

## Viabilidade Polínica em Haploides Gimnogenéticos de Milho

Tallyta Nayara Silva<sup>1</sup>, Evellyn Giselly de Oliveira Couto<sup>1</sup>, Guilherme Mendes Battistelli<sup>2</sup>,  
Renzo Garcia Von Pinho<sup>1</sup> e Lisete Chamma Davide<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras. tallytans@yahoo.com.br, evellyn.couto@yahoo.com.br, renzo@dag.ufla.br, lisete.ufla@gmail.com, <sup>2</sup>Geneze Sementes. guilherme@geneze.com.br

**RESUMO** – Objetivou-se neste trabalho analisar a viabilidade polínica de haploides duplicados oriundos do cruzamento dos genótipos P30F53, 43/48 e GNZ2004 com a linhagem indutora de haploidia materna KEMS. Foram selecionadas para o experimento as sementes que apresentavam embrião branco e pericarpo roxo. Estas foram imersas em solução contendo colchicina 0,06% e DMSO (dimetilsulfóxido) 0,5% por 12 horas no escuro, em temperatura ambiente. A partir das análises realizadas no citômetro de fluxo foi possível selecionar as plantas que apresentavam cada uma das ploidias utilizadas nesse trabalho. Desse modo, uma amostra de 3 plantas de cada ploidia identificada foi utilizada para análises de viabilidade. Por meio do teste de coloração, em que foi usado o corante Alexander, a média de viabilidade polínica para os indivíduos identificados foi de 33% para as plantas que apresentaram haploides e diploides nos gráficos de citometria de fluxo, de 3% para aquelas haploides, diploides e tetraploides, de 0% para diploides, tetraploides e hexaploides e de 25% para as plantas tetraploides, hexaploides e dodecaploides. Como a viabilidade polínica é influenciada por fatores como umidade relativa e temperatura, os valores podem ter sido baixos devido não somente à concentração de colchicina utilizada, mas também devido o horário em que foi feita a coleta de pólen, tornando necessários novos testes com diferentes concentrações de colchicina e horários de coleta.

Palavras-chave: duplicação cromossômica, teste de coloração, pólen viáveis.

### Introdução

Desde a década de 40 a análise de viabilidade polínica vem sendo empregada para muitas espécies agrícolas. Love (1949) descreveu que este estudo é muito simples para determinar se o comportamento meiótico dos cromossomos é normal, por meio da análise de grãos de pólen ou micrósoros contendo um ou mais micronúcleos. Assim, rapidamente pode-se examinar uma centena de pólenes e contar o número de micronúcleos em cada um deles. 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 outros estudos.

Uma aplicação da análise de viabilidade polínica está na identificação de pólenes viáveis em indivíduos duplo-haploides. Estes são plantas haploides - com somente metade do

patrimônio genético – que têm seu complexo cromossômico duplicado. A técnica de produção de duplo-haploides pode reduzir o tempo e o custo de obtenção de linhagens melhorando a eficiência na produção de novos híbridos, uma vez que permite obter linhagens com todos os locos em homozigose, o que não ocorre no processo tradicional de autofecundação (Pierre et al., 2011).

Segundo Galetta (1983), pode-se agrupar os métodos de testar a viabilidade do pólen em quatro tipos: por meio de corantes; germinação *in vitro*; germinação *in vivo*, e porcentagem de frutificação efetiva em frutíferas, obtida com a utilização do pólen em teste.

Na literatura não há a descrição de um teste de viabilidade universal utilizando um corante específico, entretanto dentre os corantes mais utilizados destacam-se: carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (Stanley e Linskens, 1974; Sharma e Sharma, 1994), cloreto de trifeniltetrazólio e tetrazólio vermelho (Shivanna e Rangaswamy, 1992), os quais promovem diferenças na coloração dos grãos de pólen, fornecendo resultados de forma rápida e com baixo custo.

