



## PARÂMETROS CITOGENÉTICOS QUANTO À VIABILIDADE DO GRÃO DE PÓLEN NA CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE CEVADA

LEONARDO MARTINELLO DA ROSA, SANDRA PATUSSI BRAMMER, JANE RODRIGUES DE ASSIS MACHADO, ALOISIO ALCANTARA VILARINHO

### RESUMO

O presente trabalho se justifica pela importância da caracterização citogenética em cultivares de cevada, de modo a contribuir com a manutenção em bancos de germoplasma e na seleção assistida aos programas de melhoramento genético, direcionando a seleção da melhor forma possível. O objetivo do presente trabalho foi o de caracterizar e identificar, por meio de estudos da viabilidade do grão de pólen, cultivares de cevada oriundas do programa de melhoramento da Embrapa Trigo. A metodologia envolveu coletas de espigas no ano de 2022, mantidas em telado no período ideal ao cultivo, na fase anterior ao florescimento e com duas repetições. Após as coletas as espigas foram fixadas em Carnoy por 24h em temperatura ambiente, seguida da estocagem em álcool etílico 70% a -20 °C. As lâminas citológicas foram feitas pelo método de “squash” com corante carmim acético 1%. As análises foram realizadas em microscopia ótica, com aumento de 200X, e contagem dos primeiros 500 grãos de pólen íntegros por lâmina. Os parâmetros citogenéticos avaliados foram: 1) grãos de pólen bi/trinucleados e com presença de amido, considerados viáveis; 2) grãos de pólen uninucleados; 3) grãos de pólen com pouco amido; 4) grãos de pólen com tamanhos diferentes; 5) grãos de pólen vazios ou inviáveis. Ao final da análise foi feito cálculo de porcentagem de viabilidade polínica para cada cultivar, sendo que o valor para que a viabilidade fosse considerada favorável, foi de 95% ou mais, indicando elevada estabilidade genética. Das nove cultivares analisadas, apenas duas obtiveram, ambas na segunda repetição, valores abaixo do considerado favorável, sendo que a média total da viabilidade polínica foi de 96,7%. No geral, a elevada viabilidade polínica detectada nas cultivares de cevada representa grande potencial para seguirem na manutenção do Banco Ativo de Germoplasma e no programa de melhoramento da Embrapa Trigo, indicando que os parâmetros avaliados e esse tipo de estudo fornece informações de grande relevância, de forma rápida e eficiente, na caracterização genética de plantas.

**Palavras-chave:** *Hordeum vulgare*; estabilidade genética; variabilidade; bancos de germoplasma; melhoramento.

### 1 INTRODUÇÃO

A citogenética é uma das áreas da ciência que combina a citologia e a genética e ao longo dos anos foi fazendo parte de muitos outros campos que envolvem a biologia, como a taxonomia, bioquímica, medicina clínica e melhoramento animal e vegetal (BRAMMER; ZANOTTO; CAVERZAN, 2007). Considerando a cevada (*Hordeum vulgare* L.), a caracterização citogenética merece destaque, pois essa espécie responde fortemente aos estresses ambientais e aos patógenos, em que esse tipo de análise possibilita de forma rápida e eficiente inferir sobre a fertilidade e estabilidade genética.

A cevada pertencente à família Poaceae é uma das espécies com domesticação e cultivo pelo homem mais antigas, ocupando o título do quarto cereal mais importante no mundo, uma vez que cresce em mais de 100 países, e é utilizada para diversos fins, que vão desde a cobertura

de solo, alimentação animal, como grão forrageiro, pastagem, feno e silagem, e a produção de malte e a alimentação humana, sendo consumida no próprio malte, e de forma integral e de farinha (MINELLA, 1999; GIRALDO *et al.*, 2019; EMBRAPA, 2022).

