

Duplicação cromossômica em híbridos triplóides entre capim elefante e milho – Análise de ploidia por citometria de fluxo

José Marcello Salabert de Campos¹, Lisete Chamma Davide², Caio César Salgado³, Pâmela Souza Silva⁴, Caio César de Souza Alves⁵, Antônio Vander Pereira⁶, Lyderson Facio Viccini⁷

SP3578

P. 128

Introdução

Pennisetum Rich é um importante gênero da família Poaceae, sendo *Pennisetum purpureum* Schumach (capim elefante) e *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (milho) as espécies cultivadas de maior importância econômica e forrageira do gênero [1].

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 [1]. O resultado é um híbrido triplóide 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 hexaplóide. A disponibilidade de técnicas para confirmação da ploidia é essencial 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 dos núcleos, permitindo avaliar o nível de ploidia, representando um ganho tecnológico em relação à contagem cromossômica, 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.

Material e métodos

Os híbridos triplóides (Tabela 1) foram escolhidos para a condução dos experimentos baseado numa análise dialélica, onde esses híbridos apresentaram boa capacidade específica de combinação [2].

Seedlings triplóides com 60 dias de cultivo *in vitro* foram selecionados para os tratamentos de indução de duplicação cromossômica. Os explantes (obtidos por cortes a 2cm abaixo e 1,5cm acima do coleto) foram mergulhados até a altura do coleto em solução de colchicina 0,1% por 24 horas. Posteriormente os explantes foram assepticamente lavados em três baterias 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.

Para determinação da quantidade de DNA dos parentais por citometria de fluxo foram realizadas cinco repetições constituídas da análise de 5 plantas. A análise de ploidia das plantas obtidas após os experimentos de indução de duplicação cromossômica foram realizadas pelo método descrito por Galbraith et al. [3]. O tampão de lise LBO1 descrito por Dolezel et al. [4] 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 FACS Calibur para obtenção do parâmetro FL2-Iodeto de propídeo, para estimativa da quantidade de DNA dos núcleos. Como padrão de comparação externo foram utilizados núcleos de *Pisum sativum* com 9,09 pg de DNA.

Resultados

A quantidade de DNA estimada para os parentais e o esperado para os híbridos são mostrados na Tabela 1. Um histograma para determinação da quantidade de DNA dos parentais BAG-65 e M-35 é mostrado na Fig. 1A. O valor médio da quantidade de DNA esperada para os híbridos triplóides (4,58pg) foi utilizada em comparação com a quantidade de DNA do padrão (*Pisum sativum* = 9,09pg) para posicionamento dos picos G1 das amostras e identificação e seleção das plantas triplóides e hexaplóides após indução de duplicação cromossômica. A posição do pico G1 do padrão (após 5 amostras analisadas) foi estabelecida no canal 255±1,58. Efetuando-se o cálculo,

$$\text{Qta DNA esperada para o híbrido X } 255 = 9,09$$

1. Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas, UFLA, MG, CEP 37200-000. E-mail: jmscampos@yahoo.com.br
 2. Professora Titular do Departamento de Biologia, UFLA, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: ledavide@yahoo.com.br
 3. Graduando em Ciências Biológicas, UFLA, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: caiocesio@yahoo.com.br
 4. Mestranda em Imunologia, Genética e Biotecnologia, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: pamelagenetica@yahoo.com.br
 5. Mestrando em Saúde Brasileira, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: caiocsa@yahoo.com.br
 6. Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: avanderp@cnpq.embrapa.br
 7. Professor Titular do Departamento de Biologia, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330 Email: lyderson.viccini@ufjf.edu.br
- Apoio financeiro: FAPEMIG e CNPq.

temos os valores esperados de posicionamento dos picos G1 para plantas triploides em cada um dos cruzamentos (Tabela 1). Diante disso, amostras com quantidades de DNA do pico G1 próximas aos canais 127-129 foram determinadas como triploides, e amostras com quantidades de DNA do pico G1 próximas aos canais 254-258 (correspondente ao dobro da quantidade de DNA), foram identificadas como hexaploides. Entre os sobreviventes dos tratamentos de indução de duplicação cromossômica, 33 plantas foram analisadas por citometria (Tabela 1). Desse total, 6 plantas foram identificadas como hexaploides (18%). Histogramas representativos de plantas triploides e hexaploides após experimentos de indução de duplicação cromossômica são mostrados respectivamente nas Fig. 1B e Fig. 1C. Várias plantas não apresentaram uma ploidia estável, sem a presença de dois picos (G1 e G2/M) facilmente identificáveis (Fig. 1D). O percentual de cada classe de plantas após os experimentos é mostrado na Fig. 2.