Esses corantes, de acordo com Alexander (1969, 1980), têm uma aplicação limitada, pois coram somente pólenes funcionais, enquanto que os inviáveis são identificados por não corarem. Em espécies cujos grãos de pólen apresentam paredes espessas, mucilaginosas e com presença de espículas dificultando a penetração do corante, pólenes viáveis podem não apresentar coloração e serem equivocadamente classificados como abortados. Alternativamente, o autor propôs um corante à base de verde malaquita e fucsina ácida que devido às suas propriedades químicas básicas e ácidas, respectivamente, cora pólenes viáveis e não viáveis, mostrando-se eficiente para várias espécies.

A coloração, embora, como já mencionado, seja um procedimento simples e barato, não fornece informações sobre a capacidade germinativa do pólen, o que pode ser obtido por meio de testes de germinação. Esses testes têm sido empregados principalmente quando é necessário armazenar pólenes em função da realização de cruzamentos controlados entre parentais com diferenças nos períodos de florescimento ou que se encontram em regiões distantes (Techio et al., 2006).

Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi analisar a viabilidade polínica de haploides duplicados, oriundos do cruzamento de três diferentes genótipos com a linhagem gimnogenética KEMS, indutora de haploidia.

## **Materiais e Métodos**

As sementes utilizadas foram obtidas dos cruzamentos entre os híbridos P30F53, 43/48 e GNZ2004 com a linhagem indutora de haploidia gimnogenética KEMS (Shatskaya et al., 1994).

As sementes com embrião branco e pericarpo roxo foram selecionadas e imersas em solução de duplicação cromossômica, contendo colchicina 0,06% e DMSO (dimetilsulfóxido) 0,5% por 12 horas no escuro, de acordo com o protocolo proposto por Deimling, Röber e Geiger (1997), com modificações na temperatura, sendo que neste experimento foi utilizada temperatura ambiente. As análises em citometria de fluxo foram realizadas após 15 dias da duplicação. Para isso, folhas jovens dos genitores P30F53, GNZ2004, 43/48, linhagem indutora KEMS e dos descendentes obtidos desses cruzamentos, foram utilizadas.

A partir dos resultados obtidos pela citometria de fluxo foi feita uma amostragem, sendo selecionadas aleatoriamente três plantas de cada ploidia identificada. Cada ploidia foi identificada com uma letra (Tabela 1): A (Haploide e diploide), B (Haploide, diploide e tetraploide), C (Diploide, tetraploide e hexaploide) e D (Tetraploide, hexaploide e dodecaploide). A coleta das inflorescências contendo os grãos de pólen foi feita pela manhã, às 10 horas. Ainda no campo, as anteras foram mergulhadas em solução de fixador álcool etílico:ácido acético (3:1) e, posteriormente, foram armazenadas em freezer a -4°C.

Após, no mínimo 24 horas de fixação, as inflorescências foram lavadas em água destilada por 15 minutos, sendo realizadas três trocas de água de 5 em 5 minutos.

A viabilidade do grão de pólen foi avaliada por meio de teste de coloração, utilizando o corante 'Alexander' (Alexander, 1969). Para isso, foram preparadas lâminas pela técnica de esmagamento, e feita a coloração das mesmas com o corante Alexander. As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico, com objetiva de aumento de 10x. Foram consideradas cinco repetições para cada amostra e avaliados 200 grãos de pólen/repetição. Os grãos de pólen com coloração roxa intensa foram considerados viáveis, e os de coloração azul, inviáveis (Figura 1).

### **Resultados e Discussão**

Os gráficos selecionados na citometria de fluxo podem ser vistos na figura 2 e demonstram as ploídias encontradas no experimento.

Pelo teste de coloração, foram encontradas médias de viabilidade polínica para as ploídias A, B, C e D analisadas. Foi encontrada média de 33% de viabilidade polínica para indivíduos da classe A, 3% da B, 0% da C, e 25% da D.

