

## COMUNICAÇÃO

# VIABILIDADE POLÍNICA COMO SELEÇÃO ASSISTIDA NO PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE TRITICALE

### Pollen viability as assisted selection in the triticale genetic breeding program

Maira Zanotto<sup>1</sup>, Sandra Patussi Brammer<sup>2</sup>, Alfredo do Nascimento Junior<sup>3</sup>, Sandra Mansur Scagliusi<sup>4</sup>

#### RESUMO

Neste trabalho, objetivou-se analisar a viabilidade de grãos de pólen de 52 genótipos de triticale, oriundos do bloco de cruzamentos do programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo do ano de 2005. A coleta das espigas foi realizada quando as plantas se encontravam na fase anterior à antese. As análises citológicas foram realizadas fixando as anteras de uma mesma espiga em fixador Carnoy. Para a análise polínica, as lâminas foram confeccionadas usando-se três anteras da mesma flor, oriundas das regiões basal, mediana e apical de uma espiga, totalizando nove lâminas por genótipo. Para cada lâmina, foram contados cerca de 200 grãos de pólen, classificando-os em duas categorias: 1) normais ou viáveis e 2) anormais. Os dados foram analisados e as médias comparadas pelo teste de Duncan 5%. A análise de variância demonstrou haver diferenças significativas em relação à viabilidade polínica entre os 52 genótipos observados. A grande maioria dos genótipos apresentou viabilidade polínica superior a 90%. A seleção assistida, via análise citológica de grãos de pólen, é potencialmente útil para um programa de melhoramento genético vegetal, uma vez que cruzamentos feitos entre plantas portadoras de pólen inviáveis resultarão em plantas estéreis e numa menor produção de grãos.

**Termos para indexação:** *Triticosecale* Wittmack, citogenética, grãos de pólen.

#### ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the pollen grain viability of 52 triticale genotypes from the 2005 crossing block of the Embrapa Wheat breeding program. The spikes were collected prior to anthesis and cytological analyses were performed upon fixing the anthers from the basal, medium, and apical regions of the spike and replicated three times for each sample. For each slide, about 200 pollen grains were analyzed and they were classified into two different groups: 1) normal or viable and 2) non-viable or abnormal. The obtained data were analyzed and the means were compared by the Duncan test at 5% probability. The results of analysis of variance demonstrated that the differences among the genotypes were highly significant. However, most of the genotypes studied showed a high percentage of normal pollens. Cytological analysis of the pollen grain is potentially useful as assisted selection in a breeding program, especially to decrease the possibility of obtaining sterile plants or plants with less grain production.

**Index terms:** *Triticosecale* Wittmack, cytogenetics, pollen grain.

(Recebido em 24 de janeiro de 2008 e aprovado em 22 de outubro de 2008)

O triticale (*Triticosecale* Wittmack) é um híbrido intergenérico originado do cruzamento entre o trigo (*Triticum* spp.) como o parental feminino e o centeio (*Secale* spp.) como parental masculino (Oettler, 2005), sendo o primeiro cereal criado pelo homem. Trata-se de um anfidiplóide sintético, podendo conter em seu genoma 56 ou 42 cromossomos. Os triticales octoplóides têm 56 cromossomos, oriundos da hibridação do trigo hexaplóide ( $2n=6X=42$ ) com o centeio diplóide ( $2n=2X=14$ ), possuindo 28 pares de cromossomos (21 do trigo, 7 do genoma A, 7 do genoma B e 7 do genoma D) e mais 7 pares de cromossomos R do centeio. Os hexaplóides, com 42

cromossomos, são oriundos do cruzamento entre trigo tetraplóide ( $2n=4X=28$ ) e o centeio diplóide.

O triticale é primário, quando provém diretamente do cruzamento entre espécies ancestrais (trigo e centeio) e secundário, quando resulta do cruzamento entre primários ou destes com outros secundários (Baier & Nedel, 1985). São denominados completos ou triticales hexaplóides, os que contêm todos os sete pares de cromossomos dos genomas "A" e "B", do trigo, e "R", de centeio. São denominados substituídos, os triticales hexaplóides em que um ou mais cromossomos de centeio foram substituídos por cromossomos de trigo (Baier et al., 1996).

