

II CURSO DE CITOGÉNÉTICA APLICADA

A

RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

8 a 12 de novembro de 2004.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF

República Federativa do Brasil
Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa
Silvio Crestana

Diretores Executivos
José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

DOCUMENTOS 154

II CURSO DE CITOGENÉTICA APLICADA

A

RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

8 a 12 de novembro de 2004.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF

COORDENADORA

Andréa del Pilar de Souza Peñaloza

Brasília, DF

2005

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3448-4600
Fax: (61) 3340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005)

C 977 Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genéticos Vegetais (2.:
2005 : Brasília, DF)

II Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genéticos Vegetais,
Brasília, novembro, 8-12, 2004 / coordenadora Andréa del Pilar de
Souza Peñaloza. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, 2005.

89 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, 0102 – 0110; 154)

1. Citogenética - recursos genéticos vegetais – curso. 2.
Germoplasma vegetal – caracterização citogenética e reprodutiva.
3. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. I. título. II. Série.
572.8 – CDD 21.

APRESENTAÇÃO

Os recursos genéticos vegetais são o componente da biodiversidade necessário ao desenvolvimento sustentável da agricultura e da agroindústria. Esses recursos são estratégicos para o Brasil e, para que essa riqueza seja corretamente preservada e utilizada, colaborando para o desenvolvimento tecnológico e econômicos, são necessários esforços para conhecê-las.

Para tanto, a caracterização citogenética é uma das ferramentas disponíveis. Pode ser aplicada como um instrumento de avaliação das plantas regeneradas *in vitro* e das plantas transformadas; em estudos sobre a instabilidade cromossômica em material conservado; nos estudos de evolução e citotaxonomia; no auxílio à caracterização molecular pela localização de seqüências específicas de DNA, através da hibridação *in situ*. A caracterização reprodutiva, que envolve a contagem do número cromossômico, a análise meiótica, a análise do saco embrionário e análise da viabilidade do pólen, pode exigir cruzamentos controlados e estudos de progênies. Seu uso mais imediato é evitar anos de insucesso na condução de trabalhos de conservação, multiplicação e uso do germoplasma, além de fornecer informações valiosas, de uso direto em programas de pré-melhoramento e melhoramento de plantas.

Nos produtos cujo germoplasma inclui espécies silvestres botanicamente associadas à espécie cultivada, o interesse por cruzamentos realça a importância desse conhecimento, que permite, ainda, direcionar trabalhos de multiplicação em bancos de germoplasma, através do emprego de metodologias específicas para o modo de reprodução da espécie em questão.

Também, a identificação do modo de reprodução em acessos mantidos em bancos de germoplasma pode ser útil para a definição de estratégias adequadas para a coleta de acessos adicionais da espécie analisada.

Entre as atividades da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia estão a caracterização citogenética e reprodutiva de germoplasma vegetal de interessa atual e futuro a agricultura do país, incluindo aí a formação e o treinamento de recursos humanos de instituições integrantes do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária.

O 2º Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genéticos Vegetais, realizado de 8 a 12 de novembro de 2004, contou com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Rede Nacional de Recursos Genéticos (Renargen) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Foram abordados aspectos básicos e aplicados da caracterização citogenética, promovendo o treinamento pesquisadores e estudantes que desenvolvem trabalhos relacionados à caracterização biológica de espécies vegetais, onde a caracterização citogenética e o conhecimento do modo de reprodução são fundamentais.

Instituições convidadas

UEM: Universidade Estadual de Maringá - PR
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - RS
UFPE: Universidade Federal de Pernambuco - PE
UNNE: Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina
CPATSA: Embrapa Semi-Árido - PE
CNPMPF: Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA

COORDENADORA

Andréa del Pilar de Souza Peñaloza
Coordenadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília,

DF

CONVIDADOS

Ana Christina Brasileiro-Vidal
Colaboradora, Universidade Federal de Pernambuco

Ana Cláudia Guerra de Araújo
Colaboradora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Camilo Quarín
Colaborador, Universidad Nacional del Nordeste

Janay de Almeida dos Santos-Serejo
Colaboradora, Embrapa Mandioca e Fruticultura

José Francisco Montenegro Valls
Colaborador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Maria Suely Pagliarini
Colaboradora, Universidade Estadual de Maringá

Maria Teresa Schifino Wittmann
Colaboradora, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Marisa Toniolo Pozzobon
Colaboradora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Natoniel Franklin de Melo
Colaborador, Embrapa Semi-Árido, Petrolina, PE

Sileuza dos Santos
Colaboradora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Adriana Regina Custódio

Colaboradora, PG Botânica - Universidade de Brasília/Bolsista CNPq

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen

PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS E MEIÓTICOS EM VEGETAIS

PEÑALOZA, A. P. S. ¹; POZZOBON, M. T.¹; SANTOS, S. ¹

INTRODUÇÃO

No final do século XIX e início do século XX, com a associação dos conhecimentos da Citologia e da Genética, surgiu a ciência que mais tarde passaria a chamar-se Citogenética. A visualização dos cromossomos propriamente dita, já era possível, ao microscópio de luz comum, desde meados de 1800. Entretanto, era muito difícil observar cromossomos individuais, contá-los em uma célula ou fazer qualquer análise morfológica com precisão.

A análise cromossômica compreende, atualmente, todo e qualquer estudo da morfologia, organização, função, replicação, variação e evolução dos cromossomos, quer estejam eles isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos.

A partir da década de 50, várias técnicas foram desenvolvidas, melhorando nossa capacidade de observar os cromossomos. Passou-se a utilizar substâncias químicas para bloquear as células em metáfase; enzimas para digerir a parede celular e soluções hipotônicas para provocar o rompimento da membrana nuclear e melhor separação dos cromossomos, e a utilização de corantes que são absorvidos diferencialmente por partes dos cromossomos, produzindo assim as bandas características que ajudam a identificar cada cromossomo.

Hoje, mesmo com a revolução provocada pela Genética Molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar todo o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, passíveis de serem mensurados, diferenciados em sub-unidades e manipulados de diversas maneiras (Guerra & Souza, 2002).

O ponto crucial para a obtenção de bons resultados é o perfeito domínio, com a aplicação adequada das diferentes técnicas de pré-tratamento, fixação e coloração dos “corpos corados” da citologia. Os princípios básicos dessas técnicas, quer para a análise de cromossomos mitóticos quer para a análise de cromossomos meióticos, em diferentes espécies de plantas são semelhantes e serão abordados a seguir. Pequenas variações podem ser utilizadas, dependendo do grupo de espécies e/ou dos objetivos do experimento e/ou da preferência do citogeneticista, desde que se entenda a forma de ação e função das diferentes etapas do processo (Singh, 2000). Até a observação, o meristema passa, em geral, pelos passos de pré-tratamento, fixação, hidrólise seguida ou não de digestão enzimática e coloração. Para a aplicação de técnicas de hibridação *in situ*, a hidrólise e não é adotada (Figura 1).

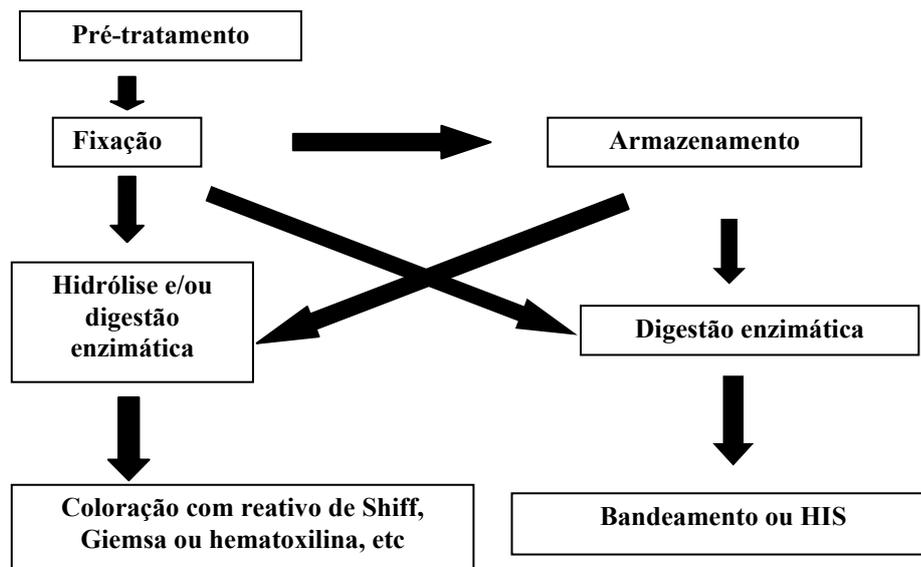


Figura 1: Esquema com passos geralmente empregados para a análise dos cromossomos mitóticos em vegetais.

Coleta de tecidos para a análise mitótica

O tecido meristemático, caracterizado por não apresentar células diferenciadas, principalmente o de raiz, é o que apresenta a maior quantidade de células em divisão mitótica (Figura 2).



Figura 2: Ilustração de meristema radicular, em corte longitudinal da raiz e em corte transversal, onde é possível visualizar células em divisão mitótica.

O meristema radicular ainda apresenta células com maior volume, crescimento mais rápido e maior facilidade em absorver as soluções anti-

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB Av. W5 Norte (Final), Brasília, DF. CEP: 70770-900. e-

mitóticas e os fixadores, o que contribui diretamente para a obtenção de melhores resultados nas análises.

Na ausência de raízes é possível utilizar outro tipo de meristema, como brotos foliares, anteras, paredes de ovário gavinhas, pétalas, etc. Entretanto, estes tecidos geralmente apresentam células menores que as encontradas no meristema radicular, além de absorverem mais lentamente as soluções anti-mitóticas e os fixadores.

O tecido mais utilizado são as pontas de raiz, obtidas de plântulas e de plantas mantidas em vasos. Na Figura 3 estão representados os passos para a obtenção de pontas de raiz de plantas mantidas em vasos. É importante que se retire delicadamente a planta, lavando totalmente o solo. Isso garante que a raiz retirada seja da planta que se quer estudar e não de plantas invasoras, comuns nessa condição.

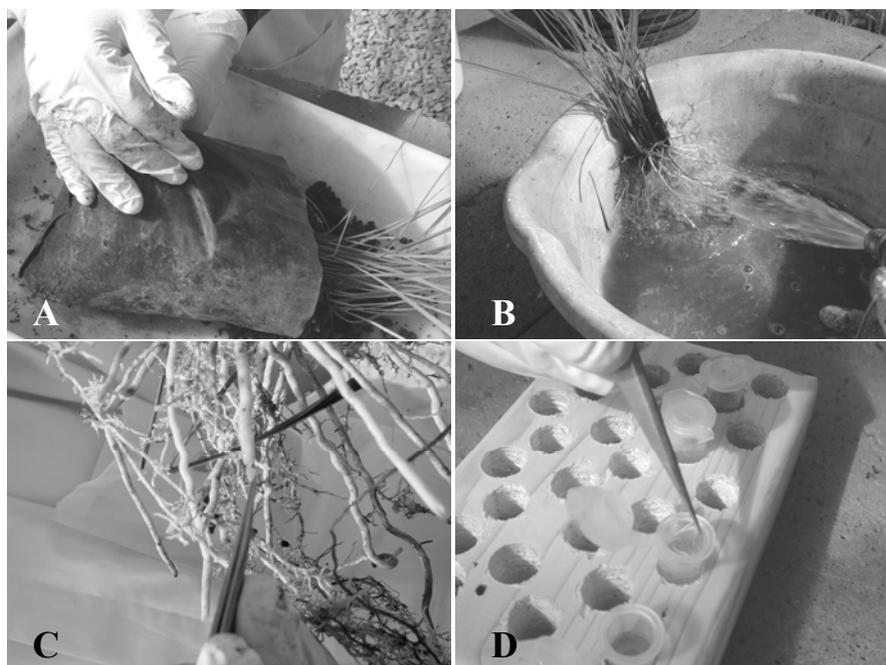


Figura 3: Seqüência de procedimentos para coleta de raízes de planta mantidas em vasos.

1. O PRÉ-TRATAMENTO

Segundo Guerra & Souza (2002), todos os meristemas destacados da planta e mantidos em ambiente úmido, continuam seus ciclos nucleares normalmente, durante horas ou mesmo dias, dependendo do órgão de origem. Daí a importância de pré-tratar adequadamente os meristemas para a análise citogenética.

O pré-tratamento das pontas de raiz é essencial para a análise de cromossomos mitóticos, especialmente quando se quer estudar sua morfologia. As substâncias utilizadas atuam (a) inibindo a formação do fuso, aumentando o número de metáfases, (b) provocando uma maior contração dos cromossomos, (c) permitindo melhor visualização das constrições primárias e secundárias, e, conseqüentemente, proporcionando melhor definição da morfologia cromossômica e (d) aumentando a viscosidade do citoplasma, facilitando a rápida penetração dos fixadores pela remoção de depósitos indesejáveis dos tecidos (Walker, 1973; Sharma & Sharma, 1999; Singh, 2000).

Os principais agentes utilizados para o pré-tratamento das pontas de raiz são descritos a seguir.

1.1) Água gelada

O pré-tratamento em água gelada, ou “choque frio”, pode causar efeito semelhante ao dos antimitóticos químicos, produzindo excelentes metáfases. Este pré-tratamento é largamente utilizado para cereais e gramíneas em geral. As pontas de raiz são colocadas em frascos com água gelada, mergulhados em isopor com água e gelo, e mantidos em refrigerador por 6 a 24 horas. Tratamentos por tempo mais prolongado, tanto em água gelada, quanto em outras substâncias químicas, provocam uma excessiva contração dos cromossomos, prejudicando a análise morfológica dos mesmos (Sharma & Sharma, 1999; Singh, 2000; Guerra & Souza, 2002).

1.2) 8-hidroxiquinoleína

Os primeiros a reconhecerem a utilidade dessa substância para a análise cromossômica foram Tijo & Levan, em 1950, mostrando a propriedade c-mitótica desta substância, com inativação do fuso e, conseqüente espalhamento dos cromossomos, além de provocar a contração uniforme dos braços cromossômicos (Singh, 2000).

O pré-tratamento das pontas de raiz em solução aquosa de 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 0,002M por 3 a 4 horas a 18°C, ou por 20-24h a 6°C, em geral, apresenta bons resultados. Temperaturas mais elevadas com essa substância podem causar as chamadas aderências cromossômicas (Singh, 2000). Melhores resultados são observados em espécies de plantas com cromossomos grandes.

1.3) Colchicina

Esta substância, um alcalóide, foi isolada das raízes de *Colchicum autumnale* por Ziesel, em 1883. É solúvel em água e extremamente ativa em baixas concentrações. A duração do pré-tratamento com colchicina é inversamente proporcional à concentração utilizada (Walker, 1973). A colchicina atua quimicamente, alterando o estado coloidal do citoplasma e, conseqüentemente, alterando o fuso.

No estudo dos cromossomos, sem a indução de poliploidia, a colchicina deve ser utilizada em baixas concentrações (0,2 a 1,0% por 1-4 horas a temperatura ambiente). Pode-se mergulhar as pontas de raiz na solução ou utilizar tecidos cultivados em meio de cultura com colchicina (Walker, 1973). Após esse pré-tratamento, convém lavar muito bem as raízes para facilitar a penetração do fixador na etapa seguinte. Por se tratar de uma substância carcinogênica, durante seu uso, deve-se adotar medidas básicas de segurança

(luvas, jaleco, manipulação em capela de exaustão, descarte apropriado em frascos e nunca na pia).

Observação 1: existem relatos de que o pré-tratamento com colchicina pode causar modificações estruturais nos cromossomos (Fukuy & Nakayama, 2000).

Observação 2: tecidos em divisão meiótica também respondem bem ao tratamento com colchicina (Walker, 1973).

1.4) α -Bromonaftaleno (ou mono-Bromonaftaleno)

Substância pouco solúvel em água e com efeito semelhante ao da colchicina. Utiliza-se a solução saturada por 2 a 4 horas a temperatura ambiente. Entretanto, para certos grupos de plantas, pré-tratamentos de 10 a 15 minutos já são suficientes, pois o α -bromonaftaleno penetra rapidamente nos tecidos (Sharma & Sharma, 1999).

1.5) Paradiclorobenzeno (PDB)

O paradiclorobenzeno é o derivado do benzeno mais indicado para o estudo de cromossomos mitótico em vegetais. Assim como o α -bromonaftaleno, é pouco solúvel em água.

O pré-tratamento com paradiclorobenzeno causa a inibição do fuso, acentuando a visualização das constricções primária e secundária devido a contração e hidratação diferenciada dos segmentos cromossômicos (Walker, 1973; Sharma & Sharma, 1999), mas, ao contrário da colchicina, faz com que as cromátides de um mesmo segmento cromossômico fiquem juntas (Walker, 1973).

Este pré-tratamento é eficiente tanto para cromossomos pequenos, quanto para cromossomos maiores, sendo que a resposta ótima dependerá do tempo de ação da substância. O maior inconveniente é o tempo mínimo de ação, que é de

aproximadamente 3 horas a temperaturas de 10 a 16°C (Walker, 1973; Sahrma & Sharma, 1999). Entretanto, alguns autores sugerem apenas 2 a 2 ½ horas de pré-tratamento a 15 a 20°C (Palmer & Herr, 1973).

2) A FIXAÇÃO

A principal finalidade da fixação é permitir a coagulação e precipitação das proteínas, mantendo a forma e a estrutura do conteúdo celular (Walker, 1973), sem causar qualquer distorção dos componentes celulares que objeto do estudo, promovendo, ainda, a conservação por longos períodos, sem que as amostras sofram decomposição. Para isso é importante a utilização de um fixador que penetre rapidamente no tecido, pois esta é uma etapa bastante crítica para a obtenção de bons resultados, especialmente quando se pretende, posteriormente, aplicar técnicas de bandeamento cromossômico e hibridação *in situ* (Guerra & Souza, 2002). O fixador também prepara a célula para uma melhor absorção dos corantes, além de permitir o abrandamento dos tecidos para a posterior maceração ou para as técnicas de *squash*.

Na literatura é possível encontrar referência a vários tipos de reagentes utilizados nas soluções fixadoras, todos com várias características em comum. Esses reagentes, em geral são utilizados combinados, em diferentes proporções, de acordo com o tipo de material. Os fixadores são classificados em dois grandes grupos, de acordo com sua capacidade para precipitar as proteínas celulares: a) **Metálicos**: ácido crômico, tetróxido de ósmio, cloreto de mercúrio, dicromato de potássio e, b) **Não metálicos**: etanol, metanol, ácido acético, formaldeído, ácido propiônico, ácido pícrico e clorofórmio (Sharma & Sharma, 1999).

Os fixadores não metálicos são os mais utilizados em citogenética vegetal. Este tipo de fixador converte substâncias celulares solúveis em insolúveis, fazendo com que estas sejam preservadas quando em contato com a água (Sharma & Sharma, 1999). Outra vantagem destes sobre os fixadores metálicos é a não necessidade de lavagens em água após a fixação.

A seguir são descritas algumas informações importantes sobre os fixadores não metálicos mais utilizados em citogenética vegetal.

Etanol: penetra nos tecidos, causando a desidratação; precipita ácidos nucléicos e causa a denaturação irreversível de proteínas. Sua única limitação é o fato de causar certo endurecimento dos tecidos.

Ácido acético: penetra rapidamente nos tecidos, provocando o inchaço do protoplasma, mas abrandando os tecidos e mantendo a estrutura cromossômica intacta. Sua combinação com o etanol em diferentes proporções, resulta no fixador mais utilizado em citogenética vegetal.

Clorofórmio: promove a dissolução de graxas e secreções cerosas da superfície celular, facilitando a penetração da solução fixadora; tóxico quando aplicado por longos períodos ou presente em elevada proporção na solução.

Ácido propiônico: absorção mais lenta que o ácido acético, mas provocando menor "inchaço" dos cromossomos. Por isso é utilizado como substituto para o ácido acético, principalmente em espécies com cromossomos pequenos (Sharma & Sharma, 1999).