De acordo com Bered (1999), uma das formas de caracterização de germoplasma é mediante a avaliação de caracteres morfológicos, em que o melhorista analisa visualmente as plantas e estima sua distância genética. Aliado a essa premissa, a citogenética permite que a caracterização seja em nível da morfologia e comportamento cromossômico e também das estruturas celulares e sub-celulares, contribuindo efetivamente na seleção dos melhores genótipos, principalmente quanto à inferência da estabilidade genética, tanto nos parentais como nas gerações segregantes, potencializando esse tipo de estudo para a seleção assistida ao melhoramento de plantas (BRAMMER; NASCIMENTO JUNIOR, 2022). Estudos da viabilidade polínica, morfologia do grão de pólen e a compatibilidade na interação “pólen-estigma”, possibilitam informações cruciais sobre os sistemas de reprodução das plantas. O tamanho dos grãos de pólen é outra característica biológica importante, além da relação com o nível de ploidia das plantas e volume de citoplasma, bem como as interações entre essas variáveis (TOMASZEWSKA; KOSINA, 2022).

Alguns parâmetros citogenéticos merecem destaques no momento da seleção assistida ao melhoramento e/ou na manutenção de espécies em bancos de germoplasma, principalmente visando à identificação de genótipos com estabilidade genética. Destaca-se a identificação de grãos de pólen vazios ou inviáveis ou grãos de pólen com pouco amido, com mais de um poro ou com malformação dos núcleos vegetativos ou generativos. No caso dos vazios, tem-se como consequência, a infertilidade da célula gamética masculina, ausência de fecundação e formação do futuro embrião, além da diminuição na produção de sementes e grãos (DAFNI; FIRMAGE, 2000). Ressalta-se, portanto, que a estabilidade genética em plantas é de extrema importância para o sucesso de programas de melhoramento genético vegetal para que mais conhecimento a respeito do material estudado seja fornecido, no objetivo de direcionar a seleção da melhor forma possível, fornecendo uma base para o melhorista na hora da tomada de decisão, de modo a economizar tempo e recursos (BRAMBATTI *et al.*, 2016, BRAMMER; FRIZON; URIO, 2019). Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi o de caracterizar e identificar, por meio de estudos da viabilidade do grão de pólen, genótipos de cevada para uso em programa de melhoramento genético e/ou na manutenção de bancos de germoplasma.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, foram avaliados citogeneticamente nove cultivares de cevada do programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS. Para a análise da viabilidade polínica, primeiramente, fez-se a coleta de espigas de cevada cultivadas na área experimental I da Embrapa Trigo, mantidas sob os tratos culturais e período de semeadura adequados para a região norte do estado no ano de 2022. Foram coletadas duas espigas por genótipo (representando as repetições) no estádio 10-5 da escala Feeks e Large (Large, 1954), fase anterior ao florescimento. Após a coleta, as espigas foram imediatamente fixadas em Carnoy (álcool etílico absoluto: ácido acético glacial, 3:1), mantidas em temperatura ambiente por 24 horas e, em seguida, foram transferidas para álcool etílico 70%, sendo armazenadas a uma temperatura de -20 °C, até o momento de uso. As análises citológicas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da referida instituição, em que as lâminas citológicas foram confeccionadas pelo método de esmagamento de anteras (“squash”). Foram usadas as três anteras da mesma flor, oriundas da região mediana da espiga e o corante empregado foi o carmim acético 1%, por ser bastante empregado em técnicas de rotina para este tipo de estudo. Após adição do corante, uma lâminula 22 x 22 mm foi colocada sobre a lâmina, sendo aquecida rapidamente sobre bico de Bunsen, por aproximadamente três vezes seguidas, de forma rápida

