

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

VIABILIDADE POLÍNICA E HIBRIDIZAÇÃO
GENÔMICA *IN SITU* APLICADA AO
MELHORAMENTO DE TRITICALE

ADRIANA BRAMBATTI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, abril de 2010

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

VIABILIDADE POLÍNICA E HIBRIDIZAÇÃO
GENÔMICA *IN SITU* APLICADA AO
MELHORAMENTO DE TRITICALE

ADRIANA BRAMBATTI

Orientador (a): Dr^a Sandra Patussi Brammer
Co-orientador: Dr. Alfredo do Nascimento Junior
Colaboração: Dr^a Ana Christina Brasileiro-Vidal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, abril de 2010

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela família e pelas pessoas maravilhosas que colocaste em meu caminho.

À Embrapa Trigo, pela disponibilização de infraestrutura e materiais adequados para a realização do presente trabalho.

À Dr^a. Sandra Patussi Brammer, pela confiança depositada em mim, excelente convívio e orientação, estímulo nos momentos de incerteza e amizade construída.

Ao Dr. Alfredo pela sua coorientação, amizade e apoio no desenvolver do trabalho.

À Dr^a Ana Christina Brasileiro-Vidal, pelos conhecimentos transmitidos e maravilhosa colaboração, juntamente com sua orientada, Ana Rafaela da Silva Oliveira, para que este trabalho se concretizasse.

À Dr^a. Paula Wiethölter, pela ajuda nas análises estatísticas, amizade e apoio técnico e emocional nos momentos difíceis.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Aos professores, pelos ensinamentos transmitidos, assim como aos demais membros do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UPF, pela eficiência demonstrada.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia da UPF, pela permissão de utilizar o microscópio óptico e programa de captura de imagens.

Aos queridos colegas do Laboratório de Biotecnologia, da Embrapa Trigo, pela ajuda no desenvolver do presente trabalho, momentos de descontração, incentivo e amizade construída, em especial à Maira, Lizete, Liane, Cibele, Valdirene, Andréa e Claudia.

À minha tia Solange assim como aos demais familiares pelo apoio prestado.

Em especial, à minha mãe Vilma e minha irmã Luciana, pelo amor, paciência, incentivo e apoio financeiro para que eu pudesse realizar mais uma etapa importante na minha vida.

E, a todos aqueles que, de alguma maneira contribuíram e acreditaram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 Triticale.....	6
2.2 Melhoramento Genético.....	18
2.3 ACitogenética no Melhoramento de Triticale.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1 Material.....	48
3.2 Métodos.....	50
3.2.1 Viabilidade Polínica.....	50
3.2.2 Hibridização <i>In Situ</i>	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1 Viabilidade Polínica.....	58
4.2 Hibridização Genômica <i>In Situ</i>	66
5 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Genótipos de triticales (X <i>Triticosecale</i> Wittmack) utilizados para estudos de viabilidade polínica e suas respectivas genealogias e origens. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2009.....	49
2	Genótipos de triticales (X <i>Triticosecale</i> Wittmack) utilizados na hibridização genômica <i>in situ</i> e suas respectivas genealogias e origens. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2009.....	50
3	Análise de variância F para diferentes categorias de grãos de pólen. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2009.....	59
4	Viabilidade polínica obtida para os genótipos de triticales analisados pelo teste de Tukey a 1%. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2009.....	60
5	Análise de correlação, por meio do Teste de Pearson, entre as variáveis analisadas: grão de pólen vazio, grão de pólen com mais de um poro, grão de pólen com pouco amido, grão de pólen com tamanho diferente e grão de pólen binucleado e/ou trinucleado. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2009.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Comparação entre espigas de trigo (A); triticale (B) e centeio (C), evidenciando a condição híbrida do triticale.....	11
2	Representação do processo de formação dos triticales primários e secundários.....	19
3	Principais etapas da hibridização genômica <i>in situ</i> (GISH).....	44
4	Preparo de lâminas de triticale (X <i>Triticosecale</i> Wittmack) para análise de viabilidade polínica.....	51
5	Esquema marcação da sonda, pela reação de <i>nicktranslation</i>	55
6	Etapas do processo de hibridização genômica <i>in situ</i>	56
7	Diversidade de grãos de pólen encontrados	58
8	Hibridização genômica <i>in situ</i> (GISH) em células de triticale ($2n = 6x = 42$), genótipos BRS Ulisses (A, B, C) e PFT 112 (D, E, F), usando DNA de centeio como sonda (verde/vermelho) e de trigo como bloqueio. Os cromossomos das células A e D foram contra-corados com DAPI (azul). Em seguida os mesmos foram corados com FITC (células B) e Cy3 (célula E). C e F apresentam a sobreposição das imagens A e B; D e E, respectivamente.....	69