<sup>1</sup> Bióloga, Universidade de Passo Fundo, BR 285 Km 171, Passo Fundo, RS – maira\_zanotto@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Bióloga, Doutora em Genética e Biologia Molecular, Embrapa Trigo, BR 285, Km 294, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS – sandra@cnpt.embrapa.br

<sup>3</sup> Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fitotecnia, Embrapa Trigo, BR 285, Km 294, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS – alfredo@cnpt.embrapa.br

<sup>4</sup> Bióloga, Doutora em Biologia Vegetal, Embrapa Trigo, BR 285, Km 294, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS – mansur@cnpt.embrapa.br

Contudo, em determinados genótipos e de acordo com a constituição, hexaplóide ou octoplóide, instabilidade genética pode ser observada por meio de variação fenotípica acentuada durante a multiplicação de sementes, acarretando prejuízos na formação da planta e do grão e eliminação de áreas e lotes de sementes. Por isso, é de extrema importância que genótipos de triticales sejam analisados geneticamente, principalmente quanto ao nível da variabilidade polínica, para detecção de possíveis anormalidades que possam refletir na uniformidade de plantas selecionadas ou linhas avançadas, visando a contribuir com o melhoramento genético, e com a multiplicação de sementes durante o desenvolvimento da cultivar.

Dentre as análises citológicas importantes e que devem ser utilizadas como seleção assistida ao programa de melhoramento genético, destaca-se a descrito por Love (1949), a qual ainda vem sendo empregado rotineiramente para muitas espécies agrícolas. Nesse caso, o autor descreve que esse estudo é muito simples para determinar se o comportamento meiótico dos cromossomos é normal, por meio da análise de pólenes ou micrósporos, com um ou mais micronúcleos. Assim, rapidamente pode-se examinar uma centena de pólenes e contar o número de micronúcleos em cada um deles. O exame de pólenes jovens é, então, um método rápido para determinar as anormalidades de comportamento cromossômico durante a meiose. Quando observados em fase mais tardia ou de desenvolvimento mais avançado, a análise de grãos de pólen permite avaliar algumas características anatômicas e fisiológicas importantes, fundamentais para a sua completa maturação e desenvolvimento, tais como: número de núcleos e poros, tamanho do pólen e quantidade de amido. Portanto, os estudos dos quartetos servem de critério adicional ao programa de melhoramento, ou seja, plantas que são anormais citologicamente podem ser descartadas ou reservadas para estudos posteriores mais intensos (Love, 1949).

As revisões de Falcão et al. (1981) e Moraes-Fernandes (1982), quanto aos aspectos citológicos e genéticos, destacam que inúmeras são as informações da literatura a respeito de associação entre fertilidade de semente e anomalias meióticas, sendo muitas delas contraditórias. Os autores também enfatizam que a relação entre a fertilidade da semente e as aberrações cromossômicas é difícil de ser demonstrada. Desde a fertilização até a obtenção da semente madura, muitos outros fatores genéticos e ambientais estão envolvidos, além da regularidade meiótica. Por outro lado, as

consequências de pequenas deficiências gaméticas podem se tornar evidentes em etapas posteriores do desenvolvimento. Se a deficiência cromossômica, consequente de um distúrbio meiótico, não for relacionada com funções essenciais à formação do grão, não será detectada a associação entre anomalias meióticas e fertilidade. Já na descendência de plantas estáveis, supõe-se que haverá maiores possibilidades de se verificar a existência dessa relação.

Neste trabalho, objetivou-se realizar a análise citológica de grãos de pólenes em genótipos de triticales oriundos do bloco de cruzamentos da Embrapa Trigo, visando a estudar a sua viabilidade e consequente uniformidade fenotípica a campo.

Foram analisados 52 genótipos de triticales, oriundos do bloco de cruzamentos do programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo do ano de 2005, sendo que o plantio da primeira geração (plantas mães) foi efetuado em campo em três diferentes épocas. A primeira semeadura foi efetuada no dia 04 de junho de 2005 e as demais a intervalos de 15 dias entre cada uma. A semeadura mecânica foi realizada em parcelas de seis linhas de três metros de comprimento, com espaçamentos de dezessete centímetros entre linhas e de vinte centímetros entre parcelas. A distância média entre os grãos foi de três a cinco centímetros. O bloco de cruzamentos foi delimitado por uma bordadura de duas linhas da cultivar Triticale BRS 203, a qual serviu como um parâmetro de comparação.

