

## AVALIACÃO DE PLOIDIA EM *Pennisetum sp.*

Pricila Palla Costa<sup>1</sup>; Cristina Maria Pinto de Paula<sup>1</sup>; José Marcello Salabert de Campos<sup>2</sup>; Lisete Chamma Davide<sup>3</sup>; Lyderson Facio Viccini<sup>4</sup>; Francisco José da Silva Léo<sup>5</sup>; Antônio Vander Pereira<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Estagiárias da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, estudantes do Curso de Ciências Biológicas do CES (Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora). emails: pricilapalla@hotmail.com

<sup>2</sup>Pós-Doutorando da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora. email: jmscampos@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Professora da Universidade Federal de Lavras. email: lcdavide@ufla.br

<sup>4</sup>Professor da Universidade Federal de Juiz de Fora. email: lyderson.viccini@ufjf.edu.br

<sup>5</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora. emails: ledo@cnppl.embrapa.br, avanderp@cnppl.embrapa.br.

Palavras-chave: citometria de fluxo, análise estomática, ploidia, *Pennisetum*.

### Introdução

*Pennisetum* é um dos importantes gêneros da família Poaceae, e *Pennisetum purpureum* Schumacher (capim elefante) e *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (milheto) são as espécies mais importantes economicamente, sendo utilizadas como forrageiras (Martel et al., 2004). O capim elefante é uma espécie tetraplóide, com  $2n=4x=28$  cromossomos e constituição genômica A'A'BB (Martel et al., 2004). O milheto é uma espécie diplóide, com  $2n=2x=14$  cromossomos e constituição genômica AA (Martel et al., 2004). Uma das estratégias dos programas de melhoramento dessas espécies é a hibridação interespecífica que resulta num híbrido triploide com  $2n=3x=21$  cromossomos e constituição genômica AA'B (Hanna, 1999). A esterilidade desse híbrido, devido a sua condição triploide é uma das limitações do seu emprego nos programas de melhoramento. A restauração da fertilidade desses híbridos pode ser conseguida pelo emprego de tecnologia citogenética visando a duplicação do número cromossômico pelo uso de agentes antimitóticos (Campos et al., 2008). Neste caso, um híbrido hexaploide, com  $2n=6x=42$  cromossomos é obtido a partir dos experimentos de duplicação cromossômica. O trabalho de manipulação desses materiais de *Pennisetum* envolvendo diferentes níveis de ploidias (diplóide, triploide, tetraploide e hexaploide) requer metodologias de avaliação e identificação rápida das plantas utilizadas nos experimentos.

A citogenética utilizando-se de contagem cromossômica tem sido utilizada para este objetivo nos experimentos utilizando materiais de *Pennisetum* (Abreu et al., 2006; Barbosa et al., 2007). Entretanto, as metodologias da citogenética são trabalhosas e dificultam a análise de um grande número de plantas, limitando o tamanho dos experimentos. A citometria de fluxo para avaliação da quantidade de DNA e a análise de frequência e tamanho de estômatos têm sido apontados como métodos rápidos e seguros para avaliação de ploidia em várias espécies (Silva et al., 2000; Gu et al., 2005).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso da citometria de fluxo e de análise estomática como metodologias para avaliação de ploidia em materiais de *Pennisetum* de forma rápida e segura para um grande número de plantas.

### Material e Métodos

#### 1. Material vegetal

Foram utilizados nos experimentos os materiais 91/25-5, 94-28-3 e 91-2-5 de capim elefante e M-27, M-29 e M-31 de milheto, os híbridos triploides 91/25-5 X M-31; 94-28-3 X M-27 e 91-2-5 X M-29 e plantas hexaploides obtidas por duplicação cromossômica desses híbridos triploides (Campos et al., 2008). Foram utilizadas nas avaliações, 10 plantas de cada parental e 10 plantas dos híbridos triploides. Quatrocentas e oitenta (480) plantas obtidas dos experimentos de duplicação cromossômica foram avaliadas.