- 9 Hibridização genômica *in situ* (GISH) em célula de triticales ($2n = 42$), genótipos Triticale BR 4 (A,B,C) e PFT 0803 (D,E,F), usando DNA de centeio como sonda (verde) e de trigo como bloqueio. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (azul). A mesma célula está representada em A, D (DAPI), B, E (FITC) e C, F (sobreposição das imagens A e B; D e E, respectivamente..... 70
- 10 Hibridização genômica *in situ* (GISH) em célula de triticales ($2n = 6x = 42$), genótipo BRS Minotauro, usando DNA de centeio como sonda (verde) e de trigo como bloqueio. Os cromossomos da célula A foram contra-corados com DAPI (azul). Em seguida, os mesmos foram corados com FITC (célula B). A sobreposição das imagens está representada na célula C. As setas representam possíveis translocações.. 71

VIABILIDADE POLÍNICA E HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA *IN SITU* APLICADA AO MELHORAMENTO DE TRITICALE

**ADRIANA BRAMBATTI¹, SANDRA PATUSSI BRAMMER²,
ALFREDO DO NASCIMENTO JUNIOR³, ANA CHRISTINA
BRASILEIRO-VIDAL⁴**

RESUMO – Análises citogenéticas são importantes ferramentas para a seleção assistida em um programa de melhoramento, possibilitando rapidamente informações acerca da constituição genética e estabilidade dos materiais, uma vez que para a obtenção de plantas estáveis, várias gerações são necessárias em virtude da segregação dos genes. O presente trabalho objetivou, primeiramente, avaliar a viabilidade polínica de 29 genótipos de triticale secundários e possivelmente hexaploides (*X Triticosecale* Wittmack), pertencentes ao bloco de cruzamentos do programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo, do ano de 2009, utilizando-se delineamento casualizado, com cinco variáveis analisadas em 29 tratamentos. Sendo que em cada tratamento foram realizadas cinco repetições, representada por uma espiga de planta diferente. O outro objetivo visou analisar, via hibridização genômica *in situ* (GISH), a estabilidade cromossômica, em células mitóticas, especialmente no que diz respeito à presença ou

¹ Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Produção Vegetal.

² Orientadora, Bióloga, Dr^a. em Genética e Biologia Molecular, Prof^a. do PPGAgro/UPF e pesquisadora da Embrapa Trigo.

³ Coorientador, Eng. Agr., Dr. em Agronomia, Pesquisador da Embrapa Trigo.

⁴ Colaboradora, Bióloga, Prof.^a Dr^a da Universidade Federal de Pernambuco.

ausência de translocações em cinco genótipos elite do programa de melhoramento, utilizando DNA genômico de Centeio BR1 como sonda. O terceiro objetivo consistiu e confirmar o nível de ploidia dos materiais analisados por GISH. Os dados da viabilidade polínica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 1%. A correlação dos dados foi efetuada pelo Teste de Pearson. A maioria dos grãos de pólen apresentou elevada taxa de grãos binucleados e/ou trinucleados (90%), valores considerados satisfatórios. Todos os triticales foram hexaploides. Quanto à GISH, um genótipo apresentou possíveis translocações cromossômicas e os demais mostraram padrão para triticales completo. Entretanto, sugere-se estudos posteriores para verificar quais os genomas e cromossomos de trigo estariam envolvidos nas translocações. Concluiu-se que os materiais avaliados apresentaram-se estáveis quanto à viabilidade polínica e nível de ploidia. A presença de translocação cromossômica em células mitóticas não representa uma instabilidade genotípica herdável, pois a mesma só é comprovada por meio de estudos em células meióticas.

