

## Distribuição dos genomas de capim-elefante e milho (*Pennisetum* sp. Schum., Poaceae) em híbrido interespecífico

Costa Santos, FM<sup>1</sup>; Reis, GB<sup>1</sup>; Andrade-Vieira, LF<sup>1</sup>; Davide, LC<sup>1</sup>; Pereira, AV<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras.

<sup>2</sup>Laboratório de Genética Vegetal, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG  
costasantosfm@gmail.com

**Palavras-chave:** *Pennisetum*, eliminação cromossômica, hibridização *in situ* genômica, mixoploidia, híbrido interespecífico

O capim-elefante (*P. purpureum*) e o milho (*P. glaucum*) são forrageiras economicamente importantes. A produção de híbridos entre essas duas espécies é uma estratégia utilizada nos programas de melhoramento visando à obtenção de cultivares com maior produção de forragem e melhor qualidade nutritiva. A condição triploide do híbrido ( $2n = 3x = 21$  cromossomos) causa esterilidade, considerada um problema na utilização dos mesmos. A duplicação cromossômica tem sido empregada como forma de restaurar a fertilidade do híbrido interespecífico, obtendo-se plantas hexaplóides. No entanto, freqüentemente são observadas plantas mixoplóides com células contendo número variável de cromossomos (14 a 42). A mixoploidia nos híbridos de capim-elefante e milho é ocasionada por eliminação cromossômica. Estudos a respeito da identificação dos cromossomos parentais eliminados nos híbridos mixoplóides, resultantes do cruzamento de capim-elefante e milho, seguido de indução de duplicação cromossômica já foram realizados, utilizando como ferramenta a hibridização *in situ* genômica (GISH). Nestes estudos, observou-se que a eliminação cromossômica é casual, podendo ser encontradas as mais diversas combinações cromossômicas. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi verificar a distribuição dos genomas de capim-elefante e milho no núcleo interfásico do híbrido interespecífico submetido a duplicação cromossômica, para melhor entendimento do fenômeno de eliminação cromossômica. Foram avaliados 100 núcleos interfásicos da cultivar Paraíso através da hibridização *in situ* genômica (GISH). Os genomas dos parentais foram localizados nos núcleos interfásicos através do uso da sonda do DNA genômico de milho. A área ocupada pelo genoma do milho na periferia do núcleo foi, em média, de  $39,53 \mu\text{m}^2$ , correspondendo a 55,72% do genoma total no núcleo. A área média ocupada pelo genoma do capim-elefante na periferia do núcleo foi  $44,72 \mu\text{m}^2$ , o equivalente a 47,24% do genoma de capim-elefante. Ambos os genomas estão distribuídos na periferia (cerca de 50% do genoma de cada um dos parentais) e na região central do núcleo. Estes resultados indicam que os genomas de capim-elefante e milho distribuem-se de forma semelhante no núcleo interfásico, o que favorece a eliminação cromossômica aleatória dos cromossomos de cada um dos parentais, não havendo preferência de eliminação do genoma de uma espécie em relação à outra. Apoio financeiro: Fapemig e CNPq

## Estabilidade genômica em explantes triploides e eliminação cromossômica após indução de poliploidia – Implicações para a duplicação cromossômica em *Pennisetum*

El-Aouar Filho, RA<sup>1</sup>; Paula, CMP<sup>2</sup>; Nunes, JD<sup>2</sup>; Azevedo, ALS<sup>2</sup>; Pereira, AV<sup>2</sup>; Davide, LC<sup>3</sup>; Campos, JMS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética e Biotecnologia, Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora-MG

<sup>2</sup>Laboratório de Genética Vegetal, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora-MG

<sup>3</sup>Laboratório de Citogenética, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras-MG  
jose.campos@ufjf.edu.br

**Palavras-chave:** *Pennisetum*, duplicação cromossômica, poliploidia, citometria de fluxo, eliminação cromossômica, citogenética

