

ASPECTOS PRATICOS DA CITOGENETICA DO CAPIM
GORDURA (*Melinis minutiflora* Beauv.) *

CYTOGENETICAL STUDIES IN MOLASSES GRASS
(*Melinis minutiflora* Beauv.)

WILSON MANARA **

ALMIRO BLUMENSCHEN ***

RESUMO

Foram estudados 20 clones de 3 variedades de *Melinis minutiflora* Beauv., procedentes de 3 regiões do Brasil Central, com os objetivos de: 1) determinar o número cromossômico das variedades; 2) estudar o pareamento e segregação dos cromossomos na meiose; 3) estimar a fertilidade do pólen e sua possível relação com o comportamento meiótico.

O número somático de cromossomos para todas as variedades foi $2n=36$. A alta frequência de bivalentes, a pequena frequência de univalentes e multivalentes, assim como a ausência de outras informações, dificultaram a decisão sobre a natureza alo ou autopoliploide da espécie. Observou-se anormalidades meióticas e esterilidade do pólen, o que é uma das causas da baixa formação de sementes. A existência de variação entre as variedades, tanto no pareamento cromossômico como na fertilidade do pólen, abre a possibilidade de melhoramento da fertilidade da semente. O aumento na média de bivalentes nem sempre foi acompanhado pelo aumento na fertilidade do pólen, o que sugere a existência de diferentes mecanismos de controle com relação a irregularidades meióticas e fertilidade do pólen.

É importante um estudo mais detalhado sobre o modo de reprodução da espécie, pois, na eventualidade da ocorrência de apomixia, como sugerida por alguns autores, as irregularidades meióticas perdem parte de sua importância.

SUMMARY

Twenty clones of three varieties of *Melinis minutiflora* from Central Brazil were studied to determine the varietal chromosome number, pairing and segregation at meiosis, as well as to estimate the pollen fertility and its possible relation to the meiotic behavior.

Chromosome number was $2n=36$ for all varieties. The high frequency of bivalents and the low number of univalents and multivalents observed, as well as the lack of additional informations, makes the characterization of the ploidy nature of species difficult.

* Trabalho apresentado como dissertação à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da USP, para obtenção do título de "Mestre" — com bolsa da CAPES.

** Professor Assistente do Departamento de Fitotecnia — CCR — UFSM.

*** Orientador-Professor Adjunto do Departamento e Instituto de Genética da ESALQ — USP.

Meiotic abnormalities and pollen sterility which may be the cause of low seed production were observed. The variability among varieties for chromosome pairing and pollen fertility suggest the possibility of breeding for seed fertility. The increase of bivalent frequency was not followed by the increase of pollen fertility. This seems to indicate the existence of different control mechanisms related to meiotic behavior and pollen fertility.

The breeding system of this species needs to be determined with more precision. If apomixis occurs, as has been suggested by some authors, the meiotic irregularities lose, partially, their importance.

INTRODUÇÃO

Pouco progresso tem sido registrado na obtenção e uso de material melhorado em plantas forrageiras, se comparado com outras espécies. No passado o criador contava com extensas pastagens naturais, porém, nos últimos anos, ele depende mais de pastagens cultivadas. O criador no princípio demonstrou certa resistência à aquisição de sementes caras de plantas forrageiras, por considerar que as forragens eram cultivos de baixo valor, não justificando, por isso, maior atenção. Por esse motivo, menos esforços foram dedicados ao melhoramento de forrageiras do que de outras espécies que pareciam mais interessantes como cereais, algodão, fumo, linho e mais recentemente a soja. Com o reconhecimento do verdadeiro valor das gramíneas e leguminosas forrageiras, esta situação está mudando rapidamente. Em alguns países como Estados Unidos e Canadá, maiores esforços estão sendo dispendidos para melhorar a capacidade hereditária das forrageiras, visando a produção econômica de alimentos para o gado (POHELMAN, 25).

O melhoramento, no entanto, não pode prescindir de uma série de estudos básicos, especialmente aqueles referentes a citologia e genética do material a ser melhorado. Tais estudos fornecem informações sobre o número de cromossomos, herança de caracteres, relacionamento filogenético, fertilidade e produção de sementes, modo de reprodução, nível de ploidia, além de permitir a formulação de hipóteses sobre o processo evolutivo de um determinado grupo.

As plantas forrageiras cultivadas no Brasil Central, são quase que exclusivamente gramíneas perenes tais como: capim gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.), capim jaraguá (*Hyparrhenia rufa*) e capim colômbio (*Panicum maximum*), havendo predominância do primeiro sobre os demais (ROSTON, 27).

Em *M. minutiflora*, segundo OTERO (24) e HAVARD-DUCLOS (13), a reprodução é geralmente feita através de sementes, pois estas possuem um bom poder germinativo, constituindo-se num processo bem mais econômico requerendo, ainda, menores cuidados que a propagação por via vegetativa.

Uma produção regular de sementes depende, principalmente, de pareamento e segregação normais dos cromossomos na meiose.

Os dados da literatura quanto a citologia do gênero *Melinis*, são muito escassos, limitando-se apenas a contagem do número somático de cromossomos de algumas espécies.

Considerando-se a importância desta gramínea como forrageira e a deficiência de informações com respeito a estudos citológicos de suas variedades, cultivadas principalmente no Brasil Central, o presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- 1 — Determinar o número cromossômico de variedades de *M. minutiflora* em tecidos meristemáticos de pontas de raízes.
- 2 — Estudar o pareamento e segregação dos cromossomos na meiose.
- 3 — Estimar a fertilidade do pólen pelo método da coloração e sua possível relação com o comportamento melótico.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Número básico, poliploidia, anormalidades meióticas e suas causas na fertilidade.

Segundo BOOTH (2), o atual número cromossômico para as espécies de gramíneas é, de modo geral, muito maior do que o derivado do dobramento do número básico. É comum encontrar no gênero *Poa* uma variação no número cromossômico de $2n=24$ até mais de 90. A espécie *Andropogon barbinodis* possui $2n=180$ cromossomos, no entanto, isto não é comum em plantas que produzem sementes. Um dos números cromossômicos mais baixos registrados em gramíneas é $2n=8$, na espécie *Aiopsis tenella*. Espécies com um conjunto haplóide de 7 cromossomos são frequentes, números mais baixos do que este são raros.

A poliploidia é um fenômeno extremamente explorado, principalmente, no Reino Vegetal. STEBBINS (31) estimou que nas plantas superiores a poliploidia está presente em cerca de 30-35% das espécies.

Especificamente para a família Gramíneae, STEBBINS (30) afirma que pelo menos 70% são poliploides, enquanto que CARNAHAN e HILL (4), elevam esta porcentagem para 80.

A classificação dos poliploides é, usualmente, baseada em 4 critérios principais: semelhanças morfológicas com espécies diploides, comportamento e número cromossômico, presença ou ausência de razões tetrassômicas e fertilidade ou esterilidade do diploide do qual o poliploide foi derivado. Com base nesses critérios, STEBBINS (29) descreveu 4 categorias de poliploides: autopoliploides, alopoliploides segmentares, alopoliploides verdadeiros ou genômicos e autoalopoliploides, sendo que todos eles envolvem a duplicação de um conjunto inteiro de cromossomos.

De acordo com CARNAHAN e HILL (4) nas espécies diploides de gramíneas, especialmente as anuais e de autofecundação, são pouco frequentes as irregularidades meióticas. Esta afirmativa também é verdadeira para a maioria dos anfídiploides, porém nos autopoliploides, alopoliploides segmentares e poliploides de categorias superiores, de gramíneas, a meiose é caracterizada pela ocorrência frequente de associações ímpares, univalentes e trivalentes, retardatários em anáfase e telófase, não disjunção numérica e micronúcleos nas tétradas.

SWANSON, MERZ e YOUNG (33) referem que, citologicamente, os autopoliploides são caracterizados e identificados pela presença de multivalentes na metáfase I da meiose. Os 3 cromossomos homólogos de um autotriploide, pareiam uns com os outros (embora dois a dois, em qualquer ponto ao longo do cromossomo) para dar unidades trivalentes; em autotetraploides resultaria unidades quadrivalentes. O número de multivalentes por célula não é constante e vai depender do grau de sinapse e da formação de quiasmas durante a prófase da meiose.

