

56. Integridade Fisiológica e Genética de Germoplasma de Trigo (*Triticum aestivum* L.) Armazenados em Longo Prazo

Pozzobon; M.T¹; Peñaloza, A. del P.S¹; Goedert, C. de O¹.; Brasileiro-Vidal, A.C.²; Brammer, S.P.³; Scagliusi, S.M.M.³; Santos, S.dos¹; Lima, G.S.de⁴; Ribeiro⁴, M.R.; Silva, R.C⁴; Costa, C.T. da⁵; Oliveira, A.R. da S⁶. ⁽¹⁾Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia, Brasília DF; ⁽²⁾Universidade Federal de Pernambuco, Recife; ⁽³⁾Embrapa Trigo, Passo Fundo; ⁽⁴⁾Bolsista - Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia; ⁽⁵⁾Bolsista - Embrapa Trigo; ⁽⁶⁾Bolsista - Universidade Federal de Pernambuco.

Os programas de melhoramento de trigo no Brasil buscam, na introdução e intercâmbio de germoplasma, com ampla base genética disponível em bancos de germoplasma, obter genótipos adaptados às condições ambientais das principais regiões produtoras. O Acervo da Coleção de Base (Colbase) do Cenargen conta com um acervo de mais de cinco mil acessos de germoplasma de *Triticum aestivum* L., conservados a temperatura de -20°C e 5% de teor de umidade, periodicamente monitorados quanto à germinação de suas sementes. Este acervo, de importância estratégica para o Brasil, está disponível aos melhoristas. Entretanto, a conservação *ex situ* em longo prazo pode levar a alterações fisiológicas e genéticas do germoplasma. As perdas de vigor e viabilidade das sementes decorrem, dentre outros fatores, devido ao processo de envelhecimento natural, ocasionado por alterações citológicas, tais como a destruição do sistema de membranas, que podem implicar em alterações metabólicas, fisiológicas e genéticas (Abdul-Baki e Anderson, 1972; Roberts, 1973). Entre as alterações genéticas há relatos da ocorrência de quebras no DNA, causando redução na capacidade de síntese de proteínas (Ghosh, Adhikary e Banerjee, 1981), danos no metabolismo de DNA (Coello e Vázquez-Ramos, 1996), até danos cromossômicos (Murata, Ross e Tsuchiya, 1981). A oferta, aos melhoristas, de materiais reprodutivamente estáveis, que possam vir a contribuir com genes de interesse, acelera o processo de disponibilidade de benefícios aos usuários e consumidores do produto.

Os objetivos do presente estudo foram: 1) Realizar levantamento dos dados de germinabilidade inicial e durante o armazenamento, agrupando-os conforme a variação da germinabilidade e com o tempo de armazenamento; 2) Determinar a natureza e a frequência das possíveis aberrações cromossômicas em indivíduos obtidos de sementes armazenadas em longo prazo e de sementes recentemente multiplicadas; 3) Analisar citogeneticamente por meio das técnicas de bandejamento com fluorocromos base específicos e de hibridização *in situ*, com sondas de DNA telomérico, de rDNA 5S e 45S, em indivíduos de diferentes acessos.

Para a execução das atividades, inicialmente foi realizada a classificação do germoplasma de trigo armazenado na Colbase em três grupos quanto a sua germinabilidade (I - 86-100%, II - 51-84% e III - 0 a 50%) e comportamento ao longo do tempo (A- germinabilidade crescente, B - germinabilidade estável e C - germinabilidade decrescente). A distribuição dos acessos de acordo com tais parâmetros permitiu a seleção dos materiais para dar início às análises fisiológicas e genéticas. As análises para determinação da qualidade fisiológica das sementes, oriundas de acessos armazenados, na Colbase, em longo prazo (20-30 anos) e das sementes dos mesmos acessos com regeneração recente no Banco Ativo de Germoplasma – Embrapa Trigo, foram conduzidas obedecendo às recomendações técnicas internacionais vigentes. Foram utilizados 43 acessos da Colbase e os mesmos 43 do BAG – Embrapa Trigo. Para o teste da germinação, amostras com 100 sementes, com 4 repetições de 25 sementes cada, foram colocadas em papel germiteste, umedecidos com água destilada e mantidos à temperatura constante de

20°C, fotoperíodo de 16h, com avaliações aos 5 e 10 dias. Quanto à citogenética, fez-se: 1) Análise dos cromossomos mitóticos por coloração convencional para todos os acessos que tiveram suas sementes germinadas; 2) Análise do comportamento meiótico em acessos selecionados, a partir das irregularidades encontradas na mitose: as inflorescências jovens foram coletadas, fixadas em Carnoy 3:1 (álcool etílico: ácido acético Glacial) por 24 h e estocadas em álcool 70% a 4°C; 3) Hibridização *in situ* (FISH) de cromossomos mitóticos, segundo protocolos usados por Brasileiro-Vidal et al. (2003) para *Triticeae*.

Os resultados obtidos nos testes de germinação dos acessos armazenados em longo prazo na Colbase e os atuais indicaram que a maioria dos acessos (70 %) com germinação inicial abaixo de 50% tiveram reduzido seu potencial de vida durante o armazenamento. No entanto, alguns acessos (23 %) permaneceram com sua taxa de germinação constante e somente três (7 %) tiveram um aumento na percentagem de sementes germinadas. Isso pode estar associado a erro amostral ou ao próprio genótipo. Contudo, para os acessos que já entraram na Colbase com baixa germinabilidade, é extremamente importante a regeneração e a reposição periódica de sementes.