Palavras-chaves: *X Triticosecale* Wittmack, citogenética, pólen, GISH, translocações cromossômicas.

**POLLEN VIABILITY, AND GENOMIC IN SITU
HYBRIDIZATION APPLIED TO THE IMPROVEMENT OF
TRITICALE**

ABSTRACT - Cytogenetic analysis are important tools to an assisted selection strategy in a breeding program, enabling information about the genetic constitution and the materials stability quickly, once to obtain stable plants, several generations are needed because of the genes disintegration. This study aimed, firstly, assess the pollen viability of 29 genotypes of secondary triticale and possibly hexaploid (*X Triticosecale* Wittmack) belonging to the block of the breeding program of Embrapa Trigo, in 2009, using a randomized block design, with five variables examined in 29 treatments, where in each treatment was made five replications, represented by a tang of a different plant. The other goal was to analyze, by genomic in situ hybridization (GISH), the chromosomal stability in mitotic cells, especially to the presence or absence of translocations in five elite genotypes of the breeding program, using rye genomic DNA as probe. The third objective was to confirm the ploidy level of the materials analyzed by GISH. The pollen viability data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the averages compared by Tukey test at 1%. The correlation data were analysed by Person test. Most of the pollen grains showed a high rate of binucleate/trinucleate (90%), values considered satisfactory. All triticales were hexaploids. About GISH, a genotype showed a possible chromosomal translocations and the other showed a pattern to complete triticale. However, we suggest further studies to see which of wheat genomes and chromosomes were involved in the translocations. We concluded that, tested materials were stable about the polinic viability and the ploidy level. The presence of chromosomal translocation in mitotic cells does not represent a heritable genotypic instability, because it is only proven by studies on meiotic cells.

Keywords: *X Triticosecale* Wittmack, cytogenetic, pollen, GISH, chromosomal translocation.

1 INTRODUÇÃO

Em programas de melhoramento genético de plantas, a análise citogenética é um dos métodos de extrema importância, usada para analisar a estabilidade genômica da espécie, a fertilidade, e principalmente, para monitorar a transferência gênica entre espécies, possibilitando auxiliar na seleção e maximizar tempo, recursos físicos e financeiros.

No caso do triticales, por ser um híbrido interespecífico, a escolha dos parentais para o desenvolvimento de populações segregantes e a adequada avaliação dos materiais, são cruciais para os melhoristas, em virtude da lenta incorporação dos alelos favoráveis, os quais, no processo de hibridação segregarão durante as gerações subsequentes.

Em Poaceae, alterações cromossômicas, numéricas ou estruturais, são comumente encontradas, afetando a estabilidade dos genótipos e repassando estas alterações às futuras gerações ou alterando o fenótipo da planta. Da mesma forma, a presença de anormalidades em grãos de pólen é um provável indicativo de irregularidade no processo meiótico ou de fatores bióticos e/ou abióticos que possam inferir baixa fertilidade masculina.

Frente às anomalias que podem ocorrer em triticales, destaca-se a importância de confirmar a estabilidade genotípica do material analisado, por meio de técnicas citogenéticas, desde as simples, como a análise da viabilidade polínica, até as mais sofisticadas, como a hibridização genômica *in situ* (GISH). Estas possibilitam selecionar e utilizar os genótipos estáveis como genitores

para geração de variabilidade, permitindo respectivamente, inferir a fertilidade masculina da planta e analisar a estabilidade cromossômica por meio da confirmação do nível de ploidia, que precisa estar estável para registro e proteção de uma futura cultivar, e detectar a presença de possíveis translocações que a planta possa vir a apresentar.

Por este motivo, é essencial que um programa de melhoramento genético adote como ferramenta de rotina a utilização de marcadores citogenéticos para analisar os materiais, devido à confiabilidade dos resultados, principalmente pelo fato de terem expressão independente das variações ambientais ou da ativação gênica.