Observação: deve-se utilizar um volume de fixador 10 vezes maior que o do material que está sendo fixado.

3) O ARMAZENAMENTO

Após a fixação é possível estocar as amostras para a posterior análise. Isto pode ser feito em etanol 70%, a 4-5°C, em geladeira, ou em fixador, em freezer, a -20°C, para períodos mais longos.

Entretanto, material fresco, recém coletado e fixado, permite a obtenção de melhores resultados. Caso seja feita a estocagem das amostras a -20°C, é necessário que se troque a solução fixadora por outra nova.

4) A COLORAÇÃO

Para a análise dos cromossomos mitóticos, seja para a elaboração de cariótipos, seja para a análise do ciclo mitótico, geralmente são utilizadas técnicas de coloração convencional, que coram os cromossomos de maneira uniforme e indistinta, independentemente do tipo de cromatina, composição do DNA ou de proteínas (Singh, 1993; Guerra & Souza, 2002).

As técnicas de coloração convencional são as mais utilizadas, pois são relativamente simples, apresentando resultados rápidos e de qualidade, elevada repetibilidade. Quando se utilizam corantes acéticos (caramim acético,orceína acética, hematoxilina acética e corante de Schiff), o esmagamento ou *squash* do meristema sobre a lâmina é feito com o tecido já corado (Guerra & Souza, 2002). Entretanto, o esmagamento do meristema radicular em ácido acético 45%, seguido de congelamento da lâmina em nitrogênio líquido, permite que as células sejam posteriormente coradas. Neste caso há maior flexibilidade na escolha do corante a ser utilizado, além da possibilidade de permitir colorações seqüenciais (Guerra & Souza, 2002).

Em 1924, Feulgen e Rossenbeck desenvolveram a técnica hoje conhecida como técnica de Feulgen e que utiliza o corante reativo de Schiff (Sharma & Sharma, 1999). A coloração dos cromossomos se dá por reação química e está extremamente associada à fixação e a hidrólise prévia do meristema. O protocolo inicial passou por várias modificações para se ajustar a diferentes grupos de plantas (Singh, 1993; Guerra & Souza, 2002) e, por isso, existem vários protocolos com pequenas variações (Singh, 1993). Esta é uma das principais técnicas para coloração não diferencial dos cromossomos vegetais. Produz bons resultados para espécies com cromossomos médios e grandes, mas com pré-tratamento e fixação adequados, também pode ser utilizada, com sucesso, para espécies com cromossomos pequenos. Guerra & Souza (2002) recomendam o uso de corante Giemsa (mistura de vários corantes) ou Hematoxilina para a obtenção de coloração mais intensa e maior contraste em espécies de plantas com cromossomos pequenos.

Em 1865, Böhmer descobriu que a hematoxilina, extraída do tronco de uma árvore (*Haematoxylon campechianum*) da América Central, também tinha maior afinidade pelo núcleo do que pelo citoplasma. Sua ação corante é atribuída ao seu produto de oxidação, a hemateína (Sharma & Sharma, 1999).

Em 1858, Gerlach descobriu que uma solução diluída de carmim corava mais intensamente o núcleo do que o citoplasma das células. Essa substância era obtida dos corpos secos da fêmea de um inseto (*Coccus cacti*), conhecido popularmente como cochonilha-do-carmim, que vive em cactos na América Central e sudoeste dos Estados Unidos (Shimoya, 1966). O Carmim é um dos corantes mais largamente empregados em citogenética vegetal.

PROTOCOLOS DE ALGUMAS SOLUÇÕES UTILIZADAS

PRÉ-TRATAMENTO

8-Hidroxiquinoleína 0.002M

0,87g de 8-hidroxiquinoleína

300 ml de água destilada

Dissolver a 8-hidroxiquinoleína na água a 60°C.

Agitar em agitador magnético até dissolver.

Guardar em geladeira.

Observação: realizar o procedimento em capela de exaustão.

Colchicina 0.2%

0,1g de colchicina

50ml água destilada

Dissolver a colchicina na água e agitar até dissolver.

Guardar a solução em pequenas alíquotas congeladas, ou em frasco na geladeira (até 6 meses).

α -Bromonaftaleno 0,2%

4,14 ml de α -Bromonaftaleno

Completa para 100 ml com água destilada

Colocar o α -Bromonaftaleno na água e agitar por 15 min.

Guardar em geladeira e agitar novamente antes de utilizar.

Paradiclorobenzeno

3g de paradiclorobenzeno

200ml de água destilada

Agitar a mistura em agitador magnético, em capela de exaustão, *over night*, a 60°C.

Deixar esfriar e guardar em frasco escuro na geladeira.

Observação: agitar novamente a solução antes de usar, pois alguns cristais precipitam.

FIXADORES (Sharma & Sharma, 1999)

Solução Carnoy I

1 parte de ácido acético glacial

3 partes de etanol absoluto

Agitar bem e utilizar imediatamente

Observação 3: O fixador deve ser preparado e utilizado imediatamente, sempre a temperatura ambiente.

Observação 4: raízes muito grossas devem ser seccionadas com uma lâmina de bisturi nova antes de serem fixados (Guerra & Souza, 2002).

Observação 5: agitar por diversas vezes os frascos com as amostras que estão sendo fixadas, pois etanol e ácido acético não se misturam facilmente. Além disso, os tecidos tendem a liberar água, durante a fixação.

Observação 6: Os tecidos tendem a liberar água durante a fixação. Assim, é conveniente trocar a solução fixadora por outra nova após 1 ½ a 2h de fixação.

Solução Carnoy II

1 parte de ácido acético glacial

3 partes de etanol absoluto

6 partes de clorofórmio

Agitar bem e utilizar imediatamente

Observação:

Para trigo:

ácido acético glacial: etanol absoluto: clorofórmio (1:3:4; v/v/v)

Solução Carnoy modificada com ácido propiônico

1 parte de ácido propiônico

3 partes de etanol absoluto

Agitar bem e utilizar imediatamente

Observação: ideal para plantas com cromossomos pequenos

CORANTES

Reativo de Schiff (Laboratório de Citogenética da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

3,5g de Fucsina básica

5,7g de Metabisulfito de Potássio

6g de carvão ativado

300 ml de HCl 0.15N

Agitar tudo por 2 horas, acrescentar o carvão e agitar por mais 2 horas à temperatura ambiente. Filtrar duas vezes ou, se necessário, até que a solução fique cristalina. Guardar em vidro escuro em geladeira.

HCl 0.15N

13,03 ml de HCl

Completar para 100 ml de água destilada.

Observação: Colocar sempre o ácido na água.

Reativo de Schiff (Baseado em Greilhuber & Ebert, 1994)

2g de Fucsina básica dissolvida em 60 ml de água destilada

7,6g de Metabisulfito de Sódio dissolvido em 340ml de água destilada

Misturar as duas soluções e agitar por 3 ½ h com agitador magnético.

Adicionar 1g de carvão ativado à solução e agitar novamente.

Filtrar a solução com ajuda de uma bomba de vácuo.

Se a solução ainda não estiver cristalina, adicionar mais carvão e filtrar novamente. Repetir se necessário.

O pH da solução final deve estar entre 1,9-2,2. Se necessário ajustar com HCl ou NaOH.

Guardar em vidro escuro em geladeira.

Reativo de Schiff (Baseado em Garcia, 1990)

0,8g de fucsina básica

0,8ml de ácido clorídrico concentrado

400ml de água destilada em ebulição.

Misturar tudo e agitar em agitador magnético por 20 minutos.

Acrescentar 16g de metabissulfito de sódio.

Agitar em agitador magnético por mais 30 minutos.

Acrescentar 3,2g de carvão ativado e deixar decantar por 1 a 2 h.

Filtrar.

Ajustar o pH para 1,9-2,0.

Guardar em vidro escuro em geladeira.

Observação: o metabissulfito de potássio e o metabissulfito de sódio são muito voláteis e tóxicos, por isso recomenda-se o preparo em capela de exaustão.

Observação: solução rosada ou amarelada deve ser descartada, pois não tem mais ação corante.

Carmim acético 2%

2g de carmin

100 ml de ácido acético 45% á 60°C

Colocar o carmin no ácido e ferver por 2 horas. Filtrar. Guardar a temperatura ambiente.

Ácido acético 45%

55 ml de de água destilada

45 ml de ácido acético

Solução corante de Giemsa (solução estoque) (Guerra & Souza, 2002)

0,5g de Giemsa

33ml de glicerina

Aquecer a mistura em banho-maria a 60°C por 2h

Após esfriar, acrescentar 33ml de álcool metílico à solução.

Guardar em frasco escuro, bem fechado, a temperatura ambiente, por uma semana.

Filtrar e guardar em frasco escuro a temperatura ambiente.

Solução corante de Giemsa 2% (solução de uso) (Guerra & Souza, 2002)

2ml da solução estoque de Giemsa

98ml de tampão fosfato pH 6,8 (ou água destilada)

Misturar bem e utilizar

Hematoxilina acética

1g de hamatoxilina acética

0,25g de alumínio férrico

100ml de ácido acético 45%

Dissolver tudo com auxílio de um bastão de vidro e guardar em frasco escuro, tampado com um chumaço de algodão, em ambiente aberto para evitar gases.

Após uma semana, filtrar e guardar em frasco escuro, bem fechado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.; SOUZA, M. J. **Como analisar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC Editora, 2002. 131p.

GREILHUBER, J; EBERT, I. Genome size variation in *Pisum sativum*. **Genome**, v.37, p. 646-655, 1994.

PALMER, R. G.; HEER, H. A root tip squash technique for soybean chromosomes. **Crop Sci.**, v. 13, p.389-391, 1973.

SHARMA, A. K.; SHARMA, A. **Plant chromosomes: analysis, manipulation and engineering**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1999. 371p.

SHIMOYA, C. **Noções de técnica citológica**. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Rural do Estado de Minas Gerais.1966. 69p.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 391p.

SUMMER, A. T. **Chromosome banding**. London: Unwin Hyman Ltd, 1990. 434p.

WALKER, S. Cytogenetics. In: SHEPPARD, P. M. (Ed.). **Practical genetics**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1973. p.130-172.

MEIOSE EM VEGETAIS: UM ENFOQUE PARA A CARACTERIZAÇÃO DE GERMOPLASMA

PAGLIARINI M. S.²; POZZOBON M. T.³

1. INTRODUÇÃO

Para deixar descendentes, os organismos que se reproduzem sexuadamente necessitam de células especializadas, os gametas. Tais células resultam de um tipo de divisão, denominado meiose, em que o número de cromossomos dos parentais é reduzido à metade. A meiose caracteriza-se pela ocorrência de uma série de eventos seqüenciais de elevada complexidade mecânica e bioquímica. Durante a meiose, os pares cromossômicos, conhecidos como cromossomos homólogos, trocam partes entre si, formando novas combinações genéticas antes de serem divididos em conjuntos únicos. Este processo faz com que cada célula haplóide receba uma mistura de genes dos dois genomas parentais da célula ancestral. Estes eventos criam variabilidade genética a cada geração, dando maior flexibilidade evolutiva aos organismos de reprodução sexuada. Esta forma de reprodução é altamente relevante para o melhoramento de plantas, uma vez que permite a recombinação gênica entre parentais com genes distintos e que necessitam ser misturados para obter variabilidade genética.

Embora a meiose seja idêntica em plantas e animais, a produção de gametas difere em alguns aspectos. Enquanto em animais as células haplóides originadas da meiose sofrem apenas diferenciação celular para dar origem aos gametas masculino (espermatozóide) e feminino (óvulo), nos vegetais, ao terminar a meiose, são produzidos esporos. Os esporos são células haplóides que necessitam sofrer mitoses para dar origem aos gametas. Enquanto o processo que leva à formação de esporos haplóides nos vegetais através da

² Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo 5790, 87020-900 Maringá, PR. E-mail: mmpagliarini@uem.br

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; PqEB, Av. W5 Norte., 70770-900 Brasília, DF. E-mail: marisa@cenargen.embrapa.br

meiose é conhecido como esporogênese, a formação dos gametas através da ocorrência de mitoses nestes esporos é conhecida como gametogênese. De forma análoga aos animais, as células resultantes da meiose nos vegetais são de tamanhos diferentes. Os produtos meióticos femininos são sempre maiores que os masculinos. Assim, por gerar células de diferentes tamanhos, a esporogênese feminina nos vegetais é denominada megasporogênese e a esporogênese masculina, microsporogênese. O produto meiótico da megasporogênese é conhecido como megásporo e o da microsporogênese como micrósporo.

A megasporogênese, por ocorrer dentro dos ovários e em um número limitado de células, é muito mais difícil de ser estudada que a microsporogênese. Na parte feminina, para se chegar às células que estão sofrendo meiose, deve-se efetuar cortes histológicos dos ovários em micrótomo, o que consiste em um processo extremamente demorado e laborioso. O estudo da microsporogênese, por outro lado, é extremamente simples. Por ocorrer dentro das anteras, que são órgãos facilmente manipuláveis com técnicas elementares e, por apresentar um grande número de células sofrendo meiose, a microsporogênese tem sido muito mais estudada que a megasporogênese.

Coleções de germoplasma geralmente envolvem uma grande quantidade de acessos de uma ou mais espécies, ou até mesmo gêneros afins. Dentro de uma coleção geralmente existe variabilidade cariotípica em nível de ploidia e número básico de cromossomos que, muitas vezes, comprometem o uso do germoplasma. Assim, estudos citogenéticos envolvendo a contagem do número de cromossomos, determinação do nível de ploidia, avaliação do comportamento meiótico e fertilidade do pólen são de fundamental importância na caracterização de germoplasma.

2. MICROSPOROGÊNESE

A identificação das diferentes fases da divisão meiótica facilita o entendimento do processo. Faremos aqui uma descrição sucinta dos eventos meióticos que levam à redução do número de cromossomos. Maiores detalhes

sobre o assunto podem ser encontrados em compêndios de Biologia Celular, como Alberts *et al.* (1997) e textos científicos.

Através da meiose, uma célula $2n$ dá origem a quatro células n . Para que isto aconteça, é necessário que haja duplicação de DNA antes que a célula $2n$ entre em divisão. Após a duplicação, cada cromossomo passa a apresentar duas cromátides, denominadas cromátides irmãs. A meiose compreende dois ciclos sucessivos de divisão denominados meiose I (ou primeira divisão) e meiose II (ou segunda divisão). Na meiose I ocorre segregação de cromossomos homólogos, formando duas células n , cada uma com conteúdo $2C$ de DNA, enquanto na meiose II ocorre segregação de cromátides irmãs, originando quatro células filhas n , porém com conteúdo $1C$ de DNA.

A meiose I caracteriza-se por uma longa prófase que, em algumas espécies, consome mais que 90% da duração de toda a meiose. Assim, torna-se muito fácil encontrar células em diferentes estágios desta fase quando se prepara lâminas para a observação citológica da meiose. Nesta fase, ocorrem eventos seqüenciais de fundamental importância para a regularidade do processo meiótico. Inicialmente, os cromossomos começam a se condensar e se unem, através de seus telômeros, a uma região específica e restrita do envoltório nuclear rica em poros formando um "bouquet". Este estágio é conhecido como leptóteno, e é dificilmente visualizado ao microscópio óptico. Este arranjo facilita o pareamento dos cromossomos que acontece em seguida, no zigóteno. O pareamento é estabilizado pela formação do complexo sinaptonêmico (CS), uma estrutura de natureza protéica que se interpõe entre os homólogos. Os dois cromossomos homólogos unidos pelo CS recebem o nome de bivalente. Neste estágio, a célula passa a apresentar n bivalentes. Após o pareamento, os dois cromossomos homólogos estão aptos a trocarem partes entre si, num processo conhecido como permuta genética. Este evento não é visualizado pela microscopia óptica. Este estágio é conhecido como paquíteno. Após a permuta genética entre cromátides homólogas, no próximo estágio, o diplóteno, o complexo sinaptonêmico se desfaz e os dois cromossomos tendem a se separar. Todavia, a separação não acontece se o bivalente sofreu recombinação genética,

pois no local da permuta aparece uma figura em forma de cruz, conhecida como quiasma. O número de quiasmas ao longo de um bivalente varia em função do tamanho do cromossomo e da constituição genética do indivíduo que controla esta característica. Para que o bivalente se mantenha até o início da anáfase I e garanta a perfeita segregação dos cromossomos homólogos, é necessária a presença de pelo menos um quiasma por bivalente. Bivalentes que não sofrem permuta genética, não formam quiasmas. Nestes casos, os cromossomos homólogos separam-se em univalentes que, em geral, sofrem segregação irregular nas fases subsequentes dando origem a gametas aneuplóides. No diplóteno, os bivalentes tendem a aglomerar-se dificultando sua visualização. No estágio seguinte, a diacinese, a condensação cromossômica acentua-se facilitando a distribuição dos bivalentes na célula. A condensação cromossômica e a força de repulsão entre os homólogos exercida pelas fibras do fuso já em formação levam ao movimento dos quiasmas para a extremidade dos braços cromossômicos. Este fenômeno é conhecido como terminalização de quiasmas. Por este processo, o número de quiasmas diminui consideravelmente e estes tendem a localizar-se em posições mais terminais.

Na fase seguinte, a metáfase I, as fibras do fuso posicionam os bivalentes na região equatorial, estando cada homólogo direcionado para um dos pólos e as duas cromátides irmãs se comportam como uma unidade funcional. Nesta fase, os cromossomos atingem o grau máximo de condensação e os quiasmas ainda podem ser visualizados. Em seguida, na anáfase I, os cromossomos homólogos são puxados para pólos opostos pelo encurtamento das fibras do fuso. Cromossomos pequenos, conectados geralmente por um quiasma terminal, separam-se rapidamente, enquanto que cromossomos grandes que podem apresentar quiasmas intersticiais atrasam-se em sua separação. Este atraso pode levar à formação de pontes que se rompem com a terminalização total dos quiasmas. Ao final da anáfase I cada pólo da célula contém n cromossomos. Chegando aos pólos, os cromossomos iniciam um processo de descondensação parcial, o envoltório nuclear volta a organizar-se e o nucléolo se reconstitui. Esta é a telófase I. Nas monocotiledôneas, ao final da meiose I ocorre uma citocinese

que separa as duas células filhas. Na segunda divisão estas células são totalmente independentes e cada uma segue seu próprio ritmo de divisão. Esta forma de citocinese é conhecida como citocinese sucessiva. Nas dicotiledôneas, por outro lado, ao final da primeira divisão não há citocinese. Esta só ocorrerá ao final da segunda divisão. Assim, na segunda divisão, os dois conjuntos cromossômicos segregados na meiose I compartilham o mesmo citoplasma e têm o mesmo ritmo de divisão. Esta, por sua vez, é conhecida como citocinese simultânea.

Um curto período de intérfase separa as duas divisões meióticas. Como não há síntese de DNA neste intervalo, os cromossomos parecem passar quase que diretamente da primeira para a segunda divisão. Os cromossomos voltam a se condensar rapidamente e o envoltório nuclear é removido, caracterizando a prófase II. Em seguida, um novo fuso é formado e posiciona os cromossomos na região equatorial. A placa metafásica da metáfase II é sempre perpendicular à da metáfase I. Nesta fase, metáfase II, cada cromátide irmã apresenta um cinetócoro ativo, onde as fibras do fuso se ligam e convergem para pólos opostos. Em seguida, os centrômeros se duplicam, liberando as cromátides irmãs para segregação para os pólos. Isto compreende a anáfase II. Chegando aos pólos, cada conjunto cromossômico descondensa-se após a reorganização do envoltório nuclear. O nucléolo se reconstitui. Estes eventos compreendem a telófase II. Ao final da microsporogênese tem-se uma estrutura formada por quatro células haplóides, conhecida como tétrade de micrósporos. Esta estrutura é extremamente didática e fala por si só, pois mostra claramente que uma célula ao sofrer meiose dá origem a quatro células filhas. A tétrade, bem como todos os demais meiócitos, é envolta por uma parede de calose, que se dissolve ao final da meiose liberando os micrósporos. Cada micrósporo torna-se arredondado e entrará em microgametogênese, ou seja, no processo de formação do grão de pólen.