para não danificar o material, e vedadas todas as bordas com uma mistura de cera de abelha e breu (“luto”) no momento da montagem lâmina/lamínula. Para cada lâmina foram analisados os primeiros 500 grãos de pólen, íntegros e sem sobreposição, utilizando-se o microscópio óptico Olympus BX5, com aumento de 200x. A captura de imagem das melhores células foi realizada pelo programa Honestech TVR 2.5 e as variáveis analisadas foram: 1) grãos de pólen bi/trinucleados e com presença de amido, considerados viáveis; 2) grãos de pólen uninucleados; 3) grãos de pólen com pouco amido; 4) grãos de pólen com tamanhos diferentes; 5) grãos de pólen vazios ou inviáveis. Ao final desta contagem, para obtenção da viabilidade polínica, foi feito um cálculo utilizando-se dos 500 grãos de pólen por genótipo, dividido pelo número de grãos de pólen considerados viáveis e a multiplicação por 100, para a obtenção do valor em porcentagem.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos quanto aos parâmetros citogenéticos, previamente mencionados, para análise polínica das nove cultivares de cevada, oriundos do programa de melhoramento da Embrapa Trigo, são apresentados na Tabela 1. Do total de cultivares analisadas, observou-se que a maioria das cultivares apresentou valores de viabilidade polínica acima 95%, considerado como favorável e indicativo de elevada estabilidade genética (Tabela 1). A média total da viabilidade polínica nas cultivares foi de 96,7%, variando de 98,4% em BRS 180 a 83,6% em uma das repetições da cultivar BRS Manduri.

Tabela 1. Número de estruturas celulares analisados para os parâmetros citogenéticos estabelecidos nas nove cultivares de cevada e porcentagem da viabilidade polínica obtida. Embrapa Trigo, 2022.

Cultivares	Binucleados e trinucleados	Uninucleados	Pouco amido	Tamanhos diferentes	Vazios	Viabilidade
BRS Itanema	485	1	7	7	0	97,0%
2° rep.	488	0	8	3	1	97,6%
BRS Manduri	474	5	8	9	4	94,8%
2° rep.	418	0	41	31	10	83,6%
BRS Sampa	480	13	6	1	0	96,0%
2° rep.	453	0	37	7	3	90,6%
BRS Farewell	490	0	9	0	1	98,0%
2° rep.	483	9	4	4	0	96,6%
Imperatriz	487	7	1	1	3	97,4%
2° rep.	484	0	4	0	12	96,8%
Fátima	478	2	2	18	0	95,6%
2° rep.	488	0	10	0	2	97,6%
BRS 180	492	4	4	1	0	98,4%
2° rep.	488	0	10	0	1	97,6%
BRS Demeter	480	0	5	15	0	96,0%
2° rep.	480	0	6	8	6	96,0%
BRS Aliensa	488	0	4	8	0	97,6%
2° rep.	475	0	19	6	0	95,0%
Totais	8611	41	185	119	43	M = 96,7%

2° rep. = segunda repetição.

Resultados semelhantes foram obtidos por Munaretto *et al.* (2020) que realizaram

análise citogenética de grãos de pólen, visando analisar a viabilidade polínica e a inferência da estabilidade genética em 11 genótipos de cevada de distintas origens e disponibilizados pelas empresas Ambev e Embrapa Trigo. Os autores demonstraram que a análise de viabilidade polínica para os genótipos avaliados está dentro do padrão esperado para as Triticeae, havendo elevada porcentagem de grãos de pólen viáveis e poucos com tamanhos diferentes. Os autores do estudo citado ainda destacam que para a variável grão de pólen bi/trinucleado não foi observada diferença significativa entre os genótipos analisados, que variaram de 84,3% a 93%. A performance do pólen está diretamente relacionada à sua viabilidade e para acessá-la,

não se torna necessário esperar para que a semente seja formada (ASCARI *et al.*, 2020). Essa premissa é extremamente relevante, visto que o presente estudo realizou as análises da viabilidade polínica na fase anterior à antese e ao florescimento da cevada, contribuindo para a seleção e inferência da estabilidade genética das cultivares, para uso posterior nos blocos de cruzamentos do programa de melhoramento da Embrapa Trigo. No geral, a média final encontrada para a viabilidade polínica foi considerada favorável para todas as cultivares, indicando que essas apresentam boa capacidade de reprodução, representando excelente germoplasma, embora à medida que os estudos continuam avançando, deve-se englobar mais genótipos e mais repetições das análises por ano de cultivo.

