INFERÊNCIA DO NÍVEL DE PLOIDIA DE ACESSOS DE *LOLIUM MULTIFLORUM* A PARTIR DA DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR

RENATA DE CASTRO NUNES[1], FERNANDA DE OLIVEIRA BUSTAMANTE[2], LAIANE CORSINI ROCHA[3], VÂNIA HELENA TECHIO[4], ANDRÉA MITTELMANN[5]

RESUMO: *A crescente demanda alimentar proveniente do crescimento populacional tem impulsionado cada vez mais a indústria alimentícia. Diante desse cenário torna-se imprescindível o melhoramento genético de forrageiras seja destinada a alimentação de gado leiteiro ou de corte. O azevém anual (Lolium multiflorum Lam.) é a principal espécie forrageira de clima temperado cultivada no Brasil destinada à alimentação animal. Devido a grande variabilidade existente nas populações dessa espécie, a obtenção de progênies resultantes do cruzamento de acessos diploides e tetraploides constitui uma ferramenta potencial, uma vez que as progênies podem reunir características de interesse além de permitir o estudo do processo reprodutivo. A certificação de ocorrência dos cruzamentos é uma etapa importante que pode ser realizada por meio da quantificação do teor de DNA por citometria de fluxo. Dessa forma, o presente trabalho objetivou fazer inferências do nível de ploidia a partir do conteúdo de DNA nuclear em folhas jovens de azevém anual das cultivares Comum e Barjumbo e da progênie resultante do cruzamento entre elas, pela técnica de citometria de fluxo. As cultivares Comum e Barjumbo apresentaram 5,43 e 10,87 pg de DNA, compatíveis com os níveis diploide e tetraploide, respectivamente. Para a progênie, três plantas avaliadas apresentaram conteúdo de DNA correspondente aos diploides (5,40-5,62pg), uma ao triploide (8,30pg)e as outras 21 plantas similares aos tetraploides (10,23-11,56pg). A metodologia de "chance hybrids" permitiu a obtenção de ao menos uma planta híbrida. Quanto aos diploides, sua formação precisa ser melhor estudada.*

Palavras-chave: quantidade de DNA nuclear, azevém anual, citometria de fluxo, melhoramento genético.

INTRODUÇÃO

O constante crescimento populacional tem impulsionado cada vez mais o setor alimentício, que assim, também necessita expandir-se. Nesse aspecto torna-se cada vez mais importante o melhoramento genético de gramíneas destinadas a alimentação de rebanhos voltados para a produção de carne ou de leite.

No Brasil, o azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) é a principal espécie forrageira de clima temperado cultivada para a alimentação dos rebanhos durante a estação fria do ano (Pinto et al., 2004). O genêro *Lolium* é constituído por oito espécies diploides (2n=2x=14), entre elas o azevém anual, e algumas cultivares poliploides.

Existe grande variabilidade entre e dentro de populações locais de azevém, seja na Espanha (Oliveira, 1997), Argentina (Alonso, 2004) ou Brasil (Corrêa et al., 2007). Entretanto, existem poucas cultivares disponíveis no Brasil, e a maior parte da semente comercializada é identificada apenas como "cultivar comum". Assim, a obtenção de progênies resultantes do cruzamento de acessos diploides e tetraploides de azevém anual é de grande interesse para o melhoramento genético da espécie.

[1] Graduanda em Ciências Biológiacs, DBI/UFLA, natinhadecastro@yahoo.com.br
[2] Doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas, DBI/UFLA, fobustamante@gmail.com
[3] Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas, DBI/UFLA, laianecorsini@gmail.com
[4] Professora Adjunta, DBI/UFLA, vhtechio@gmail.com
[5] Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite /Clima Temperado, andrea.mittelmann@cpact.embrapa.br

A determinação da quantidade de DNA via citometria de fluxo constitui um método rápido e alternativo para estimar o nível de ploidia das espécies. Em situações onde parentais diferem no conteúdo de DNA, este procedimento pode ser empregado para a certificação dos cruzamentos.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo fazer inferências do nível de ploidia a partir da determinação do conteúdo de DNA nuclear em folhas jovens de acessos de azevém anual pela técnica de citometria de fluxo em cultivares Comum e Barjumbo e da progênie resultante do cruzamento entre elas.

