

**ESTRUTURA DE NÚCLEOS INTERFÁSICOS
E DISTRIBUIÇÃO DA
HETEROCROMATINA EM *Pennisetum* sp.**

CRISTIANE GOUVÊA FAJARDO

2008

CRISTIANE GOUVÊA FAJARDO

**ESTRUTURA DE NÚCLEOS INTERFÁSICOS E DISTRIBUIÇÃO
DA HETEROCROMATINA EM *Pennisetum* sp.**

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

Orientadora

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

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

Fajardo, Cristiane Gouvêa.

Estrutura de núcleos interfásicos e distribuição da heterocromatina em
Pennisetum sp. / Cristiane Gouvêa Fajardo. -- Lavras : UFLA, 2008.
45p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.
Orientador: Lisete Chamma Davide.
Bibliografia.

1. *Pennisetum purpureum*. 2. *Pennisetum glaucum*. 3. Bandejamento-C.
4. Núcleo interfásico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.920487322

CRISTIANE GOUVÊA FAJARDO

**ESTRUTURA DE NÚCLEOS INTERFÁSICOS E DISTRIBUIÇÃO DA
HETEROCROMATINA EM *Pennisetum* sp.**

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

APROVADA em 14 de março de 2008

Dr. Antônio Vander Pereira

Embrapa

Prof. Dr. Sandro Barbosa

UNIFAL

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

*“Pedi e se vos dará; buscai e achareis: bate à porta e se vos abrirá;
portanto, quem pede recebe quem procura acha e, àquele que bata à
porta e se vos abrirá.” (Matheus VII: XI)*

*Aos meus pais, Márcio e Marli;
ao meu bisavô e bisavó Pimpa e Isabel (in memoriam).*

OFEREÇO e DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus que é infinitamente bom e justo.

Aos meus pais, Márcio e Marli, que sempre me incentivaram e confiaram nas minhas opções e decisões, pelo amor incondicional.

Ao meu irmão Guilherme, pelo apoio, preocupação e amizade.

A toda minha família, em especial para minha tia Sandra e aos primos Mariel, Natália, Ana Luísa e Lorena, pelo amor e carinho.

A minha amiga Júnia Rocha, pela participação sempre especial na minha caminhada de terra, pelo equilíbrio e colo a todos os instantes.

À Professora Dra. Lisete Chamma Davide, orientadora, pela atenção, ensinamentos e pela confiança depositada.

Ao amigo Marcus Sena, pela ajuda nas análises estatísticas e pelas milhares de gargalhadas.

Aos eternos amigos conselheiros, Saulo e Patrícia, pelo incentivo, companheirismo e pelas incontáveis contribuições ao longo da jornada.

Aos meus amigos de Juiz de Fora, Pâmela, Fernanda Sampaio, Fernanda Gomes, Prisciane, José Marcelo, Robert, Letícia, Cecília e Alessandro, pela amizade sincera.

Às amigas lavrenses, Cris, Rê, Beth e Techti, pela amizade e carinho.

À família Mendonça Cyranka, pelo eterno incentivo.

Ao amigo Fernando Leão, pelo companheirismo e incentivo à jornada acadêmica.

A todos os amigos do Centro Espírita Augusto Silva, que são a minha segunda família em Lavras. Acolheram-me como filha e irmã, sempre com muito carinho e apoio.

Ao professor Lyderson, da UFJF, pela oportunidade de conhecer o maravilhoso mundo dos cromossomos.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética da UFLA, Fernanda,

Rafael, Juliane, Leonardo, Amanda, Iara, Larissa, Ana Luiza, Kátia, Rose, Caio, Fabíola, Marcel, Patrícia, Sara, Letícia, Jeanni e a professora Giovana.

Aos professores do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fapemig, pela concessão de auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

À Embrapa Gado de Leite, especialmente ao pesquisador Dr. Antônio Vander Pereira, pela co-orientação, por ter concedido material genético para a realização deste trabalho e pela disponibilidade mesmo nas férias.

Aos funcionários do Departamento de Biologia.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Aspectos botânico-agronômicos e importância econômica gênero <i>Pennisetum</i>	3
2.2 Citogenética de <i>Pennisetum</i>	7
2.2.1 Citogenética de <i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. Br. e <i>Pennisetum purpureum</i> Schumach).....	8
2.2.2 Híbridos entre <i>P.glaucum</i> × <i>P. purpureum</i>	10
2.3 Caracterização de Genomas por Métodos de Bandeamento-C.....	13
2.4 Caracterização de núcleos interfásicos e volume nuclear.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Matéria genética.....	19
3.2 Classificação de núcleos interfásico.....	19
3.3 Volume nuclear.....	20
3.4 Análise Estatística.....	21
3.5 Análise Citogenética.....	21
3.6 Bandeamento-C.....	22
3.7 Análise de imagens.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23

5 CONCLUSÕES.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

RESUMO

FAJARDO, Cristiane Gouvêa. **Estrutura de núcleos interfásicos e distribuição da heterocromatina em *Pennisetum* sp.** 2008. 46 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Os bandeamentos cromossômicos têm sido utilizados na caracterização dos genomas e interações das espécies. Eles são de grande importância para os programas de melhoramento de plantas, visto que auxiliam na identificação de raças e de variedades presentes nos seus bancos de germoplasmas. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de analisar os caracteres nucleares do capim elefante (*Pennisetum purpureum*), do milheto (*Pennisetum glaucum*) e do híbrido resultante deste cruzamento, bem como estabelecer o padrão de distribuição da heterocromatina do capim elefante e do milheto por meio da técnica bandeamento-C. No capim elefante foram observados núcleos arreticulados e, para o milheto e o híbrido triplóide, os núcleos se apresentaram semi-reticulados. As maiores médias para as dimensões nucleares como volume nuclear, diâmetro e raio foram obtidas para o milheto, seguido do híbrido interespecífico e do capim elefante. A partir da técnica de bandeamento-C verificaram-se bandas centroméricas em todos os cromossomos do capim elefante, enquanto que no complemento cromossômico do milheto encontraram-se bandas proximais e intersticiais e menor proporção de heterocromatina constitutiva.

* Comitê de Orientação: Profa. Dra. Lisete Chamma Davide - UFLA (Orientadora) e Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite.

ABSTRACT

FAJARDO, Cristiane Gouvêa. **Structure of interphasic nuclei and distribution of heterochromatin of *Pennisetum* sp.** 2008. 46 p. Dissertation (Master in Plant Genetics and Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Chromosome banding has been used in genome characterization and species interaction which has great importance to plant breeding programs, helping to identify races and varieties in germoplasm banks. The objective of this work was to analyze nuclear characters and heterochromatin distribution pattern of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* using the C-banding technique, interphasic nuclear classification and nuclear volume quantification. Cultivars and the interspecific hybrid of *P. glaucum* and *P. purpureum* were used. The interphasic nuclei were areticate for elephantgrass and semi-reticulate for pearl millet and the triploid hybrid. Cell dimensions such as nuclei volume, diameter, and radius were measured. Pearl millet presented the biggest average, followed by the triploid hybrid and elephantgrass. Using the C-banding technique we could find centromeric bands in all elephantgrass chromosomes and proximal and interstitial bands in pearl millet which has presented lower proportion of constitutive heterochromatin.

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

1 INTRODUÇÃO

O bandejamento cromossômico é definido como o uso de procedimentos de coloração especial para induzir um padrão de diferenciação longitudinal no cromossomo. Conseqüentemente, evidencia aspectos da organização cromossômica e sua maior importância está relacionada à utilização em estudos citogenéticos e evolutivos.

A técnica de bandejamento-C, que normalmente evidencia regiões de heterocromatina constitutiva, é uma ferramenta citogenética muito utilizada para a caracterização de espécies vegetais, proporcionando a identificação de cromossomos homólogos e de genomas.

A identificação dos genomas e de interações das espécies é de grande importância para os programas de melhoramento de plantas, visto que auxilia na identificação de raças e de variedades presentes nos seus bancos de germoplasmas.

A Embrapa Gado de Leite, localizada em Juiz de Fora, MG, possui um banco ativo de germoplasma do capim elefante (BAGCE), com 110 acessos, constituindo a maior coleção de *Pennisetum* do Brasil. Uma das estratégias utilizadas no melhoramento genético do capim elefante (*Pennisetum purpureum*, $2n=4x=28$, genomas A'A'BB) é a hibridação interespecífica com o milheto (*Pennisetum glaucum*, $2n=2x=14$, genomas AA).

A obtenção de híbridos entre essas duas espécies tem sido uma estratégia de melhoramento comum e rotineiramente usada para a obtenção de progênie mais produtivas e de melhor qualidade nutricional. Essa hibridação resulta na produção de um híbrido triploide estéril, tornando necessária a duplicação cromossômica para a restauração da fertilidade e viabilização do uso da combinação híbrida em programas de melhoramento. As tentativas de duplicação cromossômica têm resultado na produção tanto de plantas

hexaplóides (Barbosa et al., 2007) como de mixoplóides, devido à eliminação cromossômica (Abreu et al., 2006, Campos, 2007).

As plantas hexaplóides constituem genótipos promissores para o desenvolvimento de cultivares propagadas por meio de sementes, em função de produzir as mesmas de tamanho maior e reunir características forrageiras das espécies parentais. Já a eliminação de cromossomos de genomas parentais reunidos no híbrido interespecífico duplicado abre a perspectiva de obtenção de linhas de adição ou substituição. Esses citótipos aneuplóides constituem material biológico de grande interesse para a localização e a manipulação de genes de interesse, a obtenção de haplóides e a caracterização da homologia entre os genomas e do efeito de cada cromossomo no comportamento do complemento total.

O estudo citogenético desses genótipos, com o uso de ferramentas que possibilitem a identificação e a distinção dos cromossomos dos genomas A, A' e B, traria importantes subsídios para o entendimento das relações evolutivas entre o capim elefante e o milho e para o uso direto e indireto dos híbridos interespecíficos no programa de melhoramento do capim elefante.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar núcleos interfásicos de capim elefante, do milho e do híbrido interespecífico, bem como estabelecer o padrão de banda-C em cromossomos metafásicos do capim elefante e milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos botânico-agronômicos e importância econômica do gênero *Pennisetum*

Pennisetum Rich. constitui um dos gêneros mais importantes da família Poaceae. Atualmente, o gênero apresenta cinco seções que foram delimitadas de acordo com caracteres morfológicos. Segundo Brunken (1977), o gênero *Pennisetum* encontra-se na seção Penicillaria.

Caracteriza-se por apresentar alta complexidade e heterogeneidade, devido aos inúmeros arranjos taxonômicos propostos, apresentando, aproximadamente, 140 espécies que estão distribuídas em uma ampla faixa tropical do planeta (Brunken, 1977; Kativu & Mithen, 1987; Xavier, *et al.*, 1995; Jauhar & Hanna, 1998). Dentre as inúmeras espécies, grande destaque tem sido dado a *Pennisetum glaucum* (milheto) e a *Pennisetum purpureum* (capim elefante), pela sua importância econômica.