Em virtude da problemática abordada, os objetivos do presente trabalho foram:

- a) Avaliar a viabilidade polínica de 29 genótipos de triticales, pertencentes ao bloco de cruzamentos do programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo, do ano de 2009;
- b) Analisar via GISH, a estabilidade cromossômica em células mitóticas de cinco principais genótipos do programa de melhoramento, especialmente no que diz respeito à presença ou ausência de translocações;
- c) Confirmar o nível de ploidia dos materiais analisados na GISH.

Desta forma, os resultados obtidos orientarão o melhorista nas escolhas dos melhores genótipos, caracterizados citogeneticamente, para os futuros cruzamentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Triticale

2.1.1 Histórico

O triticale (*X Triticosecale* Wittmack), cereal cultivado durante o inverno no Brasil, com colheita entre outubro e dezembro, é um híbrido intergenérico, pelo fato de seus parentais serem duas espécies distintas: trigo (*Triticum spp* L.) como parental feminino e centeio (*Secale cereale* L.) como parental masculino, espécies autógama e alógama respectivamente (CARVALHO et al., 2008).

Segundo Baier et al. (1994), este cereal resultou da imaginação e da iniciativa humana devido à uma grande crise alimentar na Europa ocorrida no século XIX. A princípio, objetivava-se usá-lo como substituto do trigo na alimentação humana, mas, atualmente, a maior demanda é para a alimentação de suínos e aves, embora há uma tendência de crescimento para a nutrição humana (NASCIMENTO JUNIOR, 2009). Desde o seu surgimento até os dias atuais, o interesse dos pesquisadores em melhorá-lo consiste em unir as características favoráveis de cada espécie parental, principalmente a rusticidade e qualidade nutritiva do centeio com o potencial produtivo do trigo.

Sua história data de relatos realizados por Alexandre Stephen Wilson em Edimburgo, na Escócia, no ano de 1875. Ele produziu o primeiro híbrido intergenérico, utilizando pólen de centeio para fertilizar gametas femininos de trigo, resultando em duas plantas

com pilosidade próxima à espiga (pedúnculo piloso) que foram relatadas para a Sociedade de Botânica de Edimburgo. No entanto, em seu trabalho, a F_1 foi totalmente estéril. Em 1884, foi publicada na *Rural New Yorker*, a primeira ilustração de uma planta parcialmente fértil, proveniente do cruzamento de trigo com centeio, no qual o pesquisador Elbert Sillick Carman obteve plantas que produziram aproximadamente dez espigas, cada uma com 19 grãos, em média (CARVALHO et al., 2008).

Fatos concretos sobre a produção de triticales férteis foram evidenciados em 1888, na Alemanha, pelo pesquisador Wilhelm Rimpau, que, após uma série de cruzamentos, conseguiu obter uma verdadeira planta híbrida com sementes. Ao contrário das primeiras tentativas, neste caso as progênies apresentavam uniformidade e eram realmente viáveis. Em 1933, Moritz provou a real existência de proteínas tanto de trigo como de centeio nas plantas produzidas por Rimpau (AMMAR et al., 2004).

Embora o triticale não tenha sido produto da evolução natural, Falcão (1978) relata que em 1912 foi descoberto um híbrido natural de trigo cruzado com centeio no jardim da Escola de Agronomia, em Viena, e que em 1914, três outros híbridos foram encontrados na Fazenda Experimental de Arlington, em Washintgon.

Foi durante a estação de cultivo em 1918, na Estação Experimental de Saravot, na Rússia, que o pesquisador Meister observou milhares de híbridos num campo experimental onde plantas de trigo com polinização parcialmente aberta, em ano anterior, haviam sido isoladas umas das outras por linhas de centeio (MEISTER, 1921 apud CARVALHO et al., 2008). Tais híbridos possuíam pedúnculo

piloso, caráter determinado por um gene dominante localizado no cromossomo 5R do centeio, e a maioria era macho-estéril. As sementes desses híbridos, que são mantidas em banco de germoplasma até hoje, foram exploradas durante 16 anos por Meister e seus colegas. A caracterização citológica dos híbridos obtidos em 1929, por Levitzky e Benetzkaja, confirmou sua natureza anfidiplóide (OETTLER, 2005).