#### 2. Citometria de fluxo

As quantidades de DNA dos materiais envolvidos nos experimentos foram determinadas pela citometria de fluxo. Para este objetivo, vinte miligramas de tecido foliar jovem dos materiais de *Pennisetum* juntamente com a mesma quantidade de tecido foliar jovem de *Glycine max* (padrão de referência, 2,5pg), foram triturados em placa de Petri com 1mL de tampão LB01. (Dolezel, 1997). A suspensão nuclear obtida

SP 3935

137

foram adicionados 25µL de iodeto de propídio e 2,5µL de RNase. Dez mil núcleos foram analisados por amostra para determinação da quantidade de DNA como mostrado a seguir:

$$\text{Qtd (DNA)} = \frac{\text{Posição do pico G1 da amostra analisada}}{\text{Posição do pico G1 do padrão de referência}} \times 2,5\text{pg}$$

### 3. Avaliação de frequência e tamanho dos estômatos

Para análise de frequência e tamanho dos estômatos foram realizados cortes paradérmicos no terço médio foliar. Os cortes foram clarificados em hipoclorito de sódio 1%, durante cinco minutos, sendo enxaguados em água destilada por dez minutos. Após a lavagem, as seções foram coradas com azul de astra e safranina. Os cortes foram montados em glicerina 50%. Para cada planta foram avaliadas 5 folhas e para cada folha foram avaliados cinco campos aleatórios. Para avaliação das variáveis foi utilizada uma ocular micrometrada. Análise estatística foi realizada utilizando-se Tukey ( $p < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

As quantidades de DNA estimadas para os parentais de capim elefante e milheto, para os híbridos triplóides e hexaplóides são mostradas na Tabela 1. As quantidades de DNA média para os materiais de capim elefante e milheto foram respectivamente de 4,556pg e 4,76pg. É possível observar neste caso, que para estes materiais, não existe uma correlação entre quantidade de DNA com ploidia e número cromossômico. Embora milheto seja uma espécie diplóide com 14 cromossomos e capim elefante uma espécie tetraplóide com 28 cromossomos, milheto apresenta uma quantidade de DNA ligeiramente superior à quantidade de DNA de capim elefante. Estes resultados são explicados pelos cromossomos de milheto que são maiores do que os cromossomos de capim elefante. Estes resultados demonstram uma dificuldade em distinguir os materiais diplóide, triplóide e tetraplóide, uma vez que as quantidades de DNA são muito próximas. A partir da Figura 1 é possível observar histogramas representativos para os materiais diplóide, triplóide e tetraplóide.

Entretanto é possível observar a partir da Figura 1A que trabalhando-se com resultados de boa qualidade (coeficientes de variação baixos) é possível distinguir entre as quantidades de DNA de milheto e capim elefante. Sobreposição entre as quantidades de DNA dos híbridos triplóides e do capim elefante ocorre, dificultando a separação entre esses materiais. Já os hexaplóides são distinguíveis pela citometria de fluxo, uma vez que esses materiais apresentam o dobro da quantidade de DNA dos híbridos triplóides.

Os resultados de tamanho e frequências de estômatos são apresentados na Tabela 2. Assim como para as estimativas de quantidade de DNA, com as características estomáticas é possível distinguir as plantas hexaplóides das triplóides, embora a distinção das plantas triplóides, tetraplóides e diplóides não seja de fácil realização.

Tabela 1 – Quantidades de DNA estimadas por citometria de fluxo para materiais de *Pennisetum sp.*

Capim elefante (tetraplóide)	Quantidade de DNA (pg)
91/25-5	4,54 ± 0,021
94-28-3	4,57 ± 0,012
91-2-5	4,56 ± 0,032
Milheto (diplóide)	Quantidade de DNA (pg)
M-27	4,74 ± 0,040
M-29	4,76 ± 0,017
M-31	4,78 ± 0,010
Triplóides	Quantidade de DNA (pg)
91/25-5 X M-31	4,51 ± 0,011
94-28-3 X M-27	4,50 ± 0,037
91-2-5 X M-29	4,50 ± 0,032
Hexaplóides *	Quantidade de DNA (pg)
91/25-5 X M-31	9,02 ± 0,034
94-28-3 X M-27	9,05 ± 0,015
91-2-5 X M-29	8,99 ± 0,023

\* Plantas obtidas por duplicação cromossômica a partir dos híbridos triplóides.