Das duas espécies citadas anteriormente, *P. glaucum* (L.) R. Br., sinônimo de *P. typhoides* e *P. americanum* (Jauhar & Hanna, 1998), é conhecido, popularmente, como milheto, pasto-italiano, capim-charuto e tifóide. Apresenta caule ereto com folhas largas, inflorescência do tipo panícula densa, cilíndrica e terminal. Os frutos são cariopses, variando de globosos a subcilíndricos. É uma planta de ciclo anual, bianual ou perene, alógama, apresenta hábito de floração protogínico e comportamento reprodutivo sexual ou apomítico (Bonamigo, 1999; Remigereau *et al.*, 2006).

O milheto é uma das maiores diversidades morfológicas que ocorrem do oeste ao sul da África. Possui centro de origem na região do oeste Sudão até o Senegal e foi domesticada, inicialmente, como cereal no sul do Sahara (Harlan, 1971). Como a seleção foi efetuada por diferentes comunidades na sua domesticação, isso contribuiu para a obtenção de populações com ampla

variação. Sua expansão para o oriente chegou até a Índia por volta de 2.000 anos atrás, alcançando a Europa no século XVI, sempre cultivada como grão. No século XVIII, a espécie chegou ao EUA e à Austrália, utilizada como forrageira, mas ainda com menor importância que o sorgo. A partir dos anos 1970, passou a despertar grande interesse devido ao seu valor nutricional, à fácil produção de sementes e à capacidade de rebrota após corte ou pastejo, tendo sido desenvolvidas novas cultivares produtivas, principalmente na Índia, nos EUA e na Austrália (Bogdan, 1977).

O milheto é considerado o sexto cereal mais consumido no mundo (Cheik et al., 2006). Segundo Bonamigo (1999), a área ocupada com milheto no Brasil está próxima de 2,1 milhões de ha.

O milheto destaca-se pela tolerância à seca, uma vez que cresce em regiões com 200-600 mm anuais de chuva (Upreti & Austin, 1972). Além disso, apresenta resistência a doenças, é tolerante a baixos níveis de fertilidade do solo e tem boa produção de sementes não deiscentes (Barbosa, 2004). Apesar de estar muito bem adaptado ao estresse hídrico, sobrevive bem em ambientes irrigados (Gill, 1991).

O milheto contém baixo teor de ácido hidrocianico, é rico em proteínas, fósforo, cálcio e muitos outros minerais (Gupta, 1975; Pantulu & Rao, 1982; Abreu, 2002). Todas essas características fazem do milheto uma excelente forrageira, útil na produção de rações e forragem para animais. Além disso, pode ainda ser utilizado para a alimentação humana (Paiva, 2006). Esse duplo propósito se deve ao fato de seus grãos serem usados na alimentação humana e a planta inteira é utilizada como forragem. Os valores nutricionais do milheto são semelhantes aos do trigo, do milho e do arroz, com uma superioridade em relação ao conteúdo mineral, principalmente de ferro e de cálcio (Pantulu & Rao, 1982).

Outra espécie de importância econômica é o *Pennisetum purpureum* Schumacher, conhecido popularmente como capim elefante, capim-napier, pasto-

gigante, capim-cana africana. É uma espécie perene, que apresenta plantas de crescimento cespitoso, porte elevado, colmos eretos, cilíndricos e cheios, folhas largas e compridas, inflorescência primária terminal do tipo panícula e abundante lançamento de perfilhos aéreos e basais (Passos et al., 1999).

O centro de origem e diversidade do *P. purpureum* é na África tropical, onde ocorre naturalmente em vários países, desde o Oeste de Guiné, até Moçambique e Quênia, no Leste Africano (Brunken, 1977). Nessas regiões, a espécie cresce bem entre as latitudes de 10° Norte a 20° Sul, em altitudes variando do nível do mar até 2.200m, sob temperaturas médias de 18°C a 30°C e precipitações de 800 a 4.000mm anuais (Rodrigues et al., 1975).

O capim elefante foi descoberto e divulgado como planta forrageira pelo coronel Napier Springer, que o recomendou ao Departamento de Agricultura da Rodésia (atual Zimbábue), onde foi avaliado com sucesso por volta de 1910, perpetuando, em uma das variedades, o nome Napier (Maldonado, 1955). A sua introdução nas Américas ocorreu, inicialmente, nos Estados Unidos pelo Departamento de Agricultura, em 1913 (Jauhar, 1981), expandindo-se pelas Américas Central e do Sul. No Brasil, foram relatadas duas introduções. Uma foi no Rio Grande do Sul, com estacas trazidas dos Estados Unidos, em 1920. Outra foi relatada em 1921, oriunda de Cuba para o estado de São Paulo (Faria, 1994). Posteriormente, se disseminou por todo o país.

A espécie apresenta grande variação de tipos morfológicos entre genótipos, como Napier, Cameroon, Merker, Anão e Roxo, que foram utilizados para agrupamento da variabilidade dentro da espécie (Pereira, 1992) e selecionados como importantes.

O elevado potencial produtivo do capim elefante, associado às outras características forrageiras favoráveis, tais como boa qualidade, palatabilidade, vigor e perenidade, tem estimulado não só o cultivo dessa espécie como também o seu melhoramento genético, visando ao desenvolvimento de cultivares melhoradas (Sobrinho et al., 2005). Dessa forma, esta espécie é muito utilizada

na alimentação de bovinos, ovinos e caprinos. Possui, ainda, enorme potencial para uso energético na fabricação de carvão vegetal, bioóleo, biogás, energia elétrica e paisagismo (Gómez, 2002; Timbó, 2007).

O híbrido, originado do cruzamento entre o capim elefante e o milheto, é denominado PMN (do inglês *pearl millet and napiergrass*) e foi descrito, pela primeira vez, em 1944, por Burton. Este híbrido assemelha-se mais ao capim elefante, em função da maior contribuição genética (genomas A'B), do que ao milheto (genoma A).

Jahuar & Hanna (1998) consideram o híbrido entre capim elefante e milheto de grande interesse econômico por gênero por apresentar produção e qualidade forrageira superiores aos de seus genitores. Segundo Pereira et al. (1999), os híbridos triplóides têm demonstrado grande variabilidade para caracteres de importância forrageira. Alguns materiais foram selecionados e apresentaram 23% de proteína bruta nas folhas, valor este superior à média de 16% encontrada para o capim elefante.

No entanto, essas duas espécies apresentam níveis de ploidia diferentes, sendo, pois, o capim elefante, alotetraplóide e o milheto, diplóide. A hibridação entre estas espécies produz um híbrido triplóide com $2n = 3x = 21$ cromossomos e genomas AA'B, infértil. A principal causa da esterilidade do híbrido triplóide é o número de cromossomos não balanceado. Essa infertilidade do híbrido é um fator limitante aos programas de melhoramento, pois impede sua utilização em cruzamentos e sua propagação por sementes.

A restauração da fertilidade do híbrido pode ser conseguida pela duplicação do conjunto cromossômico utilizando bloqueadores mitóticos, produzindo um híbrido hexaplóide com $2n = 6x = 42$ cromossomos e genomas AAA'A'BB (Barbosa et al., 2007; Hanna & Dujardin, 1986; Hanna et al., 1984; Hanna, 1981) que, segundo a literatura, apresentam meiose regular, levando à produção de sementes maiores e mais vigorosas. Esse procedimento possibilitaria a propagação desses híbridos via semente e viabilizaria a expansão

das áreas cultivadas de capim elefante, trazendo consideráveis contribuições para a pecuária leiteira (Schanck, 1993).

Recentemente, foi produzida, pela empresa Matsuda, a primeira cultivar de capim elefante propagada por sementes, denominada 'Paraíso'. Essa cultivar é um híbrido hexaplóide que tem sido classificada erroneamente como uma nova espécie *Pennisetum hybridum* (Reis, 2005). Paiva (2006) avaliou a meiose e a viabilidade dos produtos meióticos de alguns híbridos hexaplóides brasileiros e americanos, inclusive a cultivar 'Paraíso', e verificou elevadas taxas de anormalidades meióticas, aliadas às baixas frequências de viabilidade do pólen, o que ocasiona indivíduos com números cromossômicos desbalanceados e inférteis.

2.2 Citogenética do gênero *Pennisetum* sp.

Uma classificação genética realizada por Harlan & Wet, em 1971, estabeleceu, para o gênero *Pennisetum*, conjuntos gênicos primário, secundário e terciário, com base na facilidade de introgressão de germoplasmas selvagens nas espécies cultivadas. O conjunto gênico primário é composto pelo milheto (*P. glaucum*) e outras duas espécies diplóides selvagens (*P. mollissimum* e *P. violaceum*), que apresentam $2n = 2x = 14$ cromossomos. A espécie *P. purpureum* (capim elefante), com $2n = 4x = 28$ cromossomos, representa o segundo conjunto gênico e, no terceiro, encontram-se as demais espécies de *Pennisetum*, com $x = 5, 7, 8$ e 9 e números cromossômicos variando de $2n = 10$ a $2n = 78$. Dessa forma, verifica-se que o presente gênero constitui um grupo heterogêneo, apresentando diferentes números básicos de cromossomos, morfometria cromossômica e genômica variando de acordo com os níveis de ploidia desde diplóide até octaplóide (Barbosa et al., 2003; Techio et al., 2006).

A maioria dos trabalhos, até o momento, foi realizada utilizando

metodologias citogenéticas convencionais. Poucos foram os estudos com o gênero *Pennisetum* enfocando a citogenética molecular. Em *P. squamulatum*, por exemplo, Goel et al. (2003) delinearão, por meio da FISH, uma região cromossômica hemizigótica associada com a formação de saco embrionário apospórico. Em 2004, Akiyama et al. realizaram um mapeamento físico de alta resolução em *P. squamulatum*, que revelou extensos heteromorfismos cromossômicos em regiões associadas com a apomixia.

Para a espécie citada anteriormente, foram realizados mapeamentos físicos comparativos, por meio da FISH, para regiões genômicas específicas em plantas apomíticas (Goel et al. 2006). No mesmo ano, Akiyama et al. (2006) utilizaram a FISH para identificar citótipos hexaplóides e octaplóides.

2.2.1 Citogenética de *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. e *Pennisetum purpureum* (Schumach)

Rau (1929) relatou um número de $2n=2x=14$ cromossomos para *P. glaucum*. Posteriormente, Krishnaswamy et al. (1950) designaram a constituição genômica dessa espécie como AA (diplóide).

Segundo Pantulu (1968), o conjunto cromossômico do milheto é composto por 4 pares metacêntricos e 3 pares submetacêntricos. De acordo com Jauhar (1981), o cariótipo de *P. glaucum* é classificado como simétrico, devido ao maior cromossomo ser 1,5 vez mais extenso que o menor. Barbosa (2000) também verificou uma morfologia similar no genoma, confirmando esta classificação. Barbosa et al. (2003) observaram constrições secundárias nos pares 1 e 7 nos braços curtos. Estudos cariotípicos sobre o milheto (Krishnaswamy, 1962; Gill & Gupta, 1966, citados por Barbosa, 2000) descrevem a presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e dois cromossomos com a constrição secundária. A localização do satélite foi

observada no braço curto do cromossomo maior e no braço longo do 14º cromossomo do complemento.

