

XX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
12 a 16 de setembro de 2011

Todas as informações contidas neste trabalho, desde sua formatação até a exposição dos resultados, são de exclusiva responsabilidade dos seus autores

CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE ACESSOS DE *LOLIUM PERENNE*

LAIANE CORSINI ROCHA¹, FERNANDA DE OLIVEIRA BUSTAMANTE², RENATA CASTRO NUNES³, VÂNIA HELENA TECHIO⁴, ANDRÉA MITTELMANN⁵

RESUMO: A falta de pastagens de qualidade durante o inverno é um dos principais problemas enfrentados pelos criadores de gado leiteiro e de corte. O azevém perene (*Lolium perenne*) vem sendo utilizado para suprir a falta de pastagem durante esse período, pois é uma gramínea forrageira resistente ao frio e apresenta alta quantidade de nutrientes requeridas na criação de ruminantes. Com o objetivo de obter cultivares de maior produtividade, qualidade e adaptadas às diferentes regiões fisiográficas tem sido realizado o melhoramento genético com ênfase na indução de poliploidia, a qual pode ser investigada pela técnica de citometria de fluxo. O objetivo deste trabalho foi realizar a certificação do nível de ploidia de cultivares de azevém perene através da quantificação do teor de DNA por meio da citometria de fluxo. As cultivares Oro verde e Ellet apresentaram 10.60 e 5.54 pg de DNA, equivalentes aos níveis tetraploide e diploide, respectivamente. A quantificação do DNA por citometria de fluxo mostrou-se útil na discriminação destes genótipos.

Palavras-chave: quantidade de DNA nuclear, *Lolium perenne*, poliploidia.

INTRODUÇÃO

O gênero *Lolium* (família Poaceae) é composto de gramíneas forrageiras nativas da bacia do Mediterrâneo (Europa, Ásia temperada e Norte da África) (Terrell, 1968). Algumas espécies desse gênero são utilizadas com forragem hibernal, suprimindo o vazio forrageiro durante as estações frias.

Dentre as espécies de *Lolium*, o azevém anual (*L. perenne*) é uma das que tem se destacado como forrageira de primeira qualidade em todo o mundo, tendo maior digestibilidade do que outras espécies de gramíneas perenes de clima temperado (“Species: *Lolium perenne*” 2006). Para atender a demanda de pastagens de alta produtividade e qualidade, várias cultivares tem sido obtidas pela indução de poliploidia, resultando em características agrônômicas superiores quando comparada às espécies diploides.

O nível de ploidia das cultivares melhoradas pode ser verificado por meio da quantificação de DNA usando citometria de fluxo que é uma técnica que fornece resultados rápidos e confiáveis.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o conteúdo de DNA de cultivares de azevém perene para certificação do nível de ploidia.

REFERENCIAL TEÓRICO

A espécie *Lolium perenne* é conhecida popularmente como azevém perene e possui grande importância para a agricultura devido as suas excelentes características agrônômicas. Os azevéns são utilizados como forrageiras de estação fria em regiões de clima temperado onde são o componente dominante de pastagens.

De acordo com estudos realizados por Terrell (1968) o gênero possui oito espécies. Todas as espécies do gênero são tidas como diploides ($2n=2x=14$), mas várias cultivares poliploides obtidas por melhoramento também são reconhecidas (Polok, 2007).

O azevém perene possui ampla distribuição, pois é encontrado em quase toda a Europa, parte significativa da Ásia, África, Australásia e em ambas as Américas. É uma das espécies do gênero

¹ Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas, DBI/UFLA, laianecorsini@gmail.com

² Doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas, DBI/UFLA, fobustamante@gmail.com

³ Graduada em Ciências Biológicas, DBI/UFLA, natinhadecastro@yahoo.com.br

⁴ Professora Adjunta, DBI/UFLA, vhtechio@dbi.ufla.br

⁵ Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite/ Clima Temperado, andrea.mittelmanna@cpact.embrapa.br

XX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA

12 a 16 de setembro de 2011

Todas as informações contidas neste trabalho, desde sua formatação até a exposição dos resultados, são de exclusiva responsabilidade dos seus autores

Lolium mais utilizadas como gramínea forrageira, pois se estabelece rapidamente, apresenta longo período vegetativo e alto rendimento em ambientes favoráveis, além de em muitas regiões de clima frio ser a base alimentar de ruminantes (Hannaway et al. 1999).

O alto teor de proteína bruta durante o período vegetativo possibilita que esta forrageira seja utilizada como alimento em várias raças de gado e demais ruminantes. A partir de programas de melhoramento, foram obtidas cultivares tetraploides que apresentam alta digestibilidade e preferência de pastagem devido a uma maior percentagem de açúcares ("Species: *Lolium perenne*" 2006).

A poliploidia induzida pode ser uma poderosa ferramenta para o melhoramento genético (Blakeslee e Avery, 1937) que favorece a maximização das características agrônômicas, pois as plantas poliplóides, em geral, são maiores e mais robustas que seus genitores diploides, apresentando o chamado efeito "gigas" (Schifino-Wittmann, 2004).