REFERENCIAL TEÓRICO

O azevém anual pertence à família Poaceae e é originário da bacia do Mediterrâneo (sul da Europa, norte da África e Ásia Menor) de onde se espalhou para a Europa e posteriormente América do Norte. Em 1818 já era conhecido na França e em 1820 na Suíça, sendo introduzido na Inglaterra em 1831 (Nelson et al., 1997). Foi cultivado pela primeira vez na Itália e devido a tal fato também recebe o nome de azevém italiano (*Lolium italicum*).

Na região sul do Brasil, o azevém anual provavelmente foi introduzido por colonos italianos em 1875. Atualmente é uma das gramíneas hibernais mais cultivadas no Rio Grande do Sul, tanto para ceifa quanto para pastagens cultivadas, sendo utilizada, isoladamente ou consorciada, na alimentação dos rebanhos durante a estação fria do ano, uma vez que a espécie é totalmente aclimatada a essa região (Araújo, 1978).

No Brasil, as atividades voltadas ao melhoramento do azevém tiveram início na Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, em 1999 com a realização de coletas de germoplasma. Tendo em vista o longo tempo decorrido desde a introdução do azevém no Rio Grande do Sul, cerca de 150 anos, esperava-se obter populações com alto grau de adaptação às diferentes condições de solo e clima do Estado. As sementes coletadas originaram experimentos pioneiros que demonstraram a existência de variabilidade entre essas populações (Dias et al., 2001).

A partir de 2002, as atividades de melhoramento do azevém foram retomadas, com o estabelecimento do banco de germoplasma de azevém e de um programa de melhoramento conduzido em parceria entre Embrapa Gado de Leite- Juiz de Fora/MG, Embrapa Clima Temperado-Pelotas/RS e Embrapa Pecuária Sul-Bagé/RS.

Recentemente, diversas cultivares tetraplóides têm sido obtidas e introduzidas no Brasil, com características agronômicas interessantes, como ciclo longo (Mittelmann et al., 2004), mas tem apresentado baixa capacidade de ressemeadura natural. Assim, a obtenção de progênies resultantes do cruzamento de acessos diploides e tetraploides de azevém anual é de interesse para o melhoramento genético da espécie, pela introdução de características agronômicas e o estudo das progênies permitirá melhor conhecer o processo reprodutivo nessas cultivares.

Para a verificação de ploidia em larga escala tem sido realizada a análise do conteúdo de DNA nuclear utilizando a técnica de citometria de fluxo, já que essa é uma técnica rápida, não necessita de células em divisão e é uma metodologia não destrutiva (Dolezel, 1997), sendo que nos casos em que os parentais apresentam diferenças significativas na quantidade de DNA, é possível identificar a ocorrência de cruzamentos utilizando essa técnica.

MATERIAL E MÉTODOS

A caracterização dos acessos de azevém anual avaliados bem como a ploidia esperada e o número de indivíduos avaliados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização, ploidia esperada e número de indivíduos avaliados (N^1) de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.).

Caracterização	**Ploidia esperada**	**N^1**
Cultivar Comum	2x	25
Cultivar Barjumbo	4x	20
Progênie (♂Comum x Barjumbo ♀)	3x	25

As cultivares Comum e Barjumbo são cultivares comerciais disponíveis no Brasil, cujas amostras para este trabalho foram oriundas do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Forrageiras da Embrapa Gado de Leite/Embrapa Clima Temperado. O cruzamento entre elas foi realizado em casa de vegetação, sem emasculação, com a técnica denominada "chance hybrids", onde algumas plantas de cada cultivar são mantidas lado a lado e procura-se sincronizar o florescimento realizando cortes no material mais precoce. Apenas as plantas da cultivar Barjumbo foram colhidas, sendo essa a cultivar materna da progênie.

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo para quantificação do teor de DNA nuclear 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).