A maioria dos estudos citogenéticos realizados para *P. glaucum* até o momento se limita a estudos convencionais, sendo escassos trabalhos de bandeamento e citogenética molecular. Em 1991, Prabakaran et al. realizaram bandeamento fluorescente por quinacrina em *P. americanum* sinônimo de *P. glaucum* e verificaram cromocentros fortemente corados nas interfases e na prófase. Na metáfase, observaram bandas teloméricas e centroméricas e ausência de bandas intercalares. Verificaram também polimorfismo nos pares 1, 3, 4 e 6.

A FISH (Hibridização *in situ* fluorescente) foi utilizada por Kamm et al. (1994) para estudar a organização física de seqüências satélites do milho com o auxílio da sonda HaeIII (monômero rico em AT), observando-se que estas ocupam 55% do genoma. Essas regiões estão localizadas, preferencialmente, nos centrômeros dos 14 cromossomos.

Pennisetum purpureum é um alotetraplóide com $2n = 4x = 28$, tendo o número básico $x = 7$ e genomas A'A'BB, e comporta-se como diplóide normal (Jauhar, 1981; Jauhar & Hanna, 1998; Krishnaswamy & Raman, 1954; Martel et al., 1996; Techio, 2002).

Segundo Jauhar (1981), o cariótipo do capim elefante é constituído por cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e um acrocêntrico. É classificado como assimétrico sendo o primeiro cromossomo 2,7 vezes maior que o último, com dois pares apresentando regiões organizadoras de nucléolo no par 1 (Pantulu & Venkateswarlu, 1968). Barbosa et al. (2003) identificaram, no capim elefante, apenas cromossomos metacêntricos e confirmaram a presença de satélite no maior cromossomo do conjunto. Manara (1973) observou que, em todos os cromossomos, os centrômeros mostraram-se flanqueados por regiões coradas. Em sete pares, observaram knobs no braço longo. Esta é a principal característica pela qual os autores diferiram os 7 pares do *P. glaucum*. A presença destes knobs, entretanto, não é uniforme em todas as populações. A

diferença entre os comprimentos relativos dos cromossomos maior e menor dos acessos avaliados por Manara (1973) e Barbosa et al. (2003) é idêntica, isto é, 2:1, para os acessos estudados.

A meiose no capim elefante caracteriza-se pela presença de bivalentes na diacinese e metáfase I (Jauhar, 1981), que parece ser assegurada, segundo Techio (2002), pela presença de mecanismo supressores do pareamento homéologos, semelhante ao identificado no trigo por Sears (1976). Durante a diacinese, a finalização dos quiasmas é muito rápida. Normalmente, os maiores bivalentes possuem dois quiasmas por bivalente e com frequência de 0,68, e os menores apresentam apenas um quiasma, com frequência de 18,9 (Jauhar, 1981).

2.2.2 Híbridos entre *P. glaucum* × *P. purpureum*

Os programas de melhoramento de forrageiras utilizam estratégias de hibridação interespecífica entre o milheto ($2n = 2x = 14$) com genoma AA, e o capim elefante ($2n = 4x = 28$) com a constituição A'A'BB. Essa metodologia é recomendada por promover melhoria da qualidade da forrageira (Hanna, 1999). Conseqüentemente, o cruzamento resulta em um híbrido interespecífico triplóide ($2n = 3x = 21$) com genomas AA'B e estéril. Por meio desta combinação genética, é possível reunir, nos híbridos, características de interesse forrageiro do milheto e do capim elefante (Schank et al., 1993).

De acordo com Burton (1942), a maior parte dos cromossomos das duas espécies é perfeitamente distinguível na placa equatorial em função do tamanho dos cromossomos, pois os cinco primeiros cromossomos de *P. glaucum* são de maior tamanho que os de *P. purpureum*.

Para híbridos triplóides obtidos pela Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG, Barbosa et al. (2002) verificaram, em relação ao comprimento relativo, que o maior cromossomo chega a ser 2,6 vezes maior que o menor

cromossomo. Para estes autores, a contribuição do genótipo do capim elefante, em termos de quantidade de DNA, determinada com base no comprimento do lote haplóide (CTLH), é similar àquela fornecida pelo milheto. Esses resultados confirmam aqueles obtidos por Martel et al. (1997) e Campos (2007), que observaram, por citometria de fluxo, que o tamanho dos genomas do milheto e o do capim elefante são semelhantes. Para o híbrido triplóide entre as duas espécies, Campos (2007) obteve valor intermediário para conteúdo de DNA.

Na meiose dos híbridos triplóides com 21 cromossomos, podem-se observar 7 bivalentes e 7 univalentes. A formação dos bivalentes é atribuída ao pareamento dos cromossomos do genoma A' do capim elefante e A do milheto, enquanto os sete univalentes pertencem ao genoma B do capim elefante (Krishnaswamy & Raman, 1954).

A análise do paquíteno por Pantulu (1967) identificou que os cromossomos 6 e 7 do milheto têm homologia com os cromossomos 8 e 14 do capim elefante, e os cromossomos 1 a 5 do milheto apresentam homologia com os mesmos cromossomos do capim elefante, respectivamente. Irregularidades meióticas foram descritas para os híbridos triplóides. Sethi et al. (1970) observaram a presença de meiócitos, mostrando configurações de 4I + 7II + 1III e 13I + 4II, resultando em baixa viabilidade dos grãos de pólen.

Techio et al. (2006) verificaram ocorrência de anormalidades desde as fases iniciais até a formação dos produtos meióticos em três genótipos de híbridos triplóides entre capim elefante e milheto. Entre as anormalidades observadas, encontram-se formação de univalentes e multivalentes, ascensão precoce de cromossomos tanto na primeira divisão meiótica quanto na segunda, segregação irregular, pontes simples e múltiplas, cromossomos pegajosos, formação de células com tamanhos desiguais, citomixia, fuso anormal, células binucleadas e formação de micronúcleos.

A condição triplóide deste híbrido é apontada, por vários autores (Jauhar 1981; Sree Rangasamy, 1972; Techio et al., 2006), como a causa das

anormalidades e de conseqüente infertilidade, pois resulta na formação de univalentes, as quais levam à segregação irregular, induzindo à perda de material genético e originando gametas aneuplóides.

A esterilidade é um limitador do emprego de híbridos triplóides nos programas de melhoramento, pois impossibilita a obtenção de sementes para a implantação de pastagens economicamente viáveis (Pereira et al., 2001). A restauração da fertilidade pode ser alcançada utilizando-se ferramentas citogenéticas, com a obtenção de materiais com o número cromossômico duplicado via exposição a agentes antimitóticos (Barbosa et al., 2007). Com a duplicação, obtém-se um híbrido hexaplóide com $2n = 6x = 42$ cromossomos.

O programa de melhoramento do capim elefante, desenvolvido pela Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG, vem utilizando híbridos triplóides e hexaplóides induzidos via duplicação cromossômica. A instabilidade genética e genômica comumente associada aos processos de hibridação interespecífica e poliploidização constitui um entrave para os programas de melhoramento, pois pode estar associada a problemas de desenvolvimento e à instabilidade meiótica, com conseqüências para a produção de sementes viáveis (Comai, 2000).

Glidenhuys & Brix (1961) descrevem que esses híbridos hexaplóides demonstram instabilidade no número cromossômico somático, apresentando variação de 36 a 42 cromossomos e com $2n = 6x = 42$ ocorrendo mais freqüentemente. Os autores atribuem essa variação no número cromossômico a um controle genético.

Quanto à origem, os híbridos hexaplóides podem ser obtidos a partir da hibridação interespecífica, seguida de poliploidização induzida, estando o homem, neste caso, conduzindo a evolução das plantas a seu favor. Segundo Abreu (2002), a indução de poliploidia não é tarefa fácil, pois as metodologias variam muito, principalmente com relação aos tipos e aos tempos de ação dos indutores, às concentrações e aos tecidos alvos, buscando sempre maior

eficiência do tratamento. Porém, uma vez conseguida a poliploidização, a frequência de plantas mixoplóides é grande e a de poliplóides estáveis é muito pequena.

Vários autores, citados por Jauhar (1981), descreveram que o híbrido hexaplóide tem maior semelhança com o capim elefante, devido a uma maior contribuição genômica deste e à dominância do genoma B sobre o genoma A. Comentam também que os genomas 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 B exercem dominância em relação ao genoma 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) consideram o genoma B dominante, pois, alterando-se a proporção do genoma B dominante 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. Nos híbridos 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 foi dominante ou, talvez, epistático sobre as cinco doses do genoma A.

2.3 Caracterização de Genomas por Métodos de Bandeamento-C

Os padrões diferenciais de bandejamento dos cromossomos, geralmente observados em regiões específicas, foram inicialmente desenvolvidos para análises de cromossomos humanos. Essas técnicas correspondem a variações nas propriedades de coloração dos cromossomos causadas por tratamentos químicos, pelo frio ou por especificidade de interação do corante utilizado. Tal procedimento permite a identificação de cada par de homólogos, por meio da

observação de bandas (Fukui & Nakayama, 1996).

Segundo Guerra (1988), o bandeamento tem favorecido a análise cariotípica de várias espécies, permitindo a comparação dos cromossomos dentro e entre espécies do mesmo gênero, sendo importante na identificação de híbridos interespecíficos e dos cromossomos de cada espécie, na identificação dos homólogos correspondente ao par e na detecção das variações estruturais. Em estudos evolutivos, favorece a observação de transformações que ocorrem em grupos de espécies próximas que apresentam cariótipos semelhantes.

Existem várias técnicas de bandeamento muito informativas em citogenética vegetal, entre elas o bandeamento-C e a coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, que identificam regiões de heterocromatina (Sumner, 1990). A heterocromatina constitutiva tem sido bastante empregada para a identificação de cromossomos a partir da técnica de bandeamento-C.

O Bandeamento-C possibilita uma análise mais minuciosa do cariótipo, uma vez que cora diferencialmente regiões específicas dos cromossomos, permite a análise da heterocromatina constitutiva revelando regiões heterocromáticas com replicação tardia e DNA satélite (Baumann, 1971; Sumner, 1990). As regiões heterocromáticas podem ser ricas em GC ou AT (Sumner, 1990). Entretanto, o padrão de banda-C nem sempre é constante podendo variar de acordo com a técnica utilizada, revelando padrões de bandeamento divergentes (Pedrosa, 2000).