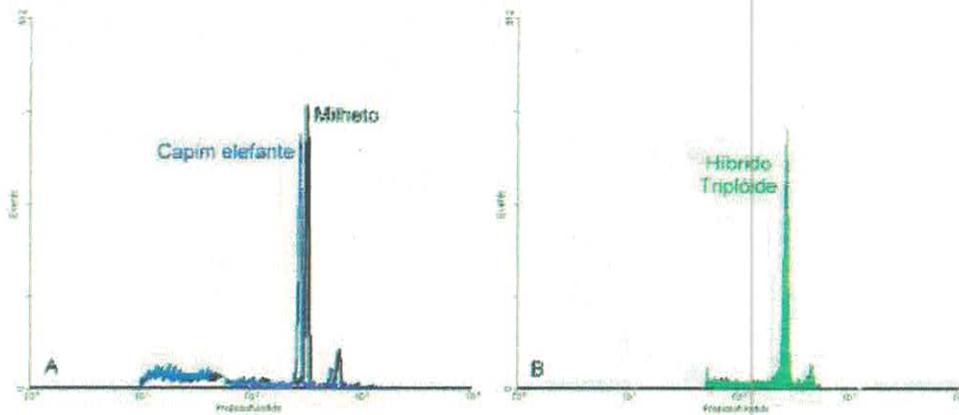


Figura 1 – Histogramas mostrando as quantidades de DNA próximas de Milheto e Capim elefante (A) e do híbrido triplóide em (B).

É possível observar que nas plantas hexaplóides os estômatos são em média 1,56x maiores do que os estômatos das plantas triplóides. Com relação à frequência estomática, nas plantas hexaplóides os estômatos são 1,85x menos frequentes. Esta relação (redução na frequência e aumento do tamanho de estômatos com aumento da quantidade de DNA) já tinha sido relatada em trabalhos com outras espécies (Silva et al., 2000; Gu et al., 2005), mas não para espécies de *Pennisetum*. Este trabalho demonstra que as características estomáticas diferem marcadamente entre plantas triplóides e hexaplóides e sendo este um método de análise rápido e seguro, constitui um modo eficiente de avaliação de ploidia em híbridos de *Pennisetum*.

A partir da Figura 2 é possível observar estômatos de plantas triplóides e hexaplóides.

Tabela 2 – Tamanhos e frequências de estômatos em materiais de *Pennisetum* sp.

Capim elefante (tetraplóide)	Tamanho dos estômatos ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>	Frequência de estômatos ( $\text{mm}^2$ )
91/25-5	30,23 $\pm$ 1,25a	96,78 $\pm$ 4,57a
94-28-3	31,24 $\pm$ 2,34a	98,23 $\pm$ 6,78a
91-2-5	32,12 $\pm$ 2,23a	100,12 $\pm$ 7,32a
Milheto (diplóide)	Tamanho dos estômatos ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>	Frequência de estômatos ( $\text{mm}^2$ )
M-27	36,57 $\pm$ 2,12b	90,21 $\pm$ 3,89b
M-29	37,65 $\pm$ 2,67b	88,65 $\pm$ 4,65b
M-31	36,87 $\pm$ 1,98b	89,43 $\pm$ 4,31b
Triplóides	Tamanho dos estômatos ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>	Frequência de estômatos ( $\text{mm}^2$ )
91/25-5 X M-31	30,21 $\pm$ 1,23a	97,34 $\pm$ 3,25a
94-28-3 X M-27	32,12 $\pm$ 1,67a	99,23 $\pm$ 5,67a
91-2-5 X M-29	31,24 $\pm$ 2,31a	101,23 $\pm$ 6,57a
Hexaplóides *	Tamanho dos estômatos ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>	Frequência de estômatos ( $\text{mm}^2$ )
91/25-5 X M-31	48,78 $\pm$ 2,21c	52,34 $\pm$ 2,56c
94-28-3 X M-27	47,89 $\pm$ 2,12c	51,27 $\pm$ 3,56c
91-2-5 X M-29	49,23 $\pm$ 1,78c	57,34 $\pm$ 5,45c

\* Plantas obtidas por duplicação cromossômica a partir dos híbridos triplóides.

<sup>1</sup> Refere-se ao diâmetro polar médio dos estômatos das superfícies adaxial e abaxial.

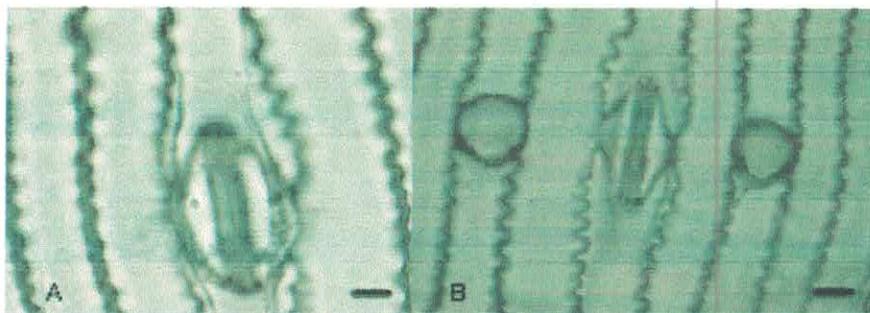


Figura 2 – (A) Estômato de uma planta hexaplóide; (B) Estômato de uma planta triplóide. Barra = 10  $\mu$ m.