**Introdução:** *Pennisetum* é um dos importantes gêneros da família Poaceae, sendo as espécies *P. purpureum* (capim elefante,  $2n=4x=28$  cromossomos) e *P. glaucum* (milheto,  $2n=2x=14$  cromossomos) amplamente utilizadas como forrageiras. Uma das estratégias de melhoramento de *Pennisetum* é o cruzamento entre essas espécies e a obtenção de um híbrido triploide ( $2n=3x=21$  cromossomos). A esterilidade desse híbrido dificulta o seu emprego nos métodos de melhoramento e a duplicação cromossômica in vitro representa uma opção para a obtenção de hexaploides. Em híbridos e poliploides recém formados, frequentemente são observadas inúmeras modificações genômicas, tais como eliminação de sequências genômicas e cromossomos. Neste trabalho, a estabilidade genômica de embriões triploides e de plantas obtidas por duplicação cromossômica foi avaliada por abordagem citogenética e de citometria de fluxo. **Métodos:** Embriões triploides de *Pennisetum* foram avaliados com 10 a 30 dias após a polinização através de metodologia citogenética e de citometria de fluxo. Para análise citogenética, os embriões foram retirados, fixados e submetidos a digestão enzimática em pectinase/celulase. As lâminas foram preparadas por dissociação celular/secagem ao ar sendo posteriormente coradas com Giemsa. Alterações citogenéticas/celulares relacionadas à instabilidade genômica foram quantificadas. Procedimento de obtenção dos núcleos em tampão LB01 foi utilizado para análise por citometria, seguido da coloração com iodeto de propídeo. Para duplicação cromossômica, sementes triploides foram submetidas a tratamentos com colchicina 0; 0,05; 0,10 e 0,20% por 12, 24 e 36h. O percentual de seedlings sobreviventes foi avaliado aos 60 dias e as plantas poliploides identificadas por citometria de fluxo. **Resultados:** Reduções nas quantidades de DNA nos embriões triploides foram observadas em uma resposta tempo dependente, evidenciando uma provável eliminação de sequências genômicas em resposta ao evento de hibridação. Nas análises citogenéticas realizadas, não foram evidenciadas eliminação de cromossomos, entretanto anormalidades relacionadas à eliminação de sequências genômicas foram observadas, tais como extravasamento de cromatina e presença de micronúcleos. O tratamento mais eficiente para duplicação cromossômica foi o de colchicina 0,10% por 12h de exposição, onde foi possível observar em média 17,38% das plantas poliploides. Nas 23 plantas recuperadas como hexaploides, a variação na quantidade de DNA foi de 7,80pg a 9,23pg (com valor esperado de 9,30pg), sugerindo a ocorrência de rearranjos genômicos também após o evento de poliploidização. **Conclusões:** Instabilidade genômica após os eventos de hibridação e poliploidização ocorrem em híbridos de *Pennisetum*, assim como já relatado para vários outros híbridos na literatura. Essas variações geradas tanto apresentam implicações para a obtenção de plantas hexaploides estáveis, como para a geração de variabilidade genética nos híbridos, que pode ser útil para o melhoramento de *Pennisetum*. **Apoio financeiro:** Capes, CNPq, Fapemig e Unipasto

SP  
4948  
P.158

4948  
P.158

70 R.A.



## Estudo da eliminação cromossômica em híbridos de capim-elefante e milho (*Pennisetum* sp. Schum., Poaceae) através da hibridização *in situ* genômica

Reis, GB<sup>1</sup>; Andrade-Vieira, LF<sup>1</sup>; Davide, LC<sup>1</sup>; Torres, GA<sup>1</sup>; Oliveira, AR<sup>2</sup>; Brasileiro-Vidal, AC<sup>2</sup>; Pereira, AV<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Citogenética, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras

<sup>2</sup> Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>3</sup> Laboratório de Genética Vegetal, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG  
larissa\_lavras@yahoo.com.br