SEARS e OKAMOTO (28) e RILEY e CHAPMAN (26) mostraram que o pareamento e segregação em poliploides estão, de alguma forma, sob controle genético. Trabalharam com *Triticum aestivum* que é um hexaploide com $2n=42$ cromossomos, possuindo 3 genomas na sua constituição, A, B e D, derivados de espécies diploides intimamente relacionadas pela similaridade de seus cromossomos. A despeito disto, só ocorre a formação de bivalentes originando gametas com 21 cromossomos. Entretanto, a perda de um gene dominante situado no braço longo do cromossomo 5B, causa uma alteração na meiose, fazendo com que haja a formação de multivalentes. Desta forma, embora haja homologia parcial entre os 3 genomas, a presença do gene no cromossomo 5B, impede a formação de multivalentes e o pareamento é limitado somente entre os cromossomos homólogos, através de um controle genético de pareamento.

Uma das principais consequências das anormalidades meióticas, é a redução da fertilidade das espécies. Os autopoliploides são, em geral, altamente estéreis, pois a ocorrência de associações multivalentes e a presença de univalentes, levam a uma segregação anormal dos cromossomos na meiose, dando origem a gametas com excesso ou falta de cromossomos.

Segundo BURNHAM (3) cromossomos univalentes podem ir para um dos polos sem se dividirem na primeira divisão meiótica, dividindo-se normalmente na segunda divisão, mas existe uma forte tendência dos univalentes ficarem atrasados na primeira divisão. Por outro lado, eles podem dividirem-se na primeira divisão e apresentarem-se como retardatários na segunda. Em qualquer um dos casos, os cromossomos retardatários, normalmente, não são incluídos nos núcleos resultantes da meiose, aparecendo como micronúcleos nas tétradas. Um univalente, o qual passa para um dos polos sem sofrer divisão, provavelmente irá se dividir normalmente na segunda divisão. Quando ocorre atraso, normalmente, nenhum núcleo recebe o cromossomo univalente, resultando em esterilidade do pólen.

2. O gênero *Melinis*

Segundo CHIPPINDALL (6), existem aproximadamente 20 espécies do gênero *Melinis*, todas confinadas à África, com exceção de *M. minutiflora*. A maioria das espécies são muito afins, muitas vezes, tornando difícil traçar os limites entre elas. Em muitas delas ocorrem duas formas, uma com aristas nas espiguetas e outra com espiguetas sem aristas. A forma sem arista é, usualmente, referida como "forma mítica" ou "forma inermis". Levando em conta este fato, em *M. minutiflora*, a forma sem aristas foi descrita como uma variedade distinta, var. *inermis* Hack.

M. minutiflora é uma espécie originária da África Tropical e provavelmente do Brasil, onde se acha muito disseminada e constitui a base das pastagens brasileiras (HAVARD-DUCLOS, 13).

OTERO (24) refere que esta gramínea cresce espontaneamente nos estados do Brasil Central, principalmente, em Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, mas também é utilizada em outros estados da União (Norte e Nordeste). É mais utilizada para pastagens, servindo também para corte, feno e ensilagem. No Brasil o mesmo autor reconhece as seguintes variedades:

a) **Capim Gordura Rôxo** — é a variedade de mais amplo cultivo.

b) **Capim Gordura Cabelo de Negro** — é a mais recomendada para formar pastagens. Tem porte e folhas menores e entrenós curtos sendo muito resistente ao pisoteio e mais pegajosa do que as outras variedades.

c) **Capim Gordura Branco** — possui folhas verde-claro, inflorescências de cor clara e pêlos curtos na região dos nós do colmo, enquanto que as outras variedades têm folhas verdes escuro e pêlos longos nos nós. Menos pegajosa, mais sensível ao frio e de composição química inferior às outras variedades.

d) **Capim Gordura Francano ou Franqueiro** — mais vigoroso e desenvolvido, com inflorescências maiores e espículas providas de aristas mais longas do que as outras variedades. Recomendado para corte pelo seu grande rendimento. Tem este nome por existir em grande quantidade em Franca (SP).

e) **Capim Gordura Rôxo variedade inerme** — muito semelhante a variedade Rôxo tendo porém as espículas desprovidas de aristas.

f) **Capim Gordura Cabelo de Negro sem aristas** — possui inflorescências menores, rôxas, com espículas sem aristas.

Das diversas espécies do gênero *Melinis*, com exceção de duas delas, não se tem conhecimento de nenhum estudo citológico nas demais. Deve-se salientar, ainda, que os estudos citológicos realizados com as duas espécies (*M. minutiflora* e *M. macrochaeta*) limitaram-se apenas a determinação do número cromossômico.

As primeiras investigações citológicas feitas na espécie *M. minutiflora*, por AVDULOV (apud HUNTER, 14), revelaram que ela possui $2n=36$ cromossomos. O gênero foi colocado a princípio na tribo *Panicaceae* devido ao pequeno tamanho dos cromossomos e também, porque $x=9$ é o número básico de cromossomos da maior parte desta tribo. No entanto, há divergências de opiniões entre vários pesquisadores sobre os limites precisos da tribo e sobre os diversos gêneros a serem incluídos nela.

De acordo com HARTLEY (12), os primeiros estudiosos do assunto adotaram um amplo ponto de vista, incluindo na tribo *Panicaceae* todos os gêneros então conhecidos, os quais foram uma vez referidos dentro de seus limites.

TATEOKA (apud HARTLEY, 12), estudando grupos de gêneros relacionados dentro da tribo *Panicaceae*, gêneros esses que já eram reconhecidos como sub-tribos, classificou-os na categoria de tribos independentes. Desse modo, os gêneros que haviam sido incluídos em *Panicaceae*, em "senso lato", são agora colocados em 8 tribos separadas, sendo, uma delas, *Melinideae*. Com exceção da *Panicaceae*, a maioria das outras tribos é muito pequena, constituindo-se de um ou poucos gêneros, muitas vezes, monoespecíficos.

A tribo *Melinideae*, segundo ENGLER (10), compreende dois gêneros (*Melinis* e *Rhynchelytrum*).

HUNTER (14), MYERS (23), MOFFETT e HURCOMBE (19), JACQUES-FELIX (16) e TATEOKA (34) investigaram, citologicamente, o gênero *Melinis* encontrando número somático $2n=36$ e número básico $x=9$.

Para o gênero *Rhynchelytrum*, De WET (8), De WET e ANDERSON (9), JACQUES-FELIX (16) e TATEOKA (34) encontraram os mesmos números somático e básico de cromossomos do gênero *Melinis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram estudados o número cromossômico, o comportamento meiótico e a fertilidade do pólen de 20 clones da espécie *M. minutiflora*, coletados em 3 estados do Brasil Central. Os 20 clones estudados, foram agrupados, por suas características morfológicas, em 3 variedades da espécie (Eng.º Agr.ºs Natal Antônio Vello e Eloah Maria Pacheco de Oliveira, informação pessoal); Capim Gordura Cabelo de Negro, Capim Gordura Francano e Capim Gordura Rôxo.

Na tabela I são apresentadas as variedades, procedência e o número de clones estudados.

Tabela I — Variedades, procedência e número de clones estudados.

Variedades	Procedência	N.º de clones estudados
Cabelo de Negro	Goiás	2
	Minas Gerais	2
	São Paulo	5
Francano	Minas Gerais	1
	São Paulo	2
Rôxo	Goiás	2
	São Paulo	6

Para a determinação do número somático de cromossomos utilizou-se pontas de raízes, as quais foram pré-tratadas com solução de hidroxiquinoleína 0,002 mol., durante 6 horas à temperatura ambiente, com a finalidade de se obter maior número de placas metafásicas e cromossomos mais condensados e separados. Depois do pré-tratamento, as pontas de raízes foram fixadas em solução de álcool absoluto e ácido acético glacial na proporção de 3:1, durante 18 horas. Em seguida o material foi colocado em solução aquosa contendo peptona a 1% e pectinase a 5%, durante 24 horas com a finalidade de ajudar no amolecimento dos tecidos e separação das células.

