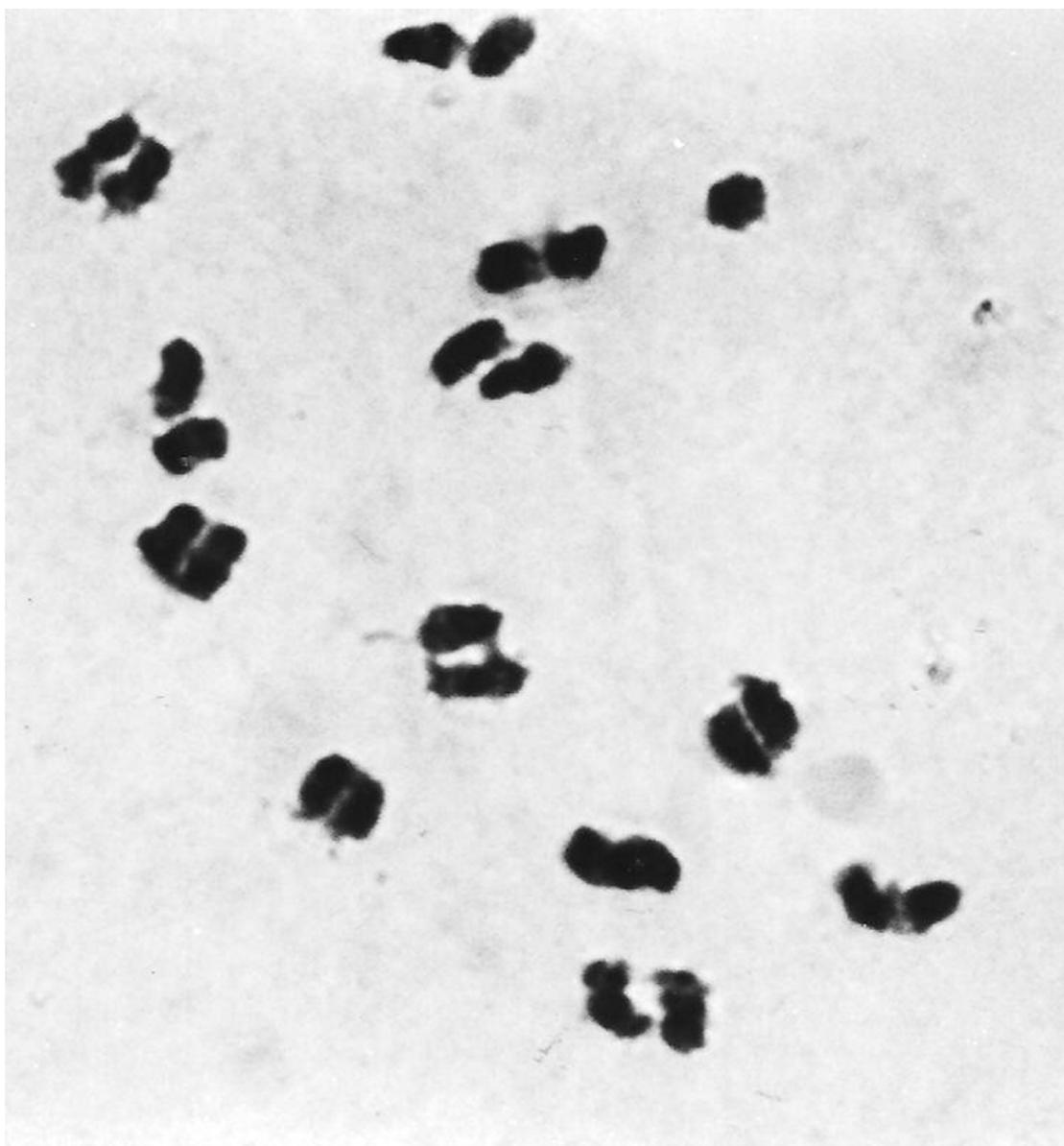


## Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Caracterização Citogenética e Reprodutiva

Foto: Marisa Toniolo Pozzobon



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Documentos 313***

### **Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Caracterização Citogenética e Reprodutiva**

Marisa Toniolo Pozzobon  
Andréa del Pilar de Souza Peñaloza  
Sileuza dos Santos