Discussão

A duplicação cromossômica tem sido uma estratégia adotada em vários trabalhos. Entretanto, o sucesso deste procedimento depende de um trabalho em larga-escala, uma vez que a eficiência da técnica é naturalmente baixa. Entretanto, essa necessidade esbarra em um problema de viabilidade dos experimentos, que é como avaliar a ploidia de um grande número de plantas obtidas após os experimentos de indução de duplicação cromossômica. A contagem do número cromossômico e a avaliação do tamanho e frequência de estômatos tem sido rotineiramente utilizado como parâmetros de identificação de ploidia. Entretanto, esses procedimentos são relativamente demorados e inviáveis

para serem utilizados em um experimento em larga-escala. A citometria de fluxo representa um ganho tecnológico nesse sentido. Facilmente, em um dia de trabalho é possível estimar a quantidade de DNA de até 100 plantas, com confiabilidade elevada dos resultados. Pela citometria é possível ainda estabelecer a ploidia de diferentes partes da planta (ou diferentes tecidos), procedimento nem sempre fácil de se estabelecer via análise citogenética. Com o uso dessa tecnologia uma análise rápida das plantas para identificação das hexaploides pode ser feita, prosseguindo-se então a análise citogenética das mesmas, para confirmação do número cromossômico. Diante disso, ganha-se muito em tempo e possibilidade de análise de um grande número de plantas.

Referências

- [1] PEREIRA, A.V.; FERREIRA, R.P.; PASSOS, L.P.; FREITAS, V.P.; VENEQUE, R.S.; BARRA, R.B.; SILVA, C.H.P. 2000. Variação da qualidade de folhas em capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e híbridos de capim elefante e milheto (*P. purpureum* x *P. glaucum*) em função da idade da planta. *Ciência e Agrotecnologia*, 24, p.490-499.
- [2] DAHER, R.F. 2003. Cruzamentos dialélicos entre capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e milheto (*Pennisetum glaucum*) e suas relações com a divergência genética. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, UENF. 125p.
- [3] GALBRAITH, D.W.; HARKINS, K.R.; MADDON, J.M.; AYRES, N.M.; SHARMA, D.P.; FIROOZABADY, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. *Science*, 220 p. 1049-1051.
- [4] DOLEZEL, J. 1997. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, 38, p. 285-302.

Tabela 1. Híbridos triploides entre capim elefante e milheto utilizados nos experimentos de indução de duplicação cromossômica.

Parental Capim elefante	Parental milheto	Quantidades de DNA (pg)	Quantidade de DNA esperada (híbridos 3X)	Posição esperada do Pico G1 (3X)	Número de plantas avaliadas após indução de duplicação cromossômica	Número de plantas hexaploides
94-7-1	M-40	94-7-1 = 4,50±0,054 M-40 = 4,65±0,102	4,57	128	6	2
BAG 65	M-35	BAG 65 = 4,56±0,123 M-35 = 4,67±0,132	4,61	129	4	1
91-2-5	M-42	91-2-5 = 4,52±0,088 M-42 = 4,59±0,235	4,55	127	3	1
BAG 19	M-59	BAG 19 = 4,52±0,068 M-59 = 4,68±0,124	4,60	129	4	1

1. Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas, UFLA, MG, CEP 37200-000. E-mail: jmscampos@yahoo.com.br
 2. Professora Titular do Departamento de Biologia, UFLA, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: lcdavide@yahoo.com.br
 3. Graduando em Ciências Biológicas, UFLA, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: caiocesio@yahoo.com.br
 4. Mestranda em Imunologia, Genética e Biotecnologia, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: pamelagenetica@yahoo.com.br
 5. Mestrando em Saúde Brasileira, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: caiocsa@yahoo.com.br
 6. Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: avanderp@cnpqgl.embrapa.br
 7. Professor Titular do Departamento de Biologia, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330 Email: lyderson.vicini@ufff.edu.br
- Apoio financeiro: **FAPEMIG e CNPq.**