A citometria de fluxo é uma técnica rápida e prática para certificação do nível de ploidia através da análise do conteúdo de DNA nuclear (Dolezel, 1997). A grande vantagem desta técnica é a facilidade e a rapidez da preparação das amostras, a possibilidade de análise de um grande número de núcleos, que não necessitam ser núcleos em divisão, o que permite que praticamente qualquer tecido seja utilizado, e em pequenas quantidades, e a possibilidade de detecção de pequenas diferenças na quantidade de DNA (Bennet & Leitch, 1995).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas as cultivares de azevém perene: Ellett (sete plantas) e Oro verde (49 plantas). Essas plantas pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma de Azevém da Embrapa.

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo para quantificação do teor de DNA nuclear para inferência de ploidia foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

Para a determinação do conteúdo de DNA nuclear foram avaliadas três amostras para cada indivíduo. Para cada amostra, utilizaram-se, aproximadamente, 20-30 mg de folhas jovens de azevém, juntamente com a mesma quantidade de folhas jovens de *Vicia faba* (padrão interno de referência). As amostras foram trituradas em uma placa de Petri contendo 1mL de tampão LB01 gelado, para a obtenção da suspensão nuclear. O tecido triturado foi aspirado por meio de duas camadas de gaze com uma pipeta plástica, filtrado em uma malha de náilon de 50µm e armazenado em um tubo de polietileno. A suspensão nuclear foi corada com 25µL de iodeto de propídeo (1mg/mL) e 2,5µL de RNase foram adicionados a cada amostra, sendo analisados, pelo menos, dez mil núcleos (Dolezel & Bartos, 2005).

A análise foi realizada no citômetro FacsCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA); os histogramas foram obtidos no software Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados no software WinMDI 2.8.

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das amostras foi estimado por meio de comparação com a posição do pico G1 do padrão interno de referência (*Vicia faba* - 26,90 pg/2C). Os cálculos foram feitos de acordo com a equação 1, onde Q é a quantidade de DNA nuclear da amostra (pg/2C), E é a posição do pico G1 da amostra, S é a posição do pico G1 do padrão de referência e R é o conteúdo de DNA nuclear do padrão (26,90 pg).

$$Q = \frac{E}{S} \times R \quad (1)$$

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

XX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
12 a 16 de setembro de 2011

Todas as informações contidas neste trabalho, desde sua formação até a exposição dos resultados, são de exclusiva responsabilidade dos seus autores

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância a 5% de significância, mostrou que as duas cultivares de azevém perene são diferentes quanto ao teor de DNA nuclear (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 - Quantidade de DNA nuclear obtida pela técnica de citometria de fluxo em cultivares de azevém perene (*Lolium perenne*).

Cultivar	Conteúdo de DNA (pg)	CV (%)
Ellett	5,54a*	0,59
Oro verde	10,60b*	0,47

*Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); CV = Coeficiente de variação médio.

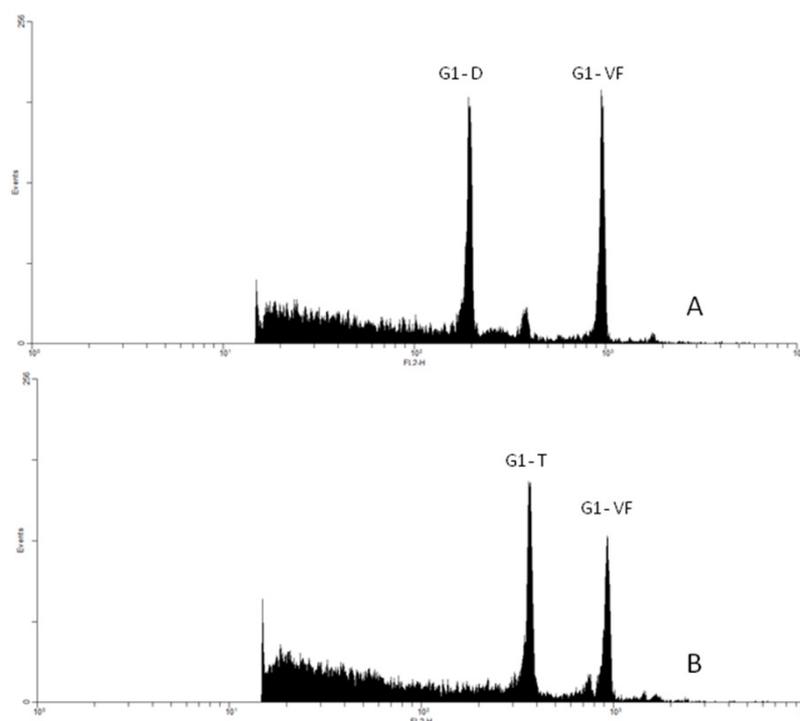


Figura 1. Histogramas do conteúdo de DNA nuclear em folhas jovens de azevém perene. A. Cultivar Ellett com 5,54pg – Diploide; B. Cultivar Oro verde com 10,60pg - Tetraploide; VF = *Vicia faba*. Eixo vertical = número de núcleos lidos; eixo horizontal = intensidade de fluorescência relativa.

