

CITOMETRIA DE FLUXO NA ANÁLISE GENÔMICA EM HÍBRIDOS ENTRE CAPIM ELEFANTE E MILHETO

**JOSÉ MARCELLO SALABERT DE CAMPOS¹; CAIO CÉSIO SALGADO¹;
PÂMELA SOUZA SILVA²; CAIO CÉSAR DE SOUZA ALVES³; LISETE
CHAMMA DAVIDE¹; ANTÔNIO VANDER PEREIRA⁴; LYDERSON FACIO
VICCINI²**

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética, CEP 37200-000, Lavras-MG. Email: jmscampos@yahoo.com.br

Resumo

Uma das estratégias do programa de melhoramento do capim elefante é recorrer à hibridação entre essa espécie e o milheto. O híbrido resultante é triploide e infértil, uma das limitações do seu emprego no melhoramento. A utilização de técnicas citogenéticas para indução de duplicação cromossômica desse híbrido é uma das soluções. Adicionalmente, é essencial a disponibilidade de tecnologia para análise rápida e confiável de um grande número de plantas submetidas aos tratamentos de poliploidização. A citometria de fluxo é uma dessas tecnologias, podendo ser utilizada larga-escala. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo de análise genômica em capim elefante, milheto e seus híbridos triploides e hexaploides induzidos via duplicação cromossômica. As quantidades de DNA foram determinadas em 4,66pg, 4,52pg e 4,56pg respectivamente para o milheto M-41, capim elefante BAG-19 e o triploide M-41xBAG-19. Quinze plantas submetidas à indução de duplicação cromossômica foram analisadas por citometria. Destas, dez não responderam ao tratamento e cinco mostraram-se como mixoploides (com células triploides e hexaploides). **Palavras-chave:** *Pennisetum purpureum*, *P. glaucum*, citometria de fluxo, duplicação cromossômica.

1. Introdução

O gênero *Pennisetum* Rich é um dos mais importantes gêneros da família Poaceae, sendo *Pennisetum purpureum* Schumacher (capim elefante) e *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (milheto) as espécies cultivadas de maior importância econômica e forrageira do gênero (Pereira et al., 2000).

² Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Biologia, Laboratório de Genética, Bairro Martelos, CEP 36036-900, Juiz de Fora-MG.

³ Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Imunologia, Laboratório de Imunologia, Bairro Martelos, CEP 36036-900, Juiz de Fora-MG

⁴ Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, nº 610, Bairro Dom Bosco, CEP 36038-330, Juiz de Fora-MG

Considerando a capacidade do capim elefante de trocar alelos com outras espécies de *Pennisetum*, uma das estratégias do programa de melhoramento é recorrer à hibridação entre o capim elefante e o milho, buscando reunir no híbrido, algumas características desejáveis do milho (Pereira et al., 2000). A hibridação entre ambas as espécies produz um híbrido triploide infértil, o que tem sido apontado como um problema, limitando o seu emprego nos programas de melhoramento.

A restauração da fertilidade do híbrido pode ser conseguida pela duplicação do conjunto cromossômico utilizando tecnologia citogenética, produzindo um híbrido hexaploide (Hanna e Dujardin, 1986). Ao mesmo tempo, técnicas para confirmação da ploidia são fundamentais para o acompanhamento desses híbridos e dos materiais obtidos a partir dos experimentos de indução de poliploidia. A citometria de fluxo é usada para mensurar a quantidade de DNA de núcleos, permitindo avaliar o nível de ploidia, representando assim uma ferramenta útil no acompanhamento de todo o processo de indução de poliploidia. A metodologia representa um ganho tecnológico em relação à contagem cromossômica para avaliação de ploidia, pois permite a análise de forma rápida de um grande número de plantas.

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo de utilização da citometria de fluxo para análise genômica em híbridos entre capim elefante e milho com potencial utilização em larga-escala na avaliação de ploidia de plantas obtidas por técnicas citogenéticas de indução de poliploidia.

2. Material e Métodos

2.1 Híbrido triploide

O híbrido triploide obtido a partir do cruzamento dos materiais (BAG-19) de capim elefante e (M-41) de milho foi escolhido para a condução dos experimentos baseado numa análise dialélica onde este híbrido apresentou boa capacidade específica de combinação (Daher, 2003).

2.2 Indução de duplicação cromossômica em híbridos triploides

2.2.1 Exposição de seedlings in vitro

As sementes triploides híbridas foram desinfestadas e inoculadas em todos de ensaio contendo meio MS. Os seedlings com 60 dias de cultivo in vitro foram selecionados para tratamentos de indução de duplicação. 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 com colchicina para indução de poliploidia. Os explantes foram mergulhados até a altura do coleto em solução de colchicina 0,1% por 24 horas. Posteriormente os explantes foram assepticamente lavados em três bacteriais de água destilada estéril e inoculados em meio MS, permanecendo neste meio por 60 dias até a etapa de aclimação e transferência para os vasos em casa de vegetação.