A coleta das espigas foi realizada quando as plantas estavam na fase anterior à antese. Após a coleta, as espigas, devidamente identificadas, foram imediatamente fixadas em Carnoy (álcool etílico: ácido acético glacial, 3:1), mantidas em temperatura ambiente por 24 horas e em seguida, transferidas para álcool 70%, sendo estocadas a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para a análise polínica, as lâminas foram confeccionadas usando-se três anteras da mesma flor, oriundas das regiões basal, mediana e apical de uma mesma espiga, com três repetições, totalizando nove lâminas por genótipo e a coloração foi realizada com carmim acético (1%). A escolha do referido corante deveu-se ao fato de que o mesmo é usado nas análises de rotina de inúmeros laboratórios, principalmente em estudos de viabilidade polínica de cereais de inverno, embora para algumas espécies possa apresentar limitações. Para cada lâmina foi inicialmente estipulada a contagem de 200 grãos de pólen. Os pólenes analisados foram agrupados em dois diferentes grupos: 1) pólenes normais (micrósporos, pólenes binucleados e trinucleados) e 2) pólenes anormais, com

mais de um poro e ou pólenes vazios. Os dados foram analisados considerando a porcentagem dos pólenes normais e viáveis.

Em razão da natureza dos dados, proporção de pólenes normais, fez-se necessária a aplicação de manipulações matemáticas para a normalização das análises estatísticas, principalmente pelo fato de que nem sempre conseguiu-se a análise das 200 células por planta. A transformação utilizada é descrita pela função arco-seno aplicada à raiz quadrada da proporção de pólenes normais. Após a realização desse procedimento, os dados obtidos foram utilizados para o teste de comparação entre médias de Duncan a 5%.

Os resultados obtidos mostraram que a porcentagem média de grãos de pólen viáveis nos genótipos analisados variou entre 68,6% a 98,8% (tabela 1), valores considerados altos entre genótipos bem distintos geneticamente.

Dos 52 genótipos analisados, observou-se que a linhagem PFT 0513 mostrou ter a viabilidade polínica mais baixa (68,6%). Embora baixos quando comparados com a média dos genótipos analisados (93,2%), esses valores ainda não são considerados críticos para a seleção assistida junto ao programa de melhoramento genético de uma determinada cultura. Nesse caso, o ideal é aumentar o número de cruzamentos por genótipo, visando a garantir a produção de sementes dos híbridos gerados.

Variações observadas entre os diversos genótipos são intrínsecas de cada acesso e esperadas, principalmente quando utilizadas dentro de um programa de melhoramento vegetal, considerando-se o fato de haver diferentes cruzamentos e de origens distintas. Variedades diferentes de uma mesma espécie podem apresentar grande variabilidade na viabilidade do grão de pólen. Domingues et al. (2000) encontraram variação na viabilidade do pólen entre 28,1% e 57,3% em diversos clones de laranjeira "Pêra".

A viabilidade do grão de pólen pode variar bastante ao longo do seu desenvolvimento. Na abertura da flor, o grão de pólen necessita estar plenamente viável, pois, geralmente, à medida que o tempo avança, a viabilidade do grão de pólen vai diminuindo e reduzindo sua eficiência na fertilização (Souza et al., 2002). O período de florescimento, as alterações ambientais, fatores bióticos e abióticos e as diferenças genotípicas podem contribuir para a viabilidade polínica (Shivanna & Rangaswamy, 1992; Techio et al., 2006). Ao determinar a taxa de viabilidade polínica em frutos de maracujazeiro amarelo, foi observado que um número inferior a 190 grãos de pólen na superfície estigmática pode resultar em frutos anômalos (Ruggiero et al., 1976). Nesse

caso, a limitação foi o número de grãos de pólenes presentes na superfície estigmática. No entanto, a obtenção de frutos anômalos poderá ainda se agravar se os poucos pólenes observados no estigma forem anormais.

Estudo realizado por Meletti et al. (2003), também em maracujá, demonstraram que há uma relação direta entre a alta viabilidade polínica e o elevado número de sementes por fruto. Inviabilidade polínica também pode ocorrer durante a microgametogênese, em que falhas no comportamento meiótico resultam em gametas com cromossomos desbalanceados ou anucleados, ou ainda resultando em grãos de pólen com citoplasma retraído (Twel, 1995). No entanto, a regularidade meiótica e, conseqüentemente, viabilidade polínica dependem, principalmente, da homologia cromossômica entre as espécies envolvidas no cruzamento (Souza et al., 2002). Em revisão sobre o assunto, Corrêa et al. (2005) relataram que uma elevada porcentagem de grãos de pólen viáveis é esperada como resultado de um alto percentual de tétrades normais, em diversas espécies. A perda da viabilidade do pólen em diferentes espécies tem sido correlacionada também com a perda de água, tanto em condições naturais como de laboratório (Tecchio et al., 2006). Segundo os mesmos autores, outro aspecto que precisa ser considerado é que a viabilidade do pólen pode variar consideravelmente entre indivíduos de uma espécie e entre amostras de um mesmo indivíduo.