Bérnard e Noiret (1970) ressaltaram que pólenes com pelo menos 60% de viabilidade podem ser considerados como bem conservados. Arnaud (1979), no entanto, afirmou que só

podem ser considerados grãos de pólen conservados aqueles que possuam viabilidades superiores a 70%, devendo ser descartados os que atingirem taxas inferiores a 40%. Essas taxas indicam que nenhuma das classes analisadas no experimento apresentou pólen viáveis que possam ser efetivamente usados no cruzamento das linhagens duplo-haploides obtidas, já que a maior taxa de viabilidade foi de 33% para indivíduos com células haploides e diploides.

Como a viabilidade polínica é afetada por fatores como umidade relativa, temperatura, pressão osmótica do conteúdo celular do pólen e resistência da parede polínica (Vara Prasad et al., 1999), a viabilidade pode ter sido baixa não só pelo tratamento com colchicina, mas também pelo horário em que foi feita a coleta de pólen.

Nas classes C e D era esperado que as taxas de viabilidade fossem similares devido ao alto nível de haploidia, que geralmente se relaciona com a segregação irregular de cromossomos na divisão celular, o que não foi identificado. A disparidade nos valores encontrados pode ser explicada não só por aderências na metáfase I, que têm sido descritas como uma das causas de decréscimo da viabilidade polínica em plantas (Pagliarini et al., 2000; Taschetto et al., 2003), como também pela confiabilidade no método de coloração, que não é alta.

Como é sabido, o uso de corantes é uma técnica bastante atrativa, especialmente pela simplicidade e rapidez na obtenção dos resultados. Galleta (1983) comenta que a viabilidade verificada por coloração normalmente é mais alta do que aquela obtida por germinação. Entretanto, a validade desse método tem sido questionada por problemas como, por exemplo, a coloração de grãos de pólen inviáveis ou grãos de pólen imaturos e abortados (Stanley & Linskens, 1974).

### **Conclusões**

Todos os genótipos foram responsivos à duplicação cromossômica, porém os genótipos P30F53 e GNZ2004 foram os que apresentaram mixoploides A (haploides e diploides), com as maiores taxas de viabilidade polínica. É importante ficar atento aos horários de coleta, uma vez que interferem na viabilidade polínica e analisar o quanto a concentração de colchicina interferiu no desenvolvimento viável do pólen.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), CNPq e Geneze Sementes pelo apoio financeiro.