BAG 75	M-59	BAG 75 = 4,51±0,167 M-59 = 4,68±0,124	4,59	128	8	0
BAG 27	M-36	BAG 27 = 4,50±0,034 M-36 = 4,61±0,078	4,55	127	1	0
BAG 64	M-64	BAG 64 = 4,53±0,145 M-64 = 4,70±0,345	4,61	129	1	0
91-2-5	M-29	91-2-5 = 4,52±0,088 M-29 = 4,65±0,002	4,58	128	1	0
94-28-3	M-27	94-28-3 = 4,44±0,056 M-27 = 4,66±0,023	4,55	127	1	0
BAG 64	M-64	BAG 64 = 4,51±0,123 M-64 = 4,70±0,345	4,60	129	1	0
94-9-1	M-27	94-9-1 = 4,53±0,124 M-27 = 4,66±0,023	4,59	128	1	0
91-2-5	M-29	91-2-5 = 4,52±0,088 M-29 = 4,65±0,002	4,58	128	1	0
91-25-5	M-31	91-25-5 = 4,50±0,234 M-31 = 4,67±0,109	4,58	128	1	1

1. Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas, UFLA, MG, CEP 37200-000. E-mail: jmscampos@yahoo.com.br
 2. Professora Titular do Departamento de Biologia, UFLA, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: lcdavide@yahoo.com.br
 3. Graduando em Ciências Biológicas, UFLA, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: caiocesio@yahoo.com.br
 4. Mestranda em Imunologia, Genética e Biotecnologia, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: pamelagenetica@yahoo.com.br
 5. Mestrando em Saúde Brasileira, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: caiocsa@yahoo.com.br
 6. Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: avanderp@cnpqgl.embrapa.br
 7. Professor Titular do Departamento de Biologia, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330 Email: lyderson.viccini@ufjf.edu.br
- Apoio financeiro: **FAPEMIG e CNPq.**

