984) ou outros antimitóticos (Dujardin & Hanna, 1985; Hanna & Dujardin, 1986; Abreu, 2002). Um hexaplóide artificial é produzido, o qual apresenta meiose bastante regular, progênie com alta frequência de polens férteis e sementes grandes, viáveis e com menor deiscência, quando comparadas às do capim-elefante, favorecendo a propagação via semente.

Embora a literatura relate metodologias de duplicação cromossômica do híbrido triplóide de capim-elefante e milho (Hanna, 1981 e Hanna et al., 1984), ainda não se conseguiu produzir hexaplóides artificiais utilizando-se híbridos desenvolvidos no Brasil. Além disso, hexaplóides induzidos foram obtidos apenas a partir 'seedlings' *in vivo*, o que não permite uma avaliação prévia do comportamento agrônomo do triplóide, podendo-se duplicar os cromossomos de híbridos sem valor forrageiro. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo adaptar e desenvolver metodologias de duplicação cromossômica, utilizando explantes e 'seedlings' triplóides estéreis provenientes do cultivo *in vitro* e *in vivo* para restaurar sua fertilidade e contribuir para a obtenção de cultivares superiores que se propaguem via semente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Foram utilizados seis híbridos triplóides obtidos do cruzamento entre capim-elefante e milheto (Tabela 1). Os híbridos CNPGL94-43-01 e CNPGL94-60-01 foram selecionados por originarem-se de genitores com características genéticas de importância forrageira complementares e os demais por serem resultantes do cruzamento entre genitores de características divergentes. Os híbridos foram obtidos no Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante (BAGCE) da Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG.

A confirmação da condição triplóide ($2n = 3x = 21$) dos híbridos listados na Tabela 1 foi feita por Assis et al. (2003).

TABELA 1 Híbridos triplóides selecionados pela Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG e utilizados nos experimentos. UFLA. Lavras, MG, 2004.

Genitores		híbridos
capim-elefante	milheto	
BAG 54	M 36	CNPGL94-43-01
BAG 75	M 24	CNPGL94-60-01
BAG 19	M 24	CNPGL2000-65-227
BAG 64	M 64	HA
BAG 28	M 64	HB
BAG 65	M 41	HC

2.2 Indução de poliploidia

Foram realizados cinco experimentos, nos quais diferentes metodologias de exposição à colchicina foram utilizadas, variando concentração e tempo de exposição, bem como material botânico (Quadro 1).

Em todos os experimentos foi incluído um híbrido cujas características botânico-agronômicas dos genitores eram complementares (CNPGL94-60-01) e um híbrido cujos genitores apresentavam características divergentes (CNPGL2000-65-227).

Dos sobreviventes de cada experimento, foram coletadas raízes para a avaliação citogenética, de acordo com o tópico 2.3.

Os experimentos de indução de poliploidia foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura e as análises citogenéticas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UFLA, Lavras – MG. Os experimentos são descritos a seguir, de acordo com o material botânico utilizado.

2.2.1 Experimento 1 – Exposição de meristemas

Estacas contendo de 2 a 3 nós dos híbridos CNPGL94-43-01, CNPGL94-60-01 e CNPGL2000-65-227 foram colocadas para enraizar e perfilhar, à temperatura ambiente, em recipiente contendo água de torneira renovada diariamente. Quando os perfilhos laterais atingiram aproximadamente 7 cm, seus meristemas foram extraídos.

O preparo do material constituiu na retirada de boa parte das lâminas foliares que se encontravam protegendo o meristema lateral, de modo a reduzir o tamanho deste fragmento de caule para 0,5 cm de diâmetro e 2 cm de comprimento.

QUADRO 1 Resumo dos experimentos realizados para indução de duplicação cromossômica, utilizando diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição em híbridos de capim-elefante x milho.

Experimento	Material botânico	Material híbrido	Concentração	Tempo
1	Meristemas	CNPGL94-43-01	0,05%	6 h, 15 h e 24 h
		CNPGL94-60-01		
		CNPGL2000-65-227		
2	'Seedlings' <i>in vitro</i>	CNPGL94-60-01	0,05% e 0,1%	12h e 24 h
		CNPGL2000-65-227		
3	Plântulas <i>in vitro</i>	CNPGL94-60-01	0,05% e 0,1%	12h e 24 h
		CNPGL2000-65-227		
4	Segmentos caulinares <i>in vitro</i>	CNPGL94-60-01	0,05% e 0,1%	12h e 24 h
		CNPGL2000-65-227		
5	'Seedlings' <i>in vivo</i>	CNPGL94-43-01	0,05%	24 h
		CNPGL2000-65-227		
		HA HB HC		

O material assim obtido foi submerso em uma solução de hipoclorito de sódio e água destilada (1:1) agitando-se por 15 minutos, sendo enxaguado três vezes em água destilada estéril, em ambiente asséptico. Em seguida, o material foi colocado sobre papel absorvente, em placa de Petri, para retirar o excesso de água. Com o auxílio do microscópio estereoscópio, em capela de fluxo laminar, os meristemas laterais foram retirados e mergulhados em 2 mL de solução de colchicina 0,05% acondicionados em tubo de ensaio de 10 x 80 mm por 6, 15 e 24 horas, assepticamente. Foram tratados cinco meristemas de cada híbrido em cada intervalo de tempo, devido à dificuldade de extração dos mesmos em tempo hábil para a realização dos tratamentos colchicínicos. Após o tempo de exposição, os meristemas foram assepticamente lavados três vezes em água destilada estéril, inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 15 mL de meio MS + 2 mg/L de BAP (Figura 1A) e mantidos sob condição de iluminação de 2000 lux e temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 30 dias do tratamento, eliminaram-se os materiais mortos e/ou contaminados. Após 60 dias de cultivo *in vitro*, fez-se a repicagem dos explantes que se desenvolveram e perfilharam (Figura 1B e 1C). Os perfilhos foram contados e individualizados em novos tubos de ensaio, contendo meio MS suplementado com 0,5 mg/L de ANA. Passados 45 dias de cultivo *in vitro*, esses explantes foram transferidos para copos plásticos contendo substrato (vermiculita) e levados para casa de vegetação para aclimatação. Após o período de aclimatação (aproximadamente 10 dias), foram transferidos para um sistema hidropônico improvisado em bandejas plásticas onde ficaram suspensos em grade de metal e em contato com a lâmina de água (Figura 1D). Todos os requisitos para cultura hidropônica, conforme recomendado por Martinez (2002), foram atendidos.

Pontas de raízes para análise citogenética foram coletadas em duas etapas do experimento: uma na transferência dos explantes sobreviventes ao tratamento de indução para a hidroponia e outra na transferência das plantas do

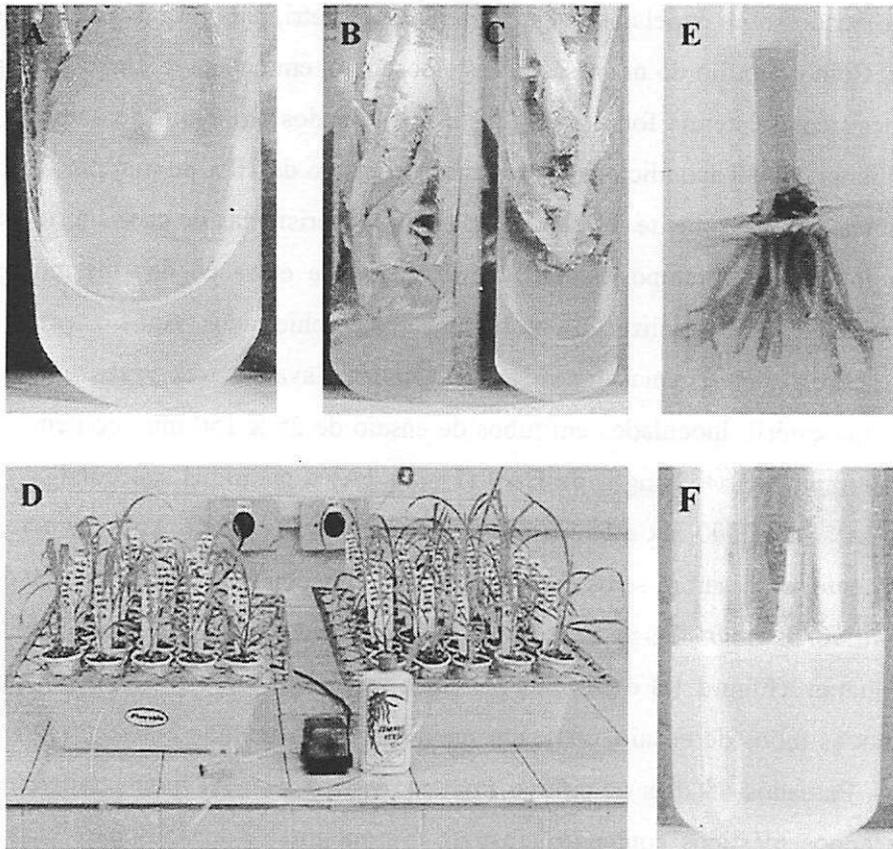


FIGURA 1 A) meristema inoculado em meio MS + 2 mg/L de BAP, B e C) explantes desenvolvidos a partir de meristemas, D) sistema hidropônico, E) explante de seedling inoculado em MS + 0,5 mg/L de ANA, F) segmento caulinar inoculado em meio MS + 2mg/L de BAP para multiplicação.

cultivo hidropônico para os vasos contendo terra e substrato Plantmax® (1:1). Os vasos foram acondicionados em casa de vegetação e adubados conforme recomendações existentes para capim-elefante (Martins & Fonseca, 1994).