Contudo, o interesse por triticales pelos melhoristas de plantas despertou depois de 1930. Inicialmente as pesquisas concentraram-se na Alemanha, Rússia, Suécia e Áustria, sendo praticamente retardadas durante a Segunda Guerra Mundial, reaparecendo em meados de 1950 nos países ora citados incluindo o Japão (FALCÃO, 1978).

Em 1937, com a descoberta da colchicina, uma nova ênfase foi dada para o triticales. Por conter parentais incompatíveis geneticamente que não pareciam-se na meiose, as progênies eram estéreis. No entanto, com a duplicação cromossômica produzida por este alcalóide, as progênies tornaram-se viáveis. O uso da cultura de embriões incluiu outra alternativa encontrada para ser aplicada ao triticales, diminuindo a incidência de anormalidades e abortos embrionários. Tais ferramentas possibilitaram a produção sistemática de anfiploides novos e férteis em números ilimitados e a condução de pesquisas em larga escala (OETTLER, 2005).

O primeiro programa de melhoramento de triticales nas Américas foi desenvolvido em 1954 na Universidade de Manitoba, Winnipeg, no Canadá. Dez anos depois, o Departamento de Ciência Vegetal, juntamente com o CIMMYT (Centro Internacional de

Melhoramento de Milho e Trigo), formaram um programa cooperativo com o objetivo de desenvolver triticales que produzissem tanto quanto as melhores cultivares de trigo, aveia e cevada para as nações em desenvolvimento (FALCÃO, 1978).

Segundo Gupta e Priyadarshan (1982), de grande importância para o melhoramento deste cereal, foi a obtenção de linhagens altamente férteis, denominadas Armadillo, em 1968, no México. Estas apresentavam o par cromossômico 2R do centeio substituído parcialmente pelo 2D do trigo.

No Brasil, uma pequena coleção de triticales originários do Canadá foi observada pela primeira vez, em 1961, no Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Sul (IPEAS). As plantas apresentaram desenvolvimento vigoroso e resistência às doenças foliares, porém eram muito tardias, altas e estéreis. Uma cooperação sistemática entre o CIMMYT e os institutos de pesquisa do Brasil teve início em 1969 (BAIER et al., 1994), as quais continuam até o presente.

Em 1976, em coleção do CIMMYT, observou-se na Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, linhagens com peso do hectolitro de até 74 kg/hl. Duas dessas linhagens foram lançadas como “Triticale BR1” e “CEP 15 Batovi” e passaram a ser cultivadas no Brasil, entre 1986 e 1988. Em decorrência da introdução desses genótipos, os programas de pesquisa com triticale foram ampliados em várias instituições de pesquisa do Brasil (BAIER et al., 1994). Entretanto, há dados de cultivo comercial de triticale a partir de 1982 (NASCIMENTO JUNIOR et al., 2004).

2.1.2 Taxonomia e caracteres botânicos

O triticales, pertencente à família Poaceae, subfamília Pooideae, tribo Triticeae e subtribo Triticineae, apresentou diversos nomes propostos por pesquisadores, acarretando em uma considerável confusão com relação à nomenclatura científica e popular deste anfidiplóide (BAIER, 1999; CARVALHO et al., 2008).

O primeiro nome, *Tritico-secale rimpaii*, foi sugerido em 1899, por L. Wittmack (OETTLER, 2005). Segundo Baier (1994), MacKey propôs a utilização dos seguintes nomes em função da ploidia do triticales: *Triticum turgidocereale* (Kiss) Mac Key e *Triticum rimpaii* (Wittmack) Mac Key para triticales hexaploides e octoploides, respectivamente. Cerca de 70 anos mais tarde, B.R. Baum, com o aval do Código Internacional de Botânica, sugeriu um nome científico mais apropriado para o híbrido intergenérico: *X Triticosecale* Wittmack (BAUM, 1971 apud CARVALHO et al., 2008). Para nome comum, M. Lindschau e E. Oehler recomendaram “triticales”, designação amplamente aceita e utilizada pela comunidade científica (OETTLER, 2005).