Na família Poaceae existem muitos relatos quanto ao padrão de distribuição de banda-C. De acordo com a revisão realizada por Guerra (2000), em cromossomos medianos de tamanho intermediário com 3 a 5µm, como os de *Milium effusum* ($2n = 28$), foram observadas 44 bandas teloméricas e 10 proximais (Bennett & Thomas, 1991); em *Zea mays* ($2n = 20$), foram observadas 8 bandas teloméricas e 20 intersticiais (Aguiar-Perecin & Vosa, 1985) e em *Zingeria biebersteiniana* ($2n = 4$), foram observadas 8 bandas teloméricas, 10 intersticiais e 4 proximais (Bennett et al., 1995). Em cromossomos grandes de

comprimento superior a 5µm, como os de *Dasypyrum villosum* (2n = 14), foram observadas 26 bandas teloméricas, 26 intersticiais e 14 proximais (Pignone et al. 1995); em *Festuca rubra* (2n = 42), foram observadas 70 bandas teloméricas (Bailey & Stace, 1992); em *Hordeum vulgare* (2n = 14), foram observadas 20 bandas teloméricas e 62 intersticiais (Kakeda et al., 1991); em *Phleum commutatum* (2n = 14), foram observadas 14 bandas proximais e 2 intercalares (Kula et al., 2006); em *Secale cereal* (2n = 14), foram observadas 28 bandas teloméricas e 40 intersticiais e 14 proximais (Mukai et al., 1992) e em *Triticum longissimum* (2n = 14), foram observadas 28 teloméricas, 92 intersticiais e 14 proximais (Friebe et al., 1993). Dessa forma, Guerra (2000) verificou que a distribuição de heterocromatina constitutiva não é inteiramente ao acaso e pode ser encontrada preferencialmente em determinadas regiões. O autor constatou ainda um paralelo entre o posicionamento das bandas e o tamanho dos cromossomos. Em geral, cromossomos pequenos apresentam, com maior frequência, banda-C proximais; com o aumento do tamanho dos cromossomos, esta frequência reduz-se.

O bandeamento-C pode auxiliar na identificação de parentais de híbridos. A partir do padrão de bandas em alguns genótipos tetraplóides de *Medicago*, Baughan & Hossain (1997) estabeleceram que estes materiais eram híbridos formados pelo cruzamento de duas subespécies de *Medicago sativa*. Dessa forma, verificaram que alguns tetraplóides neste gênero apresentam um genoma com bandas-C centroméricas e teloméricas, que são padrões observados nas subespécies diplóides *Medicago sativa caerulea* e *Medicago sativa falcata*, respectivamente.

Vários autores especulam que polimorfismos cromossômicos podem estar relacionados com o fenótipo de alguns vegetais (Vosa, 1974; Weimarck, 1975; Lelley et al., 1978; Sumner, 1990). Heneen & Brismar (1987), por exemplo, observaram que linhagens de trigo com blocos heterocromáticos terminais apresentavam grãos maiores do que linhagens cujos cromossomos não

apresentam heterocromatina terminal. Rayburn et al. (1985) observaram, a partir do padrão de bandejamento-C, que linhagens de milho obtidas de regiões geográficas distintas apresentam quantidades diferentes heterocromatina. As linhagens, quando submetidas a tratamentos de cultivo que apresentavam um ciclo celular mais rápido, levaram as plantas a um desenvolvimento precoce.

Lauresen & Seberg (2001) verificaram padrões de bandas muito divergentes entre 4 acessos de *Elymus scabrifolius* por meio do bandejamento C. Em 2004, Bildanova et al., analisando a banda C em híbridos de cevada × trigo obtidos por meio de retrocruzamentos sucessivos, observaram que estes possuíam regiões heterocromáticas de *Triticum aestivum* e ínfimas regiões convergentes com *H. vulgare*. Tuna et al. (2006) caracterizaram duas espécies *Bromus* com $2n = 2x = 14$ por bandejamento-C. Os autores relataram, para *Bromus variegates*, bandas teloméricas em ambos os braços de 5 pares cromossômicos e, em *Bromus erectus*, verificaram, em 4 pares, bandas pequenas teloméricas nos braços longos.

2.4 Caracterização de núcleos interfásicos e volume nuclear.

Heitz (1932) conceitua os dois componentes no núcleo interfásico, que seriam a cromatina difusa (eucromatina) e os cromocentros (heterocromatina). No entanto, em várias espécies, a eucromatina se apresenta condensada de tal forma que pode constituir grandes blocos irregulares de cromatina condensada, dando origem a cromocentros eucromáticos ou se associando aos cromocentros heterocromático, proporcionando-lhes um aspecto mais irregular. Nos núcleos meristemáticos de algumas espécies, a eucromatina pode também definir um gradiente de condensação de um pólo ao outro do núcleo, havendo maior concentração da cromatina no pólo onde se encontram os centrômeros e menor no pólo telomérico.

A partir da proporção e da distribuição da heterocromatina, é possível classificar os núcleos interfásicos. A estrutura desses tipos nucleares é ligeiramente variável entre diferentes tecidos da planta. Em geral, pode-se considerar que a estrutura do núcleo interfásico é constante dentro de uma espécie, mas pode variar dentro de um gênero ou em categorias taxonômicas superiores (Guerra, 1983).

A família Rutaceae oferece grande diversidade genética e, apesar deste polimorfismo, não foram encontradas diferenças significativas quanto à classificação dos núcleos (Guerra, 1984). O mesmo ocorre nas espécies das famílias Orchidaceae (Tanaka, 1971), Myrtaceae (Moussel, 1965), Annonaceae, Lauraceae e Magnoliaceae (Okada, 1975). Relatos sobre a classificação de núcleos interfásicos na família Poaceae são ínfimos e, no gênero *Pennisetum*, é inexistente até o momento.

A existência de divergências no tipo de núcleo é atribuída à redução do volume nuclear ou à variação do conteúdo de DNA, com conseqüente variação na densidade do retículo cromatínico. Neste caso, a poliploidia, comum em muitos tecidos em plantas mais derivadas, desempenha papel primordial. Guerra (1985) verificou diferentes níveis de ploidia nos núcleos de raiz do poliplóide *Epidendrum* sp. Embora o tamanho dos cromocentros e a densidade da cromatina difusa possam sofrer alguma modificação, na maioria dos casos, é evidente ainda uma constância do tipo nuclear.

Segundo Vichiato et al. (2007), uma das principais características das plantas poliplóides é, provavelmente, conseqüentes aumento de dosagem gênica. O efeito morfofisiológico imediato da poliploidização é o aumento do tamanho das células, devido ao maior volume nuclear para acomodar todo o material genético e, em muitos casos, o aumento do volume é verificado com o aumento do tamanho dos órgãos (Mondim & Neto, 2006).

A poliploidia poder vir acompanhada com a elevação do teor de DNA, ou seja, valor-C, nos núcleos. Segundo Nagl (1978), este aumento pode

apresentar alterações drásticas na estrutura cromatínica. Exemplos disso são encontrados em células com atividade de transcrição intensa, como as antípodas do saco embrionário, as células do tapete da antera ou as células do tecido suspensor do embrião. Este mesmo autor, trabalhando com *Skimmia japonica*, notou diferenças quanto ao nível de ploidia e transcrição ativa em núcleos diplóides da antera, quando comparado com células do tapete com a estrutura da cromatina modificada

Modificação na estrutura nuclear é, ainda, comumente encontrada em núcleos que sofrem forte redução de seu volume, aumentando, conseqüentemente, a densidade da cromatina. Estas alterações foram evidenciadas em núcleos densamente condensados das camadas externa da raiz de *Santolina rosmarinifolia* (Guerra, 1985).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e o material biológico utilizado foi cedido pelo programa de melhoramento de forrageiras da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Foram avaliados dois genótipos de capim elefante Merkeron Pinda (BAG 19) e CNPGL 91F2-5 e dois de milho (M41 e M62). Para as análises do núcleo interfásico, foram incluídos dois híbridos triplóides resultantes dos cruzamentos entre esses parentais CNPGL HT (Merkeron Pinda x M41) e CNPGL HT (CNPGL 91F2-5 x M62).

3.2 Classificação de núcleos interfásicos

Para a classificação dos núcleos interfásicos, foram avaliados 100 núcleos por genótipo, utilizando-se a nomenclatura proposta por Guerra (1987), como segue:

1-Arreticulado

- Retículo cromatínico invisível ou fracamente corado.
- Cromocentros bem delineados.
- Eucromatina condensada praticamente ausente.

1.1 A. simples - Cromocentro com forma regular.

1.2 A. composto - Cromocentro com forma irregular.

2-Semi-reticulado

- Cromocentros simples ou ocasionalmente fundidos.

- Quantidade variável de eucromatina condensada.

2.1 S. M. Retículo fracamente corado - Cromocentro com forma regular, raramente mostrando prolongações de eucromatina condensada.

2.2 S. M. Retículo medianamente corado – Cromocentros com densidade muito variável e com forma geralmente irregular.

2.3 S. M. Retículo profundamente corado

2.3.1 Tamanho médio, freqüentemente compostos e cromocentros de forma irregular.

2.3.2 Compostos, grandes e com cromocentros com forma irregular – retículo cromatínico levemente polarizado.

2.3.3 Simples, cromocentros pequenos e numerosos. Aparência geralmente granular e cromatina homogeneamente distribuída.

3- Reticulado

Reticulo cromatínico intensamente corado, cromocentros pequenos, de difícil visualização. Cromatina polarizada.

3.3 Volume nuclear

Para a estimativa do volume nuclear (VNI) foram analisadas dez lâminas por genótipo e, para cada lâmina, dez núcleos tomados em campos aleatórios, totalizando 100 núcleos avaliados por táxon estudado. Para cada núcleo foram tomadas duas medidas de diâmetro, sendo a média das mesmas utilizada para estimar o diâmetro médio e o raio final. Para o cálculo do volume nuclear, utilizou-se a seguinte fórmula: $\frac{4}{3}\pi r^3$, sendo o 'r' o raio do núcleo para o cálculo do volume (Das & Mallick, 1993).

3.4 Análise Estatística

Os dados originais para raio, diâmetro e volume nuclear foram

transformados para logaritmo, visando obter distribuição normal e possibilitar a realização da análise de variância. A adaptação dos dados transformados à distribuição normal foi avaliada pelo teste Q-Q plot, segundo Johnson & Wichern (1988).

As análises de variância (ANAVA) para raio, diâmetro e volume nuclear dos genótipos de *Pennisetum* sp. foram realizadas considerando o delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com auxílio do Programa GENES, da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As médias foram agrupadas pelo teste de Scott Knott (1974), a 5% de significância.

3.5 Análise Citogenética

As análises citogenéticas dos acessos de capim elefante e milheto foram realizadas em meristemas de raízes obtidas a partir do enraizamento de estacas e germinação de sementes. As raízes foram tratadas segundo protocolo de Barbosa (2007) com modificações. As raízes foram submetidas a uma solução de ciclohexamida 25 mg/L e hidroxiquinoleína 300 mg/L (1:1) por 2h 20min. Em seguida, o material foi fixado em metanol: ácido acético (P.A.) 3:1 por um período mínimo de 24h a -20 °C. Posteriormente, foram realizadas lavagens em água corrente por 15 minutos e em água destilada por 15 minutos, realizando trocas sucessivas de 5 em 5 minutos, prosseguindo com a maceração enzimática. Para a digestão enzimática utilizou-se solução de Pectinase/Celulase (40% /4%, respectivamente) (SigmaTM) incubada em banho-maria a 37 °C. Posteriormente as raízes foram lavadas e acondicionadas em fixador a -10 °C, por no mínimo 24 horas.

A montagem das lâminas foi realizada por meio da técnica de dissociação celular, com secagem ao ar segundo Carvalho (1995) e para a coloração foi utilizada solução de Giemsa 10% / tampão-fosfato pH 6.8 por 5

minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e secadas ao ar sobre placa aquecedora. As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX 60.

