



47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia  
Salvador, BA – UFBA, 27 a 30 de julho de 2010  
Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia  
Brasileira de Vanguarda



### Conteúdo de DNA nuclear em embriões de híbridos tetraploides entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*<sup>1</sup>

Cristina Maria Pinto de Paula<sup>2</sup>, Juliane Dornellas Nunes<sup>3</sup>, Ana Luisa Souza Azevedo<sup>4</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>4</sup>, Maurício Marini Kopp<sup>4</sup>, Igor de Almeida Costa<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Trabalho parcialmente financiado com recursos da FAPEMIG, CNPq e Unipasto

<sup>2</sup>Bolsista de iniciação científica do CNPq na Embrapa Gado de leite. e-mail: cris0283@hotmail.com

<sup>3</sup>Pós-Doutoranda da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG. e-mail: judornellas@gmail.com

<sup>4</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG. e-mail: azevedo@cnpq.embrapa.br

<sup>5</sup>Bolsista de desenvolvimento tecnológico na Embrapa Gado de Leite. e-mail: igoralmeida.costa@gmail.com

**Resumo:** A hibridação interespecífica entre o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e milheto (*Pennisetum glaucum*) é uma estratégia adotada para o melhoramento genético e obtenção de cultivares superiores em ambas as espécies. O objetivo do presente trabalho foi estimar o conteúdo de DNA nuclear ao longo do desenvolvimento de embriões em híbridos tetraploides entre capim-elefante e milheto através da citometria de fluxo. A quantificação de DNA foi realizada com 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a polinização. Os dados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão polinomial entre dias após a polinização (DAP) e quantidade de DNA. Através desta análise foi observada uma redução significativa de 12,65% na quantidade de DNA entre 10 e 15 dias após a polinização. As estimativas do conteúdo de DNA se mantiveram estáveis com 20, 25 e 30 DAP, apresentando respectivamente uma média de 4,96, 4,96 e 4,95 picogramas de DNA. Esses resultados evidenciaram uma possível ocorrência de eliminações de sequências genômicas após a hibridação, durante o desenvolvimento dos embriões.

**Palavras-chave:** Capim-elefante, Citometria de fluxo, Hibridação interespecífica, Milheto

### Nuclear DNA content in embryos of tetraploid hybrids among *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*

**Abstract:** The interspecific hybridization among elephantgrass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*) is a strategy adopted for the genetic breeding and obtainment of superior cultivars in both species. The objective of this study was to estimate the nuclear DNA content during the embryous development in tetraploid hybrids among elephantgrass and pearl millet by flow cytometry. DNA quantification was performed with 10, 15, 20, 25 and 30 days after pollination. The data were subjected the variance analysis and polynomial regression analysis between days after pollination (DAP) and DNA amount. Through this analysis is possible observe a reduction large of 12,65% in the amount of DNA between 10 and 15 days after pollination. DNA content estimates remained stable with 20, 25 and 30 DAP presenting respectively an average of 4,96, 4,96 and 4,95 picograms of DNA. These results showed an occurrence possible of genomic sequences elimination after hybridization, during the embryous development.

**Keywords:** Elephantgrass, Flow cytometry, Interspecific hybridization, Pearl millet

### Introdução

*Pennisetum* é um dos importantes gêneros da família Poaceae, e *Pennisetum purpureum* Schumach (capim-elefante) e *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (milheto) são as espécies mais importantes economicamente, sendo utilizadas como forrageiras (Martel et al., 2004). A proximidade genética entre o capim-elefante e o milheto possibilita a obtenção de híbridos entre essas duas espécies com relativa facilidade. Essa estratégia tem sido recomendada para o melhoramento de qualidade forrageira (Hanna, 1999). Instabilidade genômica no desenvolvimento de embriões triploides de capim-elefante com milheto após a hibridação interespecífica foi relatada por Campos (2007). Foram observadas reduções na quantidade de DNA ao longo do desenvolvimento dos embriões, além da frequente formação de micronúcleos, alteração normalmente correlacionada com eliminação de cromossomos e/ou sequências de DNA.



O objetivo do presente trabalho foi estimar o conteúdo de DNA nuclear, através da citometria de fluxo, ao longo do desenvolvimento de embriões em híbridos tetraploides após a hibridação interespecífica entre capim-elefante e milheto.

#### Material e Métodos

As sementes tetraploides foram obtidas a partir do retrocruzamento interespecífico entre um híbrido hexaploide ( $2n = 6x = 42$ ) do programa de melhoramento genético de capim-elefante da Embrapa Gado de Leite, utilizado como doador de pólen e o milheto ( $2n = 2x = 14$ ) com receptor de pólen (Tabela 1). As sementes em desenvolvimento foram coletadas com 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a polinização. Os embriões foram excisados das sementes, constituindo 3 repetições de 10 embriões e submetidos à análise por citometria de fluxo para a quantificação de DNA de acordo com o protocolo de Dolezel (1997). O delineamento experimental utilizado foi o delineamento em blocos completos, no esquema em parcelas subdivididas no tempo com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e análise de regressão polinomial entre dias após a polinização (DAP) e quantidade de DNA utilizando-se o aplicativo SAS (SAS, 2000).

Tabela 1 Espécies parentais e respectivos híbridos interespecíficos obtidos.