2.3 Análise por citometria de fluxo

Para o BAG-19 de capim elefante, o M-41 de milho e o híbrido triplóide in vitro foram realizadas cinco repetições constituídas da análise de 5 plantas. Quinze seedlings obtidos a partir dos experimentos de indução de duplicação cromossômica foram avaliados por citometria de fluxo para estimativa da quantidade de DNA. Para a obtenção da suspensão de núcleos utilizados na análise por citometria de fluxo foi utilizado o protocolo descrito por Galbraith et al., (1983). O tampão de lise LBO1 descrito por Dolezel and Bartos (2005) foi utilizado para a obtenção dos núcleos que posteriormente foram corados com solução de iodeto de propídeo, prosseguindo-se à análise das amostras no citômetro FacsCalibur para obtenção do parâmetro FL2-Iodeto de propídeo para estimativa da quantidade de DNA dos núcleos. Como padrão de comparação externo foi utilizado núcleos de *Pisum sativum* com 9,09 pg de DNA.

3 Resultados e discussão

Os resultados de quantidade de DNA para os materiais BAG-19 de capim elefante, M-41 de milho, e o híbrido triplóide in vitro são mostrados na Figura 1 e Tabela 1.

A posição do pico G1 dos núcleos de *Pisum sativum* (padrão externo de comparação) foi determinada no canal 255 e as estimativas das quantidades de DNA do M-41, BAG-19 e do híbrido triplóide foram obtidas pela posição relativa dos seus picos G1 em relação ao padrão (Tabela 1). Para o M-41 e o BAG-64 as estimativas foram de $4,66 \pm 0,188$ e $4,52 \pm 0,068$ pg de DNA respectivamente (Tabela 1). Como esperado, o híbrido triplóide deveria ter a média da quantidade de DNA entre os dois parentais (4,59pg), sendo o resultado observado de $4,56 \pm 0,142$ (Tabela 1).

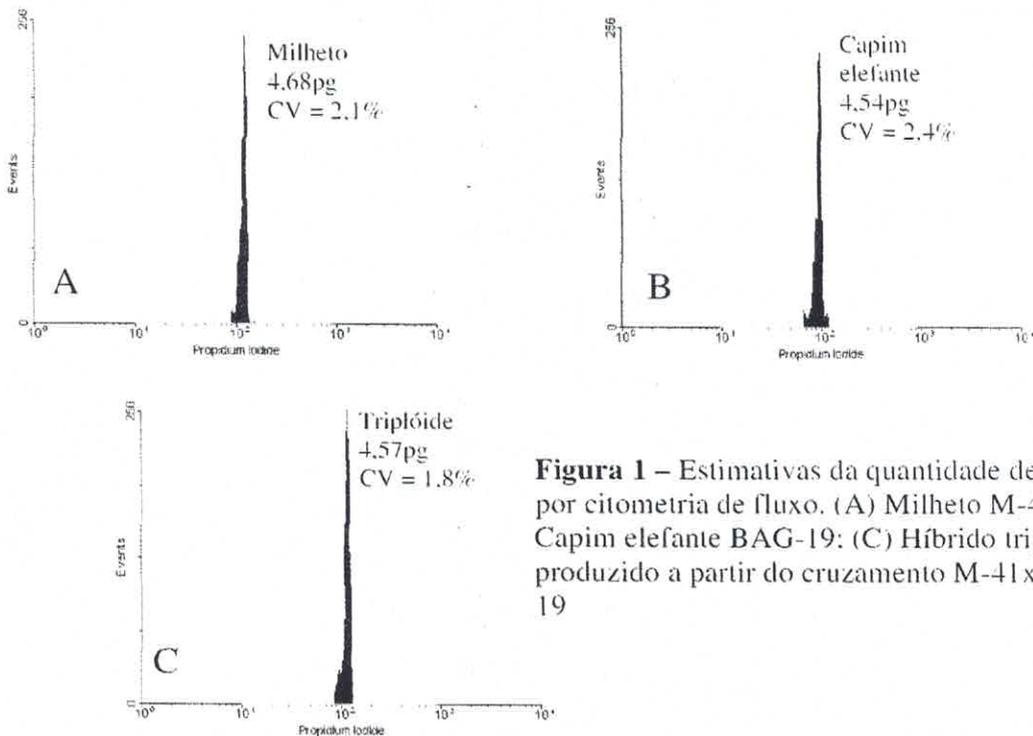


Figura 1 – Estimativas da quantidade de DNA por citometria de fluxo. (A) Milheto M-41; (B) Capim elefante BAG-19; (C) Híbrido triplóide produzido a partir do cruzamento M-41xBAG-19

Tabela 1 – Análise estatística das estimativas de quantidade de DNA.