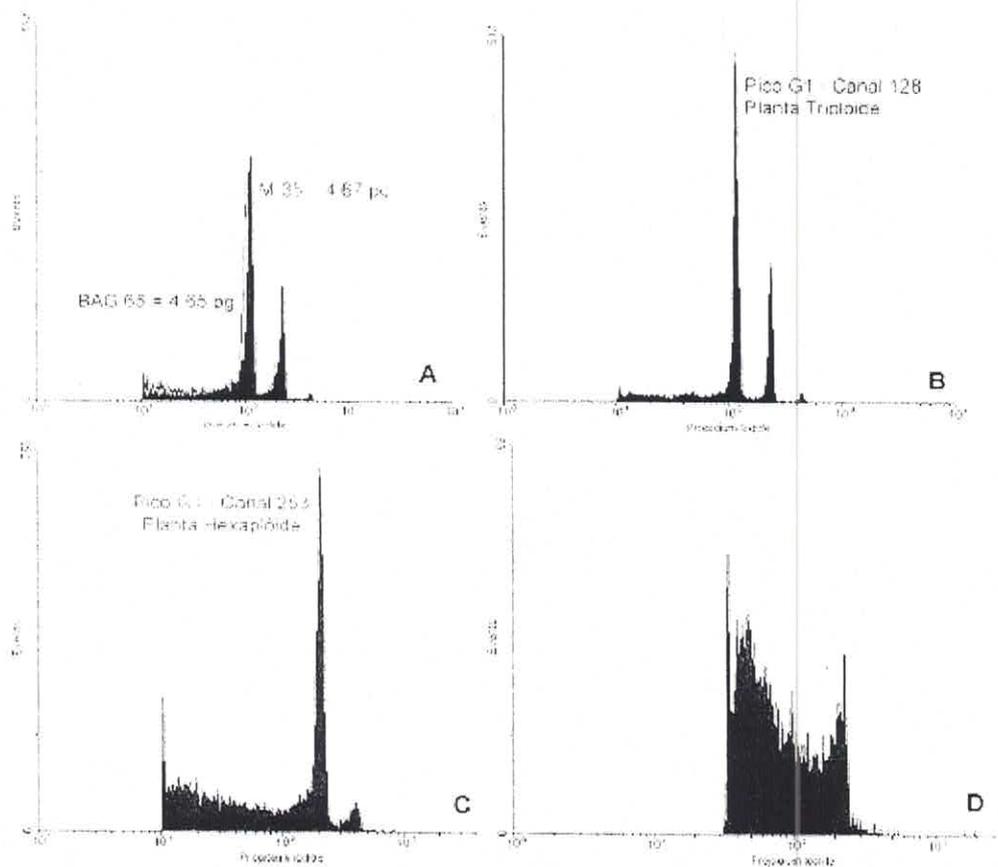


Figura 1. (A) Determinação da quantidade de DNA dos parentais BAG 65 (Capim elefante) e M-35 (Milheto). Pico G1 do BAG 65 (linha em azul) está posicionado no canal 130 (equivale a uma quantidade de DNA de 4,65pg); o pico G1 do M-35 (em vermelho) está posicionado no canal 131 (equivale a uma quantidade de DNA de 4,67pg). Esses valores foram determinados utilizando-se como padrão núcleos de *Pisum sativum* (9,09pg de DNA, Canal-255, representado pelos picos menores à direita); (B) Planta triplóide do cruzamento 91-2-5 X M-29 após tratamento de indução de duplicação cromossômica. O pico G1 da amostra coletada nessa planta posicionou-se no canal 128, quantidade de DNA correspondente a uma planta 3X; (C) Planta hexaplóide do cruzamento BAG 65 X M-35 após tratamento de indução de duplicação cromossômica. O pico G1 da amostra coletada nessa planta posicionou-se no canal 253, quantidade de DNA correspondente a uma planta 6X; (D) Planta com grande variação de quantidade de DNA. Existem células com quantidade de DNA 3X e 6X, mas a maioria das células apresentam uma quantidade de DNA sub-3X. Esta observação pode ser devida a eliminação cromossômica, fenômenos comum observado após hibridação ou poliploidia.

1. Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas, UFLA, MG, CEP 37200-000. E-mail: jmscampos@yahoo.com.br
 2. Professora Titular do Departamento de Biologia, UFLA, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: lcdavide@yahoo.com.br
 3. Graduando em Ciências Biológicas, UFLA, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: caiocesio@yahoo.com.br
 4. Mestranda em Imunologia, Genética e Biotecnologia, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: pamelagenetica@yahoo.com.br
 5. Mestrando em Saúde Brasileira, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: caiocsa@yahoo.com.br
 6. Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: avanderp@cnpqgl.embrapa.br
 7. Professor Titular do Departamento de Biologia, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330 Email: lyderson.viccini@ufjf.edu.br
- Apoio financeiro: **FAPEMIG e CNPq.**

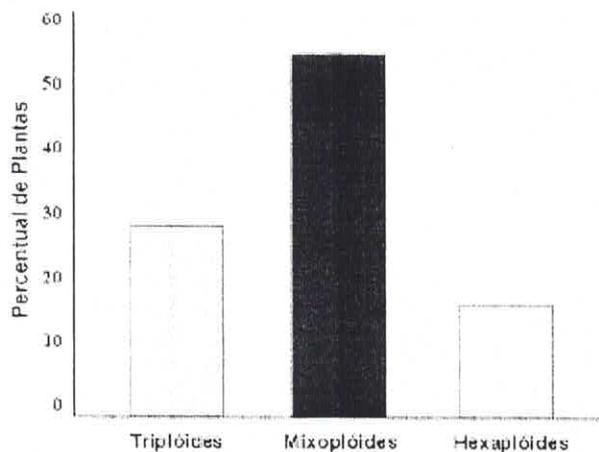


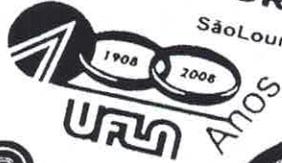
Figura 2. Percentual de plantas em cada uma das classes (triploide, mixoplóide e hexaplóide) entre as 33 plantas analisadas.

1. Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas, UFLA, MG, CEP 37200-000. E-mail: jmscampos@yahoo.com.br
 2. Professora Titular do Departamento de Biologia, UFLA, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: lcdavide@yahoo.com.br
 3. Graduando em Ciências Biológicas, UFLA, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: caiocesio@yahoo.com.br
 4. Mestranda em Imunologia, Genética e Biotecnologia, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: pamelagenetica@yahoo.com.br
 5. Mestrando em Saúde Brasileira, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: caioesa@yahoo.com.br
 6. Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330. Email: avanderp@cnppl.embrapa.br
 7. Professor Titular do Departamento de Biologia, UFJF, Juiz de Fora, MG, CEP 36036-330 Email: lyderson.viccini@ufjf.edu.br
- Apoio financeiro: **FAPEMIG** e **CNPq**.



**4º CONGRESSO BRASILEIRO DE
MELHORAMENTO DE PLANTAS**

São Lourenço, MG, 23 a 26 de abril de 2007



VERAGE



SAKATA®

MONSANTO
imagine



FAPEMIG
Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de Minas Gerais

Fundação MT



PETROBRAS