Para as análises mitóticas, entre os acessos armazenados por 30 anos na Colbase, cinco deles, além de células mitóticas normais, apresentaram metáfases com quebras de cromossomos e anáfases com pontes e/ou fragmentos acrocêntricos. Estes dados são importantes já que tais acessos foram armazenados com uma faixa de germinação entre 50 a 75 % e, apresentaram em avaliações posteriores, valores de até 50 % de germinação. Nos acessos armazenados, há 20 anos, na Embrapa Trigo três também apresentaram células com as mesmas irregularidades. Contudo, ressalta-se que apenas um pequeno número de acessos foram analisados, até o momento, e somente para o grupo armazenado em longo prazo.

Os resultados da meiose para a geração F_1 foram obtidos a partir de células em diacinese e metáfase I. Quando em metáfase I, apesar de ocorrer o alinhamento dos cromossomos na placa equatorial, a contagem e análise dos mesmos foi prejudicada pela sua sobreposição. Além disso, foram analisadas as fases anáfase I e II, telófase I e II, que permitiram observar a segregação cromossômica. Foi constatada aderência cromossômica em diacinese e na metáfase I a presença de bivalentes não orientados na placa equatorial. Nas demais fases, foram freqüentes a presença de cromossomos retardatários, pontes e/ou fragmentos em telófase e micronúcleos em telófase III, o que acarreta conseqüências diretas na formação dos micósporos. Contudo, apesar de ser observado um grau variado de anormalidades, essas não foram predominantes. Para seis acessos o índice meiótico ficou dentro do normal (90% ou mais), podendo ser considerados citologicamente estáveis para uso no melhoramento. Ressalta-se que a análise meiótica de indivíduos F_1 e F_2 darão subsídios quanto à estabilidade cromossômica do germoplasma armazenado.

Quanto à técnica de Hibridização *in situ*, esta foi realizada na UFPE. Foram usados os acessos BRA 0142247 e BRA 0142484, provenientes da Colbase e pertencentes ao grupo III. A análise de onze metáfases do primeiro acesso e seis do segundo, utilizando a sonda pSc 119.2, indicou a ausência de alterações cromossômicas nos cromossomos marcadores pela referida sonda em ambos os acessos. A FISH permitiu a identificação de todos os cromossomos do genoma B, alguns do genoma A e do genoma D, como descrito por Mukai et al. (1993) para a cultivar modelo 'Chinese Spring'. Porém, não foi possível diferenciar todos os cromossomos utilizando apenas esta sonda, uma vez que, a espécie apresenta cromossomos de tamanho e forma muito parecidos, como também, marcações semelhantes nos cromossomos dos genomas A e D. Entretanto, verificou-se a ocorrência de pequenas diferenças em relação aos resultados obtidos anteriormente para a 'Chinese Spring' e para o acesso PF 839197, proveniente da Embrapa Trigo

(Brasileiro-Vidal et al., 2005), onde se evidenciou a presença de sítios extras e outros ausentes nos cromossomos 5A, 1B, 2B, 3B, 6B e 7B. Enfatiza-se que um número maior de indivíduos deverá ser analisado dando ênfase aos indivíduos que apresentam alterações cromossômicas (pontes e fragmentos acêntricos) em células sem pré-tratamento, analisadas convencionalmente.

Diante do exposto, os resultados obtidos neste trabalho, além de contribuírem com informações importantes sobre a condição genética do germoplasma de trigo armazenado em longo prazo, podem servir de modelo para a análise da situação genética do germoplasma de outros cereais de grande importância sócio-econômica para o país.

Referências Bibliográficas

ABDUL-BAKI, A. A.; ANDERSON, J. D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOSLOWSKI, T. T. **Seed Biology**. New York: Academic, 1972. v. I, 416p.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S. P.; BENKO-ISEPPON, A. M.; GUERRA, M. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, vol.28, no.2, p.308-313. 2005.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S. P.; ZANATTA, A. C. A.; PRESTES, A. M.; MORAES-FERNANDES, M. I. B.; GUERRA, M. Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poaceae) using *in situ* hybridization with different DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, vol.26, no.4, p.505-510. 2003.

COELLO, P.; VÁZQUEZ-RAMOS, M. Maize DNA polymerase 2 (an a-type enzyme) suffers mayor damage after seed deterioration. **Seed Science Research**, Wallingford, v.6, n.1, p.1-7. 1996.

GHOSH, B.; ADHIKARY, J.; BANERJEE, N. C. Changes of some metabolites in rice seeds during ageing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.9, n.1, p.468-473. 1981.

MUKAI, Y.; NAKAHARA, Y.; YAMAMOTO, M. Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. **Genome**, Ottawa, v.36, p. 489-494, 1993.

MURATA, M.; ROSS, E. E.; TSUCHIYA, T. Chromosome damage induced by artificial seed aging in barley. I. Germinability and frequency of aberrant anaphases at first mitosis. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v.23, n.2, p.267-280.1981.

ROBERTS, E. H. Loss of seed viability: chromosomal and genetic aspects. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.3, p.515-27. 1973