3. MICROGAMETOGÊNESE

Uma vez liberado, o micrósporo passará por uma série de eventos, incluindo duas mitoses, que levará à formação do grão de pólen que contém o gameta masculino. Este processo é conhecido como microgametogênese.

O micrósporo recém-formado apresenta citoplasma denso e núcleo localizado centralmente. O volume desta célula aumenta rapidamente graças à formação de um grande vacúolo central que desloca o núcleo para a periferia. Na maioria das espécies, este núcleo haplóide entra em mitose logo a seguir, dando origem a duas células: a célula vegetativa e a generativa. Como a parede que as separa não pode ser visualizada pela microscopia óptica, geralmente são denominadas como núcleo vegetativo e núcleo generativo. Esta mitose é extremamente polarizada e assimétrica, levando à formação de duas células de tamanhos diferentes. A célula vegetativa é grande, ocupando quase todo o volume do micrósporo, enquanto a diminuta célula vegetativa se aloja em um dos pólos. Estas duas células diferenciam-se também pelas características de seus núcleos. O núcleo da célula generativa é geralmente alongado e possui cromatina bastante condensada, enquanto o núcleo da célula vegetativa é esférico e apresenta cromatina pouco condensada.

Durante a primeira mitose do micrósporo, suas paredes diferenciam-se e adquirem características típicas da espécie. Portando agora uma camada interna, denominada intina, e uma camada externa, denominada exina, esta estrutura binucleada deixa de ser um micrósporo para ser denominado grão de pólen.

Uma vez formado o grão de pólen, enquanto a célula vegetativa mantém-se em intérfase, a célula generativa sofre uma nova mitose, formando duas células espermáticas, também conhecidas como núcleos espermáticos. Um dos núcleos espermáticos (n) é o gameta masculino. Este fertilizará a oosfera (n) e dará origem ao zigoto ($2n$), que por mitoses formará o embrião da semente. O outro núcleo espermático (n) se unirá aos dois núcleos polares (n) do saco embrionário e formará o endosperma da semente ($3n$). Este processo é conhecido como fertilização dupla. Acredita-se que o núcleo vegetativo tenha

apenas a função de orientar o crescimento do tubo polínico até a micrópila do óvulo, degenerando-se após cumprir sua tarefa. Enquanto a primeira mitose do micrósporo ocorre logo após a meiose, ainda dentro da antera, para a maioria das espécies, a segunda mitose ocorre após a polinização, ou seja, durante o crescimento do tubo polínico no estilete, dificultando a visualização da segunda mitose e dos dois núcleos espermáticos. Para complementação de informações acerca da microsporogênese, pode-se consultar Maheshwari (1978), Stanley e Linskens (1974), Tanaka (1997) e Twell *et al.* (1998).

4. APLICAÇÃO DE ESTUDOS MEIÓTICOS NA CARACTERIZAÇÃO DE GERMOPLASMA.

Uma vez estabelecida a coleção de germoplasma, seja por ações de coleta ou de introdução ou intercâmbio, a seqüência de trabalhos exige procedimentos no sentido de sua caracterização e avaliação. O processo de caracterização permite a identificação de caracteres de interesse entre os acessos da coleção. Diferentes níveis de caracterização são possíveis, entre eles a caracterização agrônômica, bioquímica, molecular e citogenética.

A caracterização citogenética deveria ser encarada como um pré-requisito e uma atividade básica na caracterização das coleções de germoplasma. Esta caracterização pode envolver, entre outros aspectos, a contagem do número de cromossomos, a determinação do nível de ploidia e número básico de cromossomos, a avaliação do comportamento meiótico e da fertilidade do pólen e a determinação da afinidade genômica entre acessos em híbridos interespecíficos.

Poliploidia. Coleções de germoplasma, em geral, envolvem uma grande quantidade de acessos de uma ou várias espécies do mesmo gênero e, até mesmo, de gêneros afins. Nestas coleções podem ser frequentemente encontrados acessos com diferentes níveis números básicos de cromossomos e diferentes níveis de ploidia, fatores que obviamente comprometem o cruzamento entre os acessos.

Em algumas famílias de plantas, com especial destaque para as gramíneas, a poliploidia é muito difundida. Na coleção de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS), por exemplo, a determinação do nível de ploidia por citometria de fluxo (Penteado *et al.*, 2000) revelou que dentre os 437 analisados de 14 espécies, 13,04% são diplóides, 58,13% tetraplóides, 17,62% pentaplóides, e 10,76% hexaplóides. Neste gênero, dois números básicos de cromossomos haviam sido descritos: $x = 7$ e $x = 9$ (Bernini e Marin-Morales, 2001). Todavia, recentemente, $x = 6$ foi encontrado entre os acessos de *B. dictyoneura* (Risso-Pascotto *et al.*, 2004). Para o gênero *Paspalum*, a poliploidia é predominante. Dentre 93 acessos da coleção de germoplasma alocada no CPPSE/Embrapa (São Carlos, SP), 1,07% são diplóides, 96,78% tetraplóides e 2,15% hexaplóides (Takayama *et al.*, 1998; Pagliarini *et al.*, 2001).

Poliploidia e modo de reprodução. A utilização de um acesso em um cruzamento intra ou interespecífico visando a transferência de genes desejáveis não é limitada apenas pelas diferenças cariotípicas impostas pelo número básico de cromossomos e nível de ploidia entre os acessos. Em um grande número de gêneros, a poliploidia está associada a uma forma de reprodução assexuada, a apomixia, onde o embrião se forma a partir de uma célula maternal. Plantas poliplóides geralmente apresentam uma grande quantidade de anormalidades meióticas relacionadas à segregação irregular dos cromossomos, as quais acabam gerando micrósporos geneticamente desbalanceados, comprometendo a fertilidade dos grãos de pólen. Acessos poliplóides, por apresentarem baixa fertilidade de pólen e serem geralmente apomíticos, acabam limitando muito os programas de melhoramento para geração de variabilidade genética.

Em algumas espécies apomíticas, como *Paspalum* e *Brachiaria*, a formação de sementes viáveis só ocorre se houver fecundação dos núcleos polares do saco embrionário por um dos núcleos gaméticos do grão de pólen, fenômeno conhecido como pseudogamia. Nestes casos, acessos apomíticos 4x com meiose normal podem ser usados como parentais masculinos em cruzamentos com fêmeas sexuais 4x tetraploidizadas artificialmente. Acessos tetraplóides com alta taxa de anormalidades meióticas devem ser descartados. Dentro deste

contexto, uma avaliação criteriosa do comportamento meiótico é de fundamental importância na caracterização e escolha dos acessos. Todavia, quando há total impossibilidade de realização de análise meiótica, testes para verificar a viabilidade ou a fertilidade do pólen, realizados com o emprego de diferentes corantes, devem ser efetuados.

Afinidade genômica. Um outro aspecto muito importante que deve ser levado em consideração na utilização de germoplasma em cruzamentos interespecíficos é a afinidade entre os genomas parentais. Desde a metade do século passado, o conhecimento da similaridade genômica tem sido apontado como um aspecto fundamental para os programas de melhoramento que envolvem a introdução de genes de espécies selvagens. A transferência de genes é facilitada pela recombinação homóloga ou homeóloga durante a meiose. De acordo com King *et al.* (1999), o conhecimento da similaridade dos genomas é importante para se estimar a frequência de recombinação que pode ocorrer em híbridos interespecíficos. O pareamento de cromossomos em tais híbridos é usado como um método para se conhecer a relação genômica entre as espécies e para estabelecimento de filogenia no gênero. Um elevado grau de pareamento entre os cromossomos garante que o conjunto gênico de ambos os genitores possa ser permutado.

Nem sempre as espécies envolvidas no cruzamento comportam-se de maneira idêntica quando estão compartilhando o mesmo citoplasma, ou seja, nem sempre os parentais apresentam afinidade genômica. A afinidade genômica pode ser evidenciada de diferentes formas. Logo na prófase I pode-se ter evidências do grau de parentesco entre os parentais. O pareamento dos cromossomos no paquíteno, podendo variar de completo até total ausência, já revela a homologia entre os genomas. No diplóteno e diacinese, o aparecimento de cromossomos univalentes reforça esta observação. A formação de quiasmas evidenciada nestas fases tem sido muito utilizada como indicador de parentesco entre as espécies.

A forma de pareamento dos cromossomos nos poliplóides, ou seja, a formação de associações cromossômicas em bivalentes ou em multivalentes, por

outro lado, dá indicações sobre a origem dos poliplóides, se por duplicação do próprio genoma (autopoliplóides) ou por união de genomas distintos (alopoliplóides). Stebbins (1947) classificou os poliplóides em autopoliplóides, alopólíplóides, auto-alopoliplóides e alopólíplóides segmentais. Em autopoliplóides, todos os genomas são idênticos e os cromossomos homólogos têm igual oportunidade de se parear na meiose. Quando o pareamento se inicia em diferentes locais, multivalentes são formados. Todavia, a manutenção da multivalência até a metáfase I dependerá da freqüência e localização de quiasmas. Em alopólíplóides segmentais, os genomas não são idênticos. Como resultam de hibridização entre espécies diplóides relacionadas, seguida por duplicação do número de cromossomos, muitos bivalentes e poucos multivalentes são formados. Embora baixa freqüência de multivalentes seja um argumento freqüente para indicar poliploidia segmental, Sybenga (1996) coloca que este caráter por si só não é uma indicação segura de homologia, uma vez que autopoliplóides verdadeiros podem formar quadrivalentes com freqüências substancialmente menores que aquelas teoricamente possíveis.

A combinação de dois genomas distintos em um híbrido interespecífico freqüentemente resulta em divisões mitóticas e meióticas aberrantes. Assincronia no ciclo celular em mitose tem sido descrita entre híbridos interespecíficos durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Assincronia no ritmo meiótico, por outro lado é raramente descrita. Comportamento meiótico assincrônico foi descrito em um acesso de *Paspalum subciliatum* (Adamowski *et al.*, 1998), provavelmente um anfidiplóide natural ($2n=4x=40$), onde os dois genomas não apresentavam sincronia no curso meiótico e o genoma retardatário foi eliminado. Resultado semelhante foi encontrado em um acesso pentaplóide ($2n=5x=45$) de *Brachiaria brizantha* (Mendes *et al.*, 2004) onde um genoma ($x=9$) alocou-se periféricamente em uma placa metafásica própria e manteve-se isolado durante toda a divisão meiótica.

Há uma correlação positiva entre eliminação de cromossomos e distância genética entre algumas espécies. Híbridos F_1 interespecíficos e intergenéricos

(híbridos amplos) são usualmente estéreis porque os genomas são altamente divergentes, faltando afinidade cromossômica para pareamento e sincronia no ciclo celular. Em geral, apenas alguns cromossomos formam bivalentes. Pareamento cromossômico normal e fertilidade de sementes podem ser restaurados por duplicação dos cromossomos. Estudos citogenéticos em andamento no gênero *Brachiaria* envolvendo híbridos interespecíficos entre *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* (Risso-Pascotto *et al.*, 2004) têm revelado alguns problemas de afinidade genômica. Todavia, estes problemas parecem ser acesso-específico. Em alguns cruzamentos, o genoma de *B. ruziziensis* apresenta ciclo meiótico mais longo que o de *B. brizantha* e é eliminado do núcleo telofásico.

A importância dos aloploplóides para o melhoramento de plantas consiste, fundamentalmente, como material experimental para a análise de afinidade genômica e introdução de genes desejáveis. Todavia, devido a composição genômica desbalanceada, eles tendem a ser estéreis por apresentarem meiose anormal. Este fato representa uma grande restrição em seu uso no melhoramento como intermediários na transferência de genes ou para a construção de sistemas genéticos especiais. Por outro lado, a segregação de uma variedade de novos tipos representa uma grande oportunidade para seleção de progênies com uma composição específica de cromossomos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia usada para a análise meiótica é bastante simples, onde os reagentes usados para o preparo de fixadores ou corantes dependem, normalmente, do material biológico a ser analisado. Muitas vezes, também, o que determina a utilização de um ou outro reagente é a sua disponibilidade no laboratório.

5.1. Reagentes

Álcool etílico comum 96^o GL, ácido acético, ácido propiônico e carmim em pó.

5.2. Instrumental

Microscópio óptico, lâminas, lamínulas, lamparina, conta-gotas, espátula de Lecron ou bisturi, estilete de ponta fina, pinça de relojoeiro, espátula de ferro, papel de filtro, placas de Petri e frascos para acondicionar botões florais.

5.3. Preparo de reagentes

Carmim propiônico 1%. Misturar 55 ml de água destilada com 45 ml de ácido propiônico e levar ao fogo (bico de Bunsen) até ferver. Retirar do fogo e adicionar 1 gr de carmim. Mexer bem por alguns minutos. Levar novamente ao fogo e ferver lentamente por alguns minutos. Deixar descansar por 24 horas e filtrar. Quanto mais velho for o corante, melhor é seu poder de coloração.

5.4. Material biológico

Botões florais em diferentes estágios de maturação. No caso de gramíneas, realizar a coleta de inflorescências quando estas ainda estão totalmente envoltas pela folha bandeira. Deve-se apertar dois dedos a porção do ápice do colmo, sendo que a maciez desta região revela a presença do pendão. Para outras famílias, a coleta deve envolver botões florais de todos os tamanhos. Em todos os casos, flores maduras devem ser coletadas para testes de fertilidade de pólen.

5.5. Fixação

Botões florais jovens, em fase ideal para estudos meióticos, devem ser colhidos e fixados em 3 partes de álcool 96%: 1 parte de ácido acético em

temperatura ambiente. Após um período de 24 horas de fixação, deverão ser transferidos para álcool a 70%, onde permanecerão por mais 24 horas. Em seguida, deverão ser transferidos para novo álcool a 70% e conservados em geladeira até o momento de serem utilizados. Outros fixadores, como mistura de álcool etílico : clorofórmio : ácido propiônico (6:3:2, v/v) costumam dar bons resultados. O clorofórmio permite a limpeza do citoplasma de eventuais grãos de amido e óleos. Alguns materiais são extremamente frágeis e podem ser armazenados em freezer no próprio fixador.

5.6. Roteiro para confecção de lâminas.

Os microsporócitos são preparados pela técnica de esmagamento que consiste na retirada das anteras sob uma lâmina com auxílio de uma pinça e de um estilete e disposição das mesmas em uma lâmina limpa contendo uma gota de carmim propiônico a 1%. As anteras devem ser cortadas no sentido longitudinal com o auxílio da espátula de Lecron ou bisturi e, em seguida, esmagadas levemente com auxílio de um estilete para expulsar os microsporócitos de dentro da antera. Todo material excedente, ou seja, restos da parede das anteras deve ser cuidadosamente retirado com uma pinça de ponta fina. Deve-se passar levemente a espátula de ferro sobre esta preparação para intensificar a coloração dos cromossomos. Em seguida, coloca-se uma lamínula sobre o material e aquece-se levemente sobre chama fraca de uma lamparina. O conjunto deve ser pressionado levemente, ainda quente, entre duas folhas de papel de filtro. A preparação está pronta para ser analisada ao microscópio. Se as células estiverem pequenas ou esmagadas, deve-se controlar melhor o aquecimento e o esmagamento. Estas duas etapas são de fundamental importância para a confecção de uma boa lâmina, pois o aquecimento incha a célula, tornando-a maior e os cromossomos distribuem-se melhor dentro da mesma. O esmagamento, por sua vez, aplaina a célula entre a lâmina e a lamínula, permitindo melhor espalhamento e visualização das fases da meiose. Se a pressão colocada for muito forte, as células mostrar-se-ão rompidas. Se as preparações não forem analisadas imediatamente, devem ser vedadas com

esmalte incolor de unhas, ou com luto (cera + breu), pois assim durarão mais tempo. Para um período mais longo de conservação, as lâminas devem ser armazenadas em congelador dentro de uma placa de Petri contendo folhas de papel de filtro abundantemente umedecidas. Nem todas as espécies toleram este tipo de conservação, oxidando-se rapidamente.

5.7 Preparação de lâminas permanentes

Embora a conservação de lâminas permanentes não seja adequada para alguns propósitos devido a perda de qualidade, esta prática é passível de realização. Para isto, lâminas preparadas pela metodologia descrita acima devem ter a lamínula descolada em ácido acético a 45% ou em nitrogênio líquido. No primeiro caso, a lâmina com coloração bastante intensa deve ser mergulhada na solução com a lamínula voltada para baixo e apoiada em um palito. Após descolar, tanto a lâmina quanto a lamínula devem ser colocadas em um aparador para secar ao ar. Quando secas, devem ser montadas, separadamente, com algum meio de montagem (Bálsamo do Canadá, Permount, etc). No segundo caso, após mergulhar a lâmina no nitrogênio, remover a lamínula com o auxílio de uma gilete ou pinça. Secar e montar da mesma forma.

6. TESTES DE VIABILIDADE DE PÓLEN

Em muitas circunstâncias há necessidade de se avaliar a viabilidade dos grãos de pólen, sejam eles recém liberados da antera ou armazenados por curtos ou longos períodos. Vários fatores externos, como umidade relativa do ar, temperatura, percentagem de gás carbônico na atmosfera e pressão de oxigênio, afetam sobremaneira a viabilidade do pólen, principalmente daqueles estocados por longos períodos. A razão primária para o decréscimo de viabilidade de pólen armazenado está relacionada com inativação de enzimas e substratos metabólicos essenciais para a germinação. Acúmulos de produtos metabólicos secundários, como ácidos orgânicos, também podem inibir a germinação. Fatores genéticos, como desbalanços cromossômicos causados por

anormalidades meióticas, também afetam sobremaneira a viabilidade dos grãos de pólen. Neste caso, a inviabilidade já pode ser observada logo após a meiose, ou seja, em grãos de pólen recém liberados da antera.

Há diversas formas de se avaliar a viabilidade dos grãos de pólen como, por exemplo, averiguar seu potencial de germinação e capacidade de formar sementes. Todavia, quando se deseja fazer uma avaliação rápida, outros testes que não envolvem a germinação podem ser utilizados. Estes testes utilizam corantes químicos específicos que reagem com constituintes celulares presentes no pólen maduro. Dentre estes corantes, destacam-se: 1) *anelina azul em lactofenol* cora a parede de calose com alta especificidade; 2) *iodeto de potássio*, também conhecido como *lugol*, é específico para coloração de grãos de pólen com alto conteúdo de amido; 3) *carmin acético* ou *carmim propiônico* coram preferencialmente os cromossomos; 4) *cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio*, também conhecido como *TTC*, ou simplesmente *tetrazólio*, é um corante de oxirredução e reage com enzimas da cadeia respiratória. Assim, um ou vários testes simples podem ser aplicados sobre o pólen cuja viabilidade se deseja avaliar.

Para todos os testes deve-se cortar anteras maduras sobre a lâmina; adicionar uma gota de corante e bater suavemente sobre a antera para expulsar os grãos de pólen. Adicionar mais uma gota de corante e cobrir com lamínula. Observar ao microscópio.

6.1. Teste do Lugol

Uma solução de lugol adquirida em farmácia pode ser usada neste teste. Às vezes esta solução vem muito concentrada e necessita ser diluída em água para se obter melhor resultado.

Este teste baseia-se em uma reação química que acontece entre o iodo e a molécula de amido, conferindo aos grãos de pólen viáveis uma coloração marrom escura (quase preta) opaca. Grãos de pólen inviáveis, pela ausência de amido, adquirem coloração amarela clara e são transparentes. Espécies que apresentam grãos de pólen com pouco amido não respondem bem a este teste.