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): [sac@cenargen.embrapa.br](mailto:sac@cenargen.embrapa.br)

**Comitê Local de Publicações**

Presidente: *Lucio Brunale*

Secretária-Executiva: *Ligia Sardinha Fortes*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*

*Jonny Everson Scherwinski Pereira*

*José Roberto de Alencar Moreira*

*Regina Maria Dechechi G. Carneiro*

*Samuel Rezende Paiva*

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

*Margot Alves Nunes Dode*

Revisor técnico: Alessandra Pereira Fávero

Supervisor editorial: Lígia Sardinha Fortes

Revisor de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Lígia Sardinha Fortes

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Foto da capa: Marisa Toniolo Pozzobon

**1ª edição (on line)**

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

---

Pozzobon, Marisa Toniolo.

Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Caracterização citogenética e reprodutiva. / Marisa Toniolo Pozzobon, Andréa del Pilar de Souza Peñaloza e Sileuza dos Santos. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

14 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 313)

Revisão técnica: Alessandra Pereira Fávero.

1. Recursos Genéticos - Vegetal – Conservação. 2. Caracterização citogenética. 3. Caracterização reprodutiva. I. Peñaloza, Andréa del Pilar de Souza. II. Santos, Sileuza dos. III. Título. IV. Série.

581.15 - CDD

# **Autores**

**Marisa Toniolo Pozzobon**

Ph.D. em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

[marisa@cenargen.embrapa.br](mailto:marisa@cenargen.embrapa.br)

**Andréa del Pilar de Souza Peñaloza**

Ph.D. em Ciências Biológicas (Genética), pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

[andrea@cenargen.embrapa.br](mailto:andrea@cenargen.embrapa.br)

**Sileuza dos Santos**

Assistente da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

[sileuza@cenargen.embrapa.br](mailto:sileuza@cenargen.embrapa.br)

# Apresentação

Desde o início da década de 1970, há uma crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas de variabilidade genética dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação.

No Brasil, esta necessidade é especialmente importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do país é de origem exótica. Observa-se, por exemplo, que cerca de 95% dos acessos de cereais conservados em coleções do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são de espécies exóticas. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuo da variabilidade genética dessas coleções são prioritários e estratégicos, considerando, ainda, as atuais restrições internacionais ao intercâmbio de germoplasma.

Na década de 1970, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de Centros para a conservação de recursos genéticos situados em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Em 1974, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) criou o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje transformado no *Biodiversity International*. No mesmo ano, a Embrapa reconheceu a importância estratégica dos recursos genéticos com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura-síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do SNPA estabeleceram ambiente propício para a formatação da Rede Nacional de Recursos Genéticos. A partir de então, paulatinamente, coleções de germoplasma foram estruturadas em diferentes Unidades Descentralizadas, predominantemente na área vegetal.

Em 1993, por intermédio de deliberação da Diretoria Executiva, a Embrapa formalizou, como ferramenta de gestão das coleções, o Sistema de Curadorias de Germoplasma e definiu os papéis e as responsabilidades para os diversos atores envolvidos nesse Sistema, tais como: curadores de coleções de germoplasma, Chefes de Unidades Descentralizadas que abrigavam as coleções e a Supervisão de Curadorias. Os projetos em rede foram definidos como figuras programática e operacional, possibilitando o custeio de atividades de coleta, intercâmbio, quarentena, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização de germoplasma, além da manutenção das coleções. De 1993 até a presente data, muitas coleções de germoplasma foram estabelecidas e, atualmente, o Sistema de Curadorias da Embrapa reúne 209 coleções, incluindo Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal (BAGs), Núcleos de Conservação Animal, Coleções Biológicas de Micro-organismos e Coleções de Referência, as quais abrangem espécies nativas e exóticas.

Nas demais Instituições do SNPA, estima-se que são mantidos pelo menos outros 243 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal.

Como duplicata de segurança dos acessos mantidos nos BAGs, a Embrapa Cenargen abriga a Coleção de Base (COLBASE) de germoplasma vegetal, projetada para conservar sementes à temperatura de -20°C por longo período de tempo.

Como consequência desses 30 anos de atividades relacionadas ao manejo dos recursos genéticos, os curadores adquiriram uma bagagem de conhecimentos práticos na área, conhecimentos estes que foram, em parte, sistematizados e disponibilizados para a sociedade por intermédio da presente obra: "Manual de Curadores de Germoplasma".