No processo de coloração foi usado o método de Feulgen segundo DARLINGTON e LA COUR (7) porém, como a coloração não foi suficientemente boa esta foi intensificada usando-se uma gota de carmin acético a 2%, sobre a ponta da raiz, antes do esmagamento, por ocasião da confecção das lâminas pelo método "smear". As lâminas que apresentaram condições satisfatórias de observação microscópica foram transformadas em permanentes, segundo o método de CELARIER (5).

As lâminas permanentes foram observadas ao microscópio para determinação do número cromossômico, baseada em contagem de um número de células que variou de 4 a 6. Das melhores metafases foram obtidas fotografias em fotomicroscópio Zeiss com objetiva de 100X, fator de projetiva 3,2X, fator de optovar 1,25X e filtros verdes Kodak 56 e 58. O filme utilizado foi "High Contrast Copy", da Kodak.

Para estudo da meiose em células mães de pólen, as inflorescências das 3 variedades foram colhidas nos meses de maio a junho de 1972 e 1973. A fixação foi feita em solução de álcool 95% e ácido acético glacial na proporção de 3:1 à temperatura ambiente, por um período de 8 a 10 horas. A conservação do material foi feita em álcool 70% em congelador à temperatura de aproximadamente -5°C.

Para o preparo das lâminas, as anteras foram retiradas das flôres sob lupa de objetiva 40X. Para cada lâmina foram utilizadas 3 anteras sobre as quais foi colocada uma gota de corante. As anteras foram seccionadas com o auxílio de uma lanceta e após levemente comprimida para a expulsão dos microsporócitos sendo, a seguir, removidos todos os fragmentos de anteras, ficando apenas microsporócitos sobre a lâmina. Cuidados especiais foram tomados por ocasião da colocação da laminula sobre o material pois, qualquer pressão exercida, ainda que pequena, causa a dilaceração das células. As lâminas que apresentavam boas condições de observação foram transformadas em permanentes 24 a 48 horas após, pelo mesmo processo utilizado para lâminas de pontas de raízes.

Dentre os corantes experimentados — carmim acético a 2%, a 1% e a 0,5%,orceína lactopropiônica a 2% e orceína acética a 2% — o último foi o que apresentou melhores resultados proporcionando boa coloração por ocasião do preparo das lâminas e não oxidando o citoplasma mesmo após 48 horas.

O pareamento dos cromossomos foi estudado em diacinese e metáfase I e a segregação dos mesmos em anáfase I e II. As fotografias foram obtidas seguindo o mesmo procedimento da mitose.

Com a finalidade de se obter uma estimativa do grau de fertilidade do pólen do material em estudo, foram coletadas panículas com anteras maduras ou seja, panículas que apresentavam algumas anteras pendentes, de todos os 20 clones individualmente. Cada panícula foi dividida em 3 partes iguais (superior, média e inferior) resultando de cada parte uma lâmina. Essa divisão foi feita para verificar possíveis diferenças de fertilidade do pólen quando se considera diferentes regiões da panícula. Cada parte da panícula foi batida sobre a lâmina, contendo uma gota da mistura de carmim acético a 2% e glicerina na proporção de 1:1.

A análise das lâminas foi realizada cerca de uma semana após a preparação, a fim de proporcionar a impregnação dos grãos de pólen pelo corante, sendo os mesmos classificados em coloridos (férteis) e não coloridos (estéreis). A observação das lâminas foi realizada utilizando-se objetiva de 10X.

RESULTADOS

1. Número somático de cromossomos

Os resultados obtidos quanto ao número somático de cromossomos das 3 variedades de *M. minutiflora* estudadas, estão expressos na tabela II.

Tabela II — Números somáticos de cromossomos em pontas de raízes

Variedades	Procedência	N.º de clones estudados	2n
Cabelo de Negro	Goiás	2	36
	Minas Gerais	2	36
	São Paulo	5	36
Francano	Minas Gerais	1	36
	São Paulo	2	36
Róxo	Goiás	2	36
	São Paulo	6	36

Como pode ser observado na tabela II, não houve variação quanto ao número cromossômico, $2n = 36$ (Fig. 1), nem entre os clones da mesma variedade, provenientes de diferentes procedências, nem entre as variedades dentro ou entre as procedências. Embora não tenha sido feita observação mais detalhada sobre o tamanho dos cromossomos, não foi observada muita variação quanto a esta característica.

2. Estudo da meiose em células mães de pólen.

A tabela III mostra os resultados do estudo do comportamento meiótico em diacinese e metáfase I das 3 variedades estudadas.

A normalidade de comportamento na meiose, refere-se ao pareamento em bivalentes em diacinese e metáfase I e a segregação normal em anáfase I e II; a anormalidade significa pareamento em associações múltiplas ou falta de pareamento e segregação anormal em anáfase I e II. Foi considerada segregação anormal, a ocorrência de retardatários em anáfase I e II, pois não foi possível contar o número de cromossomos segregantes nestas fases, devido a grande condensação e agrupamento dos mesmos.

Verificou-se anormalidades em todas as variedades, de todas as procedências, com respeito a ocorrência de alguns cromossomos não pareados enquanto outros apresentaram associações múltiplas.

Tabela III. Comportamento dos cromossomos das variedades estudadas em diacinese e metáfase I

Variedade	Procedência	Nº de clones analisados	Nº de células analisadas	Nº genético	Bivalentes			Univalentes			Trivalentes			Quadivalentes		
					média	ampli	Nº mais tarde	média	ampli	Nº mais tarde	média	ampli	Nº mais tarde	média	ampli	Nº mais tarde
Cabelo de Negro	Goiás	2	26	18	15,73	13-18	16	0,46	0-2	0	0,07	0-1	0	0,96	0-2	1
	Minas Gerais	2	22	18	16,00	14-18	16	0,77	0-2	0	0,04	0-1	0	0,77	0-1	1
	São Paulo	5	14	18	15,28 15,87	12-18	16	1,00 0,74	0-2	0	0,14 0,08	0-1	0	1,00 0,91	0-2	1
Fren-cano	Minas Gerais	1	12	18	16,08	14-18	16	0,25	0-2	0	0,08	0-1	0	0,83	0-2	1
	São Paulo	2	19	18	16,15 16,11	15-18	16	0,73 0,49	0-4	0	0 0,04	0	0	0,73 0,78	0-2	1
Rôxo	Goiás	2	21	18	16,47	15-18	16	0,38	0-2	0	0	0	0	0,66	0-1	1
	São Paulo	6	19	18	15,82 16,18	13-18	16	0,84 0,61	0-4	0	0 0	0	0	0,84 0,75	~2	1

Comparando-se as médias das 3 variedades, independente das procedências, pode-se observar que a variedade Rôxo, apresentou a mais alta média de bivalentes (16,18), seguida da variedade Francano (16,11) e Cabelo de Negro (15,87). Na variedade Rôxo não foram observados trivalentes e as médias de uni e quadrivalentes (0,61 e 0,75), respectivamente, foram intermediárias entre as das outras duas variedades.

Nesta comparação observa-se uma tendência da variedade Rôxo em apresentar maior média de bivalentes, com eliminação de trivalentes.

Em todos os clones, de todas as variedades estudadas, o tipo de associação mais frequente foi 16 bi e 1 quadrivalente (Fig. 2), embora ocorressem, com regular frequência, anormalidades maiores (Fig. 3) e em raras ocasiões fosse observada a ocorrência de 18 bivalentes (Fig. 4).

Os dados relativos ao estudo da segregação cromossômica nas 3 variedades, são apresentados na tabela IV. Esta tabela mostra o número de células com segregação normal e anormal, sua proporção, além da variação no número de retardatários nas últimas.

Comparando-se a proporção média de células com segregação normal nas 3 variedades, sem levar em conta as procedências, com as médias de bivalentes das mesmas, sob a mesma condição, observa-se que a variedade que apresentou maior média de bivalentes, Rôxo, foi a que apresentou segregação mais irregular.