6.2. Teste do carmim propiônico ou carmim acético

A maioria das espécies responde bem a este teste. Devido a afinidade que o carmim tem por DNA e RNA, os grãos de pólen viáveis coram-se em rosa forte, enquanto os estéreis mostram-se transparentes e não corados. O carmim propiônico é o mesmo utilizado para a análise da meiose. O ácido propiônico pode ser substituído por ácido acético.

6.3. Teste do tetrazólio

Este talvez seja o teste mais eficaz para se investigar a viabilidade do pólen, pois somente aqueles vivos respondem à reação. O cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) é um corante de oxi-redução e somente grãos de pólen viáveis contém enzimas funcionais, ou seja, enzimas capazes de funcionar quando colocadas em condições de germinação. As enzimas de oxi-redução, como desidrogenases e peroxidases, transferem prótons e elétrons para moléculas aceptoras. Certos corantes, como tetrazólio, na redução de um próton, mudam de cor. Enzimas de cadeia respiratória são capazes de promover esta reação e a mudança de cor do corante, deixando o grão de pólen com coloração rosada, indica a presença de atividade de oxi-redução no grão de pólen vivo. Grãos de pólen mortos não têm atividade enzimática e mostram coloração levemente amarelada e transparente.

Enquanto no teste do lugol e do carmim a coloração é imediata, neste teste é necessário preparar a lâmina e deixá-la descansando por várias horas até que a reação enzimática aconteça. Às vezes, são necessárias mais que 24 horas para se ter um a boa coloração. Inicialmente os grãos de pólen viáveis vão adquirindo coloração rosa suave, a qual se intensifica com o passar do tempo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; BATISTA, L. A. R. Chromosome elimination in *Paspalum subciliatum* (Notata group). **Sexual Plant Reproduction**, Nova Iorque, v. 11, p. 272-276, 1998.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294p. (Tradução).
- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios**, v. 104, p. 157-171, 2001.
- KING, I. P.; MORGAN, W. E.; HARPER, J. A.; THOMAS, H. M. Introgression mapping in the grasses. II. Meiotic analysis of the *Lolium perenne*/*Festuca pratensis* triploid hybrid. **Heredity**, Edinburgh, v. 82, p. 107-112, 1999.
- MAHESHWARI, P. **An Introduction to the Embryology of Angiosperms**. New Delhi: McGraw-Hill Publ. Co. Ltd., 1978. 453p.
- MENDES, D. V.; BOLDRINI, K. R.; PAGLIARINI, M. S.; MENDES-BONATO AB; VALLE CB. Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, 2004, (submetido).
- 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.
- PAGLIARINI, M. S.; CARRARO, L. R.; FREITAS, P. M.; ADAMOWSKI, E. V.; BATISTA, L. A. R.; VALLS, J. F. M. Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. **Hereditas**, Lund, v. 135, p. 27-34, 2001.
- PENTEADO, M. I. O.; SANTOS, A. C. M.; RODRIGUES, I. F., VALLE, C. B., SEIXAS, M. A. C.; ESTEVES, A. **Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero Brachiaria**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. 32p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, No. 11).
- RISSO-PASCOTTO, C; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Gramineae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, 2004 (in press).
- RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B.; JANK, L. Asynchronous meiotic rhythm as the cause of selective chromosome elimination in an interspecific *Brachiaria* hybrid. **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 945-950, 2004.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: Biology, Biochemistry and Management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974, 307p.

STEBBINS, G. L. Types of polyploids: their classification and significance. **Advances in Genetics**, Nova lorque, 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.

TAKAYAMA, S. Y.; FREITAS, P. M.; PAGLIARINI, M. S.; BATISTA, L. A. R. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum* (Plicatula group) from different regions of Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v. 99, p. 89-94, 1998.

TANAKA, I. Differentiation of generative and vegetative cells in angiosperm pollen. **Sexual Plant Reproduction.**, Nova lorque, v.10, p. 1-7, 1997.

TWELL, D.; PARK, S. K.; LALANNE, E. Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, p. 305-310, 1998.

SACO EMBRIONÁRIO E MODO DE REPRODUÇÃO EM *Brachiaria brizantha* (Poaceae)

Ana Claudia Guerra Araujo⁴

Reprodução em plantas

Espécies de plantas que se reproduzem sexualmente apresentam uma seqüência organizada de eventos que culminam na produção de sementes viáveis e frutos e tem início com a formação dos órgãos reprodutor feminino e masculino, gineceu e do androceu que contêm óvulos e anteras, respectivamente. A formação do gameta feminino ou oosfera, parte fundamental da reprodução em angiospermas, se dá no megagametófito, também chamado saco embrionário, que se desenvolve no óvulo, dentro da flor. O óvulo é composto por um parênquima designado nucelo e o saco embrionário se forma na região central desse tecido. Durante a megasporogênese, algumas células do nucelo ($2n$), mais freqüentemente uma única célula do nucelo em cada óvulo, aumenta seu volume e se diferencia em célula mãe do megásporo ou megasporócito. A célula mãe do megásporo forma quatro células haplóides, os megásporos (n) após uma divisão meiótica. Durante a megagametogênese, três desses megásporos degeneram e o megásporo situado mais próximo à região da chalaza do ovário sobrevive e dá origem a um saco embrionário meioticamente reduzido (Mauseth, 1995). Para a formação do saco embrionário, o núcleo do megásporo sobrevivente sofre três divisões mitóticas sucessivas, produzindo dois, quatro e oito núcleos haplóides, que migram pelo citoplasma: três núcleos permanecem em cada um dos pólos e dois na região central. O saco embrionário formado é monospórico, do tipo Polygonum e comum a 70% das angiospermas (Willemse & van Went, 1984). Sua estrutura consiste em sete células: uma

⁴ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. PqEB Final W3 Norte. Brasília-DF 70770-900, Brasil. CP 02372. Email: guerra@cenargen.embrapa.br

oosfera, duas sinérgides, a célula central contendo dois núcleos polares e três antípodas (Willemse & van Went 1984, Reiser & Fischer, 1993).

A formação do gameta masculino se dá nas anteras. Durante a microsporogênese, inúmeras células designadas células mãe do pólen ($2n$) sofrem uma meiose e dão origem aos micrósporos (n). Cada um desses micrósporos, após a mitose, dá origem a um grão de pólen durante a microgametogênese. Os grãos de pólen (n) contêm uma célula generativa e outra vegetativa. Após a formação do tubo polínico durante o processo de polinização, ocorre outra mitose que dá origem a segunda célula generativa (revisto por McCormick, 1993).

A estrutura básica da semente compõe-se do embrião e do endosperma ambos circundados e alimentados por tecidos maternos (revisto por Chaudhury et al., 2001). O desenvolvimento da semente envolve a fusão dos gametas masculino e feminino. A dupla fertilização do saco embrionário do tipo Polygonum nessas plantas, ou seja, a fecundação da oosfera (n) e dos núcleos polares da célula central que se fusionam ($n + n$) por dois gametas masculinos(n) é geralmente necessária para que ocorra a formação do embrião e do endosperma que consistem da semente e fruto nas angiospermas (Willense & van Went, 1984). Portanto, a sexualidade nessas plantas pode ser identificada pela formação de um megagametófito reduzido e quando da fecundação do gameta, forma-se um embrião ($2n$) que por sua vez, está circundado por tecido endospermático ($3n$).

Apomixia

A apomixia é um modo de reprodução assexual por sementes presente em mais de 40 famílias de angiospermas, tais como Liliaceae, Rutaceae, Orchidaceae, Ochnaceae Asteraceae e bastante comum em Poaceae (Asker & Jerling, 1992). Nas plantas apomíticas, o embrião se desenvolve autonomamente a partir de células do tecido feminino sem a contribuição paterna. A progênie formada é geneticamente idêntica à planta-mãe e este

processo é, portanto, uma forma natural de clonagem por sementes (Nogler, 1984, Asker & Jerling, 1992, Koltunow, 1993, 1995, Savidan, 2000, Koltunow & Grossniklaus 2003, Bicknell & Koltunow 2004). A apomixia ocorre na parte feminina da flor, mas especificamente no óvulo. Durante a reprodução, dois componentes principais distinguem a sexualidade da apomixia: a apomeiose durante a megagametogênese e o desenvolvimento autônomo do embrião, ou seja, consiste na formação de embrião a partir de células femininas não meioticamente reduzidas e na ausência do gameta masculino. Portanto, o desenvolvimento do embrião se dá autonomamente, independentemente da fecundação (partenogênese) a partir de uma célula esporofítica ou de um megagametófito não reduzido. Dependendo da origem do embrião, a apomixia é então classificada em esporofítica ou gametofítica (Nogler, 1984, Asker & Jerling, 1992, Koltunow, 1993, 1995, Savidan, 2000, Dusi et al., 2000).

A apomeiose não está presente na microgametogênese (formação do gameta masculino). Similarmente ao que ocorre nas plantas sexuais, os gametas masculinos das plantas apomíticas são meioticamente reduzidos, pois a apomixia ocorre apenas na porção reprodutiva feminina. A formação de grãos de pólen meioticamente reduzidos e viáveis é importante para muitas plantas apomíticas. Isso porque, na maioria das plantas apomíticas, a formação de endosperma, tecido fundamental para a nutrição, sustentação e controle do desenvolvimento do embrião depende da fecundação da célula central (núcleo polar) no saco embrionário (Nogler, 1984). Essas plantas são conhecidas como apomíticas pseudogâmicas. Em outras raras apomíticas, como algumas espécies de Asteraceae e eventuais espécies de Poaceae e Rosaceae (Chaudhury et al., 2001), a formação do endosperma se dá autonomamente, na ausência da fecundação da célula central e essas plantas são chamadas de apomíticas autônomas.

Mecanismos da apomixia

1- Apomixia esporofítica

O caráter esporofítico da apomixia consiste na formação do embrião independentemente da formação de um saco embrionário (Lakshmanan & Ambegaokar 1984, Koltunow, 1993). Na apomixia esporofítica, também designada embrionia adventícia, vários embriões são formados diretamente a partir de células somáticas do nucelo ou tegumentos, chamadas de iniciais embriogênicas. Comumente, múltiplos embriões adventícios são observados e a reprodução sexual normalmente ocorre paralelamente à embrionia adventícia, como por exemplo, em Citrus (Koltunow, 1995).

2- Apomixia gametofítica

Diferentemente da apomixia esporofítica, a apomixia gametofítica é caracterizada pelo desenvolvimento autônomo do embrião em um saco embrionário não reduzido, onde as células, incluindo o gameta, são diplóides. Dependendo da origem desse saco embrionário, a apomixia gametofítica pode ser do tipo diplospórica ou apospórica (Nogler, 1984, Asker & Jerling, 1992, Koltunow, 1993).

a) apomixia diplospórica

Na diplosporia, o saco embrionário é formado a partir da célula mãe do megásporo, que após sofrer uma meiose irregular que mantém seu caráter não reduzido, entra em mitose e forma um saco embrionário não reduzido. Dependendo da extensão da irregularidade meiótica da célula mãe do megásporo, quatro tipos de sacos embrionários podem ser reconhecidos (Johri et al., 2001). Para a formação dos sacos embrionários do tipo *Datura*, dois núcleos não reduzidos da célula mãe do megásporo sofre mitose e o saco embrionário formado contém oito núcleos. Sacos embrionários do tipo *Taraxacum* ou *Ixeris* são formados após uma restituição do núcleo da célula mãe do megásporo durante a meiose I que dá origem a células meioticamente não reduzidas que durante a fase II da meiose, passam por duas mitoses e formam o saco

embrionário. Para o saco embrionário tipo *Allium*, ocorre uma duplicação endomitótica anterior a meiose na célula mãe do megásporo e posteriormente ocorrem mitoses. Ainda pode ocorrer o saco embrionário do tipo *Antennaria* (aposporia gonial), onde a célula mãe do megásporo não sofre meiose e entra diretamente em mitose para formar o saco embrionário. Todos os sacos embrionários diplospóricos possuem uma oosfera, duas sinérgides, a célula central binucleada e três antípodas, sendo morfológicamente similares entre si e ao saco embrionário do tipo *Polygonum*. Entretanto, os primeiros são sacos embrionários não reduzidos ($2n$), enquanto o último é meioticamente reduzido (n).

b) apomixia apospórica

Na apomixia apospórica, uma ou mais células do nucelo ou do tegumento, designadas iniciais de sacos embrionários apospóricas ou iniciais apospóricas dão origem este tipo de sacos embrionários. Uma ou mais inicial apospórica se diferencia e sem sofrer meiose, entra em divisão mitótica e dá origem a um saco embrionário não reduzido, onde ocorre a formação autônoma do embrião. Nas plantas que apresentam apomixia apospórica, é comum a formação de múltiplos sacos embrionários apospóricos, que por sua vez, podem resultar em poliembrionia devido à diferenciação de várias iniciais apospóricas. Dois tipos de sacos embrionários apospóricos são reconhecidos: o saco embrionário do tipo *Panicum*, que é formado após duas mitoses e que contém uma oosfera, duas sinérgides e uma célula central uninucleada. O outro tipo de saco embrionário apospórico é o tipo *Hieracium*, formado após três mitoses e que contém a oosfera, duas sinérgides, a célula central binucleada e três antípodas. O saco embrionário do tipo *Hieracium* é estruturalmente similar aquele do tipo *Polygonum* e, portanto, não pode ser distinguido morfológicamente daquele presente nas plantas sexuais. Já o saco embrionário do tipo *Panicum* geralmente pode ser distinguido daquele do tipo *Polygonum* devido a presença de apenas um núcleo polar e ausência de antípodas. Entretanto, em algumas plantas apomíticas apospóricas, o saco embrionário do tipo *Panicum* pode apresentar

dois núcleos polares, associados à oosfera e a uma ou duas sinérgides, como em *Paspalum minus* (Bonilha & Quarin, 1997).

Plantas com reprodução sexual apresentam exclusivamente saco embrionário do tipo Polygonum e sacos embrionários apomíticos não estão presentes. Já as plantas apomíticas diplospóricas, geralmente, apresentam apenas um saco embrionário contendo oito núcleos. Mas também mais de um tipo de saco embrionário não reduzido pode ser observado, como em *Paspalum minus*, onde foi observado em um mesmo óvulo, um saco embrionário do tipo diplospórico e outro do tipo apospórico (Bonilha & Quarin, 1997). Por outro lado, saco embrionário do tipo Polygonum não está presente nas diplospóricas, já que o saco embrionário diplospórico e o Polygonum têm origem na mesma célula. Nas plantas apomíticas apospóricas, pode ocorrer em um mesmo óvulo, um saco embrionário do tipo Polygonum associado ou não aqueles do tipo apospórico, já que se originam de células diferentes. O saco embrionário do tipo Polygonum pode estar, pode sofrer fecundação e formar uma progênie através da sexualidade (apomixia facultativa), que por definição, inclui a formação de sementes viáveis a partir da fecundação de sacos embrionários meioticamente reduzidos - tipo Polygonum, presentes em óvulos de plantas apomíticas (Nogler, 1984, Koltunow, 1993).

Importância da apomixia

Aspectos da reprodução apomítica, como a biologia celular e molecular, seu controle genético e a relação desse mecanismo com aqueles presentes na reprodução sexual têm sido alvos de pesquisa de vários grupos de pesquisa. Estes grupos têm como objetivo principal, identificar genes associados à apomixia e, através da biotecnologia, viabilizar sua transferência para plantas que se reproduzem exclusivamente por sexualidade. Assim, com a combinação da apomixia com a sexualidade, será possível integrar a fixação de características da planta-mãe na progênie e a variabilidade genética resultante da recombinação resultante da reprodução sexual. Dessa forma, o vigor híbrido

alcançado através de cruzamentos para obtenção de genótipos elite, poderá ser fixado através da apomixia, trazendo assim um benefício imensurável à agricultura. Além de se tratar também de um fenômeno muito interessante do desenvolvimento vegetal, o entendimento do mecanismo apomítico de reprodução poderá facilitar a ampliação da variabilidade genética das plantas que se reproduzem por apomixia.

Diferentes abordagens têm sido utilizadas nesses estudos, tais como experimentos visando a introgressão dos genes responsáveis pela apomixia à partir de cruzamentos de variedades apomíticas com parentes próximos (Ozias-Akins et al. 1993, Leblanc et al. 1994, Savidan 2000). Outra estratégia é a busca destes genes em plantas naturalmente apomíticas tais como *Hieracium* (Guerin et al. 2000, Tucker et al. 2003, Bicknell & Koltunow, 2004), *Paspalum* (Quarin et al. 2001) *Pennisetum* (Vielle-Calzada et al. 1998) e *Brachiaria* (Valle & Savidan 1996, Leblanc et al. 1997, Pessino et al. 1997, 1998, Dusi & Willemse 1999, Dusi et al. 2000, Araujo et al. 2000, 2003a,b, 2004, 2005, Pinheiro et al. 2000, Alves et al., 2001, Rodrigues et al. 2003, Silveira et al., 2003) bem como em mutantes que apresentam componentes do processo apomítico, como aqueles “fertilization independent endosperm” de *Arabidopsis* (Ohad et al. 1996, Chaudhury et al. 1997, Grossniklaus et al., 1998, Tucker et al. 2003).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, em colaboração com a Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS juntamente com outros parceiros no país e fora deste, vem desenvolvendo projeto de pesquisa contemplando “Estudos da reprodução vegetal visando o domínio da apomixia, clonagem de plantas através de sementes”. Para tal, alguns acessos de *Brachiaria* têm sido utilizados como modelos para estudos sobre a biologia do desenvolvimento e reprodução vegetal. Nesses estudos, realizamos comparações celulares, moleculares, reprodutivas e genéticas entre acessos sexuais e apomíticos do gênero.

Brachiaria e apomixia

O gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb. pertence a família Poaceae e compreende cerca de 100 espécies de gramíneas, originalmente africanas em sua maioria. Algumas espécies são economicamente importantes como pastagens em diversos países de clima tropical e subtropical (Renvoize et al., 1996) e no Brasil, essas forrageiras ocupam aproximadamente 40 milhões de hectares das áreas de pastagens (Santos Filho, 1996).

Uma análise abrangente do modo de reprodução de 251 acessos em 14 espécies de *Brachiaria* pertencentes à coleção do CIAT–Centro Internacional de Agricultura Tropical mostrou a ocorrência de apomixia e sexualidade dentro da mesma espécie, para várias espécies do gênero (Valle, 1990, Valle & Savidan 1996). Dois níveis de ploidia foram predominantemente encontrados nos acessos: o diplóide, associado à sexualidade e o tetraplóide, associado à apomixia (Valle & Savidan 1996).

B. brizantha

B. brizantha (Hochst. ex A. Rich.) Stapf é uma das espécies forrageiras mais importantes no Brasil (Valle & Savidan 1996). Uma avaliação dos níveis de ploidia através de citometria de fluxo (Penteado et al. 2000) confirmou que a maioria dos acessos de *B. brizantha* é tetraplóide ($2n = 4x = 36$), apomítica (Valle & Savidan 1996) e até o presente momento um único acesso diplóide ($2n = 2x = 18$) sexual está identificado (BRA 002747) nesta espécie (Carnahan & Hill 1958, Valle & Glienke 1991).

As espiguetas de *B. brizantha* possuem duas flores, uma superior hermafrodita e uma inferior, estéril. Na flor inferior, encontram-se as anteras e um único ovário, uniovulado. Nas plantas do acesso diplóide, sexual, o óvulo geralmente apresenta um saco embrionário do tipo Polygonum, comumente situado mais próximo à região da micrópila (Valle, 1990, Valle & Savidan, 1996, Cunha & Araujo, 1999, Araujo et al., 2000, Araújo et al. 2003b, 2004, 2005).