A análise polínica é ferramenta de grande importância na seleção de genótipos estáveis, e pode contribuir para o programa de melhoramento genético de triticales, utilizando os genótipos analisados como parentais em cruzamentos, ou gerando novas cultivares mais adequadas aos padrões vigentes na legislação brasileira de sementes (Rosa et al., 2006). Os resultados aqui obtidos, por meio da análise citológica, poderão servir como um guia, para estabelecer os futuros cruzamentos dentro do programa de melhoramento de triticales.

Dessa forma, pode se concluir que as diferenças entre genótipos de triticales, quanto à frequência de grãos de pólen anormais, tornam-se importantes indicativos para uso em programa de melhoramento dessa cultura, principalmente pelo tipo de seleção assistida representar uma excelente ferramenta de apoio junto aos blocos de cruzamentos. Além disso, os genótipos avaliados representam importante germoplasma para cruzamentos posteriores entre triticales hexaplóides e octoplóides, uma vez que foi detectada significativa variabilidade genética nos mesmos.

Tabela 1 – Viabilidade Polínica obtida para os genótipos de triticales analisados pelo teste de Duncan 5%. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

Genótipo	Cruzamento	Análise de Duncan e proporção de pólen normais	
IAC 3-Bantengue	Bantengue	a	0,98428
CEP 23-TATU	BGL/3/MTZTCL/Trigo/BGL/4/Nutria	ab	0,97864
PFT 0511	Octo94(BR35/CBR1)/PFT2215*2/Hoh86007-1-2	ab	0,97650
PFT 0404	ANOAS-5/STIER-13//BULL-10/MANATI-1	ab	0,97611
IPR 111	ANOAS 5 / STIER 13	abc	0,97100
PFT 0502	BR4/2*PFT8913 (PFT 909)	abc	0,96889
BRS Ulisses	ERIZO/NIMIR	ab	0,97056
BRS Netuno	POLLMER//2*ERIZO/BULL (32ITYN,42)	abc	0,97025
PFT 0501	Arapoti/Octo65(Fr/BR1)	abc	0,95526
Embrapa 18	Tapir/Yogui//2*MUS (PFT8710)	abc	0,96914
IAPAR 23-Arapoti	CIN/CNO//BGL/3/MERINO	abc	0,95965
PFT 0518	T1505_WG//ERIZO_10/BULL_1-1/3/ERIZO_10/...	abc	0,96278
PFT 0517	RHINO_3/BULL_1-1/3/GAUR_3/ANOAS_2//BANT-1	abc	0,96271
PFT 0512	PFT116/3/Octo1303/HD//SWTY89.104(Mex)	abc	0,94825
Embrapa 53	LT 1117.62/Civet//Tatu	abc	0,96038
IAPAR 54 – Ocepar 4	Uron (PR884, OCEPAR4)	abc	0,95636
PFT 0510	Octo92-3(PF89358/CBR1)/HD	abc	0,95505
PFT 0405	ANOAS-5/STIER-13/5/274/320/BGL/3//MUSX/...	abc	0,95272
PFT 0504	Embrapa16*2/Octo50(IAC5/BR1)	abc	0,95054
PFT 0413	MUSX/LYNX/STIER_12-3/3/PEURA_3/4/ASNO/3/...	abcd	0,95188
PFT 209	PFT215*2/TCA3050-89(Chile)	abcd	0,95566
PFT 0415	PFT215/Embrapa53	abcd	0,94801
PFT 112	PFT512/GUARA	abcd	0,93362
PFT 205	IGUANA//HARE/CIVET	abcd	0,95007
PFT 0402	LIRON_2/5/DISB5/3/SPHD/PVN//YOGUI_6/4/...	abcd	0,92899
PFT 0416	PRESTO//2*TESMO-1MUSX603/4/ARDI_1/...	abcd	0,94460
PFT 0407	ERIZO11*2/MILMAN*2/PICUS	abcd	0,94611
PFT 0408	ERIZO-15/FAHAD-3//POLLMER-2.1	abcd	0,93831
Triticale BR 4	BGL/CIN//MUS	abcd	0,92568
PFT 0508	OCTO65(FRONTANA/CBR1)/BR4	abcde	0,93305
PFT 0303	OCTO65(FRONTANA/CBR1)/BR4	abcde	0,93722
PFT 307	PFT312/PFT511	abcde	0,92846
PFT 0403	T1505_WG//ERIZO_10/BULL_1-1/3/ERIZO_10/...	abcde	0,93662
PFT 0505	Embrapa53//PFT116/Hoh-87102-6-1	abcde	0,93493
PFT 0506	FD-693/Vicuna(PFT 903-1)	abcde	0,93662
BRS 203	LT-1/Rhino (PFT 222a)	abcde	0,90559
CEP 28-Guara	Daman (Tatu4/ ARD1)(CEP28,TCEP...)	abcde	0,91731
PFT 0516	PFT703(Rhino/Erizo)/PFT215*2/Hoh86007-1-2	abcde	0,91609
PFT 0420	STIER_13/FAHAD-4//MANATI_1/3/POLLMER_1.1	abcde	0,90200
PFT 0406	BR4/EMBRAPA53	abcde	0,92704
PFT 0417	PRESTO//2*TESMO-1MUSX603/4/ARDI_1/...	abcde	0,91543
PFT 924	EMB18*2/HOH-85110-1-2	abcde	0,89662
BRS 148	Yogui/Tatu (PFT317)	abcde	0,91864
PFT 0507	GNU/ASAD//ARDI/3/MANATI_1/4/FAHAD_5/5/...	abcde	0,89889
PFT 210	RHINO/BULL/ERIZO/YOGUI	bcde	0,90351
PFT 0411	FD-693/2*FAHAD_4//POLLMER-4/3/POLLMER_2.1	cde	0,90858
PFT 0503	BRS148*2/Hoh85107-2-3	cde	0,88376
PFT 0509	Octo923(PF69358/CBR1)/Emb53	cde	0,87949
PFT 0514	PFT215*2/Hoh92006-3	de	0,84701
IAC 2-Tarasca	Tarasca	ef	0,84349
BRS Minotauro	OCTO92-3(PF89358/CBR1)/Triticale BR 4	fg	0,72505
PFT 0513	PFT215*2/Binova	g	0,68665

