

Análise de densidade e diâmetro estomático em híbridos interespecíficos de *Pennisetum*

Tatiana Aparecida Silva, Marco Antônio Machado, Juliane Dornellas Nunes, Ana Luisa Sousa Azevedo, Antônio Vander Pereira

Resumo

O gênero *Pennisetum* apresenta várias espécies de grande valor econômico, entre as mais estudadas estão o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e o milheto (*P. glaucum*). Uma estratégia bastante utilizada e recomendada no melhoramento genético é a hibridação interespecífica entre essas duas espécies, porém, o híbrido formado é estéril e a fertilidade só é restaurada através da duplicação do DNA. Diferentes técnicas são utilizadas para certificar se o DNA realmente foi duplicado, entre elas pode-se citar a análise estomática. Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar a eficiência da análise da densidade e diâmetro estomático em distinguir híbridos interespecíficos com diferentes níveis de ploidia. Foram avaliadas a densidade e tamanho estomático de híbridos interespecíficos, triploides e hexaploides. Após as análises, foi possível identificar diferenças significativas entre a densidade estomática das epidermes foliares abaxial e adaxial. No entanto não foi possível a distinção entre os genótipos triploides e hexaploides. Os genótipos triploides apresentaram diâmetros significativamente menores do que os genótipos hexaploides. A anatomia estomática revelou que através do diâmetro polar é possível a separação entre os genótipos 3x e 6x.

Palavras-chave: capim-elefante; densidade e diâmetro estomático; milheto.

Analysis of stomatal density and diameter in interspecific hybrids of *Pennisetum*

Abstract

The *Pennisetum* genus has several species of great economic value, napier grass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*P. glaucum*) are the most studied. A strategy widely used and recommended in breeding program is the interspecific hybridization between these two species, however, the hybrid formed is sterile and fertility is restored only through DNA duplication. Different techniques are used to make sure the DNA was actually doubled between them stomatal analysis. Thus, this study aimed to evaluate the effectiveness of the analysis of stomatal density and diameter to distinguish interspecific hybrids with different ploidy levels. The interspecific hybrids, triploid and hexaploid, stomatal density and size were evaluated. There were significant differences in the stomatal density between abaxial and adaxial leaf epidermis. However were unable to distinguish between the triploid and hexaploid genotypes. The triploid genotypes had significantly smaller diameters than the hexaploid genotypes. The stomatal anatomy revealed through the polar diameter is possible to separate between genotypes 3x and 6x.

Keywords: napier grass; stomatal density and diameter; pearl millet.

Introdução

O gênero *Pennisetum* está entre os mais importantes da família Poaceae e possui aproximadamente 140 espécies. Diversas espécies apresentam grande valor econômico, como o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e o

milheto (*Pennisetum glaucum*). Uma estratégia bastante utilizada e recomendada no melhoramento genético de *Pennisetum* é a hibridação interespecífica. A proximidade genética entre o capim-elefante e o milheto possibilita a obtenção de híbridos com relativa facilidade (SOUZA SOBRINHO et al., 2005). No entanto, este híbrido é triploide e estéril, o que dificulta a sua propagação via sementes. A restauração da fertilidade pode ser obtida através do uso de agentes antimitóticos, que produzirão híbridos hexaploides com meiose regular. Dessa forma, a Embrapa Gado de Leite desenvolve um programa de melhoramento utilizando a técnica acima citada.

Dentre os eventos mais comuns decorrentes da poliploidização está o aumento de alguns órgãos e estruturas das plantas (GUERRA, 1988). Assim, o interesse por plantas poliploides vem se tornando cada vez mais frequente, principalmente no melhoramento de forrageiras, sendo a análise do tamanho e da densidade estomática uma forma de estudo das mesmas. O estudo do comprimento e tamanho dos estômatos se tornou muito útil para o melhoramento de plantas e para a citogenética, auxiliando na confirmação do nível de ploidia (LEÃO, 2009).

Este trabalho objetivou avaliar a eficiência da análise da densidade e diâmetro estomático em distinguir híbridos interespecíficos entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum* com diferentes níveis de ploidia

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Juiz de Fora, MG. Foram avaliadas a densidade e diâmetros estomáticos de oito genótipos de propagação vegetativa de *Pennisetum*, sendo dois híbridos interespecíficos triploides (CNPGL 92-176-3, CNPGL 94-49-6), e seis híbridos interespecíficos hexaploides (PCM0701-11, PCM0701-22, PCM0701-31, PCM0701-32, PCM0701-34, PCM0701-35). Foram coletadas amostras de três folhas completamente expandidas, de cada genótipo.

As lâminas foram preparadas pelo método de impressão da epiderme. A análise da densidade estomática foi realizada sob objetiva de 40x, ao qual estava acoplada uma câmera digital (*Sony CyberShot*) para digitalização das imagens. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições sendo que os tratamentos foram dispostos no esquema fatorial 8 (genótipos) x 2 (epidermes foliares abaxial e adaxial).

A análise do diâmetro estomático foi realizada através do programa *Image Tool* 3.0 UTHSCSA. Foram realizadas as medições dos diâmetros equatoriais e polares dos estômatos. Foram selecionados para a medição 10 estômatos por superfície (abaxial e adaxial), totalizando 40 estômatos medidos por acesso. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e a comparação entre as médias foi feita utilizando-se o teste de Scott-Knott.