Material	Repetições	Posição do Pico G1 (Canal)	Coefficiente de variação dos picos G1	Quantidade de DNA (pg)
Padrão <i>Pisum sativum</i>	5	255±1,58	2,76±0,041	9,09
Milheto M-41	5	131±5,24	2,90±0,032	4,66±0,188
Capim elefante BAG-19	5	127±2,00	3,10±0,071	4,52±0,068
Triplóide M-41xBAG-19	5	128±4,06	3,20±0,109	4,56±0,142

Como medida de confiabilidade da técnica, adotamos os coeficientes de variação dos picos G1, sendo aceito coeficientes de variação abaixo de 4% como medidas de boa confiabilidade nas estimativas de quantidade de DNA. Para os materiais analisados, os coeficientes variaram de 2,76 para *Pisum sativum* a 3,20 para o triplóide (Tabela 1).

Para os seedlings submetidos a indução de duplicação cromossômica, dez não responderam ao tratamento e possuíam somente células com quantidade de DNA correspondentes à quantidade 3X (triplóide). Cinco seedlings foram identificados como mixoplóides, possuindo tanto células 3X quanto 6X (Figura 2).

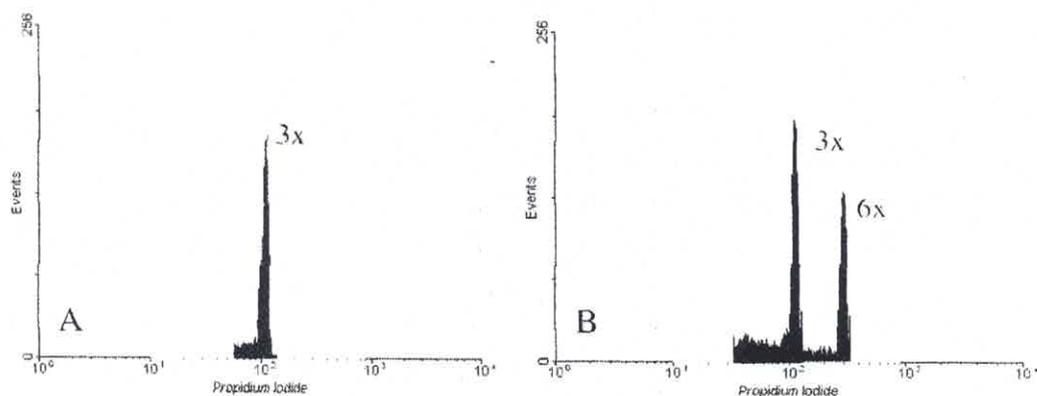


Figura 2 – Histogramas de quantidade de DNA em seedlings submetidos ao tratamento de indução de duplicação cromossômica. (A) Seedling triplóide; (b) Seedling mixoplóide (3x + 6x)

4 Conclusões

A técnica de citometria de fluxo permite a distinção de ploidia entre os seedlings obtidos via experimentos de indução de poliploidia, pela estimação da quantidade de DNA. Adicionalmente a técnica permite uma avaliação rápida de um grande número de seedlings, representando um ganho tecnológico na avaliação das plantas em relação à simples contagem do número cromossômico.

5 Referências Bibliográficas

- DAHER, R.F. Cruzamentos dialélicos entre capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e milho (*Pennisetum glaucum*) e suas relações com a divergência genética. 2003. 125 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, UENF.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95: 99-110. 2005
- GALBRAITH, D.W.; HARKINS, K.R.; MADDON, J.M.; AYRES, N.M.; SHARMA, D.P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. *Science* 220: 1049-1051. 1983.
- HANNA, W.W.; DUJARDIN, M. Cytogenetic of *Pennisetum schweinfurthii* Pilzer and its hybrids with pearl millet. *Crop Science*. 26: 499-553. 1986.
- 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 e milho (*P. purpureum* x *P. glaucum*) em função da idade da planta. *Ciência e Agrotecnologia*. 24: 490-499. 2000.

XX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química-MG

3, 4 e 5 de novembro de 2006 São João del-Rei, MG



“20 anos de Encontro Regional da SBQ-MG: Passado e Futuro”

Informações:
www.xxsbqmg.ufsj.edu.br
Fone/Fax: (32) 3379-2483



Organização:
Departamento de Ciências Naturais
Local:
Campus Santo Antônio