A planta de triticales, bem como a espiga e o grão, apresentam características intermediárias entre o trigo e o centeio. Assemelha-se mais ao trigo, apresentando o grão mais comprido e com diâmetro maior que o do centeio, não possuindo deformidades ou enrugamento em condições favoráveis ao seu desenvolvimento e enchimento. A espiga pode ser comprida como a de centeio, composta por vinte a trinta espiguetas, possuindo de três a cinco flores férteis e grãos cada uma (Figura 1). Além disso, as cultivares brasileiras são

aristadas, de coloração clara, com pilosidade nas glumas e no ráquis (BAIER et al., 1994). As diferentes variedades de triticales podem ter hábito de crescimento invernal, primaveril ou facultativo. Além disso, geralmente as cultivares possuem bastante serosidade na espiga, no colmo e nas folhas, o que lhes confere uma coloração verde azulada que aumenta um pouco antes do espigamento (ROYO, 1992).



Figura 1 - Comparação entre espigas de trigo (A); triticales (B) e centeio (C), evidenciando a condição híbrida do triticales (Fotos: Embrapa Trigo).

Quanto à sua biologia reprodutiva, por ser fruto do cruzamento entre o trigo, espécie autógama, e o centeio, preferencialmente alógama, o triticales tem uma pequena tendência à alogamia, embora ele seja considerado uma espécie autógama, tanto no melhoramento genético e na legislação e normas para a produção de sementes (CARVALHO et al., 2008).

Carvalho et al. (2008) destacam que várias pesquisas já foram desenvolvidas com o objetivo de determinar a taxa de fecundação cruzada possível em diversos genótipos de triticales, mas os resultados são diversos e variam conforme a ploidia do triticales e o genótipo. Isso pode ser explicado pelo fato de que influências genéticas e ambientais alteram a frequência de alogamia entre as plantas. De modo geral, triticales octoploides apresentam taxas de

fecundação cruzada superiores, em função de anormalidades cromossômicas, e consequente esterilidade polínica.

O uso de aurículas coloridas como marcadores morfológicos permitiu detectar uma frequência de 0,21 de polinização cruzada devido a condições ambientais da Europa. Outro estudo, utilizando genes marcadores de ausência de serosidade, evidenciou uma frequência de fecundação cruzada de 0,15 até 0,47 (GREGORY, 1976 apud CARVALHO et al., 2008). Entretanto, para as cultivares de triticales atuais, Oettler (2005) considera uma frequência de cruzamento natural de 0,10.

2.1.3 Caracteres agronômicos

O triticale é considerado uma planta rústica, com grande capacidade de crescimento em locais onde outras espécies de cereais não se desenvolveriam ou teriam crescimento reduzido; condições que lhe conferem rentabilidade econômica e ambiental, por apresentar, mesmo em condições adversas a outras culturas, uma produção elevada de matéria seca e de grãos, garantindo a sustentabilidade do sistema agrícola, principalmente em pequenas propriedades carentes de recursos para investimentos na condução de cultivos (NASCIMENTO JUNIOR, 2007).

As primeiras cultivares, tanto de primavera como de inverno, eram caracterizadas com bom índice de resistência a moléstias, mas com baixa frequência na fertilidade, reduzido rendimento de grãos e pequeno peso do hectolitro, grãos chochos, alto teor de proteínas contido nos grãos, elevada estatura de planta, alta

frequência de acamamento e germinação dos grãos na espiga. Porém, a pressão de seleção aplicada pelos melhoristas durante décadas proporcionou avanços nos caracteres agronômicos desejáveis do triticales. O grão foi melhorado de forma gradual, mas constante. Seu enchimento foi decorrente do melhoramento usando o teste de peso do hectolitro (Kg.hL^{-1}). O peso atual do hectolitro já alcançou um valor médio de 73 Kg.hL^{-1} , quando era de apenas 58 Kg.hL^{-1} na década de 1970. Contudo, com o incremento no enchimento do grão de triticales a proteína decresceu (CARVALHO et al., 2008).