Este saco embrionário apresenta a oosfera, duas células sinérgides próximas à micrópila e separadas das antípodas, pela célula central. A célula central é bastante volumosa e nela estão dois núcleos polares. As antípodas são seis células volumosas com contorno irregular, citoplasma e nucleoplasma denso, núcleo com pequeno volume com múltiplos nucléolos (Cunha & Araujo, 1999, Araujo et al., 2000, Araujo et al., 2003b, 2005). Entretanto, em 15% dos ovários analisados entre os anos de 2002 a 2004, foi observada a presença de mais de um saco embrionário do tipo Polygonum em um mesmo óvulo em aproximadamente (Araujo et al., 2003b). Nos demais acessos de *B. brizantha*, que são apomíticos (273), o óvulo apresenta sacos embrionários do tipo apospóricos. Iniciais apospóricas se originam de células no nucelo (Valle, 1986, Valle, 1990, Valle & Savidan 1996, Araujo et al., 2000) e a diferenciação dessas células pode ocorrer durante a degeneração dos megásporos da via sexual de reprodução, como observado no cultivar Marandu, acesso tetraplóide, apomítico de *B. brizantha* (Araujo et al., 2000) ou ainda, pode ocorrer durante ou após a meiose da célula mãe do megásporo, como observado em *B. decumbens* (Dusi & Willemse, 1999). No cv. Marandu, múltiplas iniciais apospóricas são observadas durante a megasporogênese, na porção mais próxima a chalaza do ovário onde ocorrem as células respectivas ao processo sexual. Posteriormente, na megagametogênese, um a seis sacos embrionários em formação pode ser observado. Entretanto, apenas um único saco embrionário do tipo Panicum está presente na maioria dos óvulos maduros. Já em outros acessos de *B. brizantha*, como BRA002232 e BRA003450, a maioria dos ovários apresenta dois, três ou quatro sacos embrionários do tipo Panicum no mesmo óvulo, sendo que em alguns ovários, até sete sacos embrionários podem ser observados (Araujo et al., 2003b).

A formação do gametófito masculino em *B. brizantha* apomítica segue, em geral, o mesmo padrão morfológico da planta sexual (Alves, 2000, Araújo et al., submetido), com a formação de inúmeras células mãe do pólen que após a meiose, formam tétrades de micrósporos que por sua vez, dão origem a grãos de pólen trinucleados, contendo um único poro (Alves 2000, Alves et al. 2001).

Entretanto, é observada uma diferença no padrão de depósito de calose no entorno da célula mãe do pólen entre a planta diplóide, sexual e o cv. Marandu. Na primeira, as células mãe do pólen estão inteiramente recobertas por uma parede celular contendo depósito de calose enquanto que na planta apomítica, esse depósito é menor e está restrito região apical da célula (Araujo et al., 2000). Apesar das diferenças no diâmetro e na corabilidade por carmim acético desses grãos de pólen, ambas as plantas produzem grãos de pólen férteis, essenciais na fecundação e formação das sementes, já que cv. Marandu é um acesso apomítico, pseudogâmico, ou seja, o endosperma é formado após a fecundação do núcleo polar (Ngendahayo 1988, Alves et al, 2001).

Apomixia facultativa em *Brachiaria*

As plantas de *Brachiaria* com reprodução sexual apresentam exclusivamente saco embrionário do tipo Polygonum (revisto por Valle e Savidan, 1996). Entretanto, sacos embrionários do tipo Polygonum são observados em diferentes freqüências nos óvulos das plantas apomíticas de *Brachiaria*, quase sempre associados a um ou múltiplos sacos embrionários apospóricos (Lutts et al., 1984, Dusi & Willemse, 1999, Araujo et al., 2000). Valle (1986) indicou a presença de saco embrionário do tipo Polygonum associado a outro do tipo Panicum em 14 dos 16 acessos apomíticos de *B. brizantha*, com rara ocorrência de um saco embrionário tipo Polygonum associado a dois do tipo Panicum em um mesmo óvulo. Posteriormente, Valle (1990) determinou que 63 dos 156 acessos apomíticos de *B. brizantha* analisados apresentavam saco embrionário do tipo Polygonum em uma freqüência entre 0-74% e que a ocorrência de dois tipos de sacos embrionários estava presente na maioria das espécies analisadas de *Brachiaria*. Mais recentemente, Valle & Savidan (1996) estenderam essa freqüência para todos os 274 acessos identificados com apomíticos em *B. brizantha* identificados. Apesar da alta freqüência de dois tipos de sacos embrionários no mesmo óvulo indicada para *B. brizantha*, no cv. Marandu apenas 2% dos ovários apresentam essa organização (Araujo et al., 2000). Em outros

acessos apomíticos de *B. brizantha*, a presença desses dois tipos de sacos embrionários em um mesmo óvulo foi confirmada em 46% dos ovários (Araujo et al., 2004). A ocorrência de dois tipos de sacos embrionários em um mesmo óvulo nas plantas apomíticas de *Brachiaria* é considerada um indicativo de apomixia facultativa (Valle & Savidan, 1996). No entanto, devido à dificuldade de se identificar segregação fenotípica na progênie, ainda não está determinado se esses sacos embrionários podem ser fecundados e originar sementes viáveis e assim confirmar o caráter facultativo da apomixia.

Análise da estrutura de saco embrionário e inferência sobre o modo de reprodução em *Brachiaria*

Comumente, para se inferir sobre o modo de reprodução e ocorrência de apomixia facultativa nos acessos de *Brachiaria*, utiliza-se estrutura de saco embrionário presente nos óvulos das plantas (Valle & Savidan, 1996). Diferenças na organização de saco embrionário do tipo Polygonum e Panicum podem ser facilmente determinadas através de observações em microscopia de luz, que permitem a efetiva constatação da presença ou não de antípodas e de um ou dois núcleos polares na célula central.

Uma forma eficiente de se fazer essa análise é a observação de ovários clareados em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (1) (veja também Pozzobon e Araújo, 1998). Ovários isolados de pistilos são fixados, desidratados e clareados de forma que, através da transparência do óvulo e uso do DIC, é possível se determinar facilmente as células da parede do ovário, dos tegumentos, do nucelo e do saco embrionário, seu aspecto citoplasmático, tais como vesículas e vacúolos, bem como os núcleos e nucléolos. Diferentes planos de foco da mesma estrutura são observados para se obter uma imagem completa do saco embrionário presente no óvulo. Muita atenção deve ser dada quando está presente em um mesmo óvulo, mais de um saco embrionário, pois a sobreposição dessas estruturas pode dificultar a interpretação correta da imagem. Através da microscopia DIC, um grande número de amostras pode ser

analisado em relativamente pouco tempo e se definir quais tipos de sacos embrionários estão presentes naquela planta e conseqüentemente, inferir sobre qual mecanismo de reprodução pode estar presente nelas (Dusi & Willemse, 1999, Araujo et al., 2000, Alves et al., 2001, Araújo et al., 2005). Entretanto, muitas vezes, a observação dos eventos de megasporogênese e megagametogênese é necessária para se definir a origem do saco embrionário e logo, o tipo de saco embrionário observado na maturidade.

Outro tipo de análise que pode auxiliar é a observação de secções semifinas e coradas na microscopia de luz em campo claro (2). Essas secções são obtidas a partir de ovários fixados, desidratados e incluídos em resinas parafina ou acrílicas (Cunha & Araujo, 1999, Dusi & Willemse, 1999, Araujo et al., 2000, Alves et al., 2001, Araújo et al., 2005). Entretanto, essa técnica é mais laboriosa e dispendiosa do que o clareamento e depende de equipamento de seccionamento-micrótomo. Mas por outro lado, a resolução da imagem obtida através da menor espessura da amostra é maior e a associação com colorações, podem trazer informações mais detalhadas a respeito das células que compõem o saco embrionário.

PROTÓCOLOS

(1) – Metodologia para análise de ovários clareados em microscopia DIC

Reagentes

Formol, ácido acético glacial, etanol, água destilada, bateria etanólica 70%, 80%, 90%, 95% e etanol absoluto, xilol, metilsalicilato.

Instrumental

Microscópio estereoscópico, microscópio de luz com DIC, frascos de vidro ou tubos Eppendorfs para acondicionar amostras (não pode ser sensível ao xilol ou metilsalicilato), capela, pinças finas (de relojoeiro ou nº 5), bisturi, estilete de

ponta fina, pipetas de vidro ou descartáveis, placas de Petri de vidro para dissecação, lâminas com concavidades, lamínulas.

Soluções

FAA: formol: ácido acético: etanol: água destilada (1:1: 18:80, v/v)

Bateria de etanol: 70% - 30 ml de água destilada + 70ml de etanol absoluto

80% - 20 ml de água destilada + 80ml de etanol absoluto

85% - 15 ml de água destilada + 85ml de etanol absoluto

90% - 10 ml de água destilada + 90ml de etanol absoluto

Material biológico

A espiguetta de *B. brizantha* contendo flores em estágios mais avançados do desenvolvimento do óvulo são encontradas 1-2 dias antes da antese ou na sua maturidade, na manhã do dia da antese. A espiguetta possui duas flores: a superior contendo pistilo e anteras e a inferior na sua maioria, masculina, mas algumas podendo ser completas (Araujo & Falcão, 2003a). A inflorescência deve ser destacada do racemo e as duas flores separadas sob o microscópio estereoscópico. Na presença de solução de fixação, isola-se o pistilo em uma placa de Petri de vidro. Para isso, faz-se um pico na base da flor, pois esse procedimento auxilia na retirada da lema e palea da flor facilitando o isolamento do pistilo. Os estigmas devem ser cortados bem na base para evitar a liberação de corantes na solução de fixação.

Fixação

Pistilos isolados devem ser imediatamente fixados em solução de FAA por 24 h à 4°C (balde com gelo, geladeira ou em câmara fria). Eventualmente se faz necessário um pequeno corte na base do ovário para facilitar a penetração da solução de fixação. O volume da solução de fixação deve exceder o volume da amostra em pelo menos 10X. Sugere-se que após a primeira hora de fixação, a solução de fixação seja trocada por uma nova. As amostras podem ser armazenadas em etanol 70% à 4°C até o momento de utilização.

Atenção: ao identificar o conteúdo, utilize lápis ou caneta permanente recoberta com fita adesiva, pois o etanol desmancha marcas de caneta ordinárias.

Desidratação

Os ovários são gradualmente desidratados em uma bateria crescente de etanol, a partir de etanol 70%, seguido de 80, 90, 95 e 100% por 30 a 60 min em cada solução.

Clareamento

Após a desidratação, os ovários são imersos por 1h ou mais em xilol puro e o frasco mantido em capela com ventilação. Para o clareamento, utiliza-se solução de xilol: metisalicitato em proporções crescentes de metilsalicilato até que este esteja puro. Esses banhos devem ser de pelo menos 2h em cada solução. Isso se faz através da adição de metilsalicilato ao frasco contendo as amostras imersas em xilol. A primeira solução deve ficar com na proporção (v/v) aproximada de 3:1 de xilol: metisalicitato, seguida de 1:1 e de 1:3. É importante que o frasco permaneça aberto durante esse procedimento para que o xilol evapore e o metilsalicilato não impregne o laboratório. Portanto, é essencial deixar as amostras em uma capela bem ventilada. Por último, troca-se a mistura do frasco por metilsalicilato puro, dois banhos.

Montagem de lâminas e observação

Os ovários clarificados são montados em lâminas de vidro contendo concavidades utilizando o metilsalicilato como meio. Após a observação, pode-se retornar com as amostras para o frasco fechado, em ambiente aberto, por tempo indeterminado (não coloque em geladeira ou qualquer outro ambiente fechado).

As observações devem ser feitas em microscópio DIC, buscando o compromisso entre iluminação, resolução para formação de uma imagem nítida e informativa e evitando sombras. Lembre-se que com DIC, é necessário trabalhar com planos de focos diferentes, ou seja, a utilização do micrometro é fundamental. Sugere-se que uma primeira análise seja feita com uma ocular de

pequeno aumento (10 ou 20X) para se ter noção de todo o objeto de estudo. A imagem DIC traz informações de contorno e de relevo, onde núcleos, nucléolos, vesículas ficam côncavos ou convexos.

Fotodocumentação

Fotomicrografias podem ser obtidas com filme 35mm, câmera fotográfica digital e melhor ainda, com sistema de digitalização de imagens. No caso de filme 35 mm, recomenda-se a utilização de preto e branco, com menor ASA. No caso de se ter somente colorido, não esquecer de utilizar filtro azul. Recomenda-se sempre uma foto inicial utilizando uma objetiva de pequeno aumento que permita fotografar toda a amostra, ou grande parte dela, mostrando a organização macro. Posteriormente, fotografa-se a amostra em detalhe, como células e núcleos em maior aumento. Verifique sempre se há sombras ou feixes de luz, que interferem na imagem fotografada. Não esqueça de anotar a objetiva utilizada e qualquer fator de correção do microscópio, para que ao final possa ser calculado o tamanho da amostra baseado no tamanho da imagem micrografada (objetiva x fator de correção x ampliação da imagem no papel).

Atenção: As concavidades da lâmina permitem a montagem sem que haja esmagamento das amostras. Mas no caso de não possuir lâminas com concavidades, monte sobre uma lâmina, duas lamínulas separadas entre si. Coloque as amostras no espaço entre as lamínulas e monte a lâmina normalmente.

Cuidados: O metilsalicilato é um agente corrosivo, portanto as amostras devem ser armazenadas em local aberto, com ventilação e proceda a imediata limpeza do microscópio após o uso.

(2) - Metodologia para análise de secções de ovários em microscopia de campo claro

Reagentes

Formol, ácido acético glacial, etanol, água destilada, bateria etanólica a 70%, 80%, 90%, 95% e etanol absoluto, resina plástica JB4 ® (Polysciences), corante azul de metileno e fucsina básica ou outros.

Instrumental

Microscópio estereoscópico, microscópio com campo claro, frascos de vidro ou tubos Eppendorfs para acondicionar as amostras, capela, pinças finas (de relojoeiro ou nº 5), bisturi, estilete de ponta fina, pipetas de vidro ou descartáveis, placas de Petri de vidro para dissecação, formas de silicone para inclusão, estufa a 65°C, micrótomo e navalhas de aço ou ultramicrótomo e navalhas de vidro, lâminas, lamínulas.

Soluções

FAA: formol: ácido acético: etanol: água destilada, 1:1: 18:80, (v/v)

Bateria de etanol: 70% - 30 ml de água destilada + 70ml de etanol absoluto

80% - 20 ml de água destilada + 80ml de etanol absoluto

85% - 15 ml de água destilada + 85ml de etanol absoluto

90% - 10 ml de água destilada + 90ml de etanol absoluto

Solução de infiltração da resina: 3 partes de etanol 100% : 1 parte de resina sem catalisador (A + B)

1 parte de etanol 100% : 1 parte de resina sem catalisador

1 parte de etanol 100% : 3 partes de resina sem catalisador

resina sem catalisador

Solução de inclusão: resina (A + B) + catalisador

Material biológico

A espiguetta de *B. brizantha* contendo flores em estágios mais avançados do desenvolvimento do óvulo são encontradas 1-2 dias antes da antese ou na sua maturidade, na manhã do dia da antese. A espiguetta possui duas flores: a superior contendo pistilo e anteras e a inferior na sua maioria, masculina, mas algumas podendo ser completas (Araujo & Falcão, 2003a). A inflorescência deve ser destacada do racemo e as duas flores separadas sob o microscópio estereoscópico. Na presença de solução de fixação, isola-se o pistilo em uma placa de Petri de vidro. Para isso, faz-se um pico na base da flor, pois esse procedimento auxilia na retirada da lema e palea da flor facilitando o isolamento do pistilo. Os estigmas devem ser cortados bem na base para evitar a liberação de corantes na solução de fixação.

Fixação

Pistilos isolados devem ser imediatamente fixados em solução de FAA por 24 h à 4°C (balde com gelo, geladeira ou em câmara fria). Eventualmente se faz necessário um pequeno corte na base do ovário para facilitar a penetração da solução de fixação. O volume da solução de fixação deve exceder o volume da amostra em pelo menos 10X. Sugere-se que após a primeira hora de fixação, a solução de fixação seja trocada por uma nova. As amostras podem ser armazenadas em etanol 70% à 4°C até o momento de utilização.

Atenção: ao identificar o conteúdo, utilize lápis ou caneta permanente recoberta com fita adesiva, pois o etanol desmancha marcas de caneta ordinárias.

Desidratação

Os ovários são gradualmente desidratados em uma bateria crescente de etanol, a partir de etanol 70%, seguido de 80, 90, 95 e 100%, sendo que as amostras devem ficar entre 30 e 60 min em cada solução. Essa etapa deve ser realizada à 4°C (balde com gelo, geladeira ou em câmara fria).

Infiltração

Após a desidratação, os ovários são imersos por 2h em cada solução de infiltração à 4°C (3:1 etanol 100%: resina, 1:1 e 1:3). Recomenda-se que as amostras fiquem agitação ao longo da infiltração. Organize-se para que a etapa de infiltração com a resina pura ocorra ao longo da noite.

Inclusão das amostras

Os ovários são incluídos em cápsulas com tampa (tipo Beem ou de gelatina) para que não haja contato com o ar e a polimerização ocorra uniformemente. Deve-se orientar a amostra de forma a permitir que o seccionamento seja na orientação desejada. A polimerização se dá por 24-48h à 4°C. Após a polimerização, retire a cápsula e mantenha as inclusões livres de umidade (em um vidro com sílica gel).

Cuidados: Utilize luvas para manusear a resina, principalmente no momento de inclusão, pois esta é tóxica.

Obtenção e coloração de secções

A inclusão deve ser presa ao suporte do micrótomo, bastante firmemente. Pode-se fazer uma trimagem preliminar, de forma a retirar o excesso de resina no entorno da amostra com a ajuda de uma lâmina (Gillete). As secções devem ter entre 2-4 µm de espessura. Cada secção é recolhida individualmente com o auxílio de um palito de dentes ou um pelo na ponta do palito (fio de sobrancelha tratado em acetona colado com parafina), e colocada sobre uma gota de água destilada sobre uma lâmina. Aproximadamente três secções devem ser colocadas em cada gota e na mesma lâmina, até oito gotas podem ser espalhadas em duas linhas ao longo da lâmina. Após a coleta de secções, aquece-se a lâmina numa chama ou placa aquecedora, lentamente, de forma a esticar as secções e fazê-las aderir a lâmina. As secções podem ser coradas com azul de metileno e fucsina básica ou qualquer outro corante em solução aquosa

ou etanólica. Para a coloração ideal, faça testes com diferentes tempos em poucos cortes. Normalmente, boa coloração é obtida em um minuto.

Referências bibliográficas

ALVES, E.R. **Aspectos da Reprodução em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. 2000. 294 p. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Brasília.

ALVES, E.R.; CARNEIRO, V.T.C.; ARAUJO, A.C.G. Direct evidence of pseudogamy in an apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, v.14, p. 207-212, 2001.

ARAUJO A.C.G.; MUKHAMBETZHANOV, S.; POZZOBON M.T.; SANTANA E.F.; CARNEIRO, V.T.C. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales - Le Botaniste**, Tome XXIII, p. 13-28, 2000.

ARAUJO, A.C.G.; FALCÃO, R. Observação de múltiplos sacos embrionários em ovário de plantas do acesso sexual de *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Comunicado Técnico**, 82. Brasília: Embrapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia. 5p. 2003a.

ARAUJO, A.C.G.; FALCÃO, R. Observação de múltiplos sacos embrionários em ovário de plantas do acesso sexual de *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 40. Brasília: Embrapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia. 16p. 2003b.

ARAUJO, A.C.G.; FALCÃO, R., SIMÕES, K.C.R., CARNEIRO, V.T.C. Identificação de acessos de *Brachiaria* com interesse ao estudo da apomixia facultativa). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 74. Brasília: Embrapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia. 29p. 2004

ARAUJO, A.C.G.; NÓBREGA, J.M., POZZOBON, M. T., CARNEIRO, V.T.C. Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, v. 144, p. 39-50, 2005.

ASKER S.E.; JERLING L. **Apomixis in Plants**. Florida, EUA. CRC Press, Inc. Boca Raton, 1992. 298p.

BICKNELL, R.; KOLTUNOW, A.M. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. **Plant Cell**, v. 16, p. S228-S245, 2004.