De um modo geral, as variedades Cabelo de Negro e Francano tiveram uma predominância na proporção de células com segregação normal e na variedade Rôxo predominaram células com segregação anormal. Um aspecto de células com segregação normal está representado nas figuras 5 e 6 e com segregação anormal nas figuras 7 e 8.

A ocorrência de pontes em anáfase I (figura 9) foi observada somente em duas células da variedade Rôxo, sendo uma em um clone procedente de Goiás e a outra em um clone de São Paulo. Embora não tenha sido feita análise de micronúcleos nas tétradas, por dificuldade de observação, em alguns casos esta constatação foi possível como mostra a figura 10.

Tabela IV. Segregação cromossômica na primeira e segunda divisões da meiose.

Variedade	Procedência	Nº de gametócitos analisados	Nº de clones analisados	Anáfase I		Nº de retardatários (variação)	Anáfase II		Nº de retardatários (variação)		
				Nº de células com segregação normal (proporção)	anormal		Nº de células com segregação normal (proporção)	anormal			
Cabelo de Negro	Goiás	18	2	22	1,8:1,0	12	1-2	57	1,4:1,0	41	1-3
	Minas Gerais	18	2	21	1,0:1,0	21	1-7	89	1,1:1,0	84	1-4
	São Paulo	18	5	63	1,3:1,0	48	1-6	28	1,4:1,0	20	1-2
				35	1,3:1,0	27		58	1,2:1,0	48	
Francano	Minas Gerais	18	1	31	1,7:1,0	18	1-5	49	1,1:1,0	35	1-4
	São Paulo	18	2	37	1,4:1,0	27	1-5	94	1,7:1,0	54	1-5
					34	1,5:1,0	22		71	1,6:1,0	44
Rôxo	Goiás	18	2	34	0,8:1,0	43	1-10	25	0,7:1,0	35	1-9
	São Paulo	18	6	75	1,0:1,0	74	1-9	151	0,9:1,0	166	1-5
					54	0,9:1,0	58		88	0,8:1,0	100

3. Fertilidade do pólen e sua relação com o comportamento meiótico.

Na tabela V são apresentados os resultados referentes à fertilidade do pólen. Nessa tabela são apresentados a porcentagem de grãos de pólen coloridos obtidos nas 3 posições da panícula para cada uma das 3 variedades nas 3 regiões, a porcentagem média de pólen colorido por variedade por região, o número de clones e grãos de pólen analisados, além da amplitude de variação na porcentagem de pólen colorido em cada variedade.

De modo geral, os clones das 3 variedades não mostraram diferenças na fertilidade do pólen nas 3 diferentes posições da panícula, embora exista pequena tendência para maior porcentagem de fertilidade na posição superior.

Comparando-se a porcentagem média de pólen colorido para cada variedade dentro das regiões, com os dados de segregação dos cromossomos na segunda divisão meiótica, observou-se que em todas as variedades e regiões houve uma perfeita concordância dos resultados. Por outro lado, comparando-se a porcentagem média de pólen colorido por variedade, sem levar em consideração a procedência, com a proporção média de células apresentando segregação normal, sob a mesma condição, observou-se concordância de resultados para a variedade Rôxo e uma inversão para as demais.

Tabela V. Dados da fertilidade do pólen, pelo método da coloração.

Variedade	Procedência	Nº de clones analisados	Nº de grãos de pólen observados	% de grãos de pólen colorido (posição na panícula)			% de pólen colorido média por região	Amplitude
				superior	média	inferior		
Cabelo de Negro	Goiás	2	2.319	64,30	54,29	62,50	59,32	39,4-75,5
	Minas Gerais	2	1.075	54,64	57,00	57,66	56,14	
	São Paulo	5	3.407	64,54	60,55	59,78	61,72	
				61,16	57,28	59,98	59,09	
Francano	Minas Gerais	1	823	45,87	47,34	53,84	48,23	46,7-68,1
	São Paulo	2	1.639	57,79	59,38	51,64	57,16	
					51,83	53,36	52,74	
Rôxo	Goiás	2	1.253	51,95	43,58	43,25	46,92	30,0-72,2
	São Paulo	6	4.192	53,12	47,69	52,21	50,97	
					52,53	45,63	47,73	
		20	14.708	x geral			53,57	

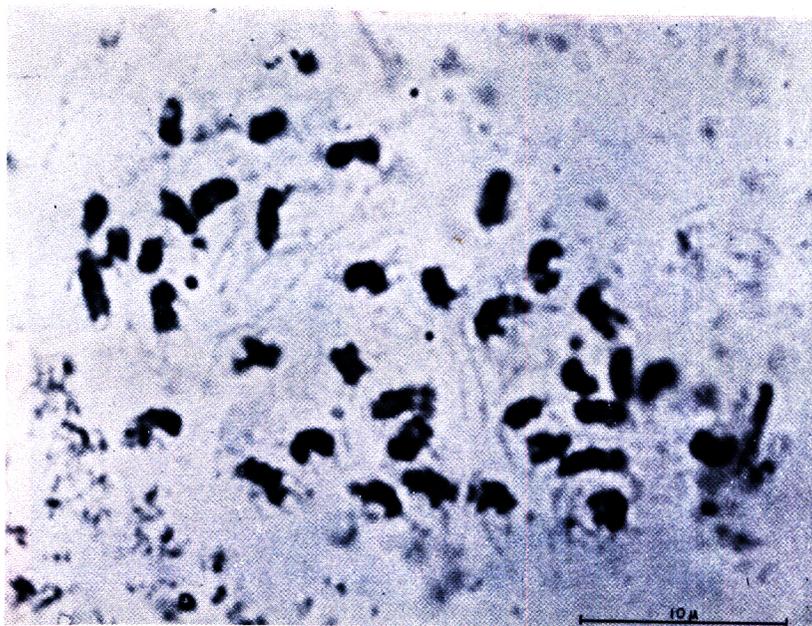


Figura 1 — Metáfase mitótica em pontas de raízes ($2n = 36$).

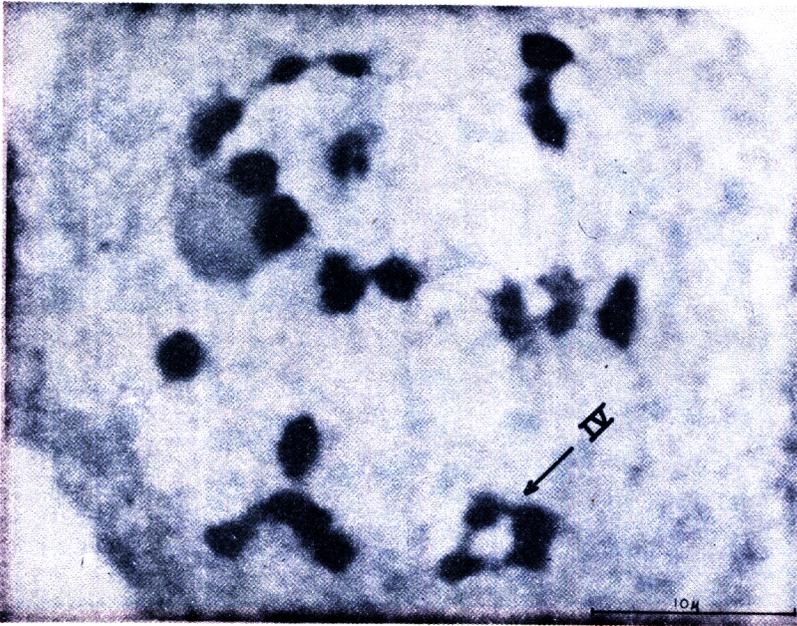


Figura 2 — Diacinese em célula mãe de pólen com pareamento anormal (1 IV, 16 II).