Nos anos de 1980 a 1990, o CIMMYT reduziu a estatura do triticales de primavera de 140 cm para 125 cm. O rendimento de grãos teve aumento expressivo em menos de 25 anos, chegando a 163%. No entanto, com a expansão da área cultivada de triticales, a resistência favorável dos primeiros triticales foi desaparecendo (CARVALHO et al., 2008).

Características agronômicas tais como a suscetibilidade a algumas doenças (giberela, brusone, manchas foliares e viroses), germinação em pré-colheita e formação deficiente do grão, são deficiências encontradas atualmente em triticales, mas que podem ser corrigidas e melhoradas através de novos ciclos de melhoramento (NASCIMENTO JUNIOR, 2007).

Embora ocorram algumas deficiências, é importante destacar que é possível o cultivo do triticales em áreas consideradas marginais para outros cereais de inverno, tais como aquelas caracterizadas por baixos teores de nutrientes e passíveis da incidência de geadas. Seu sistema radicular profundo, característica herdada do centeio, permite-lhe acesso a nutrientes do solo que são inacessíveis à

maioria dos cereais cultivados, possibilitando elevada capacidade de rendimento de grãos e de forragem nesses ambientes empobrecidos (NASCIMENTO JUNIOR, 2007).

Além do mencionado, o triticale apresenta alta produção de biomassa, melhor crescimento e desenvolvimento em baixas temperaturas, tolerância à seca e à toxidez do solo causada pelo alumínio, melhor resistência a doenças comparado ao trigo, resistência ao acamamento e grãos com alto valor protéico, principalmente lisina e treonina. A cultura contribui efetivamente para a manutenção do sistema agrícola, principalmente em sistema de semeadura direta na palha, proporcionando boa cobertura vegetal para a cultura sucessora mesmo em áreas com baixa fertilidade e/ou solos arenosos (GUPTA & PRIYADARSHAN, 1982; NASCIMENTO JUNIOR, 2009).

Portanto, seu cultivo, que não necessita de alta tecnologia, especialmente no que se refere à adubação, pode contribuir para diminuir os efeitos da degradação do solo no Sul do Brasil, para melhorar a situação econômica de pequenos e médios produtores rurais e para melhorar a competitividade da agroindústria de aves e suínos (BAIER et al., 1994).

2.1.4 Produção, importância econômica e uso final do produto

O triticale está se tornando cada vez mais importante tanto para grãos como para forragens, conforme consta no relatório da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o qual atesta que a área de cultivo do triticale aumentou de 638.042 hectares (ha), em 1980, para 3.356.778 ha, em 2004

(FAOSTAT, 2005 apud KULEUNG et al., 2006). Carvalho et al. (2008) relatam que após 40 anos de melhoramento de triticales, a área cultivada no mundo atingiu cerca de 3,5 milhões de hectares em 25 países, cuja produtividade média de grãos foi de 3.642 Kg/ha.

No Brasil, o cultivo de triticales difundiu-se primeiro no planalto do estado do Rio Grande do Sul e depois, no centro e no sul dos estados de Santa Catarina e Paraná. A partir de então, a área de produção aumentou consideravelmente, sendo cultivado também nos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Goiás (IORCZESKI et al., 2008). Atualmente, os principais estados produtores são Paraná (40 mil ha), São Paulo (25 mil ha), Rio Grande do Sul (7.800 ha) e Santa Catarina (2.500 ha) (NASCIMENTO JUNIOR, 2009).

Conforme Nascimento Junior (2009), a safra brasileira apresentou produção inferior, chegando a 2.441 Kg/ha, mas com leve aumento em relação ao ano anterior de 2.355 kg/ha. Destaca que a produtividade brasileira não está decadente, tal fato deve-se ao plantio de triticales com diferentes hábitos, pois no Brasil são semeados triticales de hábito primaveril assim como na Austrália, Espanha e Portugal, os quais apresentam rendimentos semelhantes ao brasileiro. Entretanto, países como Alemanha, França, Polônia e Suécia cultivam triticales de hábito invernal, de ciclo mais longo e exigentes em temperaturas baixas, com rendimento médio de grãos de 5.000 Kg/ha. Dados de 2005 referentes ao cultivo do triticales no Brasil apresentaram uma produção de 134.868 ha. Em 2008, porém, o triticales apresentou a menor safra dos últimos oito anos, contabilizando 75.640 ha (NASCIMENTO JUNIOR, 2009).