2.2.2 Experimento 2 – Exposição de ‘seedlings’ *in vitro*

Sementes híbridas resultantes dos cruzamentos BAG 75 x M24 (CNPGL94-60-01) e BAG 19 x M24 (CNPGL2000-65-227) foram desinfestadas em álcool etílico 70% durante um minuto. Em seguida, foram mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio e água destilada (1:1) e agitadas por 15 minutos, sendo enxaguadas três vezes em água destilada estéril, em ambiente asséptico. Após essa etapa, o material foi colocado sobre papel absorvente, em placa de Petri, para retirar o excesso de água. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 15 mL de meio MS.

‘Seedlings’ com 60 dias de cultivo *in vitro* foram selecionados para os tratamentos de indução de duplicação. Os ‘seedlings’ foram retirados dos tubos de ensaio, em câmara de fluxo laminar; as raízes foram lavadas em água destilada estéril para retirar o excesso de meio. A parte aérea, 1,5 cm acima do coleto, foi cortada assim como o sistema radicular 2,0 cm abaixo, constituindo o explante que foi submetido ao tratamento colchicínico para indução a poliploidia. Os explantes foram mergulhados até a altura do coleto em soluções de colchicina 0,05% e 0,1%, por 12 e 24 horas. Para cada tratamento foram utilizados 12 explantes de cada híbrido.

Após os tratamentos de indução a duplicação, os explantes foram assepticamente lavados três vezes em água destilada estéril e inoculados em meio MS suplementado com 0,5 mg/L de ANA (Figura 1E) e mantido sob as mesmas condições de crescimento descritas no item 2.2.1.

Após 60 dias de cultivo *in vitro*, os explantes que sobreviveram ao tratamento de indução e apresentaram sistema radicular desenvolvido tiveram algumas raízes coletadas para avaliação citogenética. Esses explantes foram transferidos para copos plásticos contendo substrato (vermiculita) e levados para casa de vegetação para aclimação. Após o período de aclimação, foram transferidos para um sistema hidropônico improvisado, conforme descrito no item 2.2.1.

Após 30 dias de cultivo hidropônico, uma segunda coleta de raízes foi feita e as plantas foram transferidas para vasos contendo terra e substrato Plantmax® (1:1) e acondicionadas em casa de vegetação.

2.2.3 Experimento 3 – Exposição de plântulas *in vitro*

Sementes híbridas resultantes dos cruzamentos BAG 75 x M24 (CNPGL94-60-01) e BAG 19 x M24 (CNPGL2000-65-227) foram desinfestadas e inoculadas conforme o procedimento apresentado no item 2.2.2. Após 45 dias de cultivo, os 'seedlings' foram repicados descartando o sistema radicular abaixo do coleto e a parte aérea 2,0 cm acima do mesmo (Figura 1F) constituindo os explantes que foram inoculados em MS suplementado com 2 mg/L de BAP para multiplicação e produção de novos explantes. Foram realizados 3 ciclos de repicagem desse material a cada 45 dias, de modo a formar um estoque de plântulas.

Segmentos caulinares provenientes do estoque foram selecionados e isolados, boa parte das lâminas foliares que se encontravam protegendo o segmento foram retiradas, de modo a reduzir o tamanho deste fragmento de caule para aproximadamente 0,5 cm de diâmetro e 2 cm de comprimento. Esses explantes foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS.

Plântulas com 60 dias de cultivo em meio MS, obtidas a partir do desenvolvimento *in vitro* dos explantes, foram selecionadas para os tratamentos de indução de duplicação. Os procedimentos de preparo das plântulas (Figura 2),

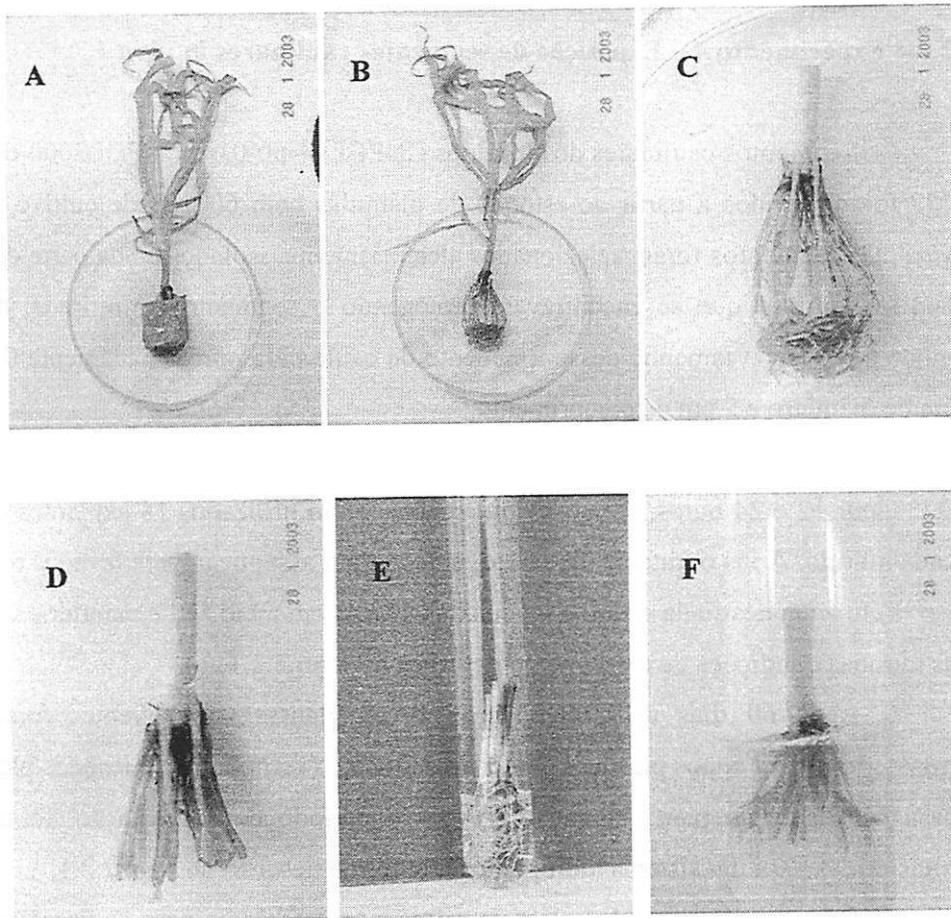


FIGURA 2 Etapas do preparo de plântulas cultivadas *in vitro* para os procedimentos do tratamento de indução de poliploidia. A) Plântula obtida *in vitro*, B) remoção do meio do sistema radicular, C) corte da parte aérea, D) corte do sistema radicular, E) tratamento em solução de colchicina e F) inoculação do explante tratado em meio MS.

de indução a duplicação cromossômica, da segunda coleta de raízes e transferência para os vasos em casa de vegetação foram os mesmos aplicados para 'seedlings' *in vitro* descritos no item 2.2.2., excetuando que foram utilizadas 18 plântulas em cada tratamento.

2.2.4 Experimento 4 – Exposição de segmentos caulinares *in vitro*

Segmentos caulinares dos híbridos CNPGL94-60-01 e CNPGL2000-65-227 foram obtidos a partir do estoque de plântulas com 60 dias de cultivo *in vitro*. Os segmentos foram selecionados aleatoriamente, isolados e boa parte das lâminas foliares que se encontravam protegendo o segmento foi retirada, de modo a reduzir o tamanho desse fragmento de caule para aproximadamente 0,5 cm de diâmetro e 2 cm de comprimento.

Os explantes foram mergulhados em soluções de colchicina 0,05% e 0,1%, por 12 e 24 horas. Para cada tratamento foram utilizados 18 explantes de cada híbrido. Após o tratamento, os explantes foram assepticamente lavados três vezes em água destilada estéril e inoculados apenas em meio MS e mantidos sob as mesmas condições de crescimento descritas no item 2.2.1.

Após 60 dias de cultivo *in vitro*, as plantas sobreviventes foram transferidas para copos plásticos contendo substrato (vermiculita) e levados para casa de vegetação para aclimação. Após o período de aclimação, foram transferidas para um sistema hidropônico, conforme descrito no item 2.2.1.

Os procedimentos de coleta de raízes e transferência para os vasos em casa de vegetação foram os mesmos aplicados para plântulas *in vitro* descritos no item 2.2.3.

2.2.5 Experimento 5 – Exposição de ‘seedlings’ *in vivo*

Sementes híbridas resultantes dos cruzamentos BAG 54 x M36 (CNPGL94-43-01), BAG 19 x M24 (CNPGL2000-65-227), BAG 64 X M64 (HA), BAG 28 x M64 (HB) e BAG 65 x M41 (HC) foram desinfestadas em álcool etílico 70% durante um minuto e semeadas em copos plásticos contendo substrato (vermiculita) e cultivados em sistema de hidroponia, conforme descrito no item 2.2.1 e as recomendações de Martinez (2002). Após 60 dias de cultivo, as plantas tiveram suas raízes lavadas até a retirada total da vermiculita, em seguida o sistema radicular foi cortado 3 cm abaixo do coleto e a parte aérea teve as folhas parcialmente cortadas.