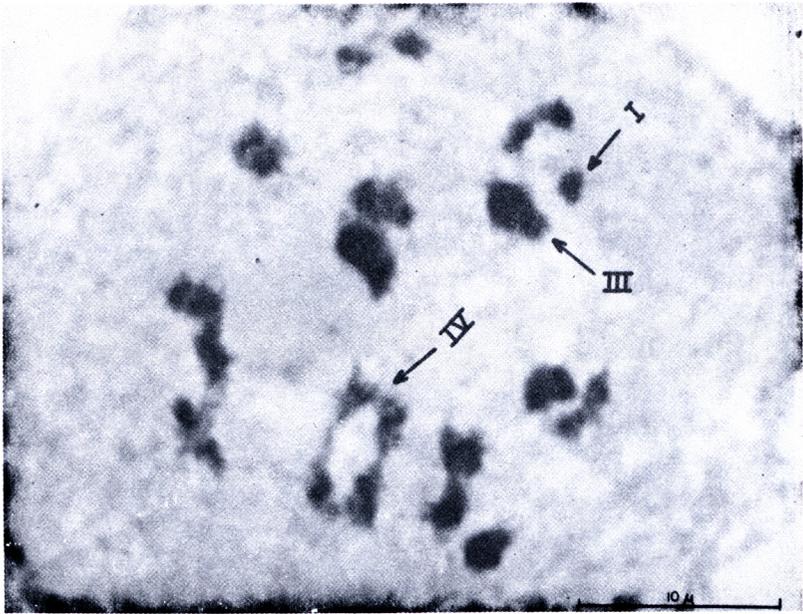


Figura 3 — Diacinese em célula mãe de pólen com pareamento anormal (1 IV, 1 III, 14 II, 1 I).

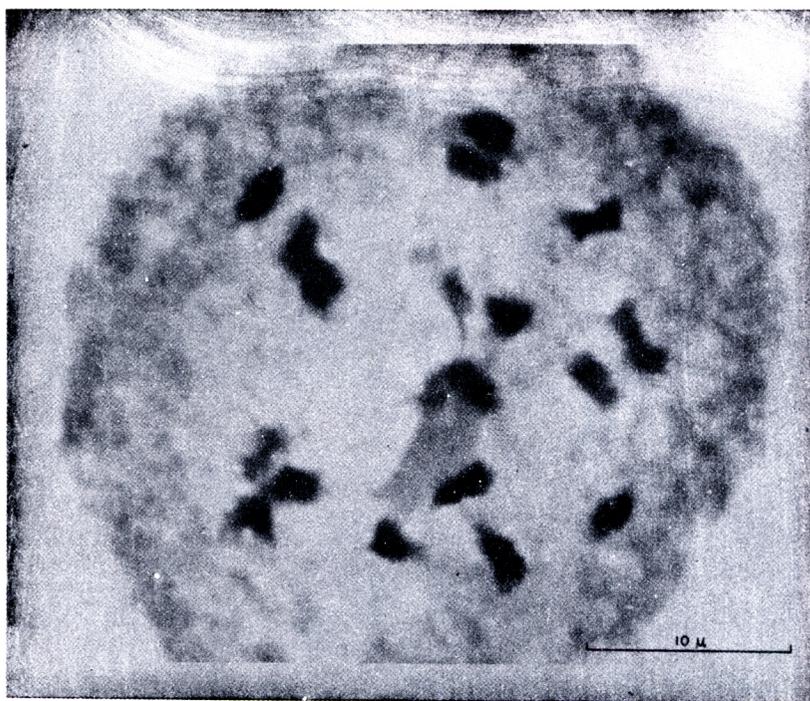


Figura 4 — Diacinese em célula mãe de pólen com 18 II.

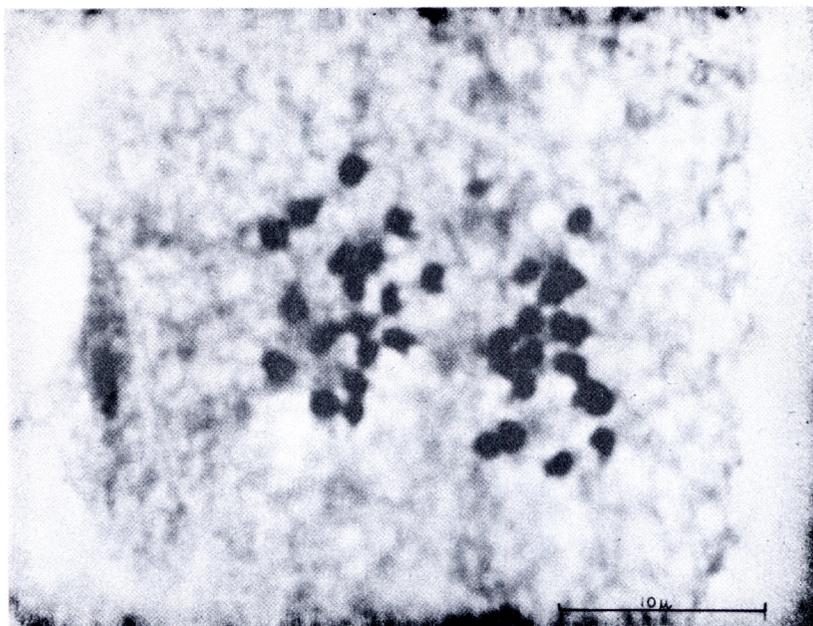


Figura 5 — Anáfase I em célula mãe de pólen com segregação normal.

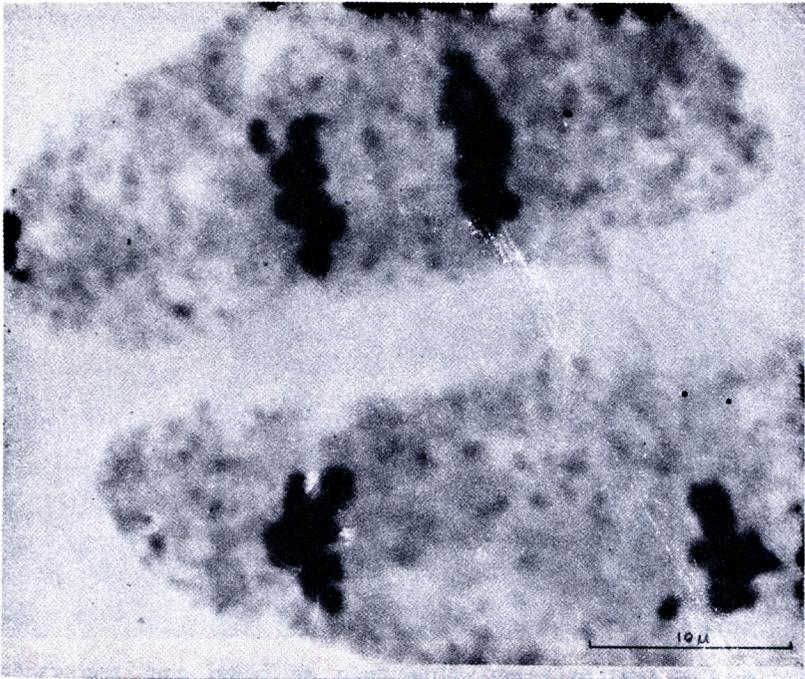


Figura 6 — Anáfase II em célula mãe de pólen com segregação normal.

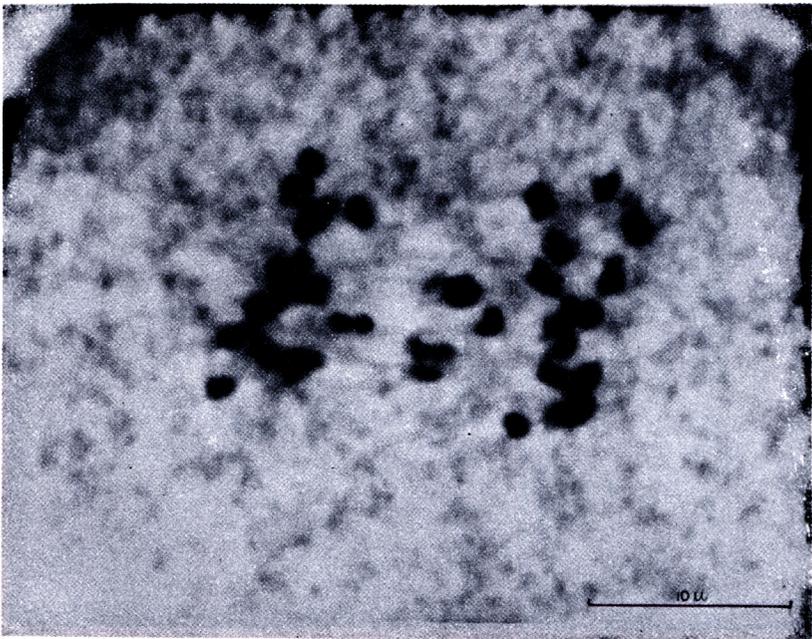


Figura 7 — Anáfase I em célula mãe de pólen com segregação anormal (cromossomos retardatários).