Esperamos que esta publicação em série torne-se um guia para os curadores de germoplasma no Brasil e no exterior, e que contribua efetivamente para o aprimoramento da gestão dos recursos genéticos deste país.

*Mauro Carneiro*

Chefe Geral

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

# Sumário

<b>Introdução e definição</b>	08
<b>Aplicações</b>	08
<b>Parâmetros utilizados na análise citogenética</b>	08
Número cromossômico	08
Comportamento meiótico (pareamento e segregação cromossômica)	09
Viabilidade e germinabilidade polínica	09
Padrões de bandeamento	10
Bandeamento cromossômico por coloração diferencial	10
Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	10
<b>Caracterização reprodutiva</b>	10
Aplicações	10
Determinação do modo de reprodução	11
<b>Coleta de material para análise</b>	11
<b>Referências</b>	12

# Caracterização Citogenética e Reprodutiva

---

*Marisa Toniolo Pozzobon*  
*Andréa del Pilar de Souza Peñaloza*  
*Sileuza dos Santos*

## Introdução e definição

A Citogenética é uma ciência especializada da genética que estuda a relação entre os eventos celulares, especialmente aqueles relacionados aos cromossomos, com os eventos genéticos e fenotípicos. Abrange todo e qualquer estudo de morfologia, organização, função, replicação, variação e evolução dos cromossomos, estejam estes isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos.

## Aplicações

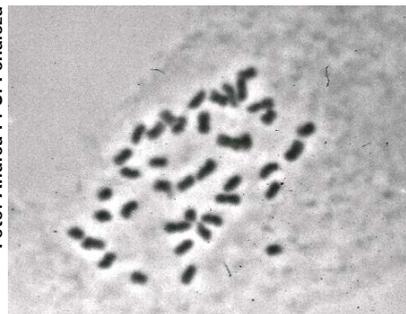
A caracterização citogenética pode ser empregada para a identificação do número cromossômico e do nível de ploidia; em estudos de instabilidade cromossômica; na determinação dos níveis de fertilidade e esterilidade; em estudos de evolução e citotaxonomia; em auxílio à caracterização molecular, pela localização de sequências específicas de DNA, diretamente nos cromossomos, pela hibridização *in situ*; na avaliação de híbridos em programas de melhoramento, principalmente quando há o envolvimento de espécies distintas; na análise de ligações e genética; como ferramenta na avaliação de plantas regeneradas *in vitro* ou transformadas e transferência de genes; entre outras.

## Parâmetros utilizados na análise citogenética

### Número cromossômico

Parâmetro bastante utilizado e de fundamental importância na caracterização de germoplasma. Auxilia no entendimento das alterações genéticas envolvidas na evolução, bem como na delimitação taxonômica das espécies. As contagens são feitas pela análise mitótica de células somáticas em pontas de raízes ou pela análise meiótica em células-mãe de pólen (CMP) provenientes de inflorescências jovens.

Foto: Andréa P. S. Peñaloza



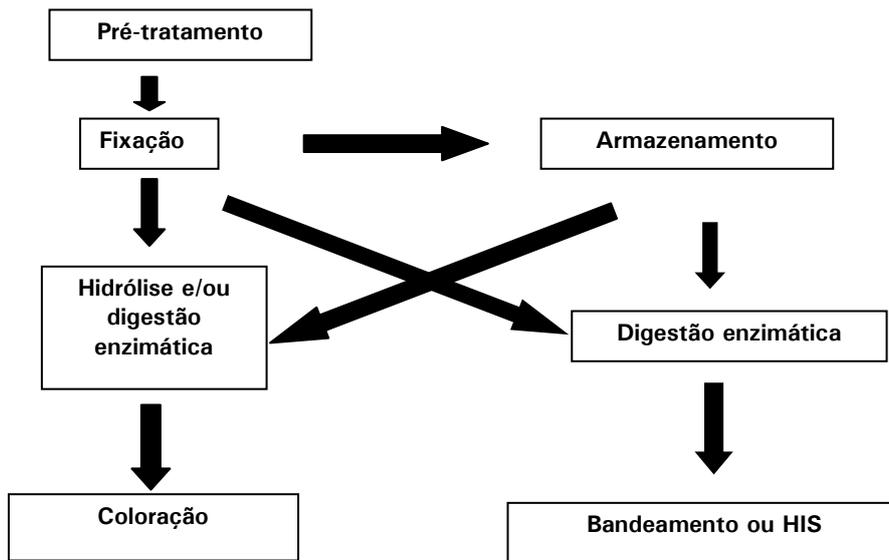
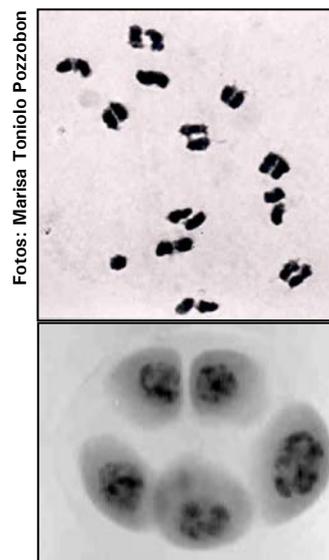