Foram selecionadas aleatoriamente 15 plantas de cada híbrido e mergulhadas até a altura do coleto em solução de colchicina 0,05% por 24 horas (Figura 3). Em seguida, as raízes foram lavadas em água corrente por 4 horas para recuperação, conforme recomendação de Hanna et al (1984). Após a recuperação, as plantas foram transferidas para copos plásticos contendo substrato (vermiculita) e levadas para casa de vegetação. Após o período de aclimação, foram transferidas para um sistema hidropônico conforme descrito no item 2.2.1.

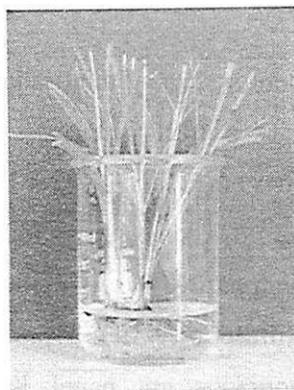


FIGURA 3 Plantas mergulhadas em solução de colchicina 0,05% por 24 horas.

Após 30 dias de cultivo hidropônico, as plantas sobreviventes ao tratamento tiveram algumas de suas raízes coletadas para análise citogenética e foram transferidas para vasos contendo terra e substrato Plantmax® (1:1) e acondicionados em casa de vegetação.

2.3 Análise citogenética

A eficiência das metodologias de indução a duplicação cromossômica dos híbridos triplóides foi averiguada pela contagem do número cromossômico em meristemas de raízes e análise *in vitro* da viabilidade polínica.

As análises citogenéticas foram realizadas de acordo com os procedimentos adaptados por Techio et al. (2002) para *Pennisetum*. As raízes recém-coletadas foram pré-tratadas com solução de ciclohexamida 25mg/L e hidroxiquinoleína 300mg/L (1:1) por 2h 45min, fixadas em solução de Carnoy, por 24h e submetidas a maceração enzimática em solução de Pectinase (20%) e Celulase (2%) seguida de hidrólise em HCl 1N, a 60°C por 8 minutos e coloração com reativo de Schiff. A extração e fragmentação do meristema foram feitas sob um microscópio estereoscópio e a montagem da lâmina por esmagamento em ácido acético 45%. A fixação da lamínula foi feita com Entellan®.

Para cada experimento, foram analisadas cinco lâminas de cada tratamento contendo de uma a três pontas de raízes de todas as plantas sobreviventes. Foram avaliadas em média, de 33 a 126 metáfases por lâmina.

A contagem do número de cromossomos foi feita em objetiva de imersão (100x), em microscópio Olympus BX 60. As melhores metáfases colchicínicas foram fotomicrografadas utilizando-se filmes preto e branco Fuji ASA 100, revelados com D-76 e copiados em papel Kodabrome Print RCF3 ou digitalizadas diretamente do fotomicroscópio utilizando o software Optronics®.

A viabilidade do pólen foi estimada por testes de germinação *in vitro*, conforme descrito por Techio (2002). Esse método se baseia na porcentagem de pólenes germinados, sendo considerados viáveis aqueles grãos de pólen que apresentarem tubo polínico com comprimento igual ou superior ao seu diâmetro.

Os grãos de pólen foram retirados de anteras provenientes de panículas (Figura 4) recém-coletadas e espalhados sobre uma placa escavada contendo como meio 9g de sacarose, 30 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10mg/L de H_3BO_3 e 0,7g de ágar diluídos em 100mL de água destilada. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e incubadas em germinador a 27°C por 12 horas. Foram avaliadas 5 lâminas por planta e 100 grãos de pólen por lâmina.

A viabilidade do pólen foi dada em função da porcentagem de pólenes germinados, sendo considerados viáveis aqueles grãos de pólen que apresentavam tubo polínico com comprimento igual ou superior ao seu diâmetro.

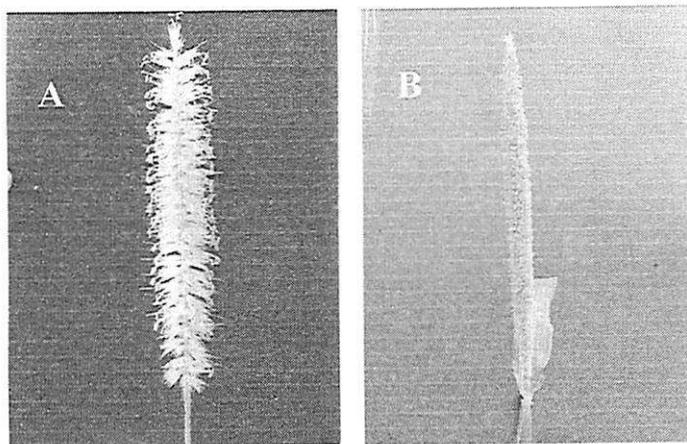


FIGURA 4 Panículas com pólen. A) panícula da planta V138-4B, B) panícula da planta V43-A.

2.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas para os experimentos 2 e 3 que geraram maior número de sobreviventes em diferentes concentrações e tempos de exposição dos explantes à colchicina. O teste de Qui-quadrado foi aplicado em ambos experimentos para variável sobrevivência.

3 RESULTADOS

A condição triplóide de todos os híbridos utilizados nos cinco experimentos realizados nesse trabalho foi confirmada por meio de metáfases obtidas de meristemas de raízes provenientes de sementes, 'seedlings' e estacas (Assis et al., 2003).

A análise citogenética associada a análise da viabilidade polínica por meio de testes de germinação *in vitro* permitiu identificar com segurança os hexaplóides induzidos entre as plantas sobreviventes em cada experimento, como será descrito a seguir.

3.1 Indução de poliploidia em meristemas laterais

Para os híbridos CNPGL94-43-01 e CNPGL94-60-01, apenas dois meristemas sobreviveram à exposição de 6 horas em solução de colchicina 0,05% resultando no desenvolvimento de plântulas. Todos os meristemas do CNPGL2000-65-227 sobreviveram a esse tratamento. No período de 15 horas de exposição, foi obtido um explante sobrevivente do híbrido CNPGL94-43-01 e dois sobreviventes dos triplóides CNPGL94-60-01 e CNPGL2000-65-227. As análises citogenéticas feitas em meristemas de raízes coletadas na transferência dos explantes sobreviventes para a hidroponia e na transferência das plantas do cultivo hidropônico para os vasos mostraram a ineficiência desses tratamentos para a indução de poliploidia, sendo todos os sobreviventes triplóides. O CNPGL94-43-01 foi o único a apresentar sobrevivente à exposição de 24 horas, cujas metáfases apresentaram números cromossômicos variando de 14 a 42 cromossomos (Figura 4), sendo o número 21 mais freqüente (43%), permitindo identificar essa planta como mixoplóide.

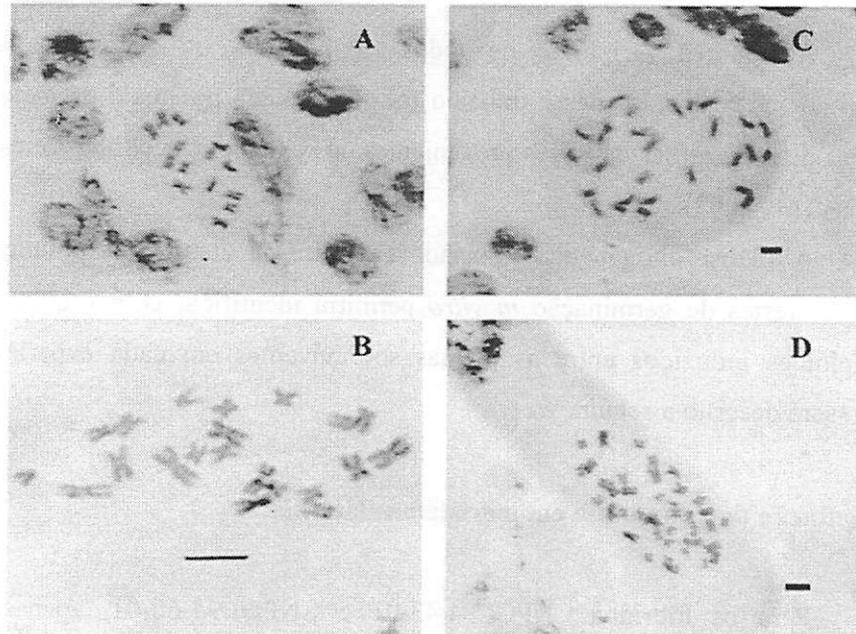


FIGURA 4 Metáfases de híbridos mixoplóides e hexaplóides de capim-elefante e milho após exposição a diferentes tempos e concentrações de colchicina. A) 14 cromossomos, B) 21 cromossomos, C) 28 cromossomos, D) 42 cromossomos. UFLA. Lavras – MG, 2004. Barra 5 µm.

3.2 Indução de poliploidia em ‘seedlings’ *in vitro*

Entre os híbridos selecionados pela Embrapa Gado de Leite para execução deste trabalho, o CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 foram os que melhor se adaptaram aos protocolos de cultivo *in vitro* sendo, portanto, utilizados em todos os experimentos que envolveram tratamentos *in vitro*.