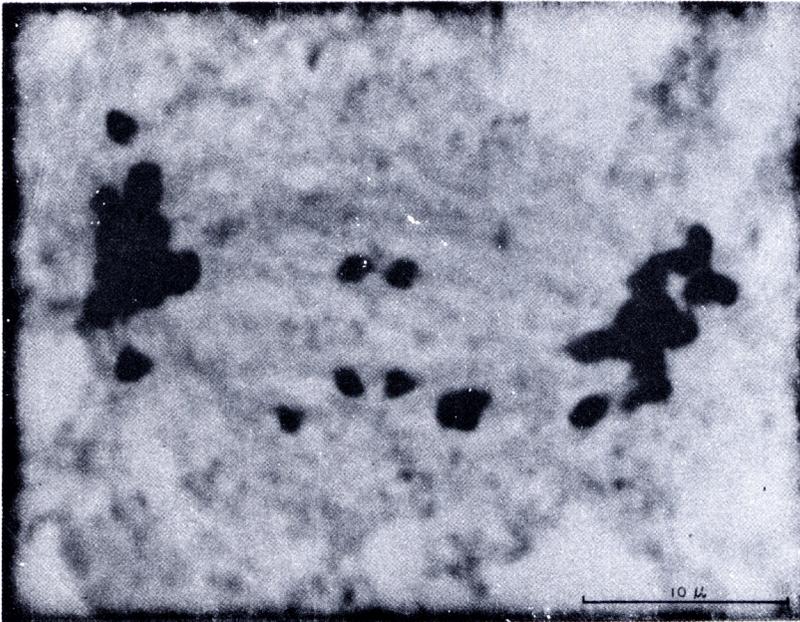


Figura 8 — Anáfase II em célula mãe de pólen com segregação anormal (cromossomos retardatários).

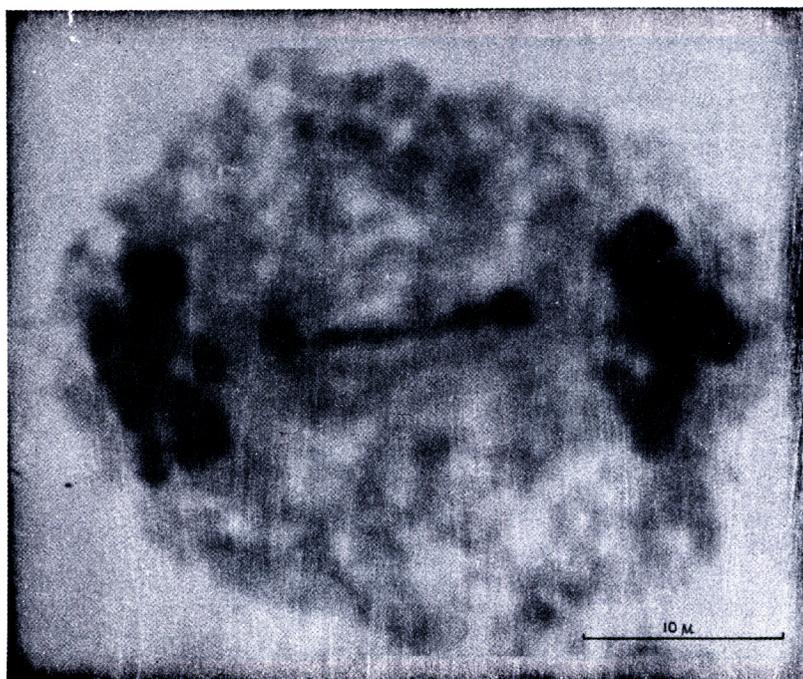


Figura 9 — Anáfase I em célula mãe de pólen mostrando ponte.

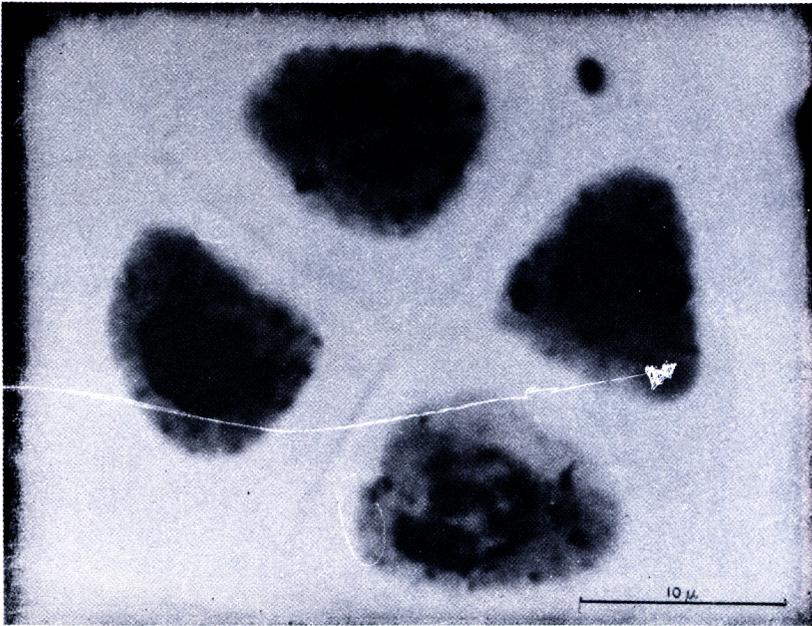


Figura 10 — Tétrade de células mostrando micronúcleos.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos estudos das 3 variedades de *M. minutiflora* mostraram que o número de cromossomos foi $2n=36$ para todas as variedades. Isto confirma o número anteriormente determinado para a espécie por outros autores como AVDULOV (apud HUNTER, 14), HUNTER (14), MYERS (23), MOFFETT e HURCOMBE (19), JACQUES-FELIX (16) e TATEOKA (34).

As características morfológicas que diferenciam as variedades, como ausência ou presença de artistas, pigmentação da parte vegetativa e inflorescência, hábito de crescimento, além de outras, são aparentemente mais de natureza genética do que citológica. Sabe-se que durante os processos evolutivos que envolvem a formação das espécies, raças e variedades, são as mutações a fonte primária da variabilidade. Apesar da frequência de mutações que ocorrem na natureza ser muito baixa, elas devem ter desempenhado um papel importante na diferenciação destas variedades.

Segundo WHYTE et alii (35) não existem linhagens melhoradas de *M. minutiflora*, ocorrendo apenas variedades mais ou menos distintas, no Brasil. Portanto, a diferenciação dessas variedades dentro da espécie, provavelmente tenha surgido naturalmente no decorrer de um espaço de tempo relativamente grande, até que as mesmas atingissem as condições atuais.

Segundo STEBBINS (31) as diferenças morfológicas podem se originar por alterações no tamanho dos cromossomos devido a trocas estruturais o que, no presente caso, não parece provável pois, apesar de não ter sido possível uma análise detalhada dos cromossomos, observou-se que seu tamanho não apresentou variação de uma variedade para outra. Outra evidência da não ocorrência de trocas estruturais foi a quase ausência de pontes cromossômicas.

Em gramíneas, segundo CARNAHAN e HILL (4), o número básico varia de $x=4$ a $x=23$.