BONILHA, J.R. & QUARIN, C.L. Diplosporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum minus*. **Plant Science**, v.127, p.97-104, 1997.

CARNAHAN H.L., HILL H.D. Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. **American Journal of Botany**, v.54, p. 253-253, 1958.

CHAUDHURY A.M.; LUO M.; MILLER C.; CARIG S.; DENNIS E.S.; PEACOCK, W.J. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings National Academy Science USA**, vol. 94, p.4223-4228, 1997.

CHAUDHURY A.M.; KOLTUNOW A.; PAYNE T.; LUO M.; TUCKER M.T.; DENNIS E.S.; PEACOCK W.J. Control of early seed development. **Annual Review Cell Developmental Biology**, v.17, p.677-699, 2001.

CUNHA A.M.C.; CARNEIRO V.T.C.; ARAUJO A.C.G. Análise do gametófito feminino de *Brachiaria brizantha* através de secções de ovários incluídos em resina Spurr. **Boletim de Pesquisa 2**, Brasília, Embrapa, 1998. 27p.

DUSI, D.A., ARAUJO, A.C.G., CARNEIRO, V.T.C. Apomixia: reprodução assexual nas angiospermas. In: **UNIVERSA**, Brasília, v, 8, p.133-148, 2000.

DUSI, D.A.A., WILLEMSE M.T.M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: Gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Biologica Cracoviense Society Botany**, 41:151-162, 1999.

GUERIN, J.; ROSSEL J. B., A. KOLTUNOW. A DEFICIENS homologue is down-regulated during apomictic initiation in ovules of Hieracium. **Planta**, v. 210, p. 914-920, 2000.

GROSSNIKLAUS U.; VIELLE-CALZADA J.P.; HOEPNER M.A.; GAGLIANO, W.B. Maternal control of embryogenesis by medea, a Polycomb group gene in *Arabidopsis*. **Science**, v.280, p. 446-50,1998.

JOHRI, B.M., SRIVASTAVA, P.S., SINGH, N. Reproductive biology of angiosperms. In: B.M. JOHRI & P.S. SRIVASTAVA (Org). **Reproductive Biology of Plants**. Berlin Heidelberg:Springer-Verlag, 2001. p. 237 – 272.

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

KOLTUNOW, AM. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiology**, v.108, p.1345-1352, 1995.

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

LAKSHMANAN, K.K.; AMBEGAOKAR, K.B. Polyembryony. In: JOHRI, B.M. (Org). **Embryology of Angiosperms**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1984. p. 445-474.

LEBLANC, O.; BERTHAUD, J. Apomixis expression in polyhaploids from mayze x *Tripsacum* hybrids. **Apomixis NewsLetter**, v.7, p. 26-27,1994.

LEBLANC, O.; ARMSTEAD, I.; PESSINO S.; ORTIZ, J.P.A.; EVANS, C.; VALLE, C.B. DO; HAYWARD, M.D. Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualize gene expression in mature ovaries of *Brachiaria* hybrids derived from B.

brizantha, an apomictic tropical forage. **Plant Science**, v. 126, n.1, p.49-58, 1997.

LUTTS S.; NDIKUMANA J.; LOUANT, B-P. Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F1 hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. **Euphytica**, v. 78, p. 19-25, 1994.

McCORMICK, S. Male gametophyte development. *The Plant Cell*, v.5, p. 1265-1275, 1993.

MAUSETH, J.D. Flowers and Reproduction. In SAUNDERS COLLEGE PUBLISHING (Org). **Botany: An Introduction to Plant Biology**. EUA, 1995. p. 228-260.

NGENDAHOYO, M. **Mecanismos de la reproducción dans le genre *Brachiaria* Gris. et strategies d'amélioration et de selection**. Louvain, 1988. 165p. Tese de doutorado da Faculdade des Sciences Agronomiques, Laboratoire de Phytotechnie Tropicale et Subtropicale de la Université Catholique de Louvain em 1988.

NOGLER, G.A. Gametophytic apomixis. In JOHRI, B.M., ed. **Embryology of Angiosperms**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 1984. p. 475-518.

OHAD, N.; YADEGARI, R.; MARGOSSIAN, L.; HANNON M.; MICHAELI, D.; HARADA, J.J., GOLDBERG, R.B.; FISCHER RL. Mutations in FIE, a WD Polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. **Plant Cell** v. 11, p. 407-15, 1999.

OZIAS-AKINS, P.; LUBBERS, E. L. Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum* : co-inheritance of the trait and molecular markers. **Theoretical Applied Genetics**, v. 85, p. 632-638, 1993.

PENTEADO, M.I. de O.; SANTOS, A.C.M. dos; RODRIGUES, J.F.; VALLE, C.B. do, SEIXAS, M.A.C.; ESTEVES, A. Determinação de ploidia e quantidade de DNA em diferentes espécies do gênero *Brachiaria*. Campo Grande Embrapa-CNPQC. **Boletim de Pesquisa**, v. 3, p. 11-31, 2000.

PESSINO, S. C.; ORTIZ, J.P.A.; LEBLANC, O.; VALLE, C. B. DO; EVANS, C.; HAYWARD, M.D. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.439-444, 1997.

PESSINO, S.C.; EVANS, C.; ORTIZ, J.P.A.; ARMSTEAD, I.; VALLE C. B. DO; HAYWARD, M.D. A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of the two markers closely associated with the trait. **Hereditas**, v.128, p.153-158, 1998.

PINHEIRO, A. A.; POZZOBON, M. T.; VALLE, C.B. DO; PENTEADO, M.I.O.; CARNEIRO, V.T.C. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants, using colchicine. **Plant Cell Reports**, v.19, p.274-278, 2000.

POZZOBON, M.T., ARAUJO, A.C.G. Método de clareamento de óvulos de *Paspalum* e *Brachiaria*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Brasília: Embrapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia 12. 1998.

QUARIN, C.L.; ESPINOZA, F.; MARTINEZ, E. J.; PESSINO, S.C.; BOVO, O. A. A RISE OF PLOIDY LEVEL INDUCES THE EXPRESSION OF APOMIXIS IN *PASPALUM NOTATUM*. **SEXUAL PLANT REPRODUCTION**, V.13, P.243-249, 2001.

REISER L., FISCHER, R.L. The ovule and the embryo sac. **Plant Cell**, v. 5, p. 1291-1301, 1993.

RENVOIZE S.A., CLAYTON W.D.& KABUYE C.H.S. Morphology, Taxonomy and Natural Distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J.W., MAASS. B.L. & VALLE, C.B.DO (eds). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. CIAT Publication Nº 259. 1996. pp-16-42.

RODRIGUES, J.C.M.; CABRAL, G.B.; DUSI, D.M.A.; MELLO, L.V.; RIGDEN, D.; CARNEIRO, V. T. C. Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. **Plant Molecular Biology**, v.53, p.745-757, 2003.

SANTOS FILHO, L.F. Seed Production: perspective from the Brazilian Private Sector. In MILES, J.W., MAASS. B.L. E VALLE, C.B.DO (Org). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. CIAT Publication nº 259, 1996, p: 141-146.

SAVIDAN Y. Apomixis: Genetics and Breeding. In: JANICK J. (ed.). **Plant Breeding Reviews**, v.18, p.13-86, 2000.

SILVEIRA, D.AE., RODRIGUES, J.C.M., CABRAL, G.B., LEITE, J.A., COSTA, S.S., CARNEIRO, V.T.C. Evaluation of exogenous promoters for use in *Brachiaria brizantha* transformation. **Journal Plant Biotechnology**, vol 5, p.87-93.

TUCKER, M.R.; ARAUJO, A.C.G.; PAECH, N.; HECHT, V.; SCHMIDT, E.D.L.; ROSSEL, J.-B.; VRIES S.C. de ; KOLTUNOW, A.M.G. Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. **Plant Cell**, v.15, p.1524-1537, 2003.

VALLE, C.B. do. Cytology, mode of reproduction and forage quality of selected species of *Brachiaria* Griseb.

VALLE C.B. do. Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético. Campo Grande. Embrapa - CNPQC. **Documentos** 46. Campo Grande, MS, Brasil. 1990.

VALLE C.B. do, GLIENKE C. New sexual accessions in *Brachiaria*. **Apomixis Newsletter**, v. 3, p.11-13, 1991.

VALLE C.B. do, SAVIDAN Y. Genetics, Cytogenetics, and Reproductive Biology of *Brachiaria*. In: MILES, J.W., MAASS, B.L. E VALLE, C.B.DO (eds). ***Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement***. Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. CIAT Publication N° 259. 1996. pp-147-163.

VIELLE-CALZADA, J.P.; MOORE, J. M.; GAGLIANO, W. B.; GROSSNIKLAUS, U. Altering Sexual Development in *Arabidopsis*. **Journal Plant Biology**, v.41, p.73-81, 1998.

WILLEMSE, M.T.M, VAN WENT, J.L. The female gametophyte. In: JOHRI, B.M., ed. **Embryology of Angiosperms**. Berlin, Heidelber: Springer-Verlag, 1984. p.159-191.

POLIPLOIDIA E EVOLUÇÃO EM PLANTAS

Schifino-Wittmann, M.T. ⁵

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Neste capítulo, que corresponde à palestra com o mesmo título apresentada no 2º Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genéticos Vegetais, tem-se por objetivo discorrer sobre alguns tópicos relacionados à poliploidia em plantas, com ênfase na sua importância evolutiva. Além de discussão da definição de poliploidia, dos tipos de poliplóides, características dos poliplóides naturais e paleopoliploidia, será apresentada uma comparação dos conhecimentos clássicos em relação ao assunto e aqueles obtidos nos últimos anos, com ênfase nas mudanças cromossômicas e genômicas que acompanham o processo de poliploidização.

Este texto foi preparado através de consulta a diversos trabalhos científicos, dos quais apenas alguns são aqui citados mas podem ser encontrados na lista de referências de Schifino-Wittmann (2004).

A bibliografia sobre o assunto é imensa, e não faltará material de leitura aos interessados. Entre os vários trabalhos gerais ou de revisão sobre o assunto são recomendados os seguintes: Stebbins (1971), Lewis (1980), Leitch e Bennet (1997), Ramsey e Schemske (1998, 2002), Soltis e Soltis (1999), Otto e Whitton (2000), Wendel (2000), Wolfe (2001), Osborn et al. (2003), Bennet (2004), Schifino-Wittmann (2004). Para um detalhamento de artigos abordando tópicos específicos, recomenda-se consultar o volume 32 (2004) do *Biological Journal of the Linnean Society*, baseado nos trabalhos apresentados na *International Polyploid Conference* de 2003.

⁵ Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. mtschif@ufrgs.br

INTRODUÇÃO

A poliploidia e sua importância na evolução das plantas é um dos temas mais fascinantes da genética vegetal, e tem sido estudada, com diversos tipos de abordagens, há várias décadas. É impossível falar-se em poliploidia em plantas sem associar este assunto ao nome de G.L. Stebbins (1904-2000), que foi, sem dúvida, um dos maiores estudiosos de genética e evolução em plantas. Entre diversas de suas obras, uma delas, "Chromosomal evolution in higher plants" (1971) chama a atenção pela ênfase dada ao estudo dos poliplóides.

É bastante conhecida a ampla variação que existe no número cromossômico entre diversas espécies vegetais. As pteridófitas caracterizam-se, de modo geral, por apresentarem os mais altos números cromossômicos conhecidos, destacando-se *Ophioglossum reticulatum*, com $2n=1260$ cromossomos. Entre as angiospermas, o menor número cromossômico conhecido é $2n=4$ que ocorre, por exemplo, em *Haplopappus gracilis*, e o maior de $2n=640$ em *Sedum suaveolens*.

Da mesma forma, a quantidade de DNA nuclear também apresenta uma ampla variação entre as plantas (não necessariamente paralela ao número cromossômico, já que o tamanho dos cromossomos também varia), desde 0,2 pg em *Arabidopsis thaliana* a até 127,4 pg em *Fritillaria assyriaca*. A amplitude de variação do tamanho cromossômico também é imensa, desde os cromossomos somáticos de *Fritillaria* spp. que podem ter até mais de 20 μm até aqueles de *Leucaena* spp. (em torno de 1 μm) ou de *Maytenus ilicifolia* (menores que 0,5 μm).

Essa enorme variação em número e tamanho cromossômico, e, principalmente, na quantidade de DNA nuclear em organismos que possuem níveis equivalentes de complexidade, levou à definição do termo paradoxo-C, que refere-se às diferenças observadas na quantidade de DNA não ligadas a diferenças na funcionalidade ou grau de organização. Sabe-se que esse DNA "em excesso" é principalmente composto por heterocromatina, DNA repetitivo, DNA espaçador, regulatório etc.. e a sua existência e manutenção nos genomas dos diferentes organismos tem diversos tipos de explicação, desde DNA-"lixo"

(junk-DNA), DNA de manutenção (house-keeping DNA) ou a um possível valor seletivo na história pregressa do organismo. Com o progresso da genética molecular e o seqüenciamento dos genomas novas informações vem sendo geradas. Aparentemente, o número de genes “necessários” seria semelhante em organismos com graus equivalentes de organização, e o restante do DNA estaria relacionado a outras funções, como as mencionadas acima, ou outras ainda desconhecidas e/ou não compreendidas. Certamente apenas conhecemos a “ponta do iceberg” em relação a isto, e informações fascinantes deverão ser obtidas nos próximos anos.

DEFINIÇÃO DE POLIPLÓIDIA

A definição básica de poliplóidia é a existência, em um mesmo núcleo celular, de mais de dois genomas. Portanto, pode haver células poliplóides dentro de um tecido (por exemplo, não é raro encontrar-se células poliplóides em raízes, na região em que o meristema radicular começa a diferenciar-se para dar origem ao tecido condutor), tecidos poliplóides dentro de um mesmo indivíduo (ex: suspensor em algumas plantas) ou indivíduos poliplóides dentro de uma mesma espécie (ex: as chamadas “raças poliplóides”). Em geral a poliplóidia implica em aumento do tamanho celular e, conseqüentemente, em outras estruturas como os grãos de pólen (ex: as células dos estômatos e os grãos de pólen em indivíduos poliplóides de *Anthriscum majus* são maiores- praticamente o dobro- do que em indivíduos diplóides). Muito comum é a ocorrência, em um mesmo gênero, de espécies diplóides e poliplóides, como, por exemplo, nos gêneros *Brassica*, *Paspalum*, *Vicia*, *Triticum*, entre muitos outros.

QUANTAS ESPÉCIES POLIPLÓIDES EXISTEM?

Esta é uma pergunta cuja resposta ainda não é clara, tanto por as estimativas variarem entre diferentes autores como pelo reconhecimento de que muitas espécies consideradas diplóides são, na verdade, poliplóides antigos. Um das estimativas mais citadas é a de Stebbins (1971), que considera que entre 30-35% das angiospermas seriam poliplóides. Cerca de 43% das dicotiledôneas

seriam poliplóides, com representantes principalmente nas famílias Rosaceae, Rubiaceae e Compositae, enquanto que 58% das monocotiledôneas seriam poliplóides, principalmente nas famílias Iridaceae e Gramineae. Uma estimativa mais atual (Leitch e Bennet, 1997) é de que 95% das pteridófitas e 80% das angiospermas seriam poliplóides ou de origem poliplóide (paleopoliplóides).

A poliploidia é muito rara nas gimnospermas, praticamente predominante entre as pteridófitas e altamente variável entre as famílias de angiospermas. É amplamente reconhecido que a poliploidia foi extremamente importante na evolução das plantas, sendo provavelmente a alteração citogenética mais importante na especiação e evolução dos vegetais. A combinação de hibridação seguida de poliploidização foi importantíssima na evolução de muitas plantas, já que restaura (ao menos cromossomicamente) a fertilidade dos híbridos interespecíficos. Hibridação seguida de poliploidização é uma ferramenta muito utilizada no melhoramento genético de plantas cultivadas.

O entendimento sobre a origem e evolução dos poliplóides (além da manipulação da poliploidia) é de grande importância não só para o conhecimento científico, mas assume também uma dimensão especial quando se considera que muitas das plantas cultivadas são poliplóides, como por exemplo o trigo de pão (*Triticum aestivum*, um hexaplóide com $2n=6x=42$) e a alfafa (*Medicago sativa*, um tetraplóide com $2n=4x=32$), além do algodão (*Gossypium hirsutum*), batata (*Solanum tuberosum*), batata doce (*Ipomoea batatas*), café (*Coffea arabica*), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), fumo (*Nicotiana tabacum*), moranguinho (*Fragaria ananassa*), dentre muitas outras. Um exemplo interessante é nas espécies de *Brassica* cultivadas, em que as combinações entre três espécies diplóides (*B. oleracea* $2n=18$, *B. nigra* $2n=16$ e *B. campestris* $2n=20$) resultaram em três espécies poliplóides (*B. carinata* ($2n=34$), *B. napus* ($2n=38$) e *B. juncea* ($2n=36$)). A manipulação da poliploidia pelo homem vem sendo realizada desde os trabalhos de Karpechenco, em torno de 1928, com a *Raphanobrassica* (um híbrido poliplóide entre a couve, *Brassica oleracea*, e o rabanete, *Raphanus sativus*). O exemplo mais famoso de uma

espécie híbrida poliplóide criada pelo homem é o *Triticale*, resultado de cruzamentos e poliploidização entre trigo e centeio.

QUANDO UMA ESPÉCIE É CONSIDERADA POLIPLÓIDE?

Normalmente, uma determinada espécie é considerada poliplóide por comparações com o menor número cromossômico conhecido dentro do gênero, independente de seu valor absoluto. Por exemplo, dentro do gênero *Trifolium*, a espécie *T. riograndense* é diplóide, com $2n = 2x = 16$, enquanto que o *T. repens* (trevo branco) é considerada tetraplóide, com $2n = 4x = 32$, sendo o número básico $x = 8$ dentro do gênero. No gênero *Triticum*, as espécies com $2n = 14$, como o *Triticum monococcum*, são consideradas diplóides, enquanto o *T. turgidum* é um tetraplóide ($2n = 4x = 28$) e o *Triticum aestivum* um hexaplóide ($2n = 6x = 42$), sendo $x = 7$. Este tipo de classificação funciona bem, ou seja, deve refletir a realidade biológica e evolutiva, para grupos com número relativamente baixo de cromossomos na espécie considerada diplóide, ou seja, em que o número básico (x) é baixo. Entretanto, o que é considerado como diplóide ao nível genérico pode representar uma poliploidia antiga em níveis taxonômicos superiores. Por exemplo, dentro do gênero *Leucaena*, o menor número conhecido é $2n = 52$. Portanto, *L. trichandra* seria uma espécie diplóide ($2n = 2x = 52$) e *L. diversifolia* seria tetraplóide ($2n = 4x = 104$), e $x = 26$ para o gênero. Entretanto, comparando-se estes números cromossômicos com aqueles conhecidos na sub-família Mimosoideae, verifica-se que são bastante altos. Em Mimosoideae, $x = 13$ é o número básico proposto para toda a sub-família, portanto o gênero *Leucaena* não teria espécies realmente diplóides, mas sim apenas poliplóides. Portanto *L. trichandra* seria na realidade um tetraplóide ($2n = 4x = 52$) e *L. diversifolia* um octoplóide ($2n = 8x = 104$) e $x = 13$. Neste caso específico não se sabe se o gênero *Leucaena* evoluiu a partir de um ancestral já poliplóide, ou se as espécies diplóides do gênero não existem mais.

