

AA

PatV

Poliploidização Induzida Em *Lolium multiflorum*

Pereira, RC¹; Andrade, MNB¹; Techio, VH¹; Pasqual, M²; Mittelmann, A³

RESUMO

O azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) é a forrageira de clima temperado mais usada para na alimentação dos rebanhos no inverno. O programa de melhoramento de azevém da Embrapa dispõe de acessos diplóides ($2n=2x=14$) e tetraplóides ($2n=4x=28$). Normalmente as plantas tetraplóides são mais vigorosas que as diplóides e desejadas nos programas de melhoramento. Entretanto, os tetraplóides de azevém disponíveis no Brasil foram introduzidos e não apresentam um bom desempenho nas condições edafoclimáticas do país. Assim, a duplicação cromossômica de genótipos melhorados de *Lolium* é bastante desejável e visa inicialmente aumentar a expressão de caracteres de interesse agrônomo como qualidade da forragem, resistência a doenças, uniformidade e estabilidade das populações. O objetivo deste trabalho foi induzir a duplicação cromossômica em *L. multiflorum* por meio de tratamento com colchicina. Para isso, seedlings de *L. multiflorum* (acesso LOL161) foram imersos em solução de colchicina nas concentrações de 0,1, 0,25 e 0,5% e dimetilsulfóxido (DMSO) 1% por um período de exposição de 24 horas. Foram avaliadas 4 repetições por tratamento e 24 seedlings/repetição. A determinação do nível de ploidia foi realizada pela citometria de fluxo. A porcentagem média de sobrevivência das plantas foi 48% e a de plantas com número cromossômico duplicado foi de 12%.

INTRODUÇÃO

O azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) é a principal espécie forrageira de clima temperado cultivada no Brasil, sendo bastante empregada para suprir a demanda alimentar dos rebanhos durante a estação fria do ano. Nas áreas do sul do Brasil que não dispõem de campos naturais e onde se concentram as bacias leiteiras, o azevém é um dos pilares dos sistemas de produção, uma vez que seu período produtivo compreende entre seis e oito meses do ano. Segundo Gomes et al. (2000), o azevém anual é a espécie forrageira mais utilizada nessas condições, podendo também ser utilizada de maneira muito eficiente sob cortes, como forragem conservada (Dias et al., 2001).

Por ser a forrageira mais empregada na alimentação do rebanho leiteiro da região sul no inverno, o programa de melhoramento conduzidos pela Embrapa visam a obtenção de genótipos produtivos e adaptados às diferentes condições edafoclimáticas para possibilitar sua efetiva incorporação pelos sistemas de produção. Para a região Sudeste especificamente, onde o clima se caracteriza por ser mais quente e pela época seca que ocorre entre os meses de abril a outubro, é desejável obter cultivares de azevém em áreas irrigáveis, bem como, com maior plasticidade adaptativa (Nunes et al., 2002).

O banco de germoplasma de azevém anual da Embrapa possui acessos diplóides ($2n=2x=14$) e tetraplóides naturais ($2n=4x=28$), a maioria de populações locais e algumas cultivares introduzidas (Barbieri et al., 2005). Normalmente, plantas polipóides são mais produtivas e bastante desejadas nos programas de melhoramento. Entretanto, os tetraplóides de azevém disponíveis no Brasil foram introduzidos e não apresentam um bom desempenho nas condições edafoclimáticas do país. Assim, a duplicação cromossômica de genótipos melhorados de *Lolium* é bastante desejável e visa inicialmente aumentar a expressão de caracteres de interesse agrônomo como qualidade da forragem, resistência a doenças, uniformidade e estabilidade das populações.

Além disso, a obtenção de tetraplóides induzidos podem ser usadas para ampliar a sua base genética e gerar materiais poliplóides que retornem ao programa de melhoramento genético para serem usados em cruzamentos. Por ocasionar uma série de efeitos morfofisiológicos sobre as plantas, a poliploidização pode expandir o potencial de utilização do azevém como forrageira, primeiramente pelo aprimoramento de características de interesse agrônomo, como aumento da produção e da qualidade da forragem. Isso é possível pois, de maneira geral, o alto vigor das plantas está diretamente associado com a ploidia. Uma alternativa interessante para o azevém é a indução da duplicação de cromossomos de diplóides promissores e posterior

¹Laboratório de Citogenética Vegetal – Departamento de Biologia - Universidade Federal de Lavras – Lavras-MG-Brasil.

² Laboratório de Cultura de Tecidos – Departamento de Agricultura - Universidade Federal de Lavras – Lavras-MG-Brasil.

³Embrapa Gado de Leite/Clima Temperado –Juiz de Fora –MG/Pelotas-RS- Brasil.
rcristinapereira@yahoo.com.br

SP 5391
P. 170

cruzamento do tetraplóide obtido com plantas diplóides elite, permitindo a obtenção de triplóides secundários com melhor distribuição estacional, resistência a pragas e doenças e outras características agrônômicas superiores.

O objetivo deste trabalho foi induzir a duplicação cromossômica em *L. multiflorum* por meio de tratamento com colchicina.