As estratégias utilizadas na condução dos experimentos com explantes *in vitro* permitiram uma sobrevivência significativa, independente do tratamento

e do tecido-alvo na maioria dos experimentos. A maioria dos sobreviventes de 'seedlings' e plântulas *in vitro* foi proveniente de brotação lateral emitida *in vitro*, pelo explante tratado (Figura 5A). Estes produziram raízes calibrosas (Figura 5B) com região meristemática bem definidas, facilitando a análise citogenética das plantas antes de transferi-las para os vasos.

A Tabela 2 apresenta um resumo da análise de desvios para a variável sobrevivência nos estádios de 'seedling' e plântula, admitindo um modelo binomial com função de ligação logística dada a natureza dos dados que invalida os requisitos básicos para o uso da metodologia convencional da análise de variância, conforme Demétrio (2001). Nesta tabela, observa-se que para a sobrevivência de explantes no estádio de 'seedling', houve efeito altamente significativo para as fontes de variação híbrido e interação híbridos por concentração, conforme probabilidades relatadas menores que 1% pelo teste do Qui-quadrado. Para a sobrevivência de explantes no estádio de plântula, houve efeito significativo apenas para a fonte de variação híbrido.

A proporção de explantes sobreviventes aos tratamentos colchicínicos para 'seedlings' de CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 é apresentada na Tabela 3. Do total de 'seedlings' (12 plantas) tratados com colchicina do híbrido CNPGL2000-65-227, 7 plantas (58%) sobreviveram ao tratamento com 0,05% por 12 horas. Dessas, 2 plantas (29%) tiveram seu complemento cromossômico duplicado. Para o híbrido CNPGL94-60-01, obteve-se 4 plantas de sobreviventes, com apenas uma planta duplicada. A porcentagem de sobreviventes para o híbrido CNPGL 2000-65-227 tratados com solução de 0,05% de colchicina por 24 horas foi de 42% (5 plantas), desses apenas uma planta era hexaplóide (6x), entre as sobreviventes do CNPGL94-60-01. Para esse tratamento não foram encontradas plantas com complementos duplicados.

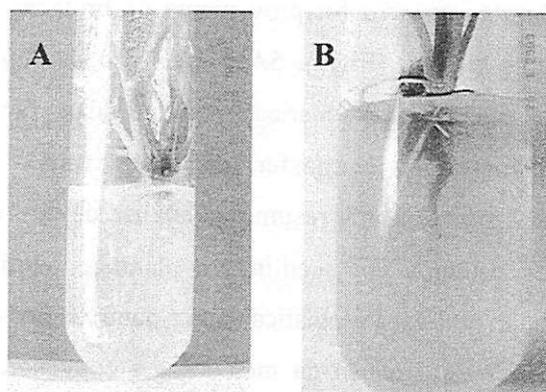


FIGURA 5 (A) Emissão de brotação lateral pós tratamento, (B) sistema radicular *in vitro* de explantes sobreviventes aos tratamentos de indução de poliploidia.

TABELA 2 Resumo da análise de desvios apresentando os valores de Qui-quadrados e suas respectivas probabilidades para a sobrevivência aos tratamentos colchicínicos de explantes de híbridos PMN nos estádios de 'seedling' e plântula. UFLA. Lavras – MG, 2004.

Fonte de Variação	Sobrevivência em Seedling			Sobrevivência em Plântulas		
	G L	Qui-quadrado (X ²)	Pr>X ²	G L	Qui-quadrado (X ²)	Pr>X ²
Híbrido (H)	1	19,74	<0,0001	1	35,25	<0,0001
Concentração (C)	1	0,06	0,8096	1	1,52	0,2178
Tempo (T)	1	3,59	0,0580	1	0,16	0,6892
HxC	1	7,92	0,0049	1	0,14	0,7113
HxT	1	0,15	0,7008	1	0,20	0,6569
CxT	1	0,25	0,6189	1	2,80	0,0944
HxCxT	1	0,22	0,6403	1	1,21	0,2723
Resíduo	88	102,26		136	152,29	

TABELA 3 Proporção de explantes sobreviventes para os híbridos CNPGL 2000-65-227 e CNPGL 94-60-01, em duas concentrações de colchicina no estágio de 'seedling'. UFLA. Lavras – MG, 2004.

Híbrido	Concentração de Colchicina		Média
	0,05%	0,1%	
CNPGL 2000-65-227	0,5a ^{1/}	0,79a	0,64A ^{2/}
CNPGL 94-60-01	0,33a	0,13b	0,23B
Média	0,42A	0,46A	0,44

^{1/}Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, dentro de cada concentração, não diferem estatisticamente pelo teste de Qui-quadrado, a 5% de probabilidade.

^{2/}Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente, pelo teste de Qui-quadrado, a 5% de probabilidade.

No tratamento com solução de colchicina 0,1% por 12 horas, 11 'seedlings' do CNPGL2000-65-227 e 2 do CNPGL94-60-01 sobreviveram, contudo apenas uma planta (9%) do CNPGL2000-65-227 era hexaplóide. No tratamento com 0,1% por 24 horas obteve-se 8 plantas sobreviventes para o CNPGL2000-65-227, sendo 3 delas hexaplóides, os sobreviventes do CNPGL94-60-01 foram todos triplóides.

Todos os tratamentos, a exceção do último citado, geraram plantas mixoplóides e triplóides. A discriminação das plantas provenientes de 'seedlings' sobreviventes aos tratamentos de indução de poliploidia, avaliação dos níveis de ploidia e presença de pólen é apresentada na Tabela 4.

A avaliação citogenética de meristemas de raízes coletadas *in vitro* das plantas V37-3C e V14-1A mostrou números cromossômicos variando de 14 a 42 cromossomos. A avaliação citogenética de raízes coletadas de estacas permitiu observar que houve estabilização das células no nível hexaplóide. A duplicação cromossômica dessas plantas foi confirmada pela viabilidade polínica por meio de testes de germinação *in vitro*, cuja frequência de pólenes germinados foi 58,3% e 63,8%, respectivamente, confirmando a restauração da fertilidade. A hexaplóide V13-1A e a mixplóide V27-2A produziram pólen, porém as taxas de

fertilidade para esses materiais não foram averiguadas. Para a V27-2^A, se faz necessária uma segunda avaliação para confirmar o nível de ploidia, podendo esta também ter estabilizado no nível hexaplóide, devido à presença de pólen em suas pániculas.

TABELA 4 Níveis de ploidia, obtidos em até três avaliações das plantas sobreviventes ao tratamento de 'seedlings' híbridos cultivados *in vitro*, expostos a diferentes tempos e concentrações de colchicina. (V = identificação da planta, * presença de pólen, ** pólen viável, Mix = mixoplóide). UFLA. Lavras – MG, 2004.

Concentração	Tempo	CNPGL 2000-65-227	Ploidia	CNPGL 94-60-01	Ploidia
Colchicina 0,05%	12 h	V 05 - 1 A	3x	V 31 - 2 A	3x
		V 04 - 1 B	3x	V 29 - 2 C	6x
		V 10 - 1 C	3x	V 40 - 3 C	Mix
		V 22 - 2 A	3x	V 46 - 4 A	3x
		V 21 - 2 C	Mix / 6x		
		V 32 - 3 A	Mix / Mix		
		V 37 - 3 C	Mix / 6x **		
	24 h	V 14 - 1 A	Mix / 6x **	V 30 - 2 C	3x
		V 12 - 1 B	3x	V 39 - 3 B	Mix
		V 09 - 1 C	3x		
		V 17 - 2 A	Mix / Mix		
		V 16 - 2 C	3x		
Colchicina 0,1%	12 h	V 11 - 1 A	3x	V 28 - 2 A	Mix / Mix
		V 08 - 1 B	Mix	V 33 - 3 B	3x
		V 15 - 1 C	6x / Mix / 3x		
		V 27 - 2 A	Mix *		
		V 26 - 2 B	3x		
		V 24 - 2 C	Mix / 6x		
		V 34 - 3 A	3x		
		V 41 - 3 B	3x		
		V 36 - 3 C	3x		
		V 48 - 4 A	Mix / Mix		
	V 43 - 4 B	3x			
	24 h	V 13 - 1 A	Mix / 6x *	V 02 - 1 C	3x
		V 07 - 1 B	6x / Mix / 3x	V 38 - 3 C	3x
		V 06 - 1 C	3x		
		V 20 - 2 B	6x		
		V 18 - 2 C	6x / 6x / 6x		
		V 33 - 3 B	3x		
		V 51 - 4 B	3x		
		V 42 - 4 C	Mix / Mix		

As plantas V15-1C, V07-1B e V18-2C foram avaliadas em três estádios do desenvolvimento vegetativo: a primeira utilizando meristemas de raízes coletadas *in vitro*, a segunda na hidroponia e a terceira em estacas de plantas adultas. Essas avaliações permitiram observar a reversão da condição hexaplóide para triplóide nas duas primeiras plantas e confirmar a duplicação cromossômica da terceira.

3.3 Indução de poliploidia em plântulas *in vitro*

A proporção de explantes sobreviventes aos tratamentos colchicínicos para plântulas de CNPGL2000-65-227 e CNPGL94-60-01 é apresentada na Tabela 5.