A média dos coeficientes de variação (CV) obtidos para as cultivares (Tabela 1) demonstram a confiabilidade dos resultados, uma vez que valores entre 1 e 2% são considerados de alta qualidade (Marie & Brown, 1993).

A cultivar Oro verde possui, em média, duas vezes maior quantidade de DNA do que a cultivar Ellett (Tabela 1 e Figura 1). Considerando que a cultivar Ellett é caracterizada como diplóide na Coleção de Base da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por inferência, pode-se dizer que a cultivar Oro verde é tetraploide. Essa constatação é útil ao programa de melhoramento genético do azevém, pois confirma a ploidia do genótipo, que é uma informação fundamental para seu uso adequado em cruzamentos.

XX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA

12 a 16 de setembro de 2011

Todas as informações contidas neste trabalho, desde sua formatação até a exposição dos resultados, são de exclusiva responsabilidade dos seus autores

Estudos semelhantes de quantificação do conteúdo de DNA em acessos de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) foram realizados por Techio et al., (2010), cujos valores próximos a 5,60pg caracterizaram os acessos diplóides e valores próximos a 10,80pg caracterizaram os tetraploides.

Em gramíneas, estudos de inferência de ploidia por meio da quantificação de DNA nuclear via citometria de fluxo foram realizados em muitas espécies, tais como milho (Couto, 2011), e híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milho (Bustamante, 2009; Campos et al., 2009; Leão, 2009), *Brachiaria* (Timbó et al, 2011).

CONCLUSÃO

As cultivares Oro verde e Ellet apresentaram 10.60 e 5.54 pg de DNA equivalentes aos níveis tetraploide e diploide, respectivamente. A quantificação do DNA por citometria de fluxo mostrou-se útil na discriminação deste genótipos

REFERÊNCIAS

BENNET, M.D., LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, Bristol, v.76, p.113-176,1995.

BLAKESLEE, H., AVERY, A.G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. **Journal of Heredity**, Washington, v. 28, p.393-411, 1937.

BUSTAMANTE, F.O. Variações cromossômicas associadas à poliploidização em híbridos de *Pennisetum* spp.: um estudo temporal e tecido específico. 2009. 53p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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**, v.128, p.101-104, 2009.

COUTO, E. G. O. **Identificação de milho haploide por citometria de fluxo, marcadores morfológicos e moleculares**. 2011. 46p. Monografia (Ciências Biológicas). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DOLEZEL, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. In: LELLEY, T. **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna : WUV-Universitätsverlag, 1997. p.80-90.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, p. 99-110, 2005.

HANNAWAY D., FRANSEN S., CROPPER J., TEEL M., CHANEY M., GRIGGS T., HALSE R., HART J., CHEEKE P., HANSEN D., KLINGER R., LANE W. 1999. **Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)**. PNW [Internet].[cited 2011]; 503.
Disponível em:<http://cropandsoil.oregonstate.edu/News/>

LEÃO, F.F. **Citogenética e potencial forrageiro de combinações genômicas de capim-elefante e milho**. 2009. 112p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, n. 1/2, p. 41-51, 1993.

XX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA
12 a 16 de setembro de 2011

Todas as informações contidas neste trabalho, desde sua formatação até a exposição dos resultados, são de exclusiva responsabilidade dos seus autores

POLOK, K. **Molecular evolution of the genus *Lolium* sp.** Olsztyn: Studio Poligrafii Komputerowej, 2007.

Species: *Lolium perenne*. Value and use. [date unknown]. [Internet] [cited 2006 Sept 20]. Disponível em: <http://www.fs.fed.us/database/feis/plants>.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Polyploidy And Its Impact On The Origin And Evolution Of Wild And Cultivated Plants. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 2, p. 151-157, abr-jun, 2004.

TECHIO, V. H. ; NUNES, R. C ; BUSTAMANTE, F. O. ; DAVIDE, L. C.; MITELLMAN, A. Nuclear DNA content from naturalized genotypes of *Lolium multiflorum* Lam.. In: Jornadas de mejoramiento genético de forrajeras, 2010, Llavallol -Buenos Aires. **Actas 2010**. Llavallol -Buenos Aires : Instituto Fitotecnico de Santa Catalina, 2010. v. 1. p. 156.

TERREL, E. E. A taxonomic revision of the genus *Lolium*. **USDA Techn Bull**, v. 1392, p.1-65.1968.

TIMBÓ, A. L. O. **Duplicação cromossômica e identificação do nível de ploidia utilizando citometria de fluxo em *Brachiaria* spp.** 2011.100p. 2010. Tese de doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade Federal de Lavras.