**Palavras-chave:** *Pennisetum*, comportamento genômico, eliminação cromossômica, hibridização *in situ*, mixoploidia

O capim-elefante (*P. purpureum*) e o milho (*P. glaucum*) destacam-se por sua importância econômica como forrageiras de elevado potencial de produção, sendo cultivadas nas regiões tropicais do planeta e empregadas na obtenção de híbridos interespecíficos em programas de melhoramento genético. No entanto, o maior problema em relação a utilização dos híbridos é a esterilidade causada por sua condição triplóide ( $2n = 3x = 21$  cromossomos). Logo, tem-se procurado restaurar a fertilidade do híbrido interespecífico por meio da duplicação cromossômica. Alguns protocolos de indução de poliploidia mostraram-se eficientes, produzindo plantas hexaplóides, no entanto, frequentemente são observadas plantas mixoplóides com células contendo número cromossômico variando de 14 a 42. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi estudar a eliminação cromossômica em híbridos de capim-elefante e milho submetidos a duplicação cromossômica, utilizando como ferramenta a hibridização *in situ* genômica (GISH), a fim de identificar se há eliminação preferencial de cromossomos de um dos parentais após indução de poliploidia. A GISH foi realizada em metáfases dos híbridos, as quais foram desnaturadas com formamida 70% a 85°C por 1,5 minutos. A sonda do DNA genômico de milho foi marcada com biotina, desnaturada a 75°C por 10 minutos e detectada com avidina-Fluoresceína. As metáfases foram contra-coradas com DAPI e avaliadas em microscópio epifluorescente nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 (DAPI) e 490/525 (Fluoresceína). Foi observada grande variação cromossômica entre e dentro as células somáticas dos híbridos analisados. Para dois híbridos (Paraíso e H-89) foi encontrada maior frequência de células com 38 cromossomos, sendo 12 cromossomos de milho e 26 de capim-elefante. Já nos híbridos H40 e H42 a maioria das células apresentou 28 cromossomos (10 de milho e 18 de capim-elefante). A eliminação cromossômica é casual, podendo ser encontradas as mais diversas combinações cromossômicas entre os híbridos em questão. Ademais, alguns híbridos tendem a se estabilizar com 28 cromossomos, enquanto outros tendem a perder menos cromossomos, se estabilizando com número cromossômico próximo a 42. Este trabalho representa o primeiro estudo realizado a respeito da identificação dos cromossomos parentais eliminados nos híbridos mixoplóides resultantes do cruzamento de capim-elefante e milho, seguido de indução de duplicação cromossômica. Apoio financeiro: Fapemig e CNPq

## Incidência da doença CVM em bovinos da raça Girolando

Paiva, DS<sup>1</sup>; Meira, LHR<sup>2</sup>; Silvestre, IR<sup>3</sup>; Alvino, RM<sup>2</sup>; Fonseca, I<sup>3</sup>; Arbex, W<sup>4</sup>; Silva, MVGB<sup>4</sup>; Guimarães, MFM<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora

<sup>2</sup>Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG

<sup>3</sup>Bolsistas de Apoio Técnico à Pesquisa II – FAPEMIG

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite.