A exposição de plântulas a solução de 0,05% de colchicina por 12 horas, gerou 14 plantas (78%) sobreviventes para o híbrido CNPGL2000-65-227, dos quais apenas uma planta (8% dos sobreviventes) apresentou nível de ploidia 6x. Nesse tratamento, foram obtidos 22% de sobrevivência para híbrido CNPGL94-60-01, porém, todos triplóides. Das 12 plantas sobreviventes do CNPGL2000-65-227, em 0,05% de colchicina por 24 horas, apenas uma planta (8%) foi duplicada. Para o CNPGL94-60-01 obtiveram-se 2 plantas sobreviventes, uma mixoplóide e outra triplóide. Das plantas sobreviventes (50%) do híbrido CNPGL2000-65-227 tratadas com 0,1% por 12 horas, 6 foram triplóides e 3 mixoplóides; apenas uma planta triplóide (6%) do CNPGL94-60-01 sobreviveu a esse tratamento. No tratamento com 0,1% por 24 horas obtiveram-se 56% de sobreviventes para o CNPGL2000-65-227, sendo uma planta (10%) hexaplóide. Entre as 4 plantas sobreviventes do CNPGL94-60-01, três apresentavam nível 3x e uma era mixoplóide.

TABELA 5 Proporção de explantes sobreviventes para os híbridos CNPGL 2000-65-227 e CNPGL 94-60-01, em duas concentrações de colchicina no estágio de plântula. UFLA. Lavras – MG, 2004.

Híbrido	Concentração de Colchicina		Média
	0,05%	0,1%	
CNPGL 2000-65-227	0,69a ^{1/}	0,52a	0,61A ^{2/}
CNPGL 94-60-01	0,16b	0,14b	0,15B
Média	0,43A	0,33A	0,38

^{1/}Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, dentro de cada concentração, não diferem estatisticamente pelo teste de Qui-quadrado a 5% de probabilidade.

^{2/}Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Qui-quadrado a 5% de probabilidade.

A discriminação das plantas sobreviventes aos tratamentos de indução de poliploidia utilizando como material botânico plântulas cultivadas *in vitro*, avaliação dos níveis de ploidia e presença de pólen é apresentada na Tabela 6.

Neste experimento, a avaliação citogenética foi feita apenas em meristemas de raízes coletados na transferência das plântulas do cultivo *in vitro* para a hidroponia.

A presença de pólen nas panículas das plantas V52-1C, V85-4C, V99-5B e V105-6C mostra a necessidade de uma segunda avaliação do nível de ploidia para averiguar o número cromossômico no estágio adulto. O teste de viabilidade polínica, por meio da germinação *in vitro*, foi feito para a planta V52-1C, que apresentou frequência de 10,4% de germinação. Para a planta V83-4A, a presença de pólen nos permite inferir que houve restauração da fertilidade, confirmando a duplicação cromossômica, embora testes de viabilidade polínica não tenham sido realizados para essa planta.

3.4 Indução de poliploidia em segmentos caulinares *in vitro*

A exposição de segmentos caulinares do híbrido CNPGL2000-65-227 a solução de colchicina 0,05% e 0,1% por 12 horas gerou apenas 6% (1 planta) de sobrevivência em cada tratamento, com nível 3x de ploidia. No tratamento com 0,05% por 24 horas, obtiveram-se 50% de sobreviventes para o CNPGL2000-65-227. Desses, 22% (2 plantas) apresentaram o complemento cromossômico duplicado. Dos 28% de sobreviventes desse mesmo híbrido à exposição de 0,1% de colchicina por 24 horas, 80% eram 3x e 20% mixoplóides. Para o híbrido CNPGL94-60-01, obteve-se apenas um sobrevivente triplóide no tratamento com 0,1% de colchicina por 24 horas.

A Tabela 7 discrimina as plantas sobreviventes aos tratamentos de indução de poliploidia utilizando como material botânico segmentos caulinares cultivados *in vitro*, avaliação dos níveis de ploidia e presença de pólen.

A planta V138-4B teve o nível de ploidia 6x confirmado em meristemas coletados nos estádios de plântula *in vitro* e adulta, apresentando, em ambas, 100% das metáfases com 42 cromossomos. A presença de pólen viável com frequência de 32,6% de germinação *in vitro*, juntamente com a avaliação citogenética, permite confirmar a duplicação cromossômica e a estabilização do nível hexaplóide, bem como afirmar que a fertilidade nessa planta foi restaurada.

3.5 Indução de poliploidia em 'seedlings' *in vivo*

Neste experimento, entre os híbridos listados na Tabela 1 apenas o CNPGL94-60-01 não foi incluído por insuficiência de material botânico.

TABELA 6 Níveis de ploidia das plantas sobreviventes ao tratamento de plântulas cultivadas *in vitro*, expostas a diferentes tempos e concentrações de colchicina. (V = identificação da planta, * presença de pólen, Mix = mixoploide). UFLA. Lavras – MG, 2004.

Concentração	Tempo	CNPGL 2000-65-227	Ploidia	CNPGL-94-60-01	Ploidia
Colchicina 0,05%	12 h	V 53 - 1 A	3x	V 60 - 2 B	3x
		V 58 - 1 B	3x	V 70 - 2 C	3x
		V 60 - 1 C	3x	V 72 - 3 C	3x
		V 65 - 2 A	6x	V 91 - 4 C	3x
		V 63 - 2 B	3x		
		V 66 - 2 C	3x		
		V 73 - 3 A	3x		
		V 75 - 3 B	3x		
		V 87 - 4 A	3x		
		V 85 - 4 C	Mix *		
		V 92 - 5 B	Mix		
		V 104 - 6 A	Mix		
		V 108 - 6 B	3x		
	V 103 - 6 C	3x			
	24 h	V 55 - 1 A	3x	V 59 - 1 B	3x
		V 56 - 1 B	3x	V 95 - 5 C	Mix
		V 52 - 1 C	Mix *		
		V 68 - 2 B	3x		
		V 62 - 2 C	3x		
		V 76 - 3 B	3x		
V 79 - 3 C		3x			
V 89 - 4 A		3x			
V 82 - 4 C		Mix			
V 97 - 5 A		3x			
V 98 - 5 B	3x				
V 96 - 5 C	6x				
Colchicina 0,1%	12 h	V 54 - 1 B	Mix	V 102 - 6 B	3x
		V 64 - 2 B	3x		
		V 80 - 3 A	Mix		
		V 77 - 3 B	3x		
		V 90 - 4 A	3x		
		V 86 - 4 B	3x		
		V 100 - 5 B	3x		
		V 106 - 6 A	3x		
	V 105 - 6 C	Mix *			
	24 h	V 57 - 1 A	Mix	V 80 - 3 A	3x
		V 69 - 2 B	Mix	V 71 - 3 C	3x
		V 67 - 2 C	3x	V 91 - A - 4 B	3x
		V 78 - 3 C	Mix	V 101 - 6 A	Mix
		V 83 - 4 A	6x *		
V 88 - 4 B		Mix			
V 84 - 4 C	3x				
V 93 - 5 A	3x				
V 99 - 5 B	Mix *				
V 94 - 5 C	3x				

TABELA 7 Níveis de ploidia, obtidos em até duas avaliações das plantas sobreviventes ao tratamento de segmentos caulinares cultivados *in vitro*, expostos a diferentes tempos e concentrações de colchicina. (V = identificação da planta, ** presença de pólen viável, Mix = mixoploidia). UFLA. Lavras – MG, 2004.

Concentração	Tempo	CNPGL 2000-65-227	Ploidia	CNPGL 94-60-01	Ploidia
Colchicina 0,05%	12 h	V 137 R 4 B	3x	Sem sobreviventes	
	24 h	V 111 - 1 C	3x	Sem sobreviventes	
		V 124 - 3 A	3x		
		V 138 - 4 B	6x / 6x **		
		V 131 - 4 C	6x		
		V 140 - 5 A	3x		
		V 144 - 5 B	Mix		
		V 146 - 6 A	3x		
		V 148 - 6 B	3x		
	V 150A - 6 C	3x			
Colchicina 0,1%	12 h	V 130 - 4 C	3x	Sem sobreviventes	
	24 h	V 112 - 1 A	3x	V 113 - 1 B 3x	
		V 109 - 1 B	3x		
		V 110 - 1 C	3x		
		V 116 - 2 B	Mix		
		V 125 - 3 C	3x		

Do total de 'seedlings' tratados (15 plantas) do híbrido HA (BAG 64 x M64), 80% sobreviveram ao tratamento. Desses sobreviventes, 8% (uma planta) duplicaram o complemento cromossômico, 8% apresentaram nível 3x de ploidia e o restante eram mixoplóides. Dos 60% de sobrevivência obtidos pelo HB (BAG 28 X M 64), apenas uma planta (11%) era duplicada, 56% dos sobreviventes foram mixoplóides e 33% triplóides. O híbrido HC (BAG65 x M41) foi o que melhor respondeu ao tratamento com 100% de sobrevivência. Porém apenas uma planta (6%) foi duplicada e foram obtidos 74% de mixoplóides e 20% de triplóides. O CNPGL2000-65-227 gerou 93% de sobreviventes e destes, 28% (4 plantas) apresentaram nível 6x de ploidia, 21% eram 3x e 51% mixoplóides. Para o CNPGL94-43-01, obtiveram-se 73% de

sobrevivência, sendo 27% (3 plantas) diplóides, 9% dos sobreviventes (1 planta) tetraplóide e o restante mixoplóides.

As plantas hexaplóides dos híbridos HA e HB apresentaram pólen em suas panículas, porém não foi possível averiguar a viabilidade polínica desses materiais devido à pouca disponibilidade de material para execução do protocolo de germinação *in vitro*. O mesmo foi observado para as plantas hexaplóides VA-227 e VE-227 do CNPGL2000-65-227.