## Literatura Citada

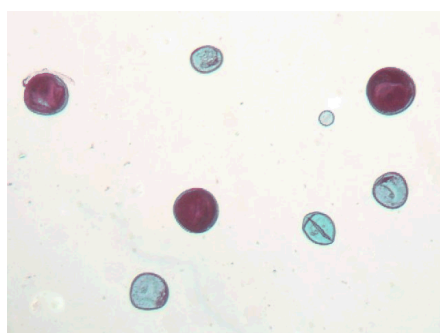
- ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol.*, Baltimore, v. 44, p. 117-122, 1969.
- ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol.*, Baltimore, v. 55, p. 13-18, 1980.
- ARNAUD, F. La pollinisation assistée les plantations de palmier à huile. Récolte et conditionnement du pollen. *Oléagineux*, Paris: v. 34, n. 4, p. 175-176, 1979.
- BALBINOT, N.D. Variabilidade citogenética em uma coleção de acessos de *Paspalum notatum* Flüggé. Dissertação (Mestrado em Zootecnia/Plantas Forrageiras). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- BÉRNARD, G.; NOIRET, J. M. Le pollen de palmier à huile réclote. Préparation, conditionnement et utilisation pour la fécondation artificielle. *Oléagineux*, Paris: v. 25, n. 2, p. 67-73. 1970.
- DEIMLING, S.; RÖBER, F.K.; GEIGER, H.H. Methodik und Genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei Mais. *Votr. Pflanzenzüchtung*, v. 38, p. 203-224, 1997.
- GALETTA, G. J. Pollen and Seed Management. In: MOORE, J.N.; JANIK, J. (Ed.). *Methods in fruit Breeding*. Indiana: Purdue University Press. p. 23-47, 1983.
- LOVE, R.M. La citología como ayuda práctica a mejoramiento de los cereales. *Revista Argentina Agronômica*, Buenos Aires, v.16, n.1, p. 1-13, 1949.
- PAGLIARINI, M.S.; FREITAS, P.M.; BATISTA, L.A.R. Chromosome stickiness in meiosis of a Brazilian *Paspalum* accession. *Cytologia*, v. 65, p. 289-294, 2000.
- PIERRE, P.M.O; DAVIDE, L.M.C; COUTO, E.G.O.; SILVA, T.N. et. al. Duplo-Haploides: Estratégias para Obtenção e Importância no Melhoramento Genético do Milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.10, n.1, p.1-16, 2011.
- SHARMA, A.K; SHARMA, A. Chromosome techniques. Switzerland: Harwood Academic Publishers. p. 367, 1994.
- SHATSKAYA O.A., E.R. ZABIROVA, V.S. SHCHERBAK, M.V. CHUMAK, Mass induction of maternal haploids in corn. *Maize Gen. Coop. Newsletter*, v. 68, p. 51, 1994.
- SHIVANNA, K.R.; RANGASWAMY, N.S. Pollen biology. A laboratory manual. Berlin/New York: Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1992.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. Pollen biology biochemistry management. Berlin: Springer-Verlag, 1974.
- TASCHETTO, O.M.; PINTRO, J.C.; PAGLIARINI, M.S. Chromosome stickiness during microsporogenesis in *Pfaffia glomerata* and *P. tuberosa* (Amaranthaceae). *The Nucleus* v. 46, p. 128-137, 2003.

TECHIO, V. H. et al. Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). *Revista Acta Scientia Biologica*, Maringá, v. 28, n. 1, p. 7-12, 2006.

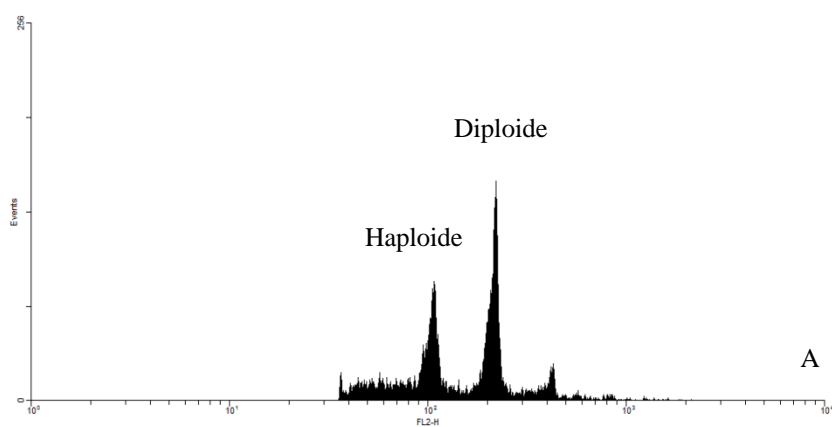
VARA PRASAD, P.V.; CRAUFURD, P.Q.; SUMMERFIELD R.J. Fruit number in relation to pollen production and viability in Groundnut exposed to short episodes of heat stress. *Annals of Botany*, v. 84, p. 381-386, 1999.