Portanto, muitas das espécies de plantas são, na realidade, poliplóides antigos, paleopoliplóides, que surgiram através de ciclos de poliploidização. A ocorrência ampla de poliploidia antiga nas plantas já era conhecida através de análises citogenética e de herança gênica e, atualmente vem sendo cada vez mais comprovada por um grande volume de dados moleculares (ex: ampla duplicação gênica). Por exemplo, o milho, com $2n=20$, era tradicionalmente considerado uma espécie diplóide. Hoje, sabe-se ser um alopoliplóide que sofreu um extensivo rearranjo cromossômico. Mesmo para as espécies consideradas diplóides de *Brassica* há uma série de indícios sugerindo origem poliplóide, com genomas muito reorganizados, fusões e rearranjos cromossômicos freqüentes. Com o aumento do volume de informações, também vem aumentando o número de comprovações de poliploidia antiga. Também há evidências de origem poliplóide nos animais, inclusive na linhagem dos vertebrados. Um aspecto importante é que as comparações e decisão sobre natureza diplóide ou poliplóide devem ser feitas a partir de um determinado ponto na escala evolutiva, caso contrário essa argumentação será desprovida de sentido, pois quanto mais de recua na escala evolutiva mais se chegará a organismos com menor quantidade de DNA e menor número cromossômico, chegando-se, finalmente, à conclusão de que todos os organismos vivos surgiram por poliploidia e duplicações gênicas.

TIPOS DE POLIPLÓIDES

A classificação tradicional diferencia os autopoliplóides, originados pela duplicação de um mesmo genoma ($AA \rightarrow AAAA$), dos alopoliplóides originados pela duplicação de genomas diferentes, normalmente após um evento de hibridação ($AA \times BB \rightarrow AB \rightarrow AABB$). No autopoliplóide, por haver cópias iguais de um mesmo genoma, espera-se aumento do pareamento cromossômico em multivalentes e herança polissômica, enquanto que no alopoliplóide, a existência de genomas diferentes levaria à formação de apenas bivalentes intragenômicos e herança dissômica. Na natureza sem sempre é possível distinguir claramente entre auto e alopoliplóides, e há uma ampla gama de tipos intermediários, que seriam os poliplóides segmentares, ou seja, aqueles originados pela duplicação

dos genomas de espécies próximas o suficiente para apresentarem certa homologia cromossômica. Estes intermediários apresentariam um comportamento cromossômico e padrões de herança intermediários entre autopoliplóides e alopoliplóides “verdadeiros” (ou genômicos). É bastante claro, que quanto mais próximas as espécies, maior probabilidade de sucesso na formação de um híbrido, portanto, provavelmente a maior parte dos alopoliplóides são, na verdade, do tipo segmentar. Apesar da dificuldade em definir claramente as categorias de poliplóides, esta classificação é útil em estudos evolutivos. Em geral, aceita-se, mas não sem contestação, que os alopoliplóides (no sentido amplo) seriam mais comuns na natureza do que os autopoliplóides e, conseqüentemente, a alopoliploidia teria desempenhado um papel muito mais importante na evolução e especiação do que a autopoliploidia. Entretanto, trabalhos recentes (ver Ramsey e Schemske, 2002) que a freqüência de formação dos autopoliplóides pode ser muito alta. Não se deve esquecer que para um poliplóide ser bem sucedido precisa passar pelas fases de formação, estabelecimento e sobrevivência, além de apresentar características vantajosas que permitam sua manutenção e expansão.

Os modos de identificação do tipo de poliplóide natural, com base no pareamento cromossômico e tipo de herança podem ser bastante falhos. Como será mencionado mais adiante, durante a evolução há uma tendência à diploidização, ou seja, ao funcionamento do poliplóide, tanto auto como alo, como se fosse um diplóide, tanto no pareamento cromossômico como na herança. Além disso, especialmente no caso de espécies poliplóides que se reproduzem por apomixia ou propagação vegetativa predominante, pode haver um “relaxamento” da seleção para regularidade meiótica.

CARACTERÍSTICAS DOS POLIPLÓIDES

Os poliplóides em geral são bons colonizadores, podendo ocupar habitats pioneiros nos quais os ancestrais diplóides não são bem sucedidos, e apresentam uma distribuição geográfica mais ampla do que seus progenitores diplóides. Vários exemplos demonstrativos, com mapas de distribuição de

poliplóides e parentes diplóides constam no livro de Stebbins (1971), como nos gêneros *Clarkia*, *Aegilops*, *Zauschneria*, entre outros. Apresentam também um efeito tamponante maior em relação à capacidade de adaptação, já que, por apresentarem mais cópias genômicas (conseqüentemente gênicas) dos que os diplóides, podem acumular maior variabilidade encoberta. Em geral (mas nem sempre) são maiores e mais robustos, apresentando células, órgãos e estruturas maiores do que seus parentes diplóides; eventualmente essas diferenças podem ser minimizadas durante o processo evolutivo. Taxonomicamente os poliplóides podem ser um problema de difícil resolução. Seriam citótipos de nível de ploidia diferente, raças cromossômicas de uma mesma espécie ou, de acordo com o conceito biológico de espécie, seriam espécies diferentes, já que não haveria fluxo gênico entre as diferentes formas? Além disto, a associação comum de apomixia e poliploidia pode levar à formação de complexos agâmicos, muitas vezes com populações morfologicamente diferentes, dificultando bastante o trabalho dos taxonomistas.

ORIGEM DOS POLIPLÓIDES NATURAIS

Setores poliplóides, como ramos, brotos etc, surgem normalmente por duplicação cromossômica nas células meristemáticas. Entretanto, apesar de potencialmente haver a possibilidade de surgimento de indivíduos poliplóides por duplicação somática (por exemplo, durante as primeiras mitoses do embrião), as evidências existentes indicam que, se houve surgimento de espécies poliplóides por duplicação somática, estas são muito raras. É amplamente aceito, e já há bastante tempo (havendo um grande volume de evidências circunstanciais), que os poliplóides, tanto os auto como os alopoliplóides, surgiram pela união de gametas não reduzidos. Gametas não reduzidos (também chamados gametas $2n$ ou gametas com o número somático de cromossomos) surgem por uma falha na meiose: há uma restituição cromossômica, na primeira (FDR) ou na segunda (SDR) divisões meióticas, o que leva à formação de gametas com o número somático de cromossomos. Gametas não reduzidos ocorrem normalmente (mas em geral com freqüências abaixo de 1%, apesar de haver casos de produção

bem mais alta) em populações naturais de plantas. A união destes gametas leva à formação de indivíduos com nível de ploidia mais alto.

O QUE EXISTE DE NOVO EM RELAÇÃO À ORIGEM E EVOLUÇÃO DOS POLIPLÓIDES

A idéia tradicional era de que, após o evento de poliploidização, a população, ou espécie nova, teria se expandido e colonizado novos espaços. Entretanto, no que pode ser considerado uma “revolução” em relação à origem e evolução dos poliplóides, foi a demonstração de que muitas, senão a maioria, das espécies poliplóides conhecidas tiveram origens múltiplas, ou seja, que o evento de poliploidização ocorreu de forma recorrente, envolvendo ancestrais variados. Neste aspecto, um papel decisivo foi exercido por Soltis e Soltis, com base em informações já existentes e em seus trabalhos de pesquisa (ver Soltis e Soltis, 1999). A origem única dos poliplóides parece, portanto, ser a exceção e não a regra, podendo-se, portanto, falar "nas origens das espécies" poliplóides. Essas conclusões foram possíveis principalmente através de diversas análises moleculares que identificaram, em uma mesma espécie ou população poliplóide, a existência de diferentes haplótipos de DNA nuclear e de cloroplasto (cp DNA). Em *Tragopogon miscellus* e *T. mirus*, alopólíplóides que surgiram na região de Washington e Idaho em tempos históricos (cerca de 70 anos), há indícios de que a poliploidização ocorreu até 20 e 12 vezes, respectivamente, mesmo em um espaço geográfico restrito.. Em *Draba norvegica*, o número de vezes do surgimento do poliplóide seria 13 e em *Heuchera grossularifolia*, a autopólíplóide ocorreu pelo menos duas vezes, e potencialmente sete, durante a história evolutiva da espécie. A morfologia também pode variar entre diferentes populações poliplóides, de acordo com sua origem. O exemplo mais interessante de uma provável origem única é o alopólíplóide *Spartina anglica*, que surgiu em tempos históricos na costa da Grã-Bretanha. Nesta região ocorria, em ambientes salobros, uma espécie nativa, *S. maritima*, com $2n=60$ cromossomos. No início do século XIX uma espécie da América do Norte, *S. alterniflora*, com $2n=62$ cromossomos, foi introduzida na região, provavelmente

através de propágulos aderidos aos cascos de navios. Ocorreram cruzamentos entre as duas espécies, dando origem, por volta de 1870, a um híbrido estéril, *S. townsendii* ($2n = 61$). Por poliploidização deste híbrido surgiu, em torno de 1880, *S. anglica*, espécie fértil com $2n = 122$ cromossomos, que rapidamente expandiu-se suplantando, e quase extingüindo, a espécie nativa. Leitch e Bennet (1997) referem existir mais de 40 exemplos de origens múltiplas de alo e autopoliplóides em angiospermas, petridófitas e briófitas, mas, como para a maioria dos poliplóides, poucas populações foram estudadas, a extensão real dos casos de origem múltipla de poliplóides é desconhecida, mas certamente está subestimada.

Também foi comprovado que algumas populações poliplóides podem trocar genes entre si, e mesmo com populações diplóides, o que varia de caso a caso, gerando uma grande variabilidade. Populações poliplóides, portanto, podem ser não só um repositório de grande variabilidade genética como também um sistema dinâmico de fluxo gênico dentro e entre níveis de ploidia.

Outro aspecto interessante foi a “reabilitação” dos triplóides como importantes na evolução: atualmente é aceito que os triplóides podem, em muitos casos, terem servido de ponte entre os diferentes níveis de ploidia, já que podem formar certa percentagem de gametas viáveis. Estudos experimentais em, por exemplo, *Chamerion angustifolium*, demonstram que a presença e manutenção de triplóides nas populações auxiliam a fixação dos tetraplóides, por aumentar a taxa de formação destes últimos.

A diploidização, ou seja, a tendência de um poliplóide passar a funcionar cromossômica e geneticamente como um diplóide, já era conhecida há bastante tempo. O que existe hoje é um novo entendimento deste processo de diploidização, que envolve uma ampla reestruturação genômica, com alterações e mudanças ao nível gênico, incluindo evolução coordenada, silenciamento gênico, reestruturação cromossômica, ação de transposons, novos padrões de expressão gênica e mudanças epigenéticas. Entretanto, a base genética da diploidização, ou seja, o processo evolutivo pelo qual um genoma poliplóide se transforma em um diplóide ainda precisa ser desvendada. O número de trabalhos

experimentais sobre mudanças genômicas pós-poliplodização vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Aparentemente, ao menos em alguns casos com em *Triticum-Aegilops*, a regularização do pareamento cromossômico estaria associada à “poda” de segmentos cromossômicos que ocorreria pela perda de seqüências observada após a poliploidização. Também há sugestões de que a seleção contra configurações meióticas levando à formação de gametas não balanceados poderia levar à regularização do pareamento.

Uma consequência imediata da poliploidização é a duplicação gênica. Isto pode levar ao silenciamento, à divergência de funções ou aquisição de novas características, o que já era conhecido nos trabalhos clássicos com poliplóides. Atualmente busca-se entender o mecanismo molecular disto.

Outra descoberta recente é a extensão e rapidez da reorganização intra e intergenômica nos poliplóides. A visão tradicional aceitava que, num alopoliplóide, os genomas constituintes ficariam isolados um dos outro. Hoje, sabe-se que os diferentes genomas podem interagir e rearranjar-se entre si, o que vem sendo comprovado pelas técnicas de hibridização *in situ* (GISH e FISH). Por exemplo, 9 translocações intergenômicas foram detectadas em *Nicotiana* alotetraplóide, 5 em *Avena maroccana* (tetra) e cerca de 18 em *A. sativa* (hexa).

Os elementos transponíveis (transposons) que ocorrem amplamente nos genomas dos diferentes organismos, teriam um papel muito importante na evolução dos poliplóides, facilitando sua evolução rápida: por terem naturalmente cópias duplicadas dos genes, os poliplóides seriam beneficiados pela variabilidade proporcionada pela ação dos transposons e, ao mesmo tempo, estariam tamponados contra seus efeitos deletérios.

Muitos alopoliplóides naturais mostram uma extensa reorganização quando comparados com seus progenitores diplóides, e grandes mudanças genômicas são verificadas já em poucas gerações de alopoliplóides sintéticos, mas a extensão e a rapidez da reestruturação genômica pode variar de espécie para espécie. Em alopoliplóides do grupo *Aegilops-Triticum* as mudanças genômicas são muito rápidas, com eliminação de seqüências genômico-específicas já nas plantas F1, e eliminação de seqüências cromossomo-específicas a partir da

primeira geração de aloploplóides. Neste grupo não foi observada aditividade genômica, ou seja, a quantidade de DNA do poliplóide não corresponde à soma dos genomas paternos. Em *Brassica*, através da análise de poliplóides naturais e sintéticos, também, há evidência de mudança genômica rápida e ampla. Em aloploplóides artificiais de *Arabidopsis*, além de uma grande instabilidade fenotípica quanto à morfologia, época de florescimento e fertilidade, em comparação com diplóides cultivados no mesmo ambiente, ocorrem mudanças rápidas na regulação gênica, incluindo silenciamento, e outros mecanismos genéticos e epigenéticos. Em alotetraplóides, aloploplóides, seus progenitores e suas progênes de *Gossypium*, entretanto, foram observadas aditividade genômica e mínimas mudanças epigenéticas durante a formação dos aloploplóides. Esses dados contrastantes mostram que a evolução por poliploidia em plantas é acompanhada por diversos tipos de mecanismos, que podem variar entre diferentes grupos taxonômicos e com os genomas envolvidos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O volume de dados existentes sobre poliploidia e evolução em plantas, desde aqueles acumulados durante os trabalhos ditos “clássicos”, assim como aqueles gerados pelas abordagens moleculares, principalmente na última década e meia, mostra que a maioria das espécies poliplóides têm origens múltiplas e recorrentes, que muitas das espécies consideradas diplóides são, na verdade, resultado de ciclos anteriores de poliploidização, e que a evolução por poliploidia foi acompanhada por uma extensa reorganização em todos os níveis do genoma, incluindo evolução coordenada, repadronização cromossômica, silenciamento gênico, eliminação de seqüências, ação de elementos transponíveis, efeitos de dose gênica, invasão intergenômica e efeitos epigenéticos. Pontos especiais a serem aprofundados são, por exemplo, a exata base genética da diploidização, que transforma um poliplóide em um diplóide funcional, as diferenças entre diversos organismos quanto às mudanças que acompanham a poliploidia, a extensão real da ocorrência da paleopoliploidia, a freqüência de ocorrência e importância evolutiva de autoploplóides em relação aos aloploplóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENNET, M.D. Perspectives on polyploidy in plants – ancient and neo. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, p. 411-423. 2004.
- LEITCH, I.J., BENNET, M.D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, p. 470-476. 1997.
- LEWIS, W.H. **Polyploidy: biological relevance**. New York: Plenum. 1980. 583 p.
- OSBORN, T.C.; PIRES, J.C.; BIRCHLER, J.A. et al. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 19, p.141-147. 2003.
- OTTO, S.P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 34, p. 401-437. 2000.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 467-501. 1998.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 33, p. 589 -639. 2002.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v. 10, n. 2, p. 151-157.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford, v. 14, p. 348-352. 1999.
- STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Reading: Addison-Wesley, 1971. 216 p.
- WENDEL, J.F. Genome evolution in polyploids. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, p. 225-249. 2000.
- WOLFE, K.H. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. **Nature Reviews Genetics**, New York, v. 2, p. 333-341. 2001.

HIBRIDAÇÃO *IN SITU* E SUAS APLICAÇÕES NO ESTUDO E USO DOS RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Brasileiro-Vidal, A. C. ⁶

A hibridização *in situ* é uma técnica que permite o pareamento de seqüências de DNA e RNA a ácidos nucléicos localizados no interior das células (seqüência alvo). Para a detecção das seqüências hibridizadas, os fragmentos de DNA ou de RNA são marcados, funcionando como uma sonda. Assim, os híbridos sonda/alvo podem ser de DNA/DNA, DNA/RNA ou RNA/RNA. Atualmente, a marcação é feita utilizando os fluorocromos (moléculas que fluorescem quando excitadas por um comprimento de onda de luz ultravioleta específico), por isso, essa técnica tem sido denominada FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization).

No texto apresentado a seguir, será abordada apenas a hibridização de segmentos de DNA em DNA cromossomal. Serão apresentados o princípio geral da técnica e os principais tipos de sonda. Em seguida, serão discutidas as suas aplicações no estudo dos recursos genéticos bem como suas recentes modificações.

PRINCÍPIO GERAL DA TÉCNICA

O primeiro passo para uma hibridização bem sucedida é a obtenção de uma sonda bem marcada. A sonda é formada por fragmentos de DNA, com cerca de 100 a 300 pb, complementares ao DNA alvo. A marcação da sonda pode ser feita pela substituição de alguns de seus nucleotídeos por nucleotídeos idênticos conjugados a fluorocromos (marcação direta) ou a moléculas marcadoras, localizadas posteriormente utilizando anticorpos conjugados a fluorocromos (marcação indireta). As moléculas marcadoras mais usadas na

⁶ Laboratório de Citogenética Vegetal; Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE; brasileiro_vidal@hotmail.com

marcação indireta são a biotina e a digoxigenina, enquanto os fluorocromos mais utilizados para sinalizar a presença das sondas são o FITC (isotiocianato de fluoresceína), de cor verde, e a rodamina ou o vermelho Texas, ambos de cor vermelha.

A preparação das lâminas também é de grande importância e segue basicamente os mesmos procedimentos utilizados para outras técnicas, como o bandeamento C ou a coloração com fluorocromos (ver Guerra & Lopes, 2002). No caso da FISH, é recomendada uma escolha criteriosa das lâminas, devendo ser selecionadas apenas lâminas com bom número e qualidade de células (em geral metáfases). Células com pouco ou sem citoplasma apresentam, geralmente, uma melhor penetração das sondas. As lâminas selecionadas podem ser usadas no dia seguinte ou estocadas a -20°C , para posterior hibridização.

Uma vez obtidas a sonda marcada e as lâminas adequadas, o passo seguinte é a hibridização da sonda no cromossomo. Para isso, é necessário primeiramente desnaturar tanto a sonda em solução quanto o DNA cromossomal, o que é feito por aquecimento a temperaturas entre 70 e 80°C . Em seguida, é feita a renaturação, ou a hibridização *in situ* propriamente dita, na qual ocorre a associação da sonda com o DNA cromossomal. Nessa fase, as lâminas contendo a sonda em solução são mantidas a 37°C , por cerca de 18 a 36 horas. Após o processo de hibridização, as lâminas passam por uma série de banhos pós-hibridização. Estes têm a função de remover as seqüências incompletamente hibridizadas, resultantes de pareamentos inespecíficos entre a sonda e as seqüências do DNA cromossomal parcialmente similares ao DNA alvo.

Se a marcação foi feita com fluorocromos (método direto), os sítios hibridizados com a sonda podem ser visualizados no microscópio de fluorescência, logo após a renaturação. Por outro lado, se a marcação foi feita com biotina ou digoxigenina, será necessário utilizar moléculas reconhecedoras acopladas a fluorocromos (FITC ou rodamina). A biotina, por exemplo, pode ser reconhecida tanto com o anticorpo antibiotina quanto com a avidina ou

estreptoavidina (moléculas com alta afinidade pela biotina). Para a digoxigenina, apenas a antidigoxigenina pode ser usada na detecção. Tanto na marcação direta quanto na indireta, os cromossomos precisam ser contracorados e a lâmina montada com lamínula. A contracoloração permite visualizar melhor a morfologia dos cromossomos e é feita com o fluorocromo DAPI, de cor azul, ou com o iodeto de propídeo, vermelho.