Todos os sobreviventes do CNPGL94-43-01 produziram pólen viáveis, pois foram coletadas sementes nas panículas da maioria das plantas, a exceção da planta VG-43 que não produziu sementes. As plantas VH-43, VJ-43, VI-43, VL-43, VN-43 e VO-43 foram consideradas mixoplóides, porém, é importante ressaltar que apenas números cromossômicos 14 e 28 foram freqüentes, sugerindo que o material botânico utilizado era diplóide (milheto). Para a planta VA-43, das 46 metáfases analisadas, 4% apresentavam 18 cromossomos, 6% 21 cromossomos, 83% 28 cromossomos e 7% 42 cromossomos. Esses dados sugerem a possível estabilização no nível tetraplóide. A planta VB-43 apresentou 77% das 64 metáfases avaliadas em 5 lâminas, com 14 cromossomos. O restante das metáfases apresentaram números cromossômicos de 21 (6%), 28 (14%) e 42 (3%), permitindo inferir a estabilização no nível diplóide.

4 DISCUSSÃO

A esterilidade dos híbridos triplóides de capim-elefante e milho constitui uma barreira para sua utilização nos programas de melhoramento genético do capim-elefante. A duplicação cromossômica por meio da exposição de diferentes tecidos-alvo a colchicina tem sido uma alternativa para resgatar a fertilidade permitindo que os mesmos possam voltar ao programa de melhoramento, transferindo alelos de características desejadas ao capim-elefante e facilitando a obtenção de materiais que possam ser propagados por meio de sementes.

Diferentes materiais botânicos têm sido utilizados como tecido-alvo em experimentos de duplicação cromossômica. Neste trabalho, utilizaram-se meristemas de ápices caulinares, 'seedlings', plântulas e segmentos caulinares *in vitro* devido ao fato desses materiais possuírem um grande número de células jovens e em divisão celular, facilitando a ação da colchicina

Os tecidos meristemáticos geralmente são as principais fontes de explantes usadas na clonagem de plantas *in vitro* (Vieira & Da-Glória, 2001), contudo esse material botânico mostrou-se inadequado para indução de duplicação cromossômica, embora a cultura de meristema tenha sido usada com sucesso por Lyrene & Perry (1982) na produção e seleção de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.) poliplóide *in vitro*. É importante ressaltar que a sobrevivência nesse tipo de experimentação pode ser influenciada não só pela elevada toxicidade da colchicina, como também pelo tamanho do explante, o qual deve ter tamanho suficiente para permitir um pegamento eficiente, conforme descrito por Teixeira & Marbach (2000). A composição do meio também pode influenciar a taxa sobrevivência. Segundo Vieira & Da-Glória (2001), cada espécie ou cultivar deve ser cuidadosamente estudada, pois, as exigências na composição do meio

de cultura podem variar de acordo com o genótipo e até mesmo com o estado fisiológico e nutricional da planta doadora do explante. A propagação dos explantes *in vitro*, pode sofrer ainda influências da inclusão de reguladores de crescimento no meio de cultura, utilizados para suprir as deficiências hormonais endógenas (Giles & Friesen, 1994; Ulmasov, Hagen & Guilfoyle, 1999a,b). Neste experimento, após os tratamentos de indução de poliploidia os explantes foram inoculados em meio MS suplementados com 2 mg/L de BAP, para induzir brotações. Embora essa dosagem tenha produzido bons resultados para a micropropagação do capim-elefante, utilizando cultura de meristemas (Karasawa, 2001), ela pode ter influenciado negativamente a sobrevivência, confirmando a necessidade de se testar previamente o meio de cultura adequado para cada genótipo.

Os resultados de sobrevivência obtidos com a exposição de 'seedlings' e plântulas *in vitro* revelaram que a colchicina mantém a mesma atividade em diferentes concentrações e tempos de exposição. Contudo, comparando-se o efeito desse químico sobre os diferentes materiais botânicos e genótipos avaliados, verificou-se que a colchicina afetou drasticamente o desenvolvimento de meristemas e segmentos caulinares. Abreu (2002) relatou que esse antimitótico foi letal para gemas axilares *in vivo* e segmentos caulinares *in vitro*. Alguns dos efeitos tóxicos da colchicina são listados por Roth (1984). Segundo esse autor, a utilização de altas concentrações ou a exposição por tempo inadequado pode levar à morte de células e plantas e a tolerância a colchicina varia de acordo com a espécie. Na literatura, vários autores relatam o efeito diferencial de antimitóticos quando diferentes tecidos-alvo são expostos (Wan, Petolino, Widholm, 1989; Wan, et al., 1991; Saisingtong et al. 1996; Carvalho, 2000; Pinheiro et al., 2000). Como a toxicidade das substâncias antimitóticas é expressiva e o objetivo desse tipo de experimentação está centrado na obtenção do maior número possível de sobreviventes com o complemento cromossômico

duplicado, a variação do material botânico a ser utilizado torna-se um requisito indispensável, completando aquelas variáveis citadas por Roth (1984) e Schifino-Wittmann (2000), como a variação da concentração e do tempo de exposição e as formas de aplicação da droga, a serem observadas no tratamento de indução de poliploidia utilizando colchicina.

Apesar de a colchicina apresentar algumas limitações, como a possibilidade de provocar aglomerações cromossômicas e fissão do centrômero, principalmente após longos períodos de tratamento, além de sua baixa afinidade pela tubulina vegetal (Hansen & Andersen, 1996), ela ainda tem sido considerada uma das substâncias mais eficazes na inibição da polimerização dos microtúbulos, principalmente em gramíneas (Poaceae) (Hassawi & Liang, 1991). A opção pela colchicina como indutor da duplicação cromossômica dos híbridos triplóides de capim-elefante e milho ocorreu em função desse antimitótico ser considerado, por diversos autores, como a substância mais eficiente na indução de poliploidia em gramíneas (Poaceae) (Hanna 1981; Hanna et al., 1984; Hassawi & Liang, 1991; Sun et al., 1994, Huang, Huang & Liu 1995; Saisintong et al. 1996; Pinheiro et al., 2000) e por ter fornecido os melhores resultados na obtenção de mixoplóides de capim-elefante e milho por Abreu (2002).

Nos diferentes experimentos realizados neste trabalho, a colchicina mostrou-se eficiente na indução de poliploidia em híbridos triplóides de capim-elefante e milho, a exceção dos tratamentos realizados com meristemas que geraram apenas uma planta mixoplóide.

Nas avaliações citogenéticas, os números cromossômicos 14, 18, 21, 28, 35 e 42 foram os mais frequentes encontrados em todos os experimentos, com frequências bastante variáveis, de acordo com o tratamento e o tecido-alvo utilizados, estando em consonância àqueles obtidos por Abreu (2002), na

avaliação de híbridos de capim-elefante e milho, após indução de duplicação cromossômica.

Os hexaplóides, obtidos nos tratamentos de 'seedlings' *in vitro* e *in vivo*, representando 8% e 9% do total de plantas utilizadas nos diferentes tratamentos, respectivamente; mostraram que esse material botânico é o mais indicado para experimentos de duplicação cromossômica nos híbridos PMN avaliados.

Os tratamentos de 0,05% de colchicina por 12 horas e 0,1% por 24 horas geraram entre as plantas sobreviventes a maior frequência de hexaplóides, 29% e 38%, respectivamente. Esses resultados foram similares aos obtidos por Hanna et al. (1984), que relataram que 30% dos 'seedlings' sobreviventes ao tratamento com solução de 0,05% de colchicina por 24 horas eram duplicados. Abreu (2002), tratando 'seedlings' *in vivo* com solução de colchicina 0,05% por 24 horas e 0,1% por 12 horas, obteve 13% e 20% de sobreviventes em cada tratamento, respectivamente, sendo todos mixoplóides. Segundo o mesmo autor, a diminuição do tempo e o aumento da concentração de colchicina não exerceram influências sobre a taxa de sobrevivência e a proporção de números cromossômicos na análise dos mixoplóides. Esta observação não está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, ou seja, concentrações mais elevadas associadas a tempos maiores de exposição aumentaram as probabilidades de se obter hexaplóides induzidos.

A exposição de plântulas e segmentos caulinares (gemas) cultivadas *in vitro* e expostas aos diferentes tratamentos de indução geraram 38% e 13% de sobrevivência em 144 explantes tratados para cada material botânico, respectivamente. Do total de plântulas utilizadas, apenas 2% (3 plantas) tiveram seus cromossomos duplicados. Para segmentos caulinares essa frequência não chegou a 1,5%. Experimentos *in vivo* utilizando gemas axilares do CNPGL94-60-01 e *in vitro* com segmentos caulinares do CNPGL94-43-01, foram conduzidos por Abreu (2002) com intuito de promover a indução de poliploidia

nos estádios iniciais do desenvolvimento dos mesmos, porém não foi observada a ocorrência de sobreviventes aos tratamentos colchicínicos. Pinheiro et al. (2002), inoculando 75 segmentos caulinares basais de clones sexuais diplóides de *Bracharia brizantha* em meios de cultura contendo 0,01%; 0,05% ou 0,1% de colchicina por 48 horas, obtiveram melhores resultados nos tratamentos com meios suplementados com 0,01%, em que 24% (18 plantas) das 44 plantas (60%) sobreviventes ao tratamento foram confirmados duplicados por citometria de fluxo. Pelos resultados obtidos com plântulas e gemas cultivadas *in vitro* submetidas a tratamentos colchicínicos para indução de poliploidia neste trabalho, juntamente com os relatos encontrados na literatura poder-se-ia inferir que esses materiais botânicos não são adequados para experimentos de duplicação cromossômica em *Pennisetum*. Entretanto, baseado nos relatos de Pinheiro et al. (2000), seria interessante testar, em estudos futuros, outras estratégias variando concentrações, tempos de exposição e genótipos.