daisyuff@gmail.com

**Palavras-chave:** Teste de Progenie, doenças hereditárias, Equilíbrio de Hardy-Weinberg, gene SLC35A3

**Introdução:** A doença do Complexo de Má Formação Vertebral, conhecida como CVM é uma doença hereditária recessiva que ocorre durante o desenvolvimento fetal, levando a frequentes abortos, além de anormalidades vertebrais. Foi determinado que CVM é causado por uma mutação pontual (G/T) no nucleotídeo 559 do gene SLC35A3 em bovinos. Esse gene codifica uma proteína transportadora de UDP-N-acetilglicosamina, que desempenha um papel essencial nos mecanismos que controlam a formação das vértebras. CVM é uma síndrome letal, caracterizada por retardamento do crescimento congênito, má-formação vertebral e deformações no septo ventricular. Essa foi, provavelmente, a desordem hereditária mais frequente em animais da raça Holandesa já registrada, chegando a uma frequência de 30% em alguns países. No Brasil ainda não há estudos que demonstrem a frequência dessa doença em bovinos. **Objetivo:** Estimar as frequências alélicas e genotípicas do gene SLC35A3 em animais da raça Girolando e verificar se os mesmos estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). **Métodos:** Foram genotipados todos os touros Girolando (93) pertencentes ao Teste de Progenie (TP) da raça coordenado pela Embrapa Gado de Leite e a GIROLANDO. A extração do DNA do sêmen foi feita utilizando um kit comercial seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação e avaliação da qualidade foram feitas por espectrofotometria (Nanodrop<sup>®</sup>). Para determinação do genótipo, foi utilizada a técnica AS-PCR (*Allele Specific-Polymerase Chain Reaction*), onde foram empregados dois *forward primers*: um para o alelo normal (G) e outro para o alelo CVM (T); e um *reverse primer* comum para os dois alelos (Ghanem et al., 2008). Em animais portadores, pode-se visualizar em géis de agarose, a amplificação de um fragmento de 395 pb para os dois alelos; e em animais normais, essa banda é visualizada somente para o alelo G. As análises de frequências gênicas e genotípicas e o teste de probabilidade de EHW foram estimados pelo programa GENEPOP web version 3.4. A probabilidade de EHW associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** Não foram encontrados animais portadores da mutação no gene SLC35A3 nos touros pertencentes ao TP da raça. Uma das possíveis causas da ausência de touros Girolando portadores pode ter ocorrido devido a um crescente uso da genotipagem em touros de alto mérito genético, principalmente na raça Holandesa. De acordo com a análise estatística, as frequências encontradas estão próximas às esperadas e, portanto, a amostra está em EHW. **Conclusões:** Estatisticamente a população de touros Girolando pertencente ao TP da raça encontra-se em EHW, entretanto está havendo seleção contra o alelo T e fixação do alelo normal. As centrais de Inseminação Artificial têm implementado a genotipagem dos touros e para os animais portadores, mesmo com alto mérito genético para produção leiteira, têm sido desestimulada a venda de sêmen. **Apoio financeiro:** EMBRAPA e FAPEMIG.

## Mapeamento fino de QTL associado à resistência ao carrapato bovino no cromossomo 2

Gasparini, K<sup>1</sup>; Bernardo, KB<sup>1</sup>; Azevedo, ALS<sup>1</sup>; Verneque, RS<sup>1</sup>; Peixoto, MGCD<sup>1</sup>; Silva, MVGB.<sup>1</sup>; Machado, MA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.  
machado@cnpqgl.embrapa.br

**Palavras-chave:** *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, marcadores moleculares, BTA2, Gir, Holandês

Nas regiões tropicais, a alta incidência do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* causa grande impacto, reduzindo a produção, afetando características reprodutivas e deixando os animais mais suscetíveis a outras infecções. A identificação de regiões genômicas e de marcadores de DNA ligados a resistência ao carrapato poderá ser uma excelente estratégia para selecionar os animais mais resistentes. Com o mapeamento de QTL e a identificação de genes que afetam a resistência ao carrapato, a seleção assistida por marcadores (MAS) poderá ser usada em programas de melhoramento. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo detectaram a presença de QTL para resistência ao carrapato em uma população F2 Gir x Holandês. Contudo esse QTL foi detectado com uma resolução moderada, pois a distância entre os marcadores era relativamente grande. O intervalo de confiança para a maioria dos QTL detectados é de 20 a 30 cM, contudo a identificação de genes candidatos requer que o QTL seja mapeado em um intervalo menor, sendo necessário refinar a região onde o mesmo foi detectado. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi saturar a região onde foi identificado um QTL associado à resistência ao carrapato bovino no cromossomo dois. Quatro novos marcadores microssatélites foram adicionados ao BTA 2. Amostras de sangue foram coletadas de 480 animais experimentais, incluindo parentais, F1 e F2 e submetidas à extração de DNA. Os produtos de PCR foram detectados utilizando o seqüenciador automático de DNA MegaBACE 1000 e as análises estatísticas foram feitas utilizando o software GridQTL. Novas análises de associação foram realizadas após a adição dos novos marcadores confirmando a presença de um QTL na estação seca. O intervalo de confiança no BTA 2 sofreu redução de 22 para 13 cM. A variação fenotípica explicada por esse QTL é de 4.17% e o efeito aditivo encontrado não foi significativo, indicando que esse QTL tem efeito dominante. A adição de marcadores e a diminuição do intervalo de confiança é um importante passo para identificação de genes candidatos que futuramente poderão ser utilizados em programas de melhoramento. Apoio financeiro: Fapemig, CNPq, Embrapa