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância confirmou que há diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao conteúdo de DNA entre as cultivares Comum, Barjumbo e a progênie resultante desse cruzamento, cujos valores médios se enquadram nos níveis diploide para a cultivar Comum e tetraploide para a

cultivar Barjumbo e para a progênie, com 5,43; 10,87 e 10,17pg respectivamente (Tabela 2 e Figura 1).

Tabela 2 - Quantidade média de DNA nuclear obtida pela técnica de citometria de fluxo em azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.).

Material	**Conteúdo de DNA (pg)**	**CV (%)**
Cultivar Comum	5,43a*	0,51
Cultivar Barjumbo	10,87b*	0,43
Progênie	10,17b*	0,48

*Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott (P<0,05)

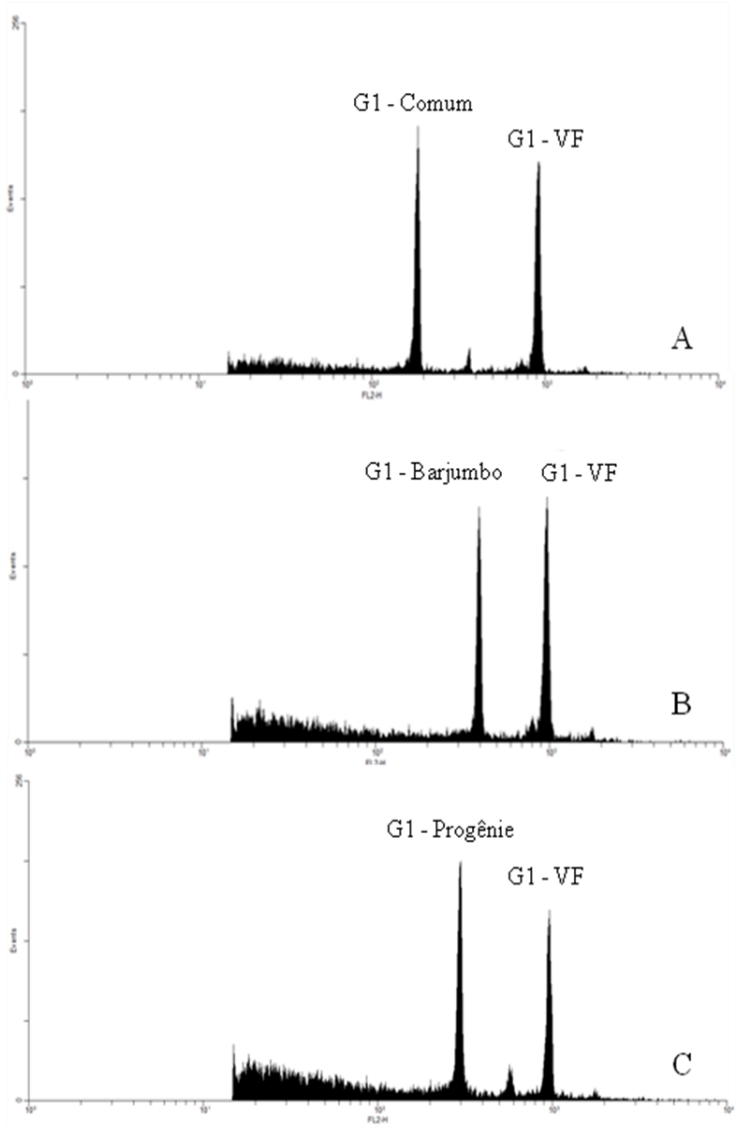

Figura 1. Histogramas do conteúdo de DNA nuclear em folhas jovens de azevém anual. A. Cultivar Comum com 5,44pg; B. Cultivar Barjumbo com 10,88pg; C. Progênie com 8,30pg. VF = *Vicia faba*. Eixo vertical = número de núcleos lidos; eixo horizontal = intensidade de fluorescência relativa.

Para a cultivar Comum verificou-se uma variação na quantidade de DNA entre 5,33pg (indivíduos 09 e 20) e 5,64pg (indivíduo 21), valor compatível com o esperado para genótipos

diploides. Para a cultivar Barjumbo verificou-se uma variação entre 10,19pg (indivíduo 19) e 11,65pg (indivíduo 17), valores esperados para plantas tetraploides. Para a progênie, três plantas avaliadas apresentaram conteúdo de DNA correspondente aos diploides, uma ao triplóide (Figura 1C) e as outras 21 plantas similares aos tetraploides (Tabela 3).