A exposição de 'seedlings' *in vitro* revelou que algumas plantas cujo complemento cromossômico foi duplicado podem reverter a condição triplóide. Isso foi observado nas plantas V15-1C e V7-1B, provenientes de 'seedlings', cujas células meristemáticas de raízes coletadas *in vitro* mostravam 42 cromossomos em 87% das metáfases analisadas. Quando a análise citogenética foi realizada em meristemas de raízes coletadas de estaca, mais de 80% das células eram triplóides.

Carvalho (2000) e Pagliarini (2001) relatam que é freqüente o aloploiplóide reduzir a duplicação genética, num processo de reversão parcial ou total à condição diplóide, após alguns ciclos de divisão, principalmente devido à proliferação das células diplóides remanescentes que se multiplicam a taxas superiores àquelas das células poliplóides. Por outro lado, as plantas V13-1C, V14-1A, V21-2C, V24-2C e V37-3C mostraram-se mixoplóides na primeira avaliação feita com meristemas de raízes coletadas de plantas em hidroponia. Já

na segunda avaliação citogenética feita com pontas de raízes obtidas de estacas, o nível de ploidia foi 6x e em muitas delas a duplicação foi confirmada pela presença de pólen. Esses resultados mostram a análise citogenética é imprescindível na avaliação da ploidia em experimentos de duplicação e deve ser realizada nos mais diferentes estádios de desenvolvimentos da planta sobrevivente para o monitoramento da ploidia. Para Singh (1993), o maior problema da indução via colchicina resulta do fato de a substância só agir efetivamente sobre as células que estão em divisão. Desse modo, a poliploidização geralmente não atinge todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixoplóides e quimeras (Abreu, 2002). Em consequência, surge o problema relativo à estabilidade da condição poliplóide, porém se a frequência de células duplicadas for elevada o suficiente para se multiplicarem em número maior que as demais, a estabilização no nível 6x pode ocorrer algum tempo após o tratamento, como observado neste trabalho.

Segundo Adamowski et al. (1998), Giacomelli et al. (2000) e Pagliarini (2001), a eliminação cromossômica é um fenômeno comumente observado nos experimentos de indução de poliploidia, podendo ser parcial ou total de um genoma parental. Abreu (2002) fez uma ampla revisão e discute detalhadamente sobre a eliminação cromossômica em híbridos mixoplóides de capim-elefante e milho. Segundo esse autor, os híbridos triplóides oriundos do cruzamento dessas duas espécies são genomicamente estáveis, tendo uma proporção de 2C:1M (C = genomas A'B de capim-elefante e M = genoma A do milho). Quando esta proporção é alterada, devido à ação das substâncias antimitóticas, as células induzidas dos híbridos começam a eliminar os cromossomos. Na literatura revisada por Jauhar (1981) e Jauhar & Hanna (1998) os resultados obtidos por vários autores permitiram concluir que, provavelmente, existe um controle gênico da eliminação cromossômica e que esses genes só se expressam quando estão em dose dupla ou elevada. Raman & Krischnaswamy (1960) e

Gildenhuis & Brix (1969), citados por Jauhar (1981), observaram uma eliminação cromossômica seletiva em embriões obtidos do cruzamento de *P. glaucum* (2x) com anfídipóide (6x). Esses autores sugerem que os cromossomos do genoma B tem uma maior chance de serem eliminados, visando buscar a estabilidade e a fertilidade pela homeologia dos cromossomos dos genomas A e A' de *P. purpureum*. Os resultados obtidos por Abreu (2002) com plântulas e perfis submetidos a tratamentos de indução de poliploidia revelaram, segundo o autor, uma tendência das células mixoplóides estabilizarem no nível diplóide. Esse fenômeno foi também observado em 'seedlings' *in vivo* do CNPGL94-43-01 submetidos à exposição em solução de colchicina 0,05% por 24 horas por Davide et al. (2003), tendo duas plantas apresentando células com 14 cromossomos, morfológicamente semelhantes, podendo corresponder a núcleos AA, A'A' ou A'A. Esse híbrido esteve incluído no experimento de indução de poliploidia em 'seedlings' *in vivo* conduzido neste trabalho tratado com a mesma concentração e tempo anteriormente citados.

Os resultados obtidos com a planta VA-43 permitem inferir que a estabilização pode também ocorrer no nível tetraplóide, com 28 cromossomos, podendo esse núcleo assumir diferentes configurações genômicas como AAA'A'. Essa pode ser a provável constituição genômica dessa planta devido a morfologia extremamente similar a do milho; tendo em vista que apenas uma dosagem do genoma B pode tornar a planta morfológicamente semelhante ao capim-elefante, segundo Krishnaswamy & Raman (1951, 1954) e Gonzalez & Hanna (1984).

Várias plantas deste experimento apresentaram alta frequência de células com 14 cromossomos, em alguns casos superando a frequência de 80%. Entretanto, essas plantas apresentavam variação do número cromossômico apenas de 14 e 28, sugerindo que o material tratado tenha sido diplóide (*P.*

glaucum). Estudos morfométricos, de bandeamento cromossômico e hibridização *in situ* estão sendo propostos para tentar confirmar essas hipóteses.

Existem muitas dúvidas sobre o controle da eliminação cromossômica. Abreu (2002), baseado nos resultados obtidos com a indução de duplicação cromossômica em perfilhos, inferiu que a eliminação cromossômica, provavelmente, tenha controle nuclear, uma vez que a direção do cruzamento para obtenção do híbrido não influenciou na eliminação cromossômica.

Hanna et al. (1984) não fazem menção sobre a eliminação cromossômica. Esses autores relataram que 30% dos triplóides sobreviventes tratados com colchicina 0,05%, por 24 horas, tiveram seu complemento cromossômico duplicado. A diferença de comportamento dos híbridos no experimento conduzido por esses autores pode ter sido em decorrência do fato de terem relatado apenas o sucesso da duplicação, não mencionando a eliminação dos cromossomos. Isso porque a duplicação em seus estudos não foi averiguada por meio de análise citogenética e, sim, apenas com base na presença de pólen nas panículas. Uma outra explicação seria a utilização de ecótipos com controle genético diferenciado. Os híbridos triplóides empregados por Hanna et al. (1984) foram obtidos de cruzamentos que utilizaram apenas duas cultivares de milho macho estéril (Tift 23 DA e Tift 23 A) que, provavelmente, não possuíam o controle genético para eliminação de cromossomos durante a duplicação. Abreu (2002) supôs que a eliminação cromossômica observada em seus estudos de indução de poliploidia em híbridos triplóides de capim-elefante e milho, possivelmente era controlada por genes presentes no genoma do genitor tetraplóide. Outra possível explicação, segundo o mesmo autor, estaria na possibilidade dos clones de capim-elefante utilizados como genitores nos cruzamentos interespecíficos apresentassem relações de parentesco e, portanto, compartilhassem o mesmo controle genético para eliminação de cromossomos.

Neste sentido, buscou-se utilizar, em todos os experimentos realizados na execução deste trabalho, pelo menos um híbrido cujas características dos genitores fossem complementares e outro cujas características fossem geneticamente divergentes, não importando os atributos forrageiros. O sucesso na duplicação cromossômica obtida para o híbrido CNPGL2000-65-227 vem dar suporte às supostas explicações aventadas por Abreu (2002) com relação a eliminação cromossômica em híbridos induzidos de capim-elefante e milheto.

Outra hipótese que poderia ser aventada é que o processo de duplicação é extremamente suscetível à variação do tempo de exposição e concentração dos antimetabólitos, bem como do tecido-alvo utilizado. Assim, as estratégias utilizadas na execução deste trabalho em relação àquelas usadas por Hanna et al. (1984) e Abreu (2002), podem explicar os resultados aqui obtidos.

É importante ressaltar que a eliminação dos cromossomos em híbridos interespecíficos é uma ferramenta valiosa para os programas de melhoramento genético (Giacomelli et al., 2000; Pagliarini, 2001). Com a eliminação parcial de cromossomos podem-se gerar novas variedades de híbridos. Já a eliminação total de um genoma do híbrido de capim-elefante e milheto pode permitir a formação de variedades diplóides férteis, que poderão servir de ponte nos cruzamentos com milheto para, futuramente, por meio de retrocruzamentos, introduzir características desejáveis no capim-elefante.