Todas as espécies dos dois gêneros que constituem a tribo Melinideae, estudadas citologicamente até o presente mostraram possuir número básico $x=9$ cromossomos. Portanto, existem indicações de que a espécie *M. minutiflora*, com $2n=36$, pertencente a esta tribo, seja um poliploide de número básico $x=9$. Tal possibilidade, aliás, já havia sido aventada por todos os outros autores que estudaram anteriormente os cromossomos desta espécie.

Os resultados do comportamento meiótico das variedades estudadas não dão indicação precisa se *M. minutiflora* é um auto ou alopoliploide. Normalmente espera-se dos alopoliploides a formação de bivalentes e nos autopoliploides a formação de multivalentes. Foi observado, no presente material, alta frequência de bivalentes e pequena frequência de univalentes e multivalentes.

GILLES e RANDOLPH (11) referem que a ausência de quadrivalentes não é aceitável como prova de origem alopoliploide por duas razões:

1 — limitado número de autotetraploides experimentais, especialmente aqueles com cromossomos pequenos, formam quase que exclusivamente bivalentes;

2 — associações multivalentes dos cromossomos, as quais são características dos autopoliploides de origem recente, podem não persistir indefinidamente em sucessivas gerações, mas desaparecerem gradual ou abruptamente e serem substituídas por pareamento biva-

lente regular. É possível pois, que muitos poliploides naturais com pareamento regular em bivalentes tenham se originado como autopoliploides. A troca de multivalentes para bivalentes pode ocorrer por diferenciação dos cromossomos ou por genes específicos que afetam o pareamento.

Vários exemplos de controle genético do pareamento em poliploides são conhecidos.

Uma tendência para formar bivalentes, controlada geneticamente, foi encontrada em *Phleum pratense* triploide, por MUNTZING e PRAKKE (22). Em trigo hexaploide, o pareamento em bivalentes é controlado por um gene situado no cromossomo 5B (RILEY e CHAPMAN, 26 e SEARS e OKAMOTO, 28).

STEBBINS (29 e 31) apontou as dificuldades na distinção entre duas categorias de poliploides (auto e alopoliploide segmentar). As fontes usuais de informações sobre o tipo de poliploide provem da natureza da associação dos cromossomos na metáfase I. A presença de associações multivalentes em um poliploide, como resultado da homologia entre cromossomos paternos, ordinariamente indica autopoliploidia e sua ausência, devido a não homologia entre os cromossomos, sugere alopoliploidia.

Em *M. minutiflora* a frequência de quadrivalentes (no máximo 2 por célula), deixa em dúvida a natureza da espécie.

GILLES e RANDOLPH (11), foram os primeiros a demonstrar uma redução na frequência de multivalentes em linhagens autotetraploides, de milho, artificialmente induzidas. Essas linhagens após 10 anos de seleção para fertilidade formaram predominantemente, senão exclusivamente, bivalentes. SWAMINATHAN e SULBHA (32) também observaram redução de multivalentes em autotetraploides experimentais de *Brassica campestris*. No entanto, MORRISON (20), McCOLLUM (18), e MORRISON e RAJHATHY (21), não observaram tal redução de multivalentes estudando autopoliploides naturais e induzidos em *Dactylis* e *Secale*.

A possibilidade da origem de *M. minutiflora* a partir da poliploidização de híbridos entre espécies muito distantes é improvável levando-se em conta a ocorrência de multivalentes, os quais indicam certa homologia entre cromossomos. Tais associações indicando homeologia de alguns cromossomos ou segmentos cromossômicos dos genomas envolvidos no híbrido levam a supor, no caso de tratar-se de um alopoliploide, que a espécie tenha se originado pelo cruzamento entre indivíduos com algum relacionamento genético. Com os dados disponíveis existe certa dificuldade em decidir sobre a possível natureza de origem da espécie, se por auto ou alopoliploidia, embora as evidências pareçam favorecer mais a segunda hipótese.

A existência de anormalidades meióticas, geralmente, reflete-se em queda na fertilidade do pólen. Multivalentes e univalentes podem apresentar segregação cromossômica irregular, com caminharmento adiantado ou atrasado em relação aos bivalentes, possibilitando a ocorrência de perdas, o que trará como consequência a formação de gametas com números irregulares de cromossomos. No geral, a falta de cromossomos causa alteração no balanço gênico de células e esterilidade do pólen. Também, um número de cromossomos extra pode causar esta esterilidade, apesar de ser menos comum. Essas irregularidades ocorreram nas variedades estudadas, o que pode ter influenciado na formação de sementes.

MARTINS e OLIVEIRA (17), estudando a formação de sementes em *M. minutiflora*, encontraram baixa formação de sementes férteis, 32,48%. A baixa fertilidade do pólen observada no presente trabalho, em média 53,57%, pode explicar, pelo menos parcialmente, esta baixa fertilidade da semente.

Os dados de pareamento e fertilidade do pólen mostraram tendências divergentes. Analisando-se as variedades, independente de seus locais de procedência, observou-se que em função da frequência de bivalentes esperava-se maior fertilidade do pólen para a variedade Rôxo, seguida pelas variedades Francano e Cabelo de Negro, o que não se verificou. A variedade Rôxo, a qual mostrou a mais alta frequência de bivalentes foi, no entanto, a que apresentou mais baixa porcentagem de pólen fértil, ocorrendo exatamente o contrário com a variedade Cabelo de Negro.

Relacionando-se variedades com os locais de procedência observou-se que as tendências no aumento da média de bivalentes foram completamente inversas em relação as tendências no aumento da fertilidade do pólen, para Cabelo de Negro e Rôxo. Somente a variedade Francano mostrou tendências iguais, quanto a estes aspectos, nos dois locais.

Tais resultados, de modo geral, parecem sugerir diferentes mecanismos de controle envolvidos no pareamento cromossômico e fertilidade do pólen.

Ainda que a propagação vegetativa possa ser utilizada em *M. minutiflora* e seja prática comum em algumas gramíneas forrageiras, no geral, como acontece também na maioria das forrageiras tropicais, o plantio de sementes é o único modo prático de estabelecimento de pastagens e qualquer aumento substancial na área de pastagens cultivadas implica em adequado suprimento de sementes a preços razoáveis. Portanto, a fertilidade da semente é fator de extrema importância para os criadores sendo mesmo, em certos casos, limitante.

A esterilidade da semente em *M. minutiflora*, como ficou indicado é consequência, pelo menos parcialmente, de irregularidades melóticas. Desse modo, qualquer programa que vise melhorar esta gramínea e, conseqüentemente a produção de sementes, deve levar em consideração estes fatos.

Embora os dados obtidos não sejam suficientes para uma afirmação categórica eles indicam uma certa variação tanto em relação ao tipo de pareamento quanto na fertilidade do pólen entre as variedades estudadas. A variação existente nas variedades, em relação a estas irregularidades, abre certa possibilidade de ser feito melhoramento para maior regularidade na meiose e conseqüentemente maior produção de sementes dependendo naturalmente em se determinar, com precisão, os mecanismos genéticos causadores dessas aberrações.

É interessante observar que BOGDAN (1) refere que a seleção realizada em variedades de *M. minutiflora*, em Kenya na Africa, visando resistência a um vírus da folha, resultou em decréscimo na produção de sementes. Isto pode trazer dificuldades em programas de melhoramento, principalmente, se for extensivo a outras características como produção de massa verde, etc.

A aogamia foi sugerida como o modo de reprodução da espécie *M. minutiflora* por MARTINS e OLIVEIRA (17), no entanto, dados da literatura (HUTTON, 15 e BOGDAN, 1) referem que a espécie tem propagação apomítica.

As espécies de gramíneas apomíticas estudadas por HUTTON (15) mostraram ser pseudogâmicas, o que, segundo o autor, se torna vantajoso se tipos sexuais puderem ser identificados para utilização em cruzamentos.

A apomixia, é um processo particular usado na perpetuação e estabilidade dos poliploides, pois confere vantagens na acumulação de qualquer troca estrutural ocorrida nos cromossomos. Portanto, a hipótese de reprodução apomítica desta espécie não pode ser desprezada e a sua ocorrência diminuiria ou eliminaria a influência das aberrações citológicas observadas na fertilidade das sementes.