3.6 Bandeamento-C

Para a técnica de bandeamento-C, as lâminas envelhecidas por uma semana foram incubadas em ácido acético 45%, a 60°C, por 15 minutos e, logo depois, foram lavadas em água destilada. Em seguida, as lâminas foram novamente incubadas em solução de hidróxido de bário 6%, por 20 minutos, à temperatura ambiente e lavadas em água corrente. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas em 2xSSC, a 60°C, por 1 hora e 45 minutos e lavadas em água destilada. Depois de secas, as lâminas foram coradas com Giemsa 10%, por 12 minutos (Schwarzacher et al., 1980).

3.7 Análise de imagens

As imagens das figuras metafásicas e dos núcleos interfásicos foram capturadas por câmera digital acoplada a um fotomicroscópio Leica e analisadas pelo programa Sigma Scan Pro v. 2.00.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Núcleos interfásicos

Conforme classificação proposta por Guerra (1987), os núcleos interfásicos do capim elefante mostraram-se arreticulados compostos, com cromocentros ocasionalmente fundidos (Figura 1A). Os núcleos do milheto foram classificados como semi-reticulados, com retículo cromatínico profundamente corado e composto, visto que apresentam cromocentros com forma irregular e retículo cromatínico levemente polarizado (Figura 1B).

O híbrido interespecífico triplóide apresentou núcleos interfásicos, sendo classificado na categoria do parental milheto. Entretanto, observaram-se raros núcleos similares aos do capim elefante, em uma proporção de 6% dos núcleos (Figuras 1C e D).

A distribuição de seqüências repetitivas, a quantidade e a distribuição da heterocromatina e a quantidade de DNA nuclear, a largura e o tamanho cromossômico podem influenciar a estrutura do núcleo interfásico (Guerra, 1984).

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com Guerra (2000), no que se refere ao tamanho de cromossomos para o capim elefante e o milheto. Segundo o autor, espécies com cromossomos pequenos, com o comprimento inferior a 3 μ m, como os do capim elefante (Barbosa et al., 2003), apresentam geralmente núcleos arreticulados, com presença de cromatina condensada. Em espécies com cromossomos medianos, em torno de 3 μ m a 5 μ m, como os do milheto (Barbosa et al., 2003), observam-se núcleos semi-reticulados com irregularidade na distribuição da heterocromatina.

Além do tamanho dos cromossomos, para as duas espécies analisadas, diferenças no número dos cromossomos podem constituir outro fator que

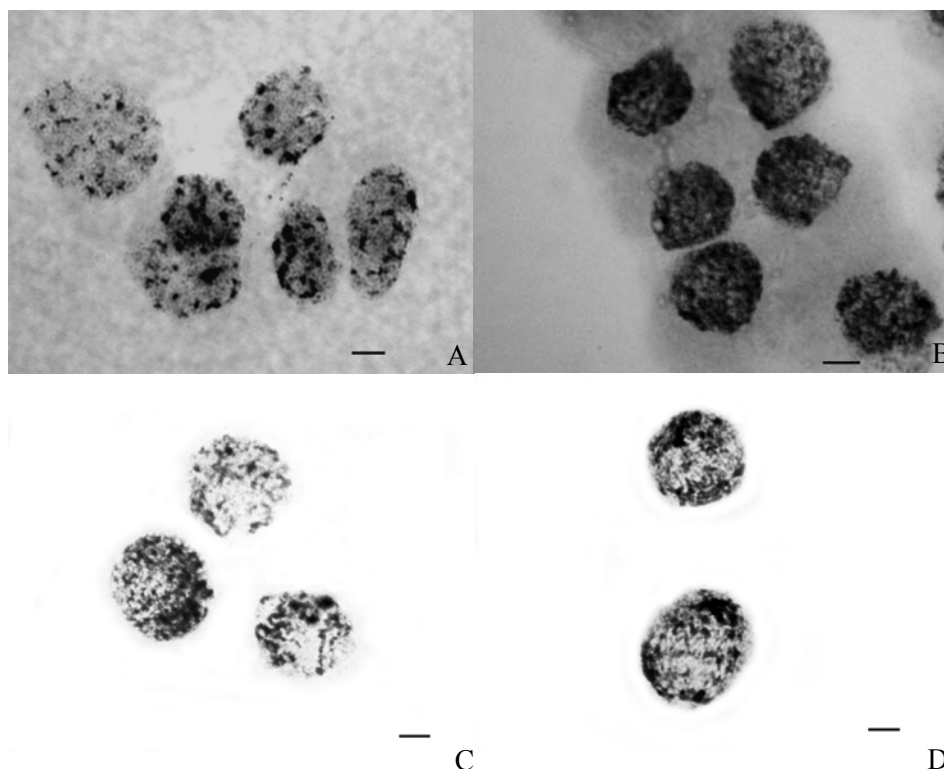


FIGURA 1 Estrutura do núcleo interfásico. A - núcleos arreticulados compostos do capim elefante; B - núcleos semi-reticulados do milho; C - núcleos semi-reticulados e arreticulados (seta) do híbrido interespecífico; D - núcleos semi-reticulados do híbrido interespecífico. Barra= 10μm. UFLA. Lavras-MG, 2008.

promove a distinção estrutural entre seus núcleos interfásicos, uma vez que o capim elefante ($2n = 4x = 28$) apresenta maior número de cromossomos com menor tamanho que o milho ($2n=2x=14$).

As diferenças na classificação dos núcleos das duas espécies estudadas ressaltam a importância desta característica como parâmetro a ser utilizado para fins taxonômicos.

Com relação às medições realizadas nos núcleos interfásicos, observa-se, nos gráficos do Q-Q plot (Figuras 2A, B e C), que a transformação dos dados de

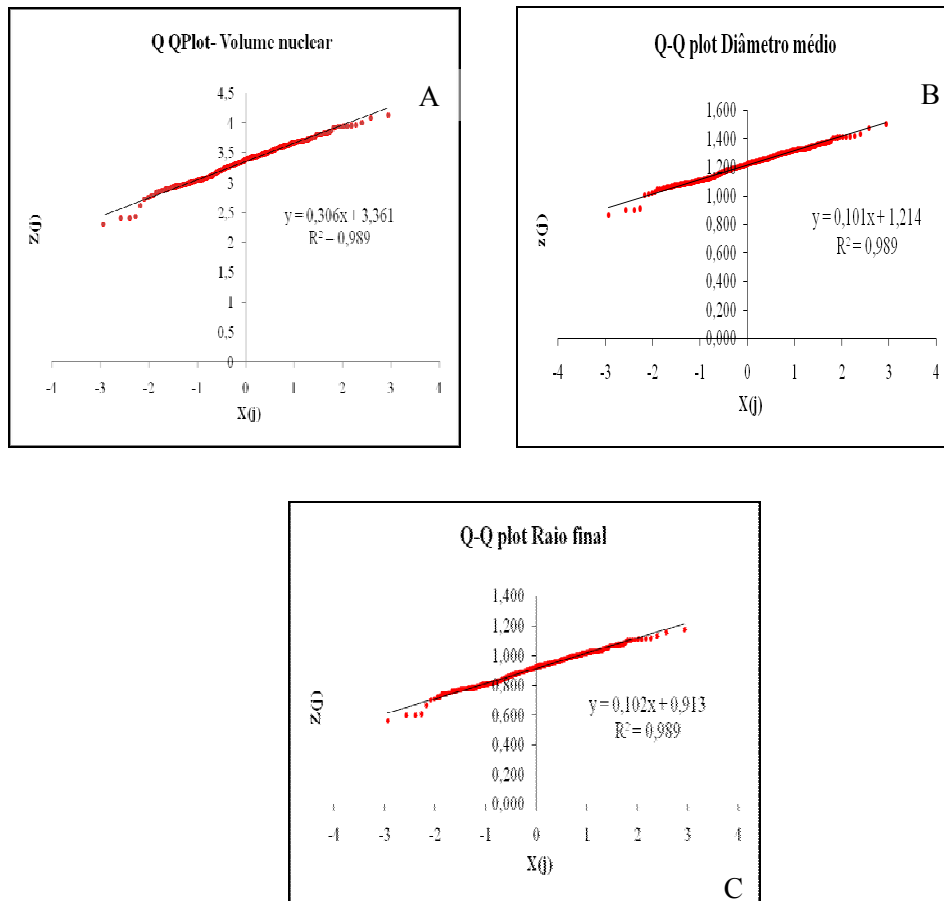


FIGURA 2 Gráficos do Q-Q plot para as variáveis volume nuclear (A), diâmetro médio (B), raio final (C) dos genótipos de milheto, capim elefante e híbrido triplóide. UFLA. Lavras-MG, 2008.

volume nuclear, diâmetro médio e raio final para logaritmo ajustou os mesmos para distribuição normal ($r^2 \rightarrow 1$) para todos os genótipos, possibilitando a realização de análise de variância. Para todos os caracteres avaliados, o teste F da análise de variância foi significativo ($P \leq 0,01$), indicando que há diferenças entre os genótipos de *Pennisetum* sp. (Tabela 1). Os maiores valores médios, segundo o teste Scott- Knott, para raio, diâmetro e volume nuclear foram observados para o milheto, seguidos pelo híbrido triplóide e, finalmente, pelo capim elefante (Tabela 2).

TABELA 1 Análise de variância para raio, diâmetro e volume dos núcleos interfásicos de milho, capim elefante e híbrido triplóide. UFLA. Lavras-MG, 2008.

FV	Quadrados Médios			
	GL	RAIO (μm)	DIÂMETRO (μm)	VOLUME (μm^3)
Tratamento	2	0,286318**	0,291985**	2,576080**
Erro	297	0,008669	0,008537	0,078078
Total	299			
CV		10,19	7,60	8,31

** : Teste de F significativo a 1% de probabilidade

TABELA 2 Valores médios para os parâmetros raio, diâmetro e volume nuclear de milho, capim elefante e híbrido triplóide UFLA. Lavras-MG, 2008.

GENÓTIPOS	RAIO (μm)	DIÂMETRO (μm)	VOLUME (μm^3)
Capim elefante	7.33 c	14.64 c	1863.11 c
Híbrido triplóide	8.53 b	17.07 b	2926.11 b
Milho	9.38 a	18.77 a	3930.89 a

*Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si a um nível de 5% de probabilidade (Scott-Knott).

Esses resultados relacionaram-se positivamente com o conteúdo de DNA desses táxons, uma vez que, de acordo com Martel et al. (1997) e Campos (2007), o capim elefante apresenta quantidade inferior de DNA em relação ao milho e o híbrido interespecífico triplóide, valor intermediário entre os parentais.

4.2 Bandeamento - C

A distribuição da heterocromatina por Bandeamento-C no milho e no capim elefante não havia sido relatada. Somente em milho, encontram-se estudos utilizando o Bandeamento-Q por Prabakaran et al. (1991) e o padrão de

distribuição de seqüências ricas em AT pela técnica de FISH por Kamm et al. (1994). Isto demonstra a importância deste estudo para servir de base para outras técnicas de bandeamento (NOR, CMA, DAPI) e citogenética molecular (FISH e GISH).