TIPOS DE SONDA

Muitos tipos de seqüências de DNA têm sido visualizados através da hibridização *in situ*, desde as de cópias únicas ou com baixo número de cópias até aquelas altamente repetitivas. Contudo, as seqüências mais amplamente usadas na hibridização são as de DNA repetitivo, por serem mais facilmente visualizadas *in situ*. As unidades de repetição podem estar distribuídas em *tandem* ou dispersas ao longo do genoma. As **seqüências repetidas em *tandem*** ocorrem em blocos de centenas a milhares de cópias, localizadas em um ou mais sítios de um dado genoma. Essa categoria inclui DNA codificante, como genes para RNAr, e não-codificante, como DNA telomérico, centromérico e outros (Leitch et al., 1994). A localização desses sítios tem fornecido informações importantes sobre a estrutura e a evolução dos genomas, além de permitir a detecção de alterações cromossômicas estruturais.

Os genes ribossomais 5S e 45S têm sido as seqüências mais utilizadas na hibridização *in situ*. A unidade de repetição do DNAr 45S é uma seqüência com cerca de 9,2 kb contendo os genes para DNAr 18S, 5,8S e 26S, sempre nessa ordem. Esses genes foram muito bem conservados durante a evolução, o que permite a hibridização de uma seqüência extraída de uma espécie em qualquer outra espécie vegetal ou até mesmo em insetos, como gafanhotos. O melhor exemplo disso é a sonda pTa71, oriunda de trigo (Gerlach & Bedbrook, 1979), utilizada para localizar esses sítios em organismos tão diferentes como a samambaia *Osmunda japonica* (Kawakami et al., 1999) e o gafanhoto *Abracris flavolineata* (Rocha, 2002). O gene ribossomal 5S é uma seqüência menor e relativamente menos conservada. Ainda assim, a sonda pTa794, contendo um

fragmento de 410 pb de DNAr 5S também isolado de trigo (Gerlach & Dyer, 1980), hibridiza bem em qualquer outra Triticeae e na maioria das angiospermas. Em *Thinopyrum ponticum* (Triticeae), por exemplo, foram localizados 20 sítios de DNAr 5S e 17 sítios de DNAr 45S (Brasileiro-Vidal et al., 2005).

Além dos genes ribossomais, as seqüências em *tandem* mais utilizadas na FISH são as do DNA telomérico e as do DNA centromérico. A hibridização de seqüências exclusivas da região terminal ou da região centromérica permite identificar alterações estruturais que modifiquem a localização dessas sondas, como deleções, inversões ou translocações.

Existem ainda outras seqüências de DNA repetitivo, que hibridizam em locais diferentes dos cromossomos de uma ou mais espécies. Por exemplo, a seqüência pSc119.2 (120 pb) que é oriunda de centeio, mas pode ser detectada por FISH em várias espécies da tribo Triticeae (Lapitan et al., 1987). Essas sondas auxiliam na identificação dos pares cromossômicos em uma espécie ou dos cromossomos de diferentes espécies em híbridos interespecíficos. Em um triticales (trigo × centeio) hexaplóide, por exemplo, foi possível o reconhecimento de todos os 42 cromossomos através da sonda pSc119.2 associada a outras características cromossômicas (Cuadrado & Schwarzacher, 1998).

Os microssatélites, formados geralmente por unidades de repetição com cinco nucleotídeos ou menos, também se encontram arranjados em *tandem* e podem ser detectados por FISH. Em trigo, o microssatélite (AAC)₅ hibridiza em vários sítios do genoma de forma semelhante às bandas N, possibilitando a identificação dos sete pares cromossômicos do genoma B, além de alguns cromossomos do genoma A (Cuadrado et al., 2000). A vantagem da hibridização *in situ* sobre as técnicas de bandeamento é a boa repetição dos resultados e a possibilidade de utilizar várias sondas em uma mesma célula, incrementando a análise de rearranjos cromossômicos e a detecção de cromossomos introgridos em híbridos interespecíficos.

A segunda categoria de DNA usada na hibridização é a de **seqüências repetitivas dispersas**, as quais são intercaladas por seqüências de DNA de cópia simples ou repetitivas. Alguns DNAs dispersos se encontram distribuídos mais

ou menos uniformemente por todo o genoma, o que possibilita a detecção dos cromossomos de uma espécie em um híbrido sintético ou do genoma de um ancestral diplóide contido em um aloploplóide. Por exemplo, o clone pAs120a, isolado de *Avena strigosa*, uma espécie diplóide com genoma AA, permite a identificação dos cromossomos do genoma A em aveia, um hexaplóide com genoma AACCCDD. Por outro lado, o clone pAm1, oriundo do diplóide *A. murphyi* (CC), permite o reconhecimento dos cromossomos do genoma C e uma hibridização com essas duas sondas diferencia claramente os três genomas de aveia (Linares et al., 1998; 2001).

Seqüências de DNA de cópia única ou com baixo número de cópias são mais difíceis de serem detectadas por FISH. Isto se deve à pequena sensibilidade da técnica de FISH nas preparações de vegetais, dificultando a detecção de sondas menores que 5 kb (Dong et al., 2001). De modo semelhante, no estudo de plantas transgênicas, a detecção dos transgenes tem se limitado a insertos grandes ou àqueles representados por muitas cópias no genoma, variando de 10 – 60 kb no total (Dong et al., 2001).

A hibridização *in situ* também pode utilizar como sonda o **DNA genômico total** de uma espécie, proporcionando a marcação de todos os seus cromossomos. Esse tipo de hibridização é denominado de GISH (Genomic *In Situ* Hybridization). A técnica de GISH permite distinguir os cromossomos oriundos de diferentes parentais, em híbridos interespecíficos ou em espécies aloploplóides (Raina & Rani, 2001). O efeito produzido por GISH é idêntico àquele descrito para o DNA repetitivo disperso, com a vantagem de ser muito mais fácil obter a sonda. Além disso, nem sempre um único DNA disperso marca todo o genoma.

Na hibridização genômica *in situ*, o objetivo é localizar os cromossomos de apenas um dos parentais envolvidos na formação do híbrido. Dessa forma, o DNA do segundo parental deve ser bloqueado, a fim de evitar a hibridização de seqüências comuns a ambos os genomas. Para isso, hibridiza-se, em conjunto com a sonda, o DNA não-marcado do genoma que se deseja bloquear, numa proporção suficiente para impedir a marcação de cromossomos do segundo

parental. Por exemplo, para distinguir os cromossomos de centeio dos de trigo em triticales, pode ser utilizado como sonda o DNA total de centeio marcado e como bloqueador o DNA total de trigo não-marcado. O DNA sem marcação, utilizado numa concentração 10 vezes mais alta que a da sonda, funciona como bloqueador das seqüências comuns ao trigo e ao centeio, ficando as seqüências exclusivas de centeio coradas fortemente com o fluorocromo sinalizador. Os cromossomos oriundos de centeio mostram uma marcação forte em toda a sua extensão (exceto nos blocos de heterocromatina, que possuem seqüências comuns às duas espécies), enquanto os cromossomos de trigo apresentam apenas uma coloração fraca.

APLICAÇÕES DA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* NO ESTUDO DOS RECURSOS GENÉTICOS

A localização de seqüências de DNA nos cromossomos tem sido bastante utilizada em programas de pré-melhoramento e de melhoramento genético vegetal, podendo ser empregada na caracterização de germoplasmas, na construção de mapas cromossômicos, na caracterização de híbridos interespecíficos bem como na análise do comportamento meiótico.

Em germoplasmas de *Passiflora*, por exemplo, Melo et al. (2003) agruparam 20 espécies em diferentes conjuntos, com base nas similaridades de número cromossômico e de número e posição dos sítios de DNAr 5S e 45S. Levando em consideração as semelhanças citológicas, Melo e colaboradores puderam selecionar, com sucesso, espécies morfológicamente contrastantes, porém sexualmente compatíveis, para cruzamentos interespecíficos realizados no programa de melhoramento da Embrapa Semi-árido (Melo et al., em preparação).

A construção de mapas cromossômicos tem sido de grande valor para a caracterização de cromossomos específicos e a sua posterior identificação em híbridos interespecíficos. Em centeio (*Secale montanum* Guss.), por exemplo, foi feita uma caracterização molecular das regiões de banda C, com o objetivo de obter novas informações a respeito de sua estrutura cromossômica. Para isso, foram usadas três seqüências de DNA de centeio altamente repetitivo

(pSc119.2, pSc74, e pSc34) e as sondas de RNA ribossomal pTa71 (18S, 5.8S, e 26S rDNA) e pTa794 (5S rDNA), tornando possível a identificação de cada um dos sete pares cromossômicos. Essas sondas foram posteriormente usadas na localização de segmentos cromossômicos de centeio, envolvidos em linhas de translocação espontâneas trigo-centeio (Cuadrado & Jouve, 1995). De modo semelhante, alguns cromossomos do híbrido *Citrus limonia* x *Poncirus trifoliata* puderam ser identificados, com base no padrão de distribuição de sítios de DNAr 5S e 45S (Brasileiro-Vidal et al., enviado para publicação).

A cromatina introgridida nas sucessivas gerações de retrocruzamentos e de autofecundações em programas de melhoramento também pode ser monitorada através da hibridização genômica *in situ*. Dessa forma, têm sido estudadas diversas linhas de adição e de substituição cromossômicas, envolvendo trigo e espécies pertencentes a gêneros próximos, como *Leymus*, *Thinopyrum*, *Hordeum* e *Secale* (Schwarzacher et al. 1992; Wang et al., 1999). Translocações e recombinações também têm sido identificadas em plantas de origem híbrida. Brasileiro-Vidal et al. (2005), por exemplo, identificaram por GISH a introgressão de um braço cromossômico de centeio em uma cultivar de trigo, resultante de uma translocação entre cromossomos dessas espécies.

A GISH também tem sido usada para identificar pareamentos cromossômicos intergenômicos na meiose de híbridos de *Triticum* x *Thinopyrum* (King et al., 1993) *Triticum* x *Secale* (King et al., 1994) e de outros híbridos. Como os cromossomos podem ser detectados em todos os estágios do ciclo celular, a técnica pode fornecer ainda informações sobre a organização e a distribuição espacial dos genomas no núcleo interfásico. Leitch et al. (1991), por exemplo, observaram que os conjuntos cromossômicos parentais do híbrido cevada x *Secale africanum* se encontram em domínios separados no núcleo interfásico e tendem a manter as mesmas posições ao longo do ciclo celular.

TÉCNICAS MAIS RECENTES

Os exemplos anteriores mostram a importância da hibridização *in situ* na análise cariotípica relacionada ao melhoramento vegetal. Atualmente, os maiores

desafios têm sido a detecção e a integração, em mapas genéticos, de seqüências de pequeno tamanho, como os marcadores moleculares e os genes de cópia única. Essa dificuldade tem sido superada pela utilização de clones de grandes insertos de DNA contendo a seqüência simples desejada, como, por exemplo, marcadores de RFLP ancorados em YACs ou BACs (Cheng et al., 2001). Outra alternativa é a utilização de um conjunto de marcadores moleculares proximamente ligados, do tipo RFLP, por exemplo, marcado e detectado como uma sonda única, como foi feito para *Phaseolus vulgaris* (Pedrosa et al., 2003).

Um outro fator que interfere na visualização dos sinais é o nível de condensação dos cromossomos mitóticos, que impede uma melhor resolução das seqüências separadas a menos de 1 Mpb (Yamamoto & Mukai, 1998). Uma alternativa para aumentar o nível de resolução da hibridização *in situ* é o uso de cromossomos meióticos na fase de paquíteno. Esses cromossomos encontram-se de 7 a 40 vezes mais estendidos que os cromossomos mitóticos (de Jong et al., 2000). Um outro procedimento auxiliar no mapeamento por FISH é a técnica de 'fibras estendidas', que permite uma resolução acima de 0,7 kb. Nesta técnica, o núcleo interfásico é lisado e as fibras de DNA do núcleo são espalhadas na superfície da lâmina. A hibridização *in situ* é feita nessas fibras (Yamamoto & Mukai, 1998).

Uma variação da técnica de hibridização *in situ*, é a utilização de sondas isoladas de cromossomos individuais que marcam apenas um par cromossômico ou segmentos cromossômicos derivados daquele par. As seqüências comuns a outros cromossomos devem ser suprimidas da hibridização, utilizando como bloqueador o DNA genômico ou seqüências repetitivas dispersas, ambos não-marcados (Schubert et al., 2001). O resultado é que apenas um par cromossômico parece inteiramente marcado, como uma 'pintura cromossômica'. Essa técnica tem sido amplamente utilizada em cromossomos humanos e em estudos comparativos em mamíferos (Ferguson et al. 2000).

Em vegetais, a pintura cromossômica ainda é pouco usada, devido à abundância de seqüências repetitivas dispersas nos genomas vegetais, o que

dificulta a eficiência do bloqueio (Schubert et al., 2001). Um bom exemplo da aplicação dessa técnica está em centeio, no qual o cromossomo 1R foi isolado, amplificado por PCR e clonado para criar uma biblioteca cromossomo-específica do tipo pintura (Zhou et al., 1999).

Finalmente, aperfeiçoamentos da FISH, que possibilitem a visualização simultânea de várias seqüências alvo, contribuirão para a análise de poliplóides mais complexos, como por exemplo, o milho, que era descrito anteriormente como espécie diplóide (Gaut et al., 2000). Esses aprimoramentos também serão importantes para facilitar a integração dos mapas cromossômicos com os mapas de ligação já existentes e a análise comparada desses mapas em espécies próximas (Cheng et al., 2001; Draye et al., 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASILEIRO-VIDAL, A. C., CUADRADO, A., BRAMMER, S. P., BENKO-ISEPPON, A. M; GUERRA, M. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 2, p. x-x, 2005.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOARES FILHO, W. S.; GUERRA, M. A chromosomal marker distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species.
- CHENG, Z.; PRESTING, G. G.; BUELL, C. R.; WING, R. A.; JIANG, J. High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. **Genetics**, Chapel Hill, v. 157, p. 1749-1757, 2001.
- CUADRADO, A.; JOUVE, N. Fluorescent in situ hybridization and C-banding analyses of highly repetitive DNA sequences in the heterochromatin of rye (*Secale montanum* Guss.) and wheat incorporating *S. montanum* chromosome segments. **Genome**, v. 38, n. 4, p. 795-802, 1995.
- CUADRADO, A.; SCHWARZACHER, T. The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 107, p. 587-594, 1998.
- CUADRADO, A.; SCHWARZACHER, T.; JOUVE, N. Identification of different chromatin classes in wheat using *in situ* hybridization with simple sequence repeat oligonucleotides. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 711-717, 2000.

de JONG, J. H.; ZHONG, X.-B.; FRANSZ, P. F.; WENNEKES-VAN EDEN, J.; JACOBSEN, E.; ZABEL, P. High resolution FISH reveals the molecular and chromosomal organization of repetitive sequences of individual tomato chromosomes. In: OLMO, E.; REDI, C. A. **Chromosomes Today**. Switzerland: Birkhäuser Verlag, 2000. v. 13, p. 267-275.

DONG, J.; KHARB, P. CERVERA, M.; HALL, T. C. The use of FISH in chromosomal localization of transgenes in rice. **Methods in Cell Science**, Norwell, v. 23, p. 105-113, 2001.

DRAYE, X.; LIN, Y.-R.; QIAN, X.-Y.; BOWERS, J. E.; BURROW, G. B.; MORRELL, P. L.; PETERSON, D. G.; PRESTING, G. G.; REN, S.-X.; WING, R. A.; PATERSON, A. H. Toward integration of comparative genetic, physical, diversity, and cytomolecular maps for grasses and grains, using the sorghum genome as a foundation. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, p. 1325-1341, 2001.

FERGUSON-SMITH, M. A.; O'BRIEN, P. C. M; RENS, W.; YANG, F. Comparative chromosome painting. In: OLMO, E.; REDI, C. A. **Chromosomes Today**. Switzerland: Birkhäuser Verlag, 2000. v. 13, p. 259-265.

GAUT, B. S.; D'ENNEQUIN, M. T.; PEEK, A. S.; SAWKINS, M. C. Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, p. 7008-7015, 2000.

GERLACH, W. L.; BEDBROOK, J. R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, p. 1869-1885, 1979.

GERLACH, W. L.; DYER, T. A. Sequence organization of the repeated units in the nucleus of wheat, which contains 5S rDNA genes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, p. 4851-4865, 1980.

GUERRA, M.; LOPES, M. J. S. **Como analisar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. FUNPEC: Ribeirão Preto, 2002, 132p.

KAWAKAMI, S. M.; KONDO, K.; KAWAKAMI, S. Analysis of nucleolar organizer constitution by fluorescent in situ hybridization (FISH) in diploid and artificially produced haploid sporophytes of the fern *Osmunda japonica* (*Osmundaceae*). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 216, p. 325-331, 1999.

KING, I. P.; PURDIE, K. A.; ORFORD, S. E.; READER, S. M.; MILLER, T. E. Detection of homoeologous chiasma formation in *Triticum durum* x *Thinopyrum bessarabicum* hybrids using genomic *in situ* hybridization. **Heredity**, Essex, v. 71, p. 369-372, 1993.

KING, I. P.; READER, S. M.; PURDIE, K. A.; ORFORD, S. E.; MILLER, T. E. A study of the homoeologous pairing promoter on chromosome pairing in

wheat/rye hybrids using genomic *in situ* hybridization. **Heredity**, Essex, v. 72, p. 318-321, 1994.

LAPITAN, N. L. V.; GILL, B. S.; SEARS, R. G. Genomic and phylogenetic relationships among rye and perennial species in the Triticeae. **Crop Science**, Madison, v. 27, p. 682-687, 1987.

LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I. J. An introduction to *in situ* hybridization. In: LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I. J. ***In situ* hybridization: a practical guide**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1994, Cap.1, p. 1-2.

LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; MOSGÖLLER, W.; BENNETT, M. D.; HESLOP-HARRISON, J. S. Parental genomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid. **Chromosoma**, Berlin, v. 101, p. 206-213, 1991.

LINARES, C.; FERRER, E.; FOMINAYA, A. Discrimination of the closely related A and D genomes of the hexaploid oat *Avena sativa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 12450-12455, 1998.

LINARES, C.; LOARCE, Y.; SERNA, A.; FOMINAYA, A. Isolation and characterization of two novel retrotransposons of the Ty1-*copia* group in oat genomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 110, p. 115-123, 2001.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, New York, v. 92, p. 309-316, 2003.

PEDROSA, A.; VALLEJOS, C. E.; BACHMAIR, A.; SCHWEIZER, D. Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, p. 205-212, 2003.

RAINA, S. N.; RANI, V. GISH technology in plant genome research. **Methods in Cell Science**, Norwell, v. 23, p. 83-104, 2001.

ROCHA, M. de F. **Caracterização citogenética em espécies de gafanhotos das famílias Acrididae e Romaleidae (Orthoptera)**. Recife, 2002. 117p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

SCHUBERT, I.; FRANSZ, P. F.; FUCHS, J.; de JONG, J. H. Chromosome painting in plants. **Methods in Cell Science**, Norwell, v. 23, p. 57-69, 2001.

SCHWARZACHER, T.; ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K.; HARRISON, G. E.; ISLAM, A. K. M. R.; JIA, J. Z.; KING, I. P.; LEITCH, A. R.; MILLER, N.; READER, S. M.; ROGERS, W. J.; SHI, M.; HESLOP-HARRISON, J. S. Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 84, p. 778-786, 1992.

WANG, S. L.; QI, L. L.; CHEN, P. D.; LIU, D. J.; FRIEBE, B.; GILL, B. S. Molecular cytogenetic identification of wheat-*Elymus tsukushiense* introgressions lines. **Euphytica**, Dordrecht, v. 107, p. 217-224, 1999.

YAMAMOTO, M.; MUKAI, Y. High-resolution mapping in wheat and rye by FISH on extended DNA fibers. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 9., 1998, Saskatchewan. **Proceedings...** Saskatchewan: University Extension Press, 1998, v. 1, p. 12-16.

ZHOU, Y.; ZANMIN, H.; DANG, B.; WANG, H.; DENG, X.; WANG, L.; CHEN, Z. Microdissection and microcloning of rye (*Secale cereale* L.). **Chromosoma**, Berlin, v. 108, p. 250-255, 1999.