CONCLUSÕES

Face aos resultados obtidos pode-se enumerar as seguintes conclusões:

- 1 — O número somático de cromossomos determinado em células de pontas de raízes foi $2n=36$, em todas as variedades.
- 2 — Em relação aos números de cromossomos encontrados em outras espécies da tribo Melnideae, a que pertence *M. minutiflora*, o número $2n=36$ indica a ocorrência de poliploidia.
- 3 — A ocorrência de alta frequência de bivalentes e pequena frequência de univalentes e multivalentes, assim como a ausência de outras informações dificultam a decisão sobre a natureza alo ou autopoliploide da espécie.
- 4 — Observou-se anormalidades melóticas e esterilidade do pólen, o que é uma das causas da baixa formação de sementes.
- 5 — A existência de variação entre as variedades, tanto no pareamento cromossômico como na fertilidade do pólen, abre a possibilidade de melhoramento da fertilidade da semente.
- 6 — Observou-se que houve divergências nas tendências das variações sendo que o aumento na média de bivalentes, no geral, não foi acompanhado pelo aumento na fertilidade do pólen. Isto sugere a existência de diferentes mecanismos de controle com relação a irregularidade meiótica e fertilidade do pólen.
- 7 — Nos programas de melhoramento de variedades da espécie, deve ser levado em consideração as aberrações citológicas como fator importante influenciando a produção de sementes.
- 9 — É importante um estudo mais detalhado sobre o modo de reprodução da espécie pois na eventualidade da ocorrência de apomixia, como sugerido por alguns autores, as irregularidades meióticas perdem parte de sua importância.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BOGDAN, A.V. 1966. — "Plant introduction, selection, breeding and multiplication". (in): DAVIES, W. e SKIDMORE, C.L. *Tropical pasture*. London, Faber and Faber Ltd. pp. 75-88.
- 2 — BOOTH, W.E. 1964. "Cytology and evolution of the grasses". (in): *Agrostology*. Michigan, Edwards Brothers Inc. pp. 130-131.
- 3 — BURNHAM, C.R. 1964. — *Discussions in cytogenetics*. Minneapolis, Burgess Publishing Company. 375. p.
- 4 — CARNAHAN, H.L. e HILL, H.D. 1961 — Cytology and Genetics of forage grasses. *The Botanical Review* 27 (1): 1-131.

- 5 — CELARIER, R. 1956. — Tertiary butyl alcohol dehydration of chromosome smears. *Stain Technology* 31: 155-157.
- 6 — CHIPPINDALL, L.K.A. 1955. — "A guide to identificate on of grasses". (in): MEREDITH, D. *The grasses and pastures of South Africa*. Africa, Cape Times Ltd. pp. 426-427.
- 7 — DARLINGTON, C.D. e LA COUR, L.F. 1969. — *The handling of chromosomes*. 5.^o ed. London, George Allen & Unwin Ltd. 272 p.
- 8 — De WET, J.M.J. 1954. — Chromosome number of a few South African grasses *Cytologia* 19: 97-103.
- 9 — De WET, J.M.J. e ANDERSON, L.J. 1956. — Chromosome numbers in Transvaal grasses. *Cytologia* 21: 1-10.
- 10 — ENGLER, A. 1964. — *Syllabus der pflanzenfamilien*. Berlin. Gebrüder Borntraeger. vol. II. 666 p.
- 11 — GILLES, A. e RANDOLPH, L.F. 1951. — Reduction of quadrivalent frequency in autotetraploid maize, during a period of 16 years. *American Journal of Botany* 38: 12-17.
- 12 — HARTLEY, W. 1958. — Studies on the origin, evolution, and distribution of the Gramineae. II. The tribe Paniceae. *Australian Journal of Botany* 6: 343-357.
- 13 — HAVARD-DUCLOS, B. 1967. — *Les plantes fourragères tropicales*. Paris, G. P. Maisonneuve & Larosé. 397 p.
- 14 — HUNTER, A.W.S. 1934. — A karyosystematic investigation in the Gramineae. *Canadian Journal of Research* 11: 213-214.
- 15 — HUFFON, E.M. 1964 — "Plant breeding and genetics". (in): *Some concepts and methods in substancial pastures research*. England, Commonwealth Agricultural Bureaux. pp. 79-101.
- 16 — JACQUES-FELIX, E. 1962. — *Les graminées d'Afrique Tropicale*. I. Généralités, Classification description des genres. *Bulletin Scientifique* 8: 250-252.
- 17 — MARTINS, P.S. e OLIVEIRA, E.M.P. 1971. — Estudo sobre o modo de reprodução de capim gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.) Relatório Científico do Instituto de Genética, E.S. A.L.Q. — U.S.P. 5: 100-103.
- 18 — McCOLLUM, G.D. 1958. — Comparative studies of chromosome pairing in natural and induced tetraploide *Dactylis*. *Chromosome* (Berlin) 9: 571-605.
- 19 — MOFFETT, A.A. e HURCOMBE, R. 1949. — Chromosome numbers of South African grasses. *Heredity* 3: 369-373.
- 20 — MORRISON, J.W. 1956. — Chromosome behaviour and fertility of Tetra-Petkus rye. *Canadian Journal of Agricultural Science* 36: (3): 157-165.
- 21 — MORRISON, J.W. e RAJHATHY, T. 1960. — Chromosome behaviour in autotetraploid cereals and grasses. *Chromosoma* (Berlin) 11: 297-309.
- 22 — MUNTZING, A. e PRAKKEN, R. 1940. — The mode of chromosome pairing in *Phleum* twins with 63 chromosomes and its cytogenetic consequences. *Hereditas* 26: 463-501.

-
- 23 — MYERS, W.M. 1947. — Cytology and genetics of forages grasses. *The Botanical Review* 13 (6): 319-367.
- 24 — OTERO, J.R. 1961. — **Informações sobre algumas plantas forrageiras 2.ª ed.** Rio de Janeiro, S.I.A. — Ministério da Agricultura. Série didática n.º 11. 331 p.
- 25 — POHELMAN, J.M. 1965. — **Mejoramiento genetico de las cosechas.** trad. DURON, N.S. México, Editorial Limusa-Wiley, S.A. 453 p.
- 26 — RILEY, R. e CHAPMAN, V. 1958. — Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature* (London) 182: 713-715.
- 27 — ROSTON, A.J. 1970. — **Nutrição animal e pastagens: produção de alimentos.** Campinas — SP, Secretaria da Agricultura, CATI (mimeografado). 71 p.
- 28 — SEARS, E.R. e OKAMOTO, M. 1958. — Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat. *Proceedings of the 10 th Congress International of Genetics.* Vol. 2 pp. 258-259.
- 29 — STEBBINS, G.L. Jr. 1947. — Types of polyploids: their classification and significance. *Advances in Genetics* 1: 403-429.
- 30 — STEBBINS, G.L. Jr. 1947. — Cytogenetics and evolution in the grass family. *American Journal of Botany.* 43: 890-905.
- 31 — STEBBINS, G.L. Jr. 1957. — **Variation and evolution in plants.** New York, Columbia University Press. 643 p.
- 32 — SWAMINATHAN, M.S. e SULBHA, K. 1959. — Multivalent frequency and seed fertility in raw and evolved tetraploids of *Brassica campestris* var. toria. *Zeitschrift für Vererbungslehre* 90: 385-392.
- 33 — SWANSON, C.P., MERZ, T. e YOUNG, W.J. 1969. — **Citogenética,** trad. PERONDINI, A.L.P. e PERONDINI, D.R. São Paulo, Editora Poligono. 244 p.
- 34 — TATEOKA, T. 1965. — Chromosome numbers of some East African grasses. *American Journal of Botany* 52 (8): 864-869.
- 35 — WHYTE, R.O., MOIR, T.R.G. e COOPER, J.P. 1962. — **Grasses in agriculture 2.ª ed.** Roma, F.A.O. 417 p.