MATERIAL E MÉTODOS

Seedlings de *L. multiflorum*, acesso LOL 161, foram imersos, por 24h, em solução de colchicina nas concentrações de 0,1, 0,25 e 0,5% contendo dimetilsulfóxido (DMSO) 1%. Após esse período, os *seedlings* foram lavados em água corrente por, aproximadamente, 30 minutos e plantados em bandejas contendo substrato, as quais foram mantidas em BOD em temperatura de 15°C. Foram avaliadas 4 repetições/tratamento e 24 *seedlings*/repetição. Após, aproximadamente, 3 meses foi realizada a determinação do conteúdo de DNA dos materiais expostos aos tratamentos, utilizando a técnica de citometria de fluxo. Para isso, foram pesadas 70 mg de tecido foliar das plantas de azevém e da planta padrão de referência (*Vicia faba*). Ambas foram trituradas juntas, em placa de Petri, contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a liberação dos núcleos (Dolezel et al., 1997). As amostras foram coradas com 25 µL de Iodeto de Propídeo.

Para cada amostra, foram analisados 10 mil núcleos em escala logarítmica em citômetro FacScalibur (Becton Dickinson). Os histogramas obtidos com o software Cell Quest foram analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8.

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 (núcleos que estão na fase G1 da Interfase) do padrão de referência (*Vicia faba*) e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (26,9 pg).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de sobrevivência e de plantas duplicadas obtidas, a partir do tratamento de *seedlings in vivo* com diferentes concentrações de colchicina estão apresentadas na Tabela 1. A taxa de sobrevivência das plantas variou de 25 a 75% (Tabela 1), sendo maior na concentração de colchicina 0,1% mais DMSO 1%, com tempo de exposição de 24h. Para as concentrações de 0,25 e 0,5%, a sobrevivência foi de 46% e 25%; respectivamente. Nair (2004) utilizando tratamento de *seedlings* de *Lolium* com solução aquosa de colchicina nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4% obteve as seguintes taxas de sobrevivência: 41,8; 26; 10 e 3,2%, respectivamente. Portanto, os resultados para o porcentagem de sobrevivência das plantas expostas aos tratamentos com colchicina obtidos neste estudo foram superiores aos obtidos por Nair (2004).

Tabela 1- Porcentagem de sobrevivência e de plantas duplicadas de *L. multiflorum*, acesso LOL 161, obtidas a partir do tratamento de *seedlings in vivo* com diferentes concentrações de colchicina.

	Tratamentos (concentração da colchicina e DMSO 1%)			
	Testemunha	0,1%/24h	0,25%/24h	0,50%/24h
Sobrevivência (%)	100	75	46	25
Tetraplóides (%)	0	18	10	8,3

A porcentagem de plantas duplicadas obtidas com os tratamentos com colchicina nas concentrações de 0,1%, 0,25% e 0,5% mais DMSO 1% foi de 18%, 10% e 8,3%, respectivamente. Em *Lolium*, Nair (2004) obteve 39,7; 18,5; 15,7 e 0% de tetraplóides induzidos com o tratamento com 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4% de colchicina/3h, respectivamente. Já Pasakinskiene (2000) obteve 79,1% de plantas de *Lolium* duplicadas artificialmente a partir de embriões cultivados *in vitro* em meio suplementado com 0,3% de colchicina/4h e 40% de duplicados quando se utilizou embriões híbridos entre *Lolium* e *Festuca*. A taxa de sobrevivência variou de 60% (*Lolium*) e de 27,8% (híbrido). Esses dados evidenciam as dificuldades em se estabelecer uma metodologia eficiente para as espécies do gênero.

De todas as plantas indicadas como tetraplóides pela citometria de fluxo foram coletadas raízes para obtenção de metáfases mitóticas visando a confirmação do número cromossômico por meio de contagens, bem como coleta de inflorescências para avaliação do comportamento meiótico e viabilidade do pólen.

CONCLUSÃO

O tratamento com colchicina mais dimetilsulfóxido permite a obtenção de plantas tetraplóides em azevém, sendo as taxas de sobrevivência e duplicação inversamente proporcionais à concentração de colchicina.”

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbieri, R. L.; Castro, C. M.; Mittelman, A. et al. **Conservação ‘ex-situ’ de recursos genéticos vegetais na Embrapa Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. 27 p. (Embrapa Clima Temperado Documentos, 143).

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

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

Gomes, J. F.; Stumpf Júnior, W.; Ribeiro, M. E. R. Produção e utilização de alimentos. In: Bitencourt, D.; Pegoraro, L. M. C.; Gomes, J. F.; Vetromila, M. A. M.; Ribeiro, M. E. R.; Stumpf Júnior, W. **Sistemas de pecuária de leite: uma visão na região de clima temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000, p. 63-99.

Nair, R.M. (2004). **Developing tetraploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations**. New Zealand Journal of Agricultural Research, 2004, Vol. 47: 45-49

Nunes, C. D. M.; Brancão, N.; Rodrigues, R. C.; Reis, J. C. Ocorrência de brusone em azevém. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27 (Suplemento), p.803, resumo S231, 2002.

Pasakinskiene, I. Culture of embryos and shoot tips for chromosome doubling in *Lolium perenne* and sterile hybrids between *Lolium* and *Festuca*. **Plant Breed** 119:185-187, 2000.