Tabela 3 - Amplitude de variação no conteúdo de DNA (pg) e inferência de ploidia de indivíduos pertencentes a progênie resultante do cruzamento entre as cultivares Comum e Barjumbo.

Indivíduos	**Amplitude de variação no conteúdo de DNA (pg)**	**Ploidia**
10, 14 e 21	5,40 - 5,62	2x
15	8,30	3x
Demais	10,23 -11,56	4x

Assim, a planta triploide possivelmente é a única realmente resultante de cruzamento. Os indivíduos tetraploides seriam resultantes de pólen do próprio Barjumbo, que foi utilizado como mãe. E no caso das plantas diploides, técnicas mais apuradas como FISH (Hibridização Fluorescente *in situ*) e GISH (Hibridização Genômica *in situ*) serão necessárias para investigar se ocorreu a formação de um gameta feminino reduzido.

Techio et al. (2010), ao estudarem sete acessos de azevém anual detectaram os níveis diploide para dois acessos (5,48 - 5,76pg), triploide para um acesso (8,07pg) e tetraplóide para quatro acessos (10,66 - 11,19pg). Essas inferências são resultantes da estimativa do conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo.

A média geral dos coeficientes de variação foi de 0,47% para os três acessos, o que indica a confiabilidade dos resultados, uma vez que valores entre 1 e 2% são considerados de alta qualidade (Marie & Brown, 1993).

CONCLUSÃO

A metodologia de "chance hybrids" permitiu a obtenção de ao menos uma planta híbrida. Quanto aos diploides, sua formação precisa ser melhor estudada.

REFERÊNCIAS

ALONSO, S. I. Evalution of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) populations naturalized in the pampa of Argentina: I- Morphological and physiological characters at the juvenile stage. **Genetic Resources and Crop Evolution,** Wageningen, v.51, p.747-758, 2004.

ARAÚJO, A. A. **Forrageiras para ceifa: capineiras, fenação e ensilagem.** Porto Alegre: Sulin, 1978. 196p.

CORRÊA, B. O.; MITTELMANN, A.; STUMPF, T. M.; PERES, M. M.; DUARTE, P. R. Caracteres agronômicos em populações locais de azevém no Sul do Brasil. **Magistra**, v.19, n.4, p.274-282. 2007.

DIAS, J. C. A.; GOMES, J. F.; INFELD, J. A. **Avaliação de genótipos de azevém anual em solos hidromórficos.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001, 2p. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico, 42).

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plants genomes. **Journal of Applied Genetics,** Olomouc, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

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

HAMMIL, S.D; SMITH, M.K.; DODD, W.A. *In vitro* induction of banana autotetraploides by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany.**40:887-896, 1992.

MARIE, D.; BROWN, S. A citrometric 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.

MITTELMANN, A.; LÉDO, F. J. S.; POLI, C. H. E. C.;MORAES, C. O. C.; NESKE, M. Z. **Avaliação de populações de azevém quanto à produção de forragem.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2004. 12 p. (Embrapa Gado de Leite/Boletim de Pesquisa, 15).

NELSON, L. R.; PHILLIPS, T. D.; WATSON, C. E. Plant breeding for improved production in annual ryegrass: In: ROUQUETTE, F. M.; NELSON, L. R. **Ecology, production, and management of *Lolium* for forage in the USA.** Madison: Crop Science Society of America, 1997, 138p.

OLIVEIRA, J. A.; LINDER, R.; BREGU, R. **Genetic diversity of westerwold ryegrass landraces collected in Northwest Spain.** Genetic Resources and Crop Evolution, v.44, p.479-487, 1997.

PINTO, L. F. E.; LAUS, J. A.; PAULETTO, E. A. Solos de várzea no sul do Brasil. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES Jr, A. M. **Arroz irrigado no sul do Brasil.** Embrapa - Informação Tecnológica, Distrito Federal, Brasília, 2004, cap. 3, p. 75 -95.

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.