## Perfil da expressão do gene IL-17 em células do leite de vacas Gir infectadas artificialmente com *Streptococcus agalactiae*

Guimarães, MFM<sup>1</sup>; Fonseca, I<sup>1,2</sup>; Paiva, DS<sup>3</sup>; Ferreira, MBD<sup>4</sup>; Brito, MAVP<sup>1</sup>; Brandão, HM<sup>1</sup>; Guimarães, SEF<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Gado de Leite

<sup>2</sup>Departamento de Zootecnia - UFV

<sup>3</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora

<sup>4</sup>Fazenda Experimental Getúlio Vargas, Centro Tecnológico do Triângulo e Alto Paranaíba, EPAMIG  
mmartins@cnpqgl.embrapa.br

**Palavras-chave:** expressão relativa, mastite bovina, qPCR, resposta imune.

**Introdução:** A pecuária leiteira é uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro, porém ainda há vários entraves que precisam ser resolvidos para que se possa manter a sustentabilidade e a competitividade do setor. Dentre os problemas de sanidade, as doenças infectocontagiosas são as que mais se destacam, sendo a mastite a principal doença no aspecto econômico. Esta doença caracteriza-se por resposta inflamatória na glândula mamária causada por alterações metabólicas e fisiológicas, traumas, ou mais frequentemente por micro-organismos patogênicos ambientais ou contagiosos. Uma das opções mais promissoras para a redução dos problemas causados pela mastite, além dos cuidados sanitários e de manejo, é a seleção de animais resistentes e a incorporação desta característica aos rebanhos. Por isso, estudos com a finalidade de compreender melhor os processos biológicos envolvidos na determinação das respostas de resistência às doenças são fundamentais na compreensão, na resolução de problemas e no desenvolvimento de soluções tecnológicas. Genes ligados à resposta imune estão correlacionados à resposta de resistência/susceptibilidade à mastite e por isso, dentre estes genes, foi selecionada o gene da *interleucina 17 (IL-17)* como alvo deste trabalho. **Objetivo:** Investigar a expressão do gene *IL-17* em células presentes no leite de bovinos da raça Gir Leiteiro infectados artificialmente com *Streptococcus agalactiae* antes da inoculação (tempo 0) e 24 h após a inoculação do patógeno (tempo 24). **Métodos:** O RNA total foi extraído de células presentes no leite de 17 animais provenientes da Fazenda Experimental Getúlio Vargas da EPAMIG, localizada no município de Uberaba (MG). O leite foi coletado imediatamente antes da inoculação do patógeno e 24 h após a inoculação. A primeira fita de cDNA foi sintetizada e a análise da expressão dos genes foi feita utilizando-se a metodologia de PCR em Tempo Real. Foram utilizados dois controles endógenos (GAPDH e Ubiquitina) para a normalização dos dados. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa REST©2008 versão 2.0.7, disponível em <http://www.genequantification.de/rest-2008.html> que utiliza o modelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test* para comparar a diferença de expressão entre os tempos. **Resultados:** As comparações do nível de expressão gênica indicaram que no tempo 24 os animais expressaram 17,4 vezes mais *IL-17* que no tempo 0 ( $p < 0,001$ ). Uma importante ação da IL-17 nos locais de infecção é induzir células locais a secretarem citocinas e quimiocinas que atraem neutrófilos. A presença de IL-17 atua como um eficiente amplificador da resposta inflamatória aguda pelo sistema imune inato nos locais recém-infectados, por isso a maior expressão de *IL-17* no tempo 24 era esperada. **Conclusão:** Uma diferença significativa no perfil de expressão do gene *IL-17* foi verificada nos diferentes tempos, sugerindo que este gene desempenhe um papel importante nos mecanismos de resposta à mastite bovina. **Apoio financeiro:** Embrapa/Agrofuturo, CNPq, FAPEMIG.