Parental ♂	Parental ♀	Híbrido obtido e ploidia
Híbrido hexaploide CNPGL 09/07-01	Milheto 2	A ( $2n = 4x = 28$ )
Híbrido hexaploide CNPGL 09/07-01	Milheto 7	B ( $2n = 4x = 28$ )
Híbrido hexaploide CNPGL 09/07-01	Milheto 11	C ( $2n = 4x = 28$ )

#### Resultados e Discussão

De acordo com o teste F houve diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade entre os cruzamentos de capim-elefante hexaploide e milheto em relação ao conteúdo de DNA quantificado nos híbridos tetraploides. Esses resultados demonstraram que ocorreu variação nos genótipos utilizados e existem combinações de genitores que foram melhores. Para os dias após a polinização e interação DAP x cruzamentos também houve efeito significativo, o que evidenciou a existência de uma relação entre quantidade de DNA e dias após a polinização.

A quantificação do conteúdo de DNA pela citometria de fluxo nos híbridos tetraploides gerou histogramas como mostrado na Figura 1.

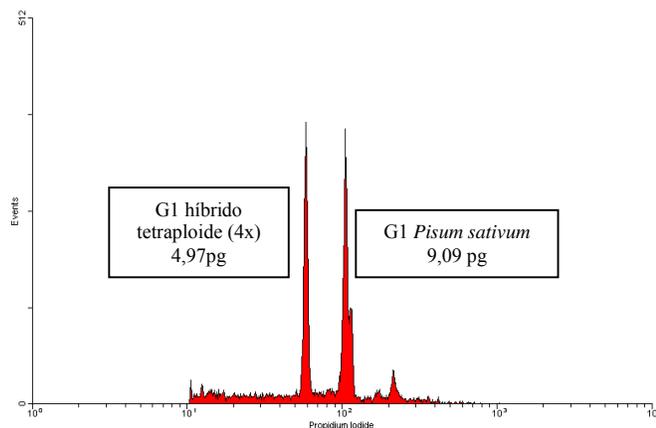


Figura 1 Histograma de citometria de fluxo do híbrido tetraploide C (capim-elefante X milheto) coletado com 20 DAP.

No histograma acima de um híbrido tetraploide coletado com 20 dias após a polinização, o coeficiente de variação (CV) foi de 0,66% e a quantificação para este híbrido foi de 4,97pg.



Na análise de regressão o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 80,06%, esse resultado evidenciou que o modelo adotado foi adequado e que o conteúdo de DNA quantificado em diferentes dias após a polinização foi avaliado com boa precisão (Figura 2).

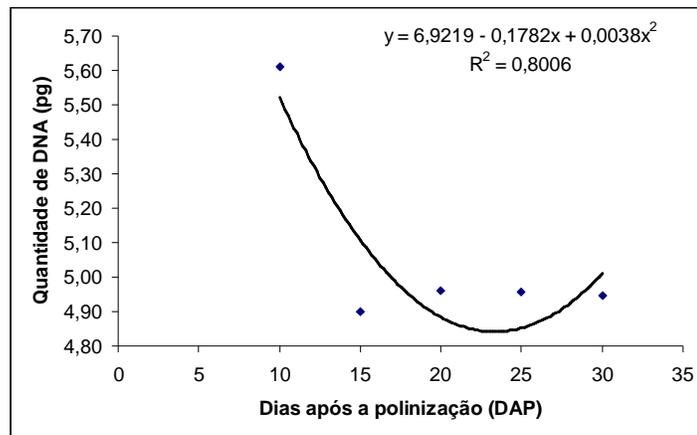


Figura 2 Equação de regressão com respectivo coeficiente de determinação para quantidade de DNA (pg) em função dos dias após a polinização (DAP) em híbridos tetraploides.

De acordo com a análise de regressão pôde-se observar uma grande redução de 12,65% na quantidade de DNA entre 10 e 15 dias após a polinização. Liu et al. (1996) relataram que a eliminação de seqüências específicas de DNA frequentemente ocorre em estágios precoces logo após a hibridação. As estimativas do conteúdo de DNA se mantiveram estáveis com 20, 25 e 30 DAP, apresentando respectivamente uma média de 4,96, 4,96 e 4,95pg. Esses resultados sugerem a ocorrência de eliminações de seqüências genômicas após a hibridação, durante o desenvolvimento dos embriões.

### Conclusões

A citometria de fluxo fornece uma maneira rápida e precisa de estudar as alterações no tamanho do genoma decorrentes do processo de hibridação interespecífica, durante o processo de desenvolvimento e diferenciação do embrião.

Foi possível observar uma redução na quantidade de DNA logo nos primeiros estágios de desenvolvimento de embriões tetraploides entre capim-elefante e milheto.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPEMIG, UNIPASTO e CNPq pelo apoio financeiro a pesquisa.

### Literatura citada

- CAMPOS, J.M.S. **Obtenção de híbridos hexaploides e análise genômica em *Pennisetum* sp. Por citometria de fluxo.** 2007. 115f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**. v.38, n.3, p.285-302, 1997.
- 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.
- LIU, S.C.; KOWALSKI, S.P.; LAN, T.H. et al. Genome-wide high-resolution mapping by recurrent intermating using *Arabidopsis thaliana* as a model. **Genetics**, v.142, p.247-258, 1996.
- MARTEL, E.; PONCET, V.; LANY, F. et al. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v.249, p.139-149, 2004.
- SAS - **Statistical Analysis System.** SAS/SAT 9.00. User's guide, Cary, NC: BFDS 2000.