### AGRADECIMENTOS

Os autores desejam expressar seus agradecimentos ao colega Márcio Nicolau (Embrapa Trigo) pelas análises estatísticas realizadas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAIER, A.C.; NEDEL, J.L. Triticale breeding in Brazil. In: \_\_\_\_\_. **Genetics and breeding of triticale**. Eucarpia: [s.n.], 1985. p.497-502.
- BAIER, A.C.; NADEL, J.L.; REIS, E.M.; WIETHHÖLTER, S. **Triticale: cultivo e aproveitamento**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1996. 72p.
- CORRÊA, M.G.S.; VIÉGAS, J.; SILVA, J.B.; ÁVILA, P.F.V.; BUSATO, G.R.; LEMES, J.S. Meiose e viabilidade polínica na família *Araceae*. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v.19, n.2, p.295-303, 2005.
- DOMINGUES, E.T.; TULLMANN NETO, A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Viabilidade de pólen em clones de laranja Pêra e outras variedades assemelhadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.85-89, 2000.
- FALCÃO, T.M.M.A.; MORAES-FERNANDES, M.I.B. de; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Genotypic and environmental effect on meiotic behavior and the influence of chromosomal abnormalities on fertility of hexaploid Triticale (*X Triticosecale* Wittmack). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.4, n.4, p.611-624, 1981.
- LOVE, R.M. La citología como ayuda práctica al mejoramiento de los cereales. **Revista Argentina Agronômica**, Buenos Aires, v.1, n.16, p.1-13, 1949.
- MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.275-278, ago. 2003.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B. de. Estudo da instabilidade meiótica em cultivares de trigo: efeito genotípico, relação com a fertilidade e seleção de plantas estáveis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.8, p.1177-1191, 1982.
- OETTLER, G. The fortune of a botanical curiosity-Triticale: past, present and future. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, n.143, p.329-346, 2005.
- ROSA, P.S.; CORRÊA, M.G.S.; NASCIMENTO, A.J.; BRAMMER, S.P.; VIÉGAS, J. **Análise de tétrades e grãos de pólen em triticale hexaplóide**. Pelotas: UFPel, 2006.
- RUGGIERO, C.; LAM SANCHEZ, A.; MIGUEL, S. Estudos sobre a fertilidade de grãos de pólen de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 3., 1975, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1976. v.2, p.515- 519.
- SHIVANNA, K.R.; RANGASWAMY, N.S. **Pollen biology: a laboratory manual**. Berlin; New York: Springer-Verlag, 1992. 119p.
- SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Revista Ciência Agropecuária**, Lavras, v.26, n.6, p.1209-1217, nov./dez. 2002.
- TECHIO, V.H.; DAVIDE, L.C.; PEDROZO, C.A.; PEREIRA, A.V. Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Revista Acta Scientia Biologica**, Maringá, v.28, n.1, p.7-12, jan./mar. 2006.
- TWEL, D. Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: vegetative cell ablation blocks generative cell migration. **Science**, New York, v.187, p.144-154, 1995.