Figura 1. Sequência de procedimentos empregados na análise de cromossomos mitóticos em vegetais (Fonte: PEÑALOZA *et al.*, 2005).

## Comportamento meiótico (pareamento e segregação cromossômica)

Medida da estabilidade evolutiva de um organismo. Permite a análise genômica, indispensável nas etapas de planejamento e seleção de genótipos, assim como na manipulação e no monitoramento de programas de melhoramento genético. Permite a observação dos tipos de pareamento dos cromossomos em bi ou polivalentes, explicando, assim, o comportamento de plantas, acessos ou espécies quanto a sua fertilidade. Permite a detecção de possíveis híbridos entre ecotipos nativos. A análise é feita a partir de células de CMP fixadas e coradas.



Fotos: Marisa Toniolo Pozzobon

## Viabilidade e germinabilidade polínica



Foto: Marisa T. Pozzobon

Constitui uma medida da fertilidade masculina e seu potencial para melhoramento genético; sendo viável, garante a sua utilização em cruzamentos. A análise pode ser realizada por meio de coloração, corantes específicos para DNA ou amido; ou, ainda, germinação do tubo polínico em meio de cultura.

## Padrões de bandeamento

Contribuem para a identificação de cromossomos individuais e partes de cromossomos, de organização e variações estruturais, de variações cromossômicas decorrentes da evolução, de polimorfismo cromossômico e de aneuploidias, como também para a análise genômica e o estudo das relações filogenéticas entre espécies. A escolha da técnica depende do objetivo a que se propõe o estudo, assim como dos recursos e das condições técnicas e de infraestrutura do laboratório, ou mesmo da preferência do citologista por uma ou outra técnica.

## Bandeamento cromossômico por coloração diferencial

Bandas-C, Q, R, CMA/DAPI e bandas RONS (regiões organizadoras de nucléolos). Revelam a heterocromatina constitutiva que se encontra nos satélites ou no DNA repetitivo.

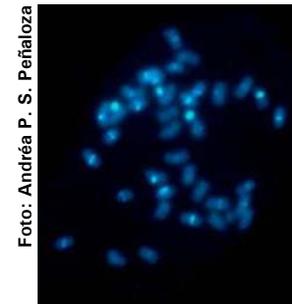


Foto: Andréa P. S. Peñalzo

## Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

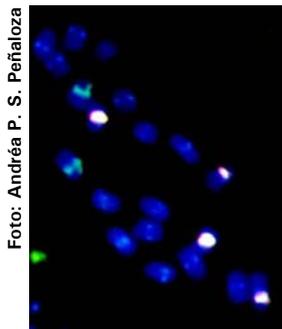


Foto: Andréa P. S. Peñalzo

Consiste na hibridização de um ácido nucleico alvo, utilizando-se uma sonda de DNA ou RNA conhecido e previamente marcado com fluoróforos, permitindo a localização *in situ* dessas sequências no ácido nucleico nos cromossomos, no citoplasma, nas organelas ou nos tecidos estudados. A sonda-alvo pode ser de um fragmento de DNA, de DNA genômico total ou de RNA. Auxilia na comparação de espécies relacionadas, cultivares ou populações, na identificação de cromossomos ou de segmentos cromossômicos em híbridos interespecíficos, na detecção de alterações cromossômicas e na integração de mapas genéticos e cromossômicos, nos estudos de filogenia e evolução.