A análise de bandeamento cromossômico do milheto possibilitou identificar bandas-C proximais nos pares 1, 2, 3, 5, 6 e 7 nos braços curtos e longos, sendo que no par 7, no braço curto, a banda ocupa toda a região entre o centrômero e o satélite. O par 4 apresenta bandas intersticiais nos dois braços (Figuras 4A, B e 6A).

No capim elefante, grandes blocos heterocromáticos centroméricos foram observados (Figura 5 A, B e 6B). Segundo Guerra (2000), a distribuição das bandas C depende do tamanho dos cromossomos. Cromossomos pequenos, com comprimento menor que 3 μ m, normalmente, apresentam bandas proximais e, à medida que aumenta o tamanho dos cromossomos, aumenta a frequência das bandas intersticiais e teloméricas. Os padrões de bandeamento observados para o milheto e capim elefante corroboram com esta afirmação, uma vez que bandas intersticiais foram encontradas somente nos cromossomos do milheto, cujos comprimentos variam entre 3 μ m e 5 μ m, de acordo com Barbosa et al. (2003). No capim elefante, com cromossomos menores que 3 μ m (Barbosa et al. 2003), somente bandas centroméricas, denominadas proximais por Guerra (2000), foram encontradas.

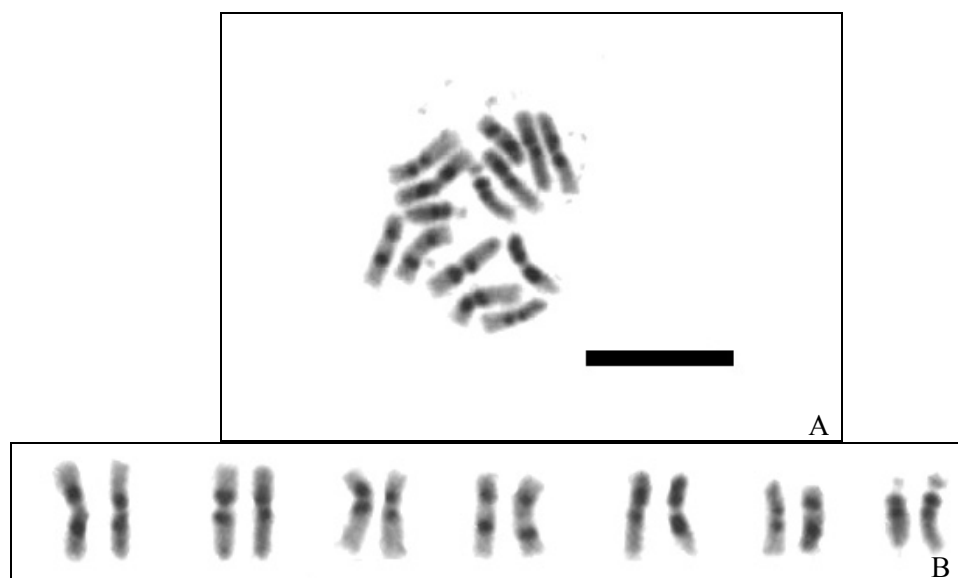


FIGURA 4 Bandeamento-C em *Pennisetum glaucum*. A – Metáfase mitótica. B - Cariograma. Barra = 10 μ m. UFLA. Lavras-MG, 2008

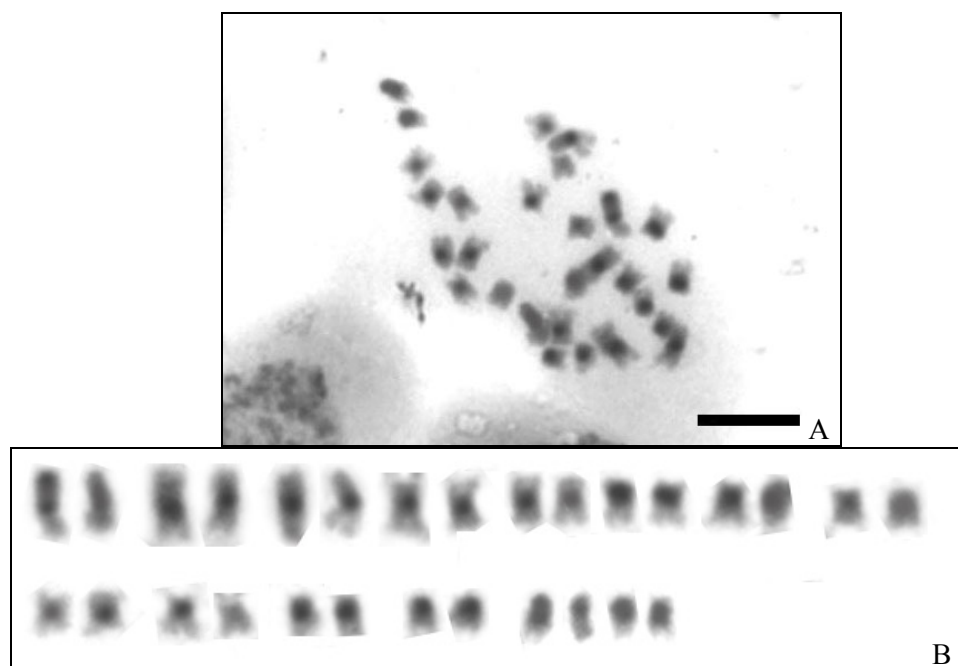


FIGURA 5 Bandeamento-C em *Pennisetum purpureum* A – Metáfase mitótica. B - Cariograma. Barra = 10 μ m. UFLA. Lavras-MG, 2008

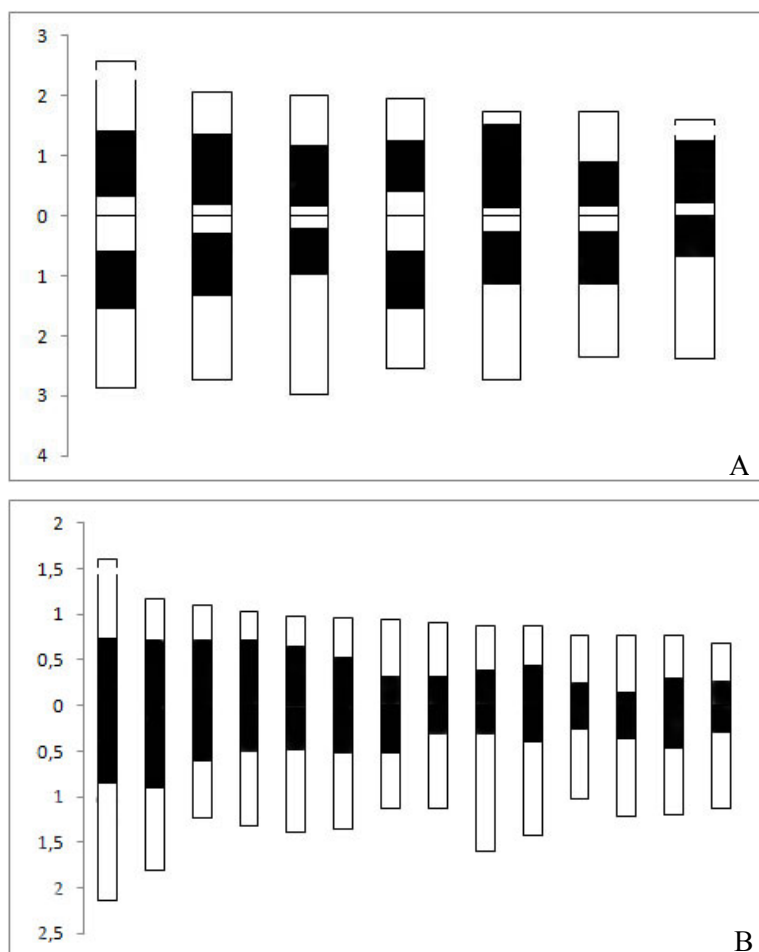


FIGURA 6 Idiogramas representando o padrão de bandejamento-C em *P. glaucum* (A) e *P. purpureum* (B). Valores em micrômetros no eixo Y. UFLA. Lavras-MG, 2008.

Prabakaran et al. (1991) realizaram o bandejamento-Q em *Pennisetum americanum*, sinônimo de *P. glaucum*, e verificaram polimorfismo nos pares cromossômicos 1, 3, 4 e 6, em função de diferenças no tamanho ou posição das bandas nos homólogos. Uma análise mais detalhada do kariograma do milheto com bandejamento-C verifica-se também certo grau de polimorfismo nos pares 1, 4, 5 e 6.

Segundo Prabakaran et al. (1991), a coloração com quinacrina no milheto permitiu identificar, nos núcleos interfásicos, uma variação na estrutura e no número dos cromocentros. Nas prófases, os autores constataram grandes blocos corados. Segundo esses autores, a quinacrina cora, preferencialmente, regiões heterocromáticas condensadas.

O padrão de bandas evidenciado pelo corante fluorescente quinacrina mostarda revela, com muita eficiência, regiões ricas em AT. Segundo Saitoh & Laemmli (1993), o padrão de banda-Q é muito semelhante ao da Banda-C. Entretanto, no presente trabalho, o padrão de banda-C mostrou-se diferente, uma vez que foram observadas bandas-C proximais na maioria dos cromossomos do milheto, enquanto que as bandas-Q foram teloméricas nos braços curtos dos pares 1, 2, 3, 5, 6 e 7 e nos longos 1, 6 e 7, e centromérica entre os cromossomos do par 4.

Verificou-se, ainda, a proporção da heterocromatina constitutiva no milheto (Figura 7A) e capim elefante (Figura 7B), sendo que o capim elefante apresenta uma proporção de heterocromatina constitutiva de 7% maior que o milheto. Dessa forma, supõe-se que processos de poliploidização poderiam ter gerado valores divergentes entre as espécies, visto que o capim elefante é alopoliplóide. Eventos associados à poliploidia são dinâmicos e recorrentes e podem ser acompanhados de mudanças epigenéticas e genéticas, levando a uma reestruturação no genoma por meio de silenciamento gênico, a rearranjos cromossômicos, à ação de transposons e à amplificação de cópias altamente repetitivas (Schifino-Wittmann, 2003; Soltis et al., 2003; Feldman & Levy, 2005).

Considerando que uma das estratégias do melhoramento do capim elefante inclui a obtenção de híbridos interespecíficos visando à introgressão de características de importância forrageira presente no milheto, as técnicas de bandejamento cromossômico e de citogenética molecular (FISH e GISH) são de extrema importância. Isso porque fornecerão subsídios para a identificação e

caracterização dos cromossomos, auxiliando a construção de mapas físicos e permitindo distinguir os genomas A, A' e B do capim elefante e do milho, nos híbridos interespecíficos e raças cromossômicas.