Outro parâmetro citogenético que deve ser considerado nas análises são os grãos de pólen com quantidade insuficiente de amido. Conforme Amanda *et al.* (2022), a falta ou pouca produção de amido, é outro problema para o desenvolvimento normal das células gaméticas vegetais, pois pode ser causada pela deficiência de auxina, importante fitormônio envolvido na regulação de importantes genes associados a geração de energia. Para a cevada, a auxina é importante no fluxo de sacarose e hexoses e para aumentar os níveis de metabólitos do ciclo tricarboxílico, além de atuar na maturação para aumentar a expressão de genes que codificam quase todas as etapas da produção de energia heterotrófica. Entretanto, no presente trabalho, a maioria dos grãos de pólen inclusos nessa categoria, não possuía anormalidades quanto à quantidade de amido, bem como, possuíam de dois a três núcleos o que é a condição normal do desenvolvimento dos grãos de pólen das plantas.

Além do mencionado, os fatores ambientais afetam diretamente o desenvolvimento das plantas, como exemplo luminosidade, temperatura, umidade do ar, disponibilidade de água, vento, entre outros. A utilização de ambientes protegidos no cultivo de plantas pode auxiliar no controle das condições as quais irão interferir no desenvolvimento da planta, de modo a superar adversidades e potencializar a produtividade, além de permitir que cultivos sejam realizados em épocas que não seriam escolhidas para tal atividade em ambiente a campo (CALIMAN *et al.*, 2005, SANTOS; SEABRA JUNIOR; NUNES, 2010). Diante do exposto, Pereira Neto (2006), também abordam que a viabilidade do pólen pode mudar bastante entre indivíduos de uma mesma espécie e também, para diferentes amostras de um mesmo indivíduo, bem como as próprias alterações ambientais e diferenças genotípicas, que influenciam na viabilidade. Portanto, considerando a cevada e o estudo realizado na Embrapa Trigo no ano de 2022, o ambiente pouco influenciou sobre a inviabilidade polínica, uma vez que das nove cultivares analisadas, oito apresentaram viabilidade acima de 95%, em uma ou nas duas repetições. Destaca-se que as condições e a época de cultivo foram as padronizadas para esse cereal e que a manutenção das plantas em telado, para o completo desenvolvimento das espigas, favoreceu a estabilidade genética detectada por meio das análises citogenéticas.

## 4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos do ano de 2022, pode-se concluir que as cultivares avaliadas, considerando os parâmetros citogenéticos comumente usados na análise polínica, apresentam viabilidade polínica e estabilidade genética adequadas e dentro do esperado,

servindo para uso em programas de melhoramento genético e manutenção de bancos de germoplasma. A continuidade desse tipo de estudo é reforçada, para que maiores informações a respeito dessas cultivares em outros anos de cultivo, além de outros genótipos do programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo, possam ser adquiridas e utilizadas da melhor maneira possível.

## REFERÊNCIAS

AMANDA, D. et al. Auxin boosts energy generation pathways to fuel pollen maturation in barley. *Current Biology*, [s.l.] v. 32, n. 8, p. 1798–1811, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960982222003438>. Acesso em: 07 mar. 2023

ASCARI, L. et al. Quantitative methods in microscopy to assess pollen viability in different plant taxa. *Plant Reproduction*, [s.l.], v. 33, n. 3-4, p. 205-219, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00497-020-00398-6>. Acesso em: 07 mar. 2023.

BERED, F. Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas. In: SACCHET, A. M. O. F. *Genética, para que te quero?* Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999. p. 99-104.

BRAMBATTI, A. et al. Estabilidade genética em triticales estimada pela viabilidade polínica. *Arquivos do Instituto Biológico*, [s.l.], v. 83, n. 1, p. 1-7, 2016.

BRAMMER, S.P.; NASCIMENTO JUNIOR, A. do. Estudos genéticos em triticales: caracterização de germoplasma e apoio ao melhoramento genético. In: BARBOSA, F. C. (Org.) *Genética: hereditariedade e características*. Piracanjuba: Editora Conhecimento Livre, 2022. Cap. 2. p. 12 – 26.

BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. Citogenética vegetal: da era clássica à molecular. *Passo Fundo: Embrapa Trigo*, 2007. 9p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 85). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do85.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm)>. Acesso em 06 mar 2023

BRAMMER, S.P.; FRIZON, P.; URIO, E. A. Caracterização citogenética em genótipos de trigo: presença de micronúcleos e viabilidade polínica. In: SILVA NETO, B. R. da (Org) *Inventário de recursos genéticos*. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. Cap. 1. p. 1-13.