Resultados e Discussão

A análise da densidade estomática evidenciou que existem diferenças significativas entre as epidermes foliares abaxial e adaxial dos genótipos analisados (Tabela 1). A epiderme abaxial apresentou densidade estomática de 162,58 estômatos/mm², significativamente maior do que a epiderme adaxial, com 120,75 estômatos/mm². No entanto, não foi possível a distinção entre os genótipos triploides e hexaploides através da densidade estomática. Campos et al. (2009) observaram reduções na frequência de estômatos/mm² de 48,83% e 44,83%, nas epidermes abaxial e adaxial, respectivamente, em plantas de híbridos hexaploides interespecíficos de *Pennisetum*, em comparação a híbridos triploides. O autor relatou ainda o aumento do tamanho dos estômatos nas plantas hexaploides, que apresentaram estômatos 1,52 vezes maiores do que os observados nas plantas triploides.

A anatomia estomática revelou que através do diâmetro polar é possível a separação entre os genótipos 3x e 6x. Os genótipos triploides apresentaram diâmetros significativamente menores do que os genótipos hexaploides, nas duas epidermes foliares. O genótipo triploide CNPGL94-49-6 apresentou o menor diâmetro polar abaxial com 15,84 μ m, enquanto o genótipo hexaploide PCM0701-22 apresentou o maior valor com 36,87 μ m de diâmetro polar abaxial. Os valores de diâmetro equatorial variaram de 44,18 a 51,70 μ m na epiderme adaxial e 40,46 a 50,07 μ m na epiderme abaxial, no entanto não foi possível distinguir as ploidias dos genótipos através desta característica.

Tabela 1. Teste de médias e análises de variância para densidade e diâmetros estomáticos.

Genótipos	Densidade adaxial	Densidade abaxial	Diâmetro polar adaxial	Diâmetro equatorial adaxial	Diâmetro polar abaxial	Diâmetro equatorial abaxial
CNPGL 92 -176-3	174,34 a	160,76 b	18,10 c	51,70 a	16,23 c	46,24 a
CNPGL 94 -49-6	126,22 b	188,56 a	19,00 c	45,00 b	15,84 c	40,46 b
PCM0701 -11	122,46 b	163,76 b	33,73 a	48,73 a	32,11 b	46,34 a
PCM0701 -22	98,12 c	166,76 b	33,96 a	49,02 a	36,87 a	50,07 a
PCM0701 -31	95,13 c	148,77 b	33,06 a	44,18 b	36,41 a	48,73 a
PCM0701 -32	103,08 c	155,70 b	30,68 b	47,09 a	35,03 a	47,10 a
PCM0701 -34	122,28 b	130,52 b	29,41 b	47,40 a	29,88 b	46,80 a
PCM0701 -35	124,34 b	185,76 a	35,62 a	47,64 a	34,71 a	49,11 a
Média	120,75	162,58	29,19	47,59	29,64	46,86
QM	3771,89 ^{**}	2142,91 ^{**}	469,48 ^{**}	55,60 ^{**}	755,94 ^{**}	86,45 ^{**}
CV%	15,80	15,80	10,06	9,03	10,71	13,76

QM – Quadrado médio

^{**} Significativo a 1% de probabilidade pelo Teste de F. Médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott

CV – Coeficiente de variação

Pode-se observar a tendência dos genótipos 3x apresentarem maior número de estômatos, com diâmetros menores. Observou-se a tendência inversa nos genótipos 6x. Costa et al. (2009) avaliaram híbridos interespecíficos de *Pennisetum* de diferentes ploidias e verificaram que não houve correlação entre poliploidização e redução na frequência de estômatos. Os genótipos triploides, tetraploides e hexaploides apresentaram densidades estomáticas estatisticamente iguais nas diferentes regiões foliares avaliadas.

A distinção de espécies ou indivíduos com diferentes níveis de ploidia através da análise do número e do tamanho dos estômatos foram indicadores confiáveis em vários trabalhos (COSTA et al., 2004; CAMPOS et al., 2009). Os resultados aqui obtidos evidenciaram que a utilização da análise estomática para distinção de ploidias deve estar associada a outras técnicas tais como citometria de fluxo e análise citogenética. Leão et al. (2009) constatou que a anatomia de estômatos sofre variações decorrentes de efeito ambiental e portanto não é recomendável para a identificação de ploidias e combinações genômicas em *Pennisetum*.

Conclusões

O diâmetro polar nas epidermes abaxial e adaxial foi a única característica estomática que permitiu a completa distinção entre os genótipos 3x e 6x.

As epidermes foliares e regiões foliares avaliadas apresentaram diferenças significativas entre si.

A anatomia estomática é uma ferramenta útil na caracterização de genótipos de *Pennisetum*, mas não é um indicador seguro para distinção de ploidias no gênero.

Agradecimentos

A Embrapa Gado de Leite ao CNPq e à Fapemig pelo apoio ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Referências

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. 128p. 101-104. 2009.

COSTA, M. P. A. C.; ALMEIDA, W. A. B.; FILHO, F. A. A. M.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Stomatal analysis of citrus somatic hybrids obtained by protoplasm fusion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 297-300, 2004.

COSTA, P. P.; COELHO, V. A. T.; PEREIRA, A. V.; PAULA, C. M. P.; NUNES, J. D.; LÉDO, F. J. S.; AUAD,

A. M.; SOUZA SOBRINHO, F.; AZEVEDO, A. L. S. **Avaliação do número de estômatos em híbridos intra e interespecíficos de *Pennisetum* sp.** Resumo expandido. Anais do 5º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Guarapari, ES. 2009.

GUERRA, M. Introdução à citogenética geral. Ed. Guanabara. 1988. 142p.

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

SOUZA SOBRINHO, F. de; PEREIRA, A. V.; LÉDO, F. J. da S.; BOTREL, M. de A.; OLIVEIRA, J.S.; XAVIER, D.F. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 873-880, 2005.