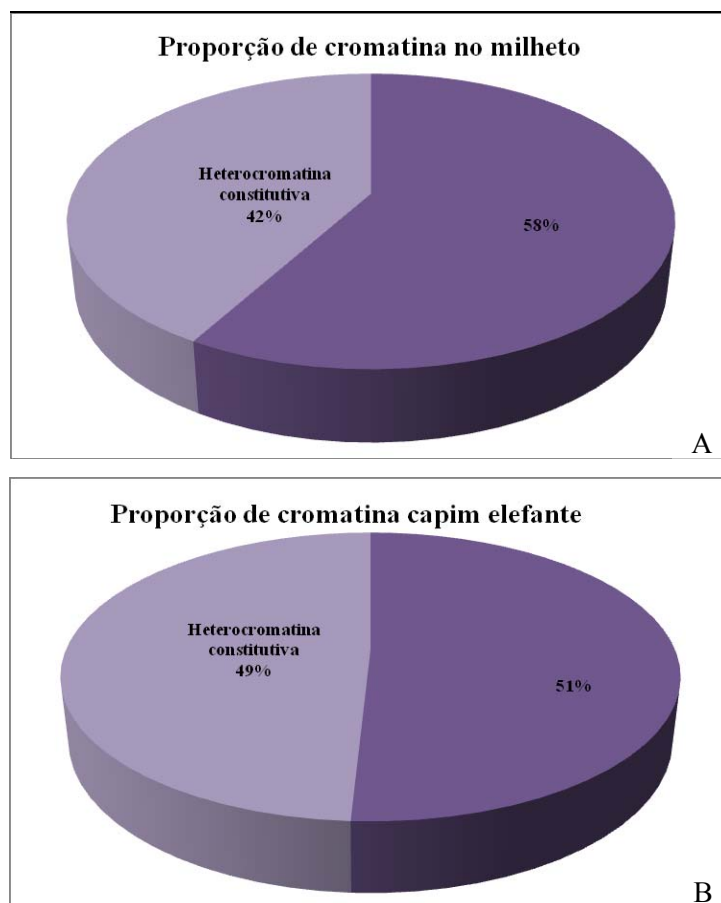


FIGURA 7 Proporção de heterocromatina constitutiva no milho (A) e capim elefante (B). UFLA. Lavras-MG, 2008.

5 CONCLUSÕES

- A estrutura dos núcleos interfásicos do capim elefante difere daquela observada no milheto e híbrido interespecífico.

- Os núcleos interfásicos são maiores no milheto e menores no capim elefante, enquanto o híbrido triplóide apresenta núcleos de tamanho intermediário. Esses valores relacionam-se positivamente com o conteúdo de DNA desses táxons.

- O milheto e o capim elefante apresentam diferentes padrões de heterocromatina constitutiva, sendo a proporção desta maior no capim elefante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. C. de. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milheto tratados com agentes antimitóticos**. 2002. 72 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ABREU, J. C.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; BARBOSA, S. Mixoploidia em híbridos de capim elefante x milheto tratados com agentes antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.11, p.1629-1635, 2006.
- AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; VOSA, C. G. C-banding in maize II. Identification of somatic chromosome. **Heredity**, v.54, p. 37-42, 1985.
- AKIYAMA, Y.; GOEL, S.; CHEN, Z.; HANNA, W.; OZIAS-AKINS, P. *Pennisetum squamulatum*: Is the Predominant Cytotype Hexaploid or Octaploid? **Journal of Heredity**, v. 97, n. 5, p. 521–524, 2006.
- AKIYAMA, Y.; CONNER, J.A.; GOEL, S.; MORISHIGE, D.T.; MULLET, J.E.; HANNA, W.W.; OZIAS-AKINS, P. High-resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic regions associated with apomixis. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1733-1741, 2004.
- BADAEVA, E. D.; BOGUSLAVSKY, R. L.; BADAIEV, N. S.; ZELENIN, A. V. Intraspecific chromosomal polymorphism of *Triticum araraticum* (Poaceae) detected by C-banding technique. **Plant Systematics and Evolution**, v. 169, n. 1, p. 13-24, 1998.
- BAILEY, J. P.; STACE, C. A. Chromosome banding and pairing behaviour in *Festuca* and *Vulpia* (Poaceae, Pooideae). **Plant Syst. Evol.**, v. 182, p. 21-28, 1992.
- BARBOSA, S. **Citogenética de híbridos entre *Pennisetum purpureum* Schumack e *Pennisetum glaucum* L. e seus genitores**. 2000. 48 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Cytogenetic of *Pennisetum purpureum* Schumach. x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents.

Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 27, n. 1, p. 26-35, 2003.

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

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

BAUCHAN, G. R.; HOSSAIN, M. A. Karyotypic Analysis of C-Banded Chromosomes of Diploid Alfalfa: *Medicago sativa* ssp. *caerulea* and ssp. *Falcate* and Their Hybrid. **The Journal of Heredity**, v. 88, n.6, p.533-537, 1997.

BAUMANN, T. W. Heterochromatin und DNS-Replikation bei *Scilla sibirica*. **Exp. Cell Res**, v. 64, p. 323-330, 1971.

BENNETT, S.T.; THOMAS, S.M. Karyological analysis and genome size in *Milium* (Gramineae) with special reference to polyploidy and chromosomal evolution. **Genome**, v. 34, p. 868-878, 1991.

BENNETT, S.T.; LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. Chromosome identification and mapping in the grass *Zingiber biebersteiniana* ($2n = 4$) using fluorochromes. **Chromosome Res.**, v. 3, p. 101-108, 1995.

BENNETT, M. D.; BHANDOL, P.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern Uses 807 new estimates. **Annals of Botany**, v. 86, p. 859-909, 2000.

BILDANOVA, L. L.; BADAIEVA, E. D.; PERSHINA, L. A.; SALINA, E. A. Molecular Study and C-banding of chromosomes in common wheat alloplasmic lines obtained from the backcross progeny of barley–wheat hybrids *Hordeum vulgare* L. ($2n = 14$) $\times$ *Triticum aestivum* L. ($2n = 42$) and differing in fertility. **Russian Journal of Genetics**, v. 40, n. 12, p. 1383–1391, 2004.

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

BODGAN, A.V. **Tropical pastures and fodder crops**. New York: Longman,

1977. 475p.

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

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

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

CARVALHO, C. R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.).** 1995. p. 127. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CHOWDARI, K. V.; DARVIERWALA, V. S.; GUPTA, P. K.; RANJAEKAR, P. K. Genotype identification and assesment of genetic relationships in pearl milhet. **Theory Applied Genetics**, v. 97, p. 154-162, 1998.

CHEIK, A.T. O.; SAVADOGO, A.; YAYA, B.; ALFRED, T. S. A Comparative Study on Nutritional and Technological Quality of Fourteen (14) Cultivars of Pearl Millets [*Pennisetum glaucum* (L) Leeke] in Burkina Faso. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 5, n.6, pp. 512-521, 2006.

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

DAS, A. B.; MALLICK, R. Karyotype diversity and interspecific 4C DNA variation in *Bupleurum*. **Biologia Plantarum**, v. 35, p. 355-363, 1993.

FARIA, V.P. de. Formas de uso do capim-elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM-ELEFANTE, 2., 1994, Coronel Pacheco. **Anais...** Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1994. p.139-148.

FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Allopoliploidy – a sharpening force in the evolution of wheat genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, p. 250-258, 2005.

FRIEBE, B.; TULEEN, N.; JIANG, J.; GILL, B.S. Standard karyotype of *Triticum longissimum* and its cytogenetic relationship with *T. aestivum*. **Genome**, v. 36, p. 731-742, 1993.

FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. **Plant chromosome**: laboratory methods. Boca Raton: CRC, 1996. p. 247.

GILL, K. S. Pearl millet and its improvement. New Delhi: ICAR, Krishi/Anusandhan/ Bhavan/ PUSA, 1991.

GILDENHUYS, P.; BRIX, K. Cytogenetic evidence of relationship between the X-7 and X-9 groups of *Pennisetum* species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 31, n. 4, Jan. 1961

GOEL, S.; CHEN, Z.; CONNER, J. A.; AKIYAMA, Y.; CONNER, J.A.; BASU, M.; GUALTIERI, G.; HANNA, W.W.; OZIAS-AKINS, P. Comparative physical mapping of the apospory specific genomic regions in the apomictic grasses: *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. **Genetics**, v. 173, p. 389-400, 2006.

GOEL, S.; CHEN, Z.; CONNER, J. A.; AKIYAMA, Y.; HANNA, W. W.; OZIAS-AKINS, P. Delineation by Fluorescence *in situ* hybridization of a single hemizygous chromosomal region associated with aposporous embryo sac formation in *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. **Genetics**, v. 168, p. 1069-1082, 2003.

GÓMEZ, E. O. **Estudo da pirólise rápida de capim-elefante em leito fluidizado borbulhante mediante caracterização dos finos de carvão**. 2002. 369 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

GUENGUANT, J. P.; BANOIN, M. **Dynamique des populations, disponibilité des terres et adaptation des régimes fonciers**: le cas du Niger. Paris: CICRED-FAO, 2003. 157p.

GUERRA, M. dos S. O uso do Giemsa na citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandejamento. **Cienc. e Cult.**, v. 35, p. 190-193, 1983.

GUERRA, M. dos S. New chromosome number in *Rutaceae*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 146, n. 1-2, Mar. 1984

GUERRA, M. **Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1985. p. 137-153.

GUERRA, M. dos S. Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v.158, p. 107-115, 1987a.

GUERRA, M. dos S. Cytogenetics of Rutaceae IV. Structure and systematic significance of interphase nuclei. **Cytologia**, v. 52, p. 213-222, 1987b.

GUERRA, M. dos S. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142p.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

GUERRA, M.; GARCÍA, M. A. Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae) **Genome**, v.47, p. 134-140, 2004.

GUPTA, V. P. Fodder improvement in *Pennisetum*. **Forage Res.**, v. 1, p. 54-60, 1975.

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

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

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

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, Nov./Dec. 1984.

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

HARLAN, J.R. Agriculture origins: centers and noncenters. **Science**, v.174, p.468-474, 1971.

HAGRA, A. A.; KISHII, M.; TANAKA, H.; SATO, K.; TSUJIMOTO, H. Genomic differentiation of *Hordeum chilense* from *H. vulgare* as revealed by repetitive and EST sequences. **Genes & Genetic Systems**, v. 80, n. 3, p.147-159, 2005.

HEITZ, E. Die Herkunft der Chromocentren. **Planta**, v. 18, p. 571-636, 1932.

HENEEN, W. K.; BRISMAR, G. R. Identification of B Chromosome using giemsa banding in medicago. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 90, n. 3, p. 428-429, 1999.

HENNIG, W. Heterochromatin. **Chromosoma**, v.108, p. 1-9, 1999.

HOSSAIN, M. A.; BAUCHAN, G. R. Identification of B Chromosomes Using Giemsa Banding in *Medicago*. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 90, n. 3, p. 428-429, 1999.

JAUHAR, P. P. Inter- and intragenomal chromosome pairing in an inter-specific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. **Genetica**, Dordrecht, v. 39, n.3/4, p. 360-370, 1968.

JAUHAR, P. P. Genetic control of diploid-like meiosis in hexaploid tall fescue. **Nature**, London, v. 254, n. 5501, p. 595-597, Apr. 1975.

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. A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. 2thed. Texas: Prentice Hall/University of Wisconsin, 1988. p.607.

JUAN, C.; STOCKERT, E.; PINNA-SENNEB, J.; L. BELLAA; LISANTIB, J. A. DNA-binding fluorochromes: correlation between of mouse metaphase chromosomes and hydrogen bonding to adenine-thymine base pairs. **Acta histochemica**, v. 106, p. 413-420, 2005.