CALIMAN, F. R. B. et al. Avaliação de genótipos de tomateiro cultivados em ambiente protegido e em campo nas condições edafoclimáticas de Viçosa. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.23, n.2, p.255-259, 2005. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/250045997\\_Avaliacao\\_de\\_genotipos\\_de\\_tomateiro\\_cultivados\\_em\\_ambiente\\_protegido\\_e\\_em\\_campo\\_nas\\_condicoes\\_edafoclimaticas\\_de\\_Vico\\_sa](https://www.researchgate.net/publication/250045997_Avaliacao_de_genotipos_de_tomateiro_cultivados_em_ambiente_protegido_e_em_campo_nas_condicoes_edafoclimaticas_de_Vico_sa). Acesso em: 06 mar. 2023.

DAFNI, A.; FIRMAGE, D. Pollen viability and longevity: Practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*, [s.l.], v. 22, p. 113-122, 2000. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00984098>. Acesso em: 07 mar. 2023.

EMBRAPA. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. *Árvore do conhecimento*:

Cevada. Euclides Minella. Brasília, DF, 2022. Disponível em:  
<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cevada>. Acesso em: 06 mar. 2023

GIRALDO, P. et al. Worldwide Research Trends on Wheat and Barley: a bibliometric comparative analysis. *Agronomy*, [s.l.] v. 9, n. 7, p. 352, 2019. Disponível em:  
[https://www.researchgate.net/publication/334214547\\_Worldwide\\_Research\\_Trends\\_on\\_Wheat\\_and\\_Barley\\_A\\_Bibliometric\\_Comparative\\_Analysis](https://www.researchgate.net/publication/334214547_Worldwide_Research_Trends_on_Wheat_and_Barley_A_Bibliometric_Comparative_Analysis). Acesso em: 06 mar. 2023.

LARGE, E. C. Growth stages in cereals illustration of the Feeks scales. *Plant Pathology*, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 128-129, 1954. Disponível em:  
<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.1954.tb00716.x>. Acesso em: 06 mar. 2023.

MINELLA, E. Melhoramento da Cevada. In: BOREM, A. (Ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: UFV, 1999. p. 253-272.

MUNARETTO, D. et al. Viabilidade polínica e inferência da estabilidade genética em genótipos de cevada. *Passo Fundo: Embrapa Trigo*, 2020, 18 P. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento online, 95). Disponível em:  
<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/222525/1/BolPesqDes-95-online-2021.pdf>> Acesso em: 03 nov. 2022.

PEREIRA NETO, B. Avaliação do crescimento inicial de plantas de maracujazeiro cultivadas sob diferentes telas de sombreamento. 2020. 39 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Orgânica) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2020.

SANTOS, L. L.; SEABRA JUNIOR, S.; NUNES, M. C. M. Luminosidade, temperatura do ar e do solo em ambientes de cultivo protegido. *Revista de Ciências Agro-Ambientais, Alta Floresta*, v. 8, n. 1, p. 83-93, 2010. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/[http://www.unemat.br/revistas/rcaa/docs/vol8/8\\_artigo\\_v8.pdf](http://www.unemat.br/revistas/rcaa/docs/vol8/8_artigo_v8.pdf). Acesso em: 06 mar. 2023.

TOMASZEWSKA, P.; KOSINA, R. Variability in the quality of pollen grains in oat amphiploids and their parental species. *Brazilian Journal of Botany*, [s.l.], v. 45, p. 987–1000, 2022. Disponível em:  
[https://www.researchgate.net/publication/362424570\\_Variability\\_in\\_the\\_quality\\_of\\_pollen\\_grains\\_in\\_oat\\_amphiploids\\_and\\_their\\_parental\\_species](https://www.researchgate.net/publication/362424570_Variability_in_the_quality_of_pollen_grains_in_oat_amphiploids_and_their_parental_species). Acesso em: 06 mar. 2023.