Em relação à viabilidade polínica observada pela emissão de tubo polínico em meio de cultura, os resultados obtidos para as plantas V37-3C e V14-1A com freqüências de 58,3% e 63,8%, respectivamente; V52-1C com freqüência de 10,4% e V138-4B com 32,6% de pólenes germinados *in vitro*, revelaram que, efetivada a duplicação cromossômica, a fertilidade é restaurada independentemente do tratamento ou tecido alvo utilizado. As variações nas freqüências de germinação *in vitro* obtidas para os hexaplóides supracitados são consonantes àquelas obtidas para *Pennisetum*, segundo a literatura. Os acessos

de milho avaliados por Techio (2002) exibiram uma baixa frequência de pólen funcionais, variando de 6% (M 24) a 47,6% (M 36). Chaudhury & Shivanna (1986) descreveram, também para milho, uma taxa reduzida de pólen germinados *in vitro*, cuja frequência foi de 57,6%, 18,1% e 12% para três amostras. Segundo Techio (2002), para germinação *in vitro*, o capim-elefante exibiu um comportamento similar ao do milho com uma frequência muito baixa de pólen viáveis, variando de 3,6% (BAG 91) a 39,4% (BAG 75). Aken'ova & Chheda (1970) descreveram, para o capim-elefante, uma taxa de 54,3% de viabilidade que se manteve por mais de um dia, sob diferentes condições ambientais. Na literatura, apenas um relato sobre análise da fertilidade masculina por meio de germinação *in vitro* de pólen para híbridos hexaploides de capim-elefante e milho foi encontrado. Pedrozo et al. (2003) analisaram por meio de germinação *in vitro*, a viabilidade polínica de um hexaploide, observando uma frequência de 39% de pólen viáveis.

Das plantas sobreviventes ao tratamento de 'seedlings' *in vivo* com colchicina 0,05%, por 24 horas, do híbrido CNPGL94-43-01, apenas a planta VG-43 não produziu pólen viáveis. Ressalta-se que, neste caso, o teste de viabilidade do pólen não foi feito por meio de testes laboratoriais e sim pela capacidade de fertilização desses. Foram coletadas sementes nas panículas de todas as plantas, a exceção da VG-43. Segundo Schanck (1999), a capacidade de produzir sementes é uma forma segura de se avaliar a viabilidade do pólen *in vivo*. Contudo, o tempo necessário para as observações torna-se um fator limitante para o seu emprego na rotina dos programas de melhoramento.

CONCLUSÕES

1. 'Seedling' é o material botânico mais adequado para experimentação *in vivo* e *in vitro* de indução de poliploidia em híbridos triplóides de capim-elefante e milho.

2. As soluções de colchicina 0,05% e 0,1% demonstraram efeitos semelhantes em materiais botânicos e genéticos diferentes, sendo 24 horas o tempo ideal de exposição a colchicina.

3. Cultivo *in vitro* facilitou tanto a indução de duplicação cromossômica quanto a obtenção e proliferação de raízes para avaliações citogenéticas ainda no estágio de plântulas.

4. Híbridos de capim-elefante e milho cujos genitores apresentam características botânico-agronômicas não complementares são mais resistentes aos efeitos tóxicos da colchicina gerando maior número de sobreviventes e hexaplóides induzidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. C. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimutagênicos.** 2002. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; BATISTA, L. A. R. Chromosome elimination in *Paspalum subciliatum* (Notata group). **Sex. Plant Reprod.**, v. 11, p. 272-276, 1998.

AKEN'OVA, M. E.; CHHEDA, H. R. Effects of storage on viability of elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pollen. **The Nigerian Agricultural Journal**, Ibadan, v. 7, n. 1, p. 111 – 114, 1970.

ASSIS, J. C.; BARBOSA, S.; PEDROSO, C. A.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Eficiência de Cruzamentos entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*. In: 49º Congresso Brasileiro de Genética, 2003, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia**, p. 643, 2003.

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

BURTON, G. W. A cytological study of some species in the Tribe Paniceae. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 29, p. 335 – 361, 1942.

CARVALHO, J. F. R. P. **Análise cariotípica e indução *in vitro* de poliploidia em Urucum (*Bixa orellana* L.).** Viçosa : UFV, 2000. 124 p. (Tese de doutorado em Genética e Melhoramento de plantas)

CHAUDHURY, R.; SHIVANNA, K. R. Studies on pollen storage of *Pennisetum typhoides*. **Phytomorphology**, New Dehli, v. 36, p. 211 – 218, 1986.

DAVIDE, L. C.; BARBOSA, S.; ASSIS, J. C.; PEDROSO, C. A.; PEREIRA, A. V. Obtenção de raça cromossômica a partir de mixoplóides de *Pennisetum*. In: 49º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2003, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia**, p. 690, 2003.

DEMÉTRIO, C. G. B. Modelos Lineares Generalizados em Experimentação Agronômica. **Reunião Anual da RBRAS**, 46.; **SEAGRO**, 9., 2001, Piracicaba. Piracicaba: ESALQ/USP, 2001. 113 p.

DUJARDIN, M; HANNA, W. W. Cytology and reproductive behavior of pearl millet-napiergrass hexaploids x *Pennisetum squamulatum* trispecific hybrids. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 72, p. 382 – 384, 1985.

GIACOMELLI, F. R. B.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. de. Elimination of micronuclei from microspores in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetic Molecular Biology**, v. 23, n. 3, 2000.

GILES, K. L; FRIESEN, R. D. Micropropagation. In: SHARGOOL, P. D.; NGO, T. T. **Biotechnological applications of plant culture**. CRC Press: Flórida, p. 111 – 128, 1994.

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

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

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

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

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

HANSEN, N. J. P.; ANDERSEN, S. B. *In vitro* chromosome doubling potential of colchicines, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. **Euphytica**. V. 88, n, 2, p. 159-164, 1996.

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

HASSAWI, D. S.; LIANG, G. H. Antimitotic agents: effects on double haploid production in wheat. **Crop Science**, v. 31, p. 723 – 726, May/June 1991.

HUANG, H. J.; HUANG, D. Q.; LIU, L. X. Induction and heredity of somatic autotetraploids. **Guandong Agricultural Sciences**, v. 1, p. 9 – 12, 1995.

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

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

KARASAWA, M. M. G. **Revigoroamento de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) submetidas à termoterapia e cultura de tecidos**. 2001. 135p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

KATIVU, S.; MITHEN, R. *Pennisetum* in southern Africa. FAO/IBPGR. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.73/74, p.1 – 8, 1987.

KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V. S. Cytogenetical studies in the interspecific hybrid of *Pennisetum typhoides* x *P. purpureum* Schumach. **Proc. Lst. Science Workers Conference. Departamento Agriculture Madras**, p. 43 – 71, 1951.

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

LYRENE, P. M.; PERRY, J. L. Production and selection of blueberry polyploids *in vitro*. **Journal Heredit**, v. 73, p. 377 – 378, 1982.

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

MARTINEZ, H. E. P. **O uso do cultivo hidropônico de plantas em pesquisa.** Viçosa : UFV, 61 p., 2002.

MARTINS, C. E.; FONSECA, D. M. Manejo de solo e adubação de pastagem de capim-elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM-ELEFANTE, 2., 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Coronel Pacheco-MG: EMBRAPA - CNPGL, 1994. p. 1-11.

PAGLIARINI, M. S. Citogenética aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento.** Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, p.871 – 910; 2001.

PEDROSO, C. A.; BARBOSA, S.; ASSIS, J. C.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Viabilidade polínica por meio da germinação *in vitro* em diferentes níveis de ploidia e em híbrido sintético de *Pennisetum*. In: 49º Congresso Brasileiro de Genética, 2003, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, p.644, 2003.

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

PEREIRA, A. V.; SOBRINHO, F. S.; SOUZA, F. H. D.; LÊDO, F. J. S. Tendências do melhoramento genético e produção de sementes de forrageiras no Brasil. In: VII Simpósio sobre atualização em Genética e Melhoramento de Plantas. Tema: “Melhoramento de Plantas e produção de sementes no Brasil”, Lavras, 2003. **Anais...** Lavras – MG: UFLA, 2003.

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.

ROTH, P. S. **Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake.** 1984. 79 p. Dissertação (Mestrado em Genética de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SAISINGTONG, S.; SCHMID, J. E.; STAMP, P.; BÜTER, B. Colchicine mediated chromosome doubling anther culture of maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, n. 8, p. 1017 – 1023, 1996.

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

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. The cytogenetics and evolution of forage legumes from Rio Grande do Sul: a review. **Genetics and Molecular Biology**, n. 23: v. 4, p. 989 – 995, 2000.

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

SLUDER, G. The practical use of colchicine and cocemid to reversibly block microtubule assembly in living cells. In: ADOLPH, K. W. **Advanced techniques in chromosome research**. New York: Marcel Dekker, 1991. 427 – 447p.

SUN, Y; CHENG, S. Q.; LIANG, G. H. Induction of autotetraploid plants of *Sorghum versicolor*. **Cytologia**, v. 59, n. 1, p. 109 – 114, 1994.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 469p.

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

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S. Fitohormônios. **Universa**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 101 – 132, 2000.

ULMASOV, T.; HAGEN, G. GUILFOYLE, T. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 5844 – 5849, 1999a.

ULMASOV, T.; HAGEN, G. GUILFOYLE, T. Dimerization and DNA binding of auxin response factors. **Plant Journal**, v. 19, p. 309 – 319, 1999b.

VIEIRA, M. L. C; DA-GLÓRIA, B. A. Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, p.911 – 938; 2001.

WAN, Y.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicines treatment of anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, p. 889 – 892, 1989.

WAN, Y.; DUNCAN, D. R.; RAYBURN, A. L.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. The use of anti-microtubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 81, p. 205 – 211, 1991.

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