A análise de características estomáticas e de quantidade de DNA são metodologias rápidas de avaliação de plantas obtidas através de experimentos de duplicação cromossômica em híbridos de *Pennisetum*. Neste trabalho, entre as 480 plantas obtidas por duplicação cromossômica, foi possível distinguir entre as triplóides e hexaplóides. A análise pode ser realizada ainda no estágio *in vitro* reduzindo a população de plantas mantidas *in vitro* ou no campo. Essas tecnologias representam um ganho em relação à contagem convencional de cromossomos por tecnologia citogenética, que constitui um método demorado e, portanto dificulta a obtenção de um grande número de plantas.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à Fapemig e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

#### Referências Bibliográficas

- ABREU, J.C.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; BARBOSA, S. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, 2006.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; ABREU, J.C. Duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim elefante e milho. *Bragantia*, v. 66, n. 3, p. 365-372, 2007.
- CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE, L.C.; SALGADO, C.C.; SANTOS, F.C.; COSTA, P.N.; SILVA, P.S.; ALVES, C.C.S.; VICCINI, L.F.; PEREIRA, A.V. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. *Plant Breeding*. In Press.
- DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, v. 38, p. 285-302, 1997.
- GU, X.F.; YANG, A.F.; MENG, H.; ZHANG, J.R. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. **Plant Cell Report**, v. 24, p. 671-676, 2005.
- HANNA, W.W. Melhoramento do capim elefante. In: PASSOS, L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E.; PEREIRA, A.V. (Ed.). *Biologia e Manejo do Capim elefante*. Juiz de Fora, Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 17-28.
- MARTEL, E.; PONCET, V.; LANY, F.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; LEJUME, B.; SARR, A. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. *Plant Systematics and Evolution*, v. 249, p. 139-149, 2004.
- SILVA, P.A.K.X.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. *Ciência Rural*, v. 30, p. 105-111, 2000.



A cura está na consciência de  
quem faz da Terra o seu laboratório



ANAIS  
XXXI SEMANA DE BIOLOGIA  
XIV MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA  
6 a 10 de outubro de 2008

**dacbio**

# XXXI SEMANA DE BIOLOGIA

## 6 a 10 de Outubro

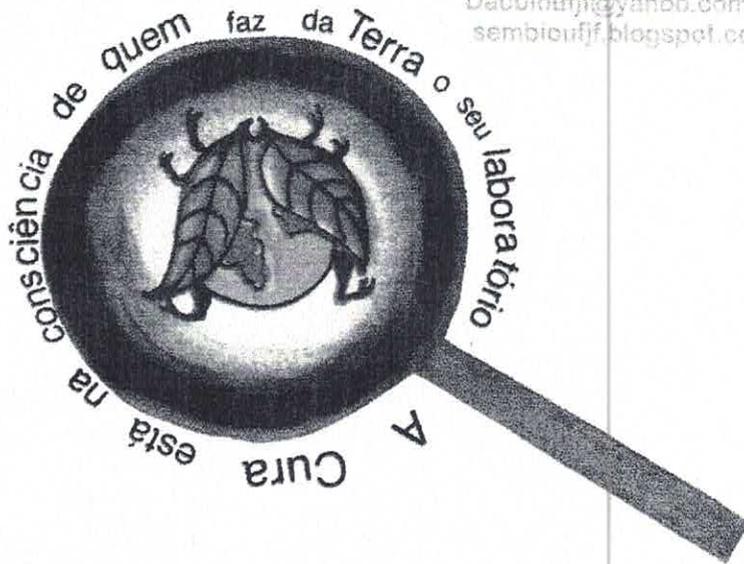


Realização



Dacbinuff@yahoo.com.br  
sembiouff.blogspot.com

**Biologia e Saúde**  
*Biologia e Saúde*



XIV Mostra de Produção Científica  
III Concurso de Fotografias Biológicas  
Mini-Cursos      Ciclo de Palestras  
Mesa Redonda      Assembléia



Design gráfico: www.2100.com.br 00474510