KAKEDA, K.; FUKUI, K. YAMAGATA, H. Heterochromatic differentiation in barley chromosome revealed by C- and N-banding techniques. **Theory Applied Genetics**, v. 81, p. 144-150, 1991.

KAMM, A.; SCHMIDT, T.; HESLOP- HARRISON, J. S. Molecular and physical organization of highly repetitive, undermethylated DNA from *Pennisetum glaucum* **Mol. Gen. Genet.**, v. 244, p. 420-425, 1994.

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

KOKUBUGATA, G.; KONDO, K. Differential fluorescent- banding patterns in chromosome of four species do *Cycas* (Cycadaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.120, p.51-55, 1996.

KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V. S. Studies on the interespecific hybrid of *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. X *P. purpureum* Schumach. III. The cytogenetics of the colchicine-induced amphidiploid. **Genetica**, Dordrecht, v. 27, n. 2, p. 253-272, 1954.

KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V.; NAIR, N. H. An autotraploid in pearl millet. **Current Science**, v. 19, p. 252-253, 1950.

KULA, A.; DUDZIAK, B.; SLIWINSKA, E.; GRABOWSKA-JOACHIMIAK, A.; STEWART, A.; GOLCZYK, H.; JOACHIMIAK, A. J. Cytomorphological studies on American and European *Phleum commutatum* Gaud. (Poaceae). **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 48, n. 1, p. 99-108, 2006.

LAURESEN, I. B. L.; SEBERG, O. L. E. Karyotypes of *Elymus scabrifolius* (Poaceae: Triticeae) from South America studied by banding techniques and in situ hybridization. **Hereditas**, v. 135, p. 41-51, 2001.

LELLEY, T.; JOSIFEK, K.; KALTSIKES, P. J.; Polymorphism in Giemsa C-banding pattern of rye chromosome. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Montreal, v. 20, n. 3, p. 307-312, 1978.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclatura for centromeric activity of essential oils from Brazilian plants. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

LIU, C. J.; WITCOMBE, R.; PITTAWAY, T. S.; NASH, M.; HASH, C. T.; BUSSO, C. S.; GALE, M. D. An RFLP. based genetic map of pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Theor. Applied Genetic**, v. 89, p. 481-487, 1994.

MANARA, N. T. F. **Citogenética de variedades de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.)** 1973. 63 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

MARIAC, C.; LUONG, V.; KAPRAN, I.; MAMADOU, A.; SAGNARD, F.; DEU, M.; CHANTEREAU, J.; GERARD, B. Diversity of wild and cultivated pearl millet accessions (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.) in Niger assessed by microsatellite markers. **Theory Applied Genetic**, v. 114, p. 49-58, 2006.

MARIE, N.T.F. **Flore de l’ Afrique du Nord**. Paris: Paul Lechevalier, 1952.

MALDONADO, J. A. El pasto elefante o grama elefante *Pennisetum purpureum* (Schum). **Revista Industrial y Agrícola de Tucuman**, Tucuman, v. 39, n. 1-9, p. 22-29, 1955.

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

MARTEL, E.; DE NAY, D.; SILJAK-YAKOVIEV, S.; BROWN, S.; SARR, A. Genome Size Variation and Basic Chromosome Number in Pearl Millet and Fourteen Related *Pennisetum* Species. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 88, n. 2, p. 139-143, Mar./Apr. 1997.

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

MOUSSEL, B. Contribution a l’etude cytotoxinomique des mytacées. **Mem. Mus. Natl. Hist. Nat. Ser. B. Bot.**, v. 16, p. 91-125, 1965.

MONDIM, M.; NETO, A. Citogenética vegetal enfatizando a família Orchidaceae. **Orchidstudium**, v. 4, p. 24-54, 2006.

MUKAI, Y.; FRIEBE, B.; GILL, B. S. Comparison of C-banding patterns and *in situ* hybridization sites using highly repetitive and total genomic rye DNA probes of .Imperial. rye chromosomes added to .Chinese Spring. wheat. **Japan Journal Genetics**, v.67, p.71-83, 1992.

NAGL, W. **Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution**. Amsterdam: North-Holland, 1978.

OKADA, H. Karyomorphological studies of Wood Polycarpicae. **J. Sci. Hiroshima Univ.** v. 2, n. 15, p. 115-200, 1975.

PAIVA, E. A. A. **Meiose em híbridos hexaplóides de capim-elefante e milheto**. 2006. 63p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

PANTULU, J. V. Pachytene pairing and meiosis in the F1 hybrid of *Pennisetum typhoides* and *P. purpureum*. **Cytologia**, Tokyo, v. 32, n. 3/4, p. 532-541, 1967.

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

PANTULU, J. V.; VENKATESWARLU, J. Morphology of pachytene chromosome of *Pennisetum purpureum* Schum. **Genética**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 41-44, 1968.

PASSOS, L. P.; CARVALHO, L. de A.; MARTINS, C.E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A. V. **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: EMPRAPA-CNPGL, 1999. 229p.

PEDROSA, A.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange (*Citrus sinensis* (L) Osbeck). **Theory Applied Genetic**, v. 100, p. 361-367, 2000.

PEREIRA, A. V. Escolha de variedades de capim –elefante. In: SIMPOSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 1992, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1992. p. 47-62.

PEREIRA, A. V. Germoplasma e diversidade genética do capim-elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM-ELEFANTE, 2., 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Coronel Pacheco-MG: EMBRAPA-CNPGL, 1994. p. 1-11.

PEREIRA, A. V. Germoplasma e diversidade genética do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). In: PASSOS, L. P.; CARVALHO, L. A.;

MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A. V. (Ed.). **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 1-16.

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, Apr./June 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, 2001. p. 549-602.

PIGNONE, D.; GALASSO, I.; ROSSINO, R.; MEZZANOTTE, R. Characterization of *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy chromosomal chromatin by means of in situ restriction endonucleases, fluorochromes, silver staining and C-banding. **Chromosome Res.**, v. 3, p. 109-114, 1995.

PRABAKARAN, K. A. A. J.; VAIDYANATHAN, P.; DREE ANGASAMY S. R. Quinacrine fluorescent karyotypic pattern in *Pennisetum americanum* (L.) Leeke. **Cytologia**, v. 56, n. 2, p. 229-232, 1991.

RANGASWAMY, S. R. Cytological studies on diploid and polyploidy taxa of the genus *Pennisetum* Rich. **Genetica**, Dordrecht, v. 43, n. 2, p. 257-273, 1972.

RASCH, E. M.; WYNGAARD, G. A. Change in morphology associated with elevated DNA levels during in cyclopoid copepods with chromatin diminution. **Invertebrate Biology**, v. 125, n. 1, p. 56-69, 2006.

RAU, N. S. On the chromosome numbers of cultivated plants of south India. **Journal of the Indian Botanical Society**, v. 8, n. 2, p. 126-128, 1929.

RAYBURN, A. L.; PRICE, H. J.; SMITH, J. D.; GOLD, J. R. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 72, p. 1610-1617, 1985.

REIS, M. C. dos. **Potencial de utilização da seleção recorrente na população de capim-elefante hexaplóide**. 2005. 67 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

REMIGEREAU, M. S.; ROBIN, O.; YAKOVLEV, S. S.; SARR, A.; ROBERT,

- T.; LANGIN T. A novel miniature-inverted repeat family of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) related to the *PIF* superfamily of maize. **Genetica**, v. 128, n. 1-3, p. 205-216, 2006.
- RODRIGUES, L. R. de A.; PEDREIRA, J. V. S.; MATTOS H. B. de. Adaptação ecológica de algumas plantas forrageiras. **Zootecnia**, Nova Odessa, v.13, n.4, p.201-218, 1975.
- SAITOH, Y.; LAEMMLI, V. K. From the chromosomal loops and the scaffold to the classic bands of the metaphase chromosome. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 83, 1999.
- SCHANK, S. C.; DIZ, D. A.; BATES, D. B.; THOMPSON, K. E. Genetic improvement of napiergrass and hybrids with pearl millet. **Biomass and Bioenergy**, v. 5, p. 35-40, 1993.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução de plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**. Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 151-157, 2004.
- SCHWAZACHER, D.; AMBROS, P. SHWEIZER, D. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analyses. **Plant systematic and evolution**, v.134, p. 293-297, 1980.
- SEARS, E. R. Genetic control of chromosome pairing in wheat. **Annual Review in Genetics**, Palo Alto, v. 10, p. 31-51, 1976.
- SREE RANGASAMY, S. R. Cytological studies on diploid and polyploidy taxa of genus *Pennisetum* Rich. **Genetica**, v. 43, p. 257- 273, 1972.
- SETHI, G. S.; KALIA, H. R.; GHAI, B. S. Cytogenetical studies of three interspecific hybrids between *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. and *P. purpureum* Schumach. **Cytologia**, v. 35, n. 1, p. 96-101, 1970
- SOBRINHO, F.; PEREIRA, A. V.; LEDO, F. I. S.; BOTREL, M. A.; OLIVEIRA, J. S.; XAVIER, D. F. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim elefante e milheto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 873-880, 2005.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; TATE, J. A. Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. **New Phytologist**, v. 161, p. 173-191, 2003.

- SOUSA, S. M. **Bandeamento Cromossômico em *Lippia alba***. 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- 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: A. Wesley, 1971. 215 p.
- SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. London: Unwin. Human, 1990. p. 434.
- TANAKA, R. Types of resting nuclei in Orchidaceae. **Bot. Mag.**, v. 84, p. 118-122, 1971.
- TECHIO, V. H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum spp.*** 104 p. 2002. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 353-362, June 2006.
- TIMBÓ, A. L. O. **Obtenção de protoplasto de híbridos triplóides entre o capim-elefante e o milho**. 2007. 44p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- TUNA, M.; VOGEL, K.P.; ARUMUGANATHAN, K. Cytogenetic and Nuclear DNA Content Characterization of Diploid *Bromus erectus* and *Bromus variegates*. **Crop Science**, v. 46, p. 637-641, 2006.
- UPRETY, D. C.; AUSTIN, A. Varietal differences in nutritional composition of improved bajra (pearl millet) hybrid. **Bulletin of Grain Technology**, v.10, p. 249-255, 1972.
- VICHIATO, M. R. M.; VICHIATO, M.; PASQUAL, M, CASTRO, D. M. C.; DUTRA, L. F. Indução e identificação de tetraplóides em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Rev. Ciên. Agron.**, Fortaleza, v. 38, n. 4, p. 385-390, 2007.

VOSA, C. G. The basic karyotype of rye (*Secale cereal*) analysed with Giemsa and fluorescence methods. **Heredity**, v. 33, p. 403 – 408, 1974.

VOSA, C. G. Chromosome banding in plant. In: SHARMA, K.; SHARMA, A. (Ed.). **Chromosome and cell genetics**. London: Gordon and Breach Science, 1985. p. 79-104.

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, 1995. 24 p. (EMBRAPA-CNPGL. Documentos, 60).

WEIMARCK, A. Heterochromatin polymorphism in the rye karyotype as detected by Giemsa C-banding technique. **Hereditas**, Landskrovia, v. 79, p. 293-300, 1975.