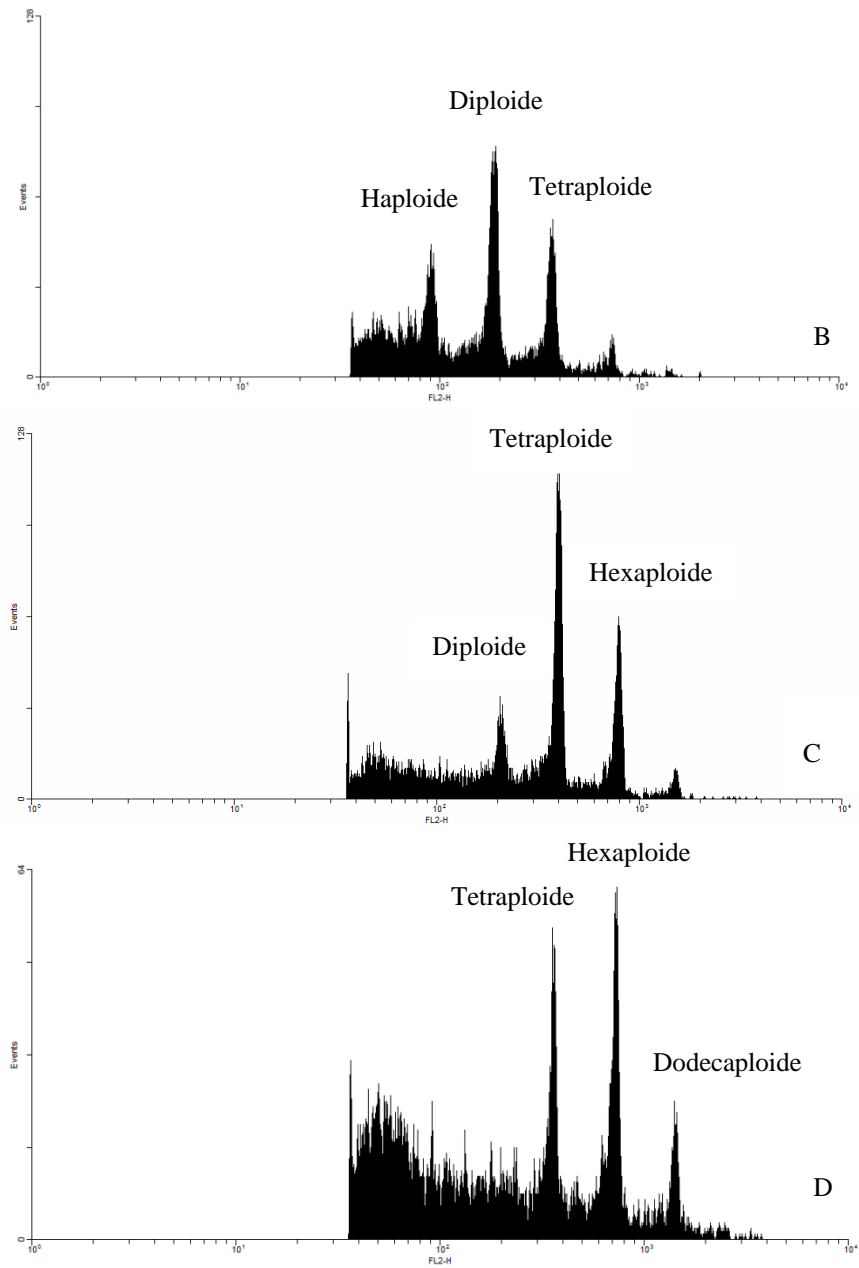
**Tabela 1.** Classes de ploidia identificadas por citometria de fluxo.

Ploidia	Identificação
Haploides e Diploides	A
Haploides, Diploides e Tetraploides	B
Diploides, Tetraploides e Hexaploides	C
Tetraploides, Hexaploides e Dodecaploides	D



**Figura 1.** Grãos de pólen roxos (viáveis) e azuis (inviáveis).





**Figura 2.** Histogramas de citometria de fluxo em folhas jovens de milho. A) Haploide e diploide. B) Haploide, diploide e tetraploide. C) Diploide, tetraploide e hexaploide. D) Tetraploide, hexaploide e dodecaploide. Eixo vertical = número de núcleos lidos; eixo horizontal = intensidade de fluorescência relativa.