## Caracterização reprodutiva

Geralmente envolve a contagem do número cromossômico, a análise meiótica, a análise do saco embrionário e a análise da viabilidade do pólen, mas pode requerer cruzamentos controlados e estudos de progênies.

## Aplicações

É essencial para o desenvolvimento de estratégias de coleta, conservação e multiplicação de uma determinada espécie, assim como para a adequação da metodologia a ser utilizada no melhoramento, diferenciada pelo modo de reprodução (autogamia, alogamia, apomixia). Na identificação do tipo de apomixia, esporófitica (embrionia adventícia), ou gametófitica (diplosporia ou aposporia), se são pseudógamos (necessidade de polinização, apenas para a formação do endosperma).

## Determinação do modo de reprodução

Foto: Marisa Toniolo Pozzobon



Realizada por meio do estudo do desenvolvimento do saco embrionário, utilizando-se técnicas tradicionais de cortes seriados do ovário, corados com safranina e fast-green ou de clareamento do ovário, *in toto*, como a de Herr (1971), Young *et al.* (1979) e Pozzobon e Araújo (1998). Com o auxílio da microscopia ótica clássica de contraste de interferência diferencial (DIC). Por meio de polinização controlada em casas de vegetação ou no campo, onde é feito o ensacamento de inflorescências antes da antese e posterior análise da progênie.

## Coleta de material para análise

O tipo de análise a ser realizada vai indicar quais os procedimentos a serem seguidos na coleta: quais as estruturas coletadas (raízes, inflorescências, ovários, etc.), incluindo possíveis pré-tratamentos, fixação, conservação e coloração. Pode variar de acordo com a espécie e conforme os procedimentos adotados em cada laboratório. Para maiores detalhes, consultar Guerra e Sousa (2002), Singh (2002), e Peñaloza (2005).

## Referências

- ACUÑA, C. A.; BLOUNT, A. R.; QUESENBERRY, K. H.; HANNA, W. W.; KENWORTHY, K. E. Reproductive Characterization of Bahiagrass Germplasm, **Crop Science**, v. 47, p. 1711-1717, 2007.
- FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. **Plant chromosomes: laboratory methods**. Boca Raton: CRS Press, 1996. 274p.
- GARCIA, A. **Manual de Técnicas Citogenéticas**. Chapingo: Colégio de Posgraduados, 1990. 196p.
- GUERRA, M. S. **Introdução à Citogenética Geral**. Pernambuco: Guanabara Koogan, 1988. 142p.
- GUERRA, M. Chromosome number variation and evolution in monocots. In: WILSON, K. L. e MORRISON, D. A. (Ed.). **Monocots systematics and evolution**. Melbourne: CSIRO, 2000. p. 127-136.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como analisar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC, 2002. 131p.
- NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos Genéticos & Melhoramento: Plantas**. Rondonópolis: Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária do Mato Grosso, 2001. 1183p.
- PEÑALOZA, A. P. S. (Org.). **II Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília, 2005. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 154).
- PEÑALOZA, A. P. S.; POZZOBON, M. T.; SANTOS, S. Procedimentos para a análise de cromossomos mitóticos e meióticos em vegetais. In: PEÑALOZA, A. P. S. (Org.). **II Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília, 2005. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 154). p. 9-23.
- POZZOBON, M. T.; ARAUJO, A. C. G. **Método de clareamento de óvulos de *Paspalum* e *Brachiaria***. Brasília, 1998. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 12).
- SAVIDAN, Y.; CARMAN, J. G.; DRESSELHAUS, T. **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. El Batan: CIMMYT, 2001. 243 p.
- SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press, 2002. 488 p.

STEBBINS, G. L. Types of polyploids: their classification and significance. **Advances in Genetics**, New York, v. 1, p. 403-429, 1947.

SYBENGA, J. Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: do segmental allopolyploids exist? **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 1176-1184, 1996.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell**, v. 5, p. 1425-1437, 1993.

KOLTUNOW A. M.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review Plant Biology**, v. 54, p. 547-574, 2003.



---

*Recursos Genéticos e  
Biotecnologia*