Para o ano de 2009 era esperada uma redução em área e produção de triticales relativa a 2008, mas com pequena elevação da produtividade: 1,5% (IBGE, 2009 apud NASCIMENTO JUNIOR, 2009). Contudo, as condições climáticas do referido ano desfavoreceram seu cultivo, proporcionando uma queda substancial na produção. Além de uma safra menor, os produtores defrontam-se com outro problema: a oferta de milho no mercado interno. Com isto, boa parte dos grãos de triticales que poderiam destinar-se à alimentação animal está estocada em armazéns, em virtude da oferta de milho, utilizado para o mesmo fim e menores exportações decorrentes da desvalorização do dólar (NASCIMENTO JUNIOR, 2009).

A princípio, a intenção era utilizar a farinha de triticales na alimentação humana, em substituição à de trigo. Todavia, como esta se apresentava mais escura e com glúten mais fraco, essa possibilidade foi descartada (BAIER et al., 1994). Entretanto, Nascimento Junior (2009) destaca que existe uma tendência ao aumento do uso de grãos para a alimentação humana. No Brasil, os grãos destinam-se à fabricação de biscoitos, massas de pizza e macarrão, e para a fabricação de farinha, na mistura ou “blend” com farinha de trigo. Além disso, os grãos são moídos ou usados inteiros para mistura em cereais matinais e alguns produtos dietéticos.

Outra utilização do triticales, principalmente em alguns países como Alemanha, Austrália e Canadá, é a síntese de bioetanol, a partir da matéria seca da parte aérea das plantas (NASCIMENTO JUNIOR, 2009).

Aproximadamente 60% dos grãos de triticales são destinados para a alimentação animal, principalmente de suínos e

aves, na forma de silagem, pastoreio ou na fabricação de rações, na qual o triticale demonstrou a sua superioridade em relação a alguns outros cereais para determinadas características (NASCIMENTO JUNIOR, 2007).

Neste sentido, a Embrapa Suínos e Aves estudou o uso deste cereal na composição de rações e diagnosticou que não afetou o ganho peso e de conversão alimentar de animais em fase de terminação tratados com triticale, substituindo o milho em até 75%. Por possuir maior concentração de algumas proteínas, além de outros elementos químicos, o triticale concede maior qualidade nutricional às rações, permitindo, inclusive, a diminuição da quantidade de farelo de soja usado no composto. Por outro lado, a energia e o teor de gordura no triticale são menores que no milho, caracterizando desvantagem para o seu uso na alimentação de animais em fase de terminação. Em 1991, algumas indústrias de suínos e aves apoiaram fortemente a cultura de triticale, conduzindo lavouras demonstrativas e fomentando o cultivo deste cereal (BAIER et al., 1994; NASCIMENTO JUNIOR et al., 2004).

Como o triticale apresenta crescimento vigoroso no outono e no inverno, pode ser utilizado para forragem verde nesses períodos críticos para outras culturas menos resistentes ao frio, como o milho. Assim, a técnica de duplo propósito pode ser aplicada, já que a planta jovem pode ser pastejada ou utilizada para silagem, incrementando a alimentação do gado com uma pastagem de boa qualidade, no final do outono e no início do inverno, ao mesmo tempo em que o rebrote é colhido e utilizado normalmente, inclusive com altos rendimentos de grãos. Porém, a silagem de matéria jovem não é

muito recomendada, pois depende de murchamento no campo, devido ao baixo teor de matéria seca nesta fase, aumentando o risco de deterioração se houver chuva (BAIER, 1997).

Nascimento Junior (2007) relata que o Brasil é considerado um dos grandes expoentes na cultura do triticales, sendo que atualmente menos de 20% dos materiais em ensaios no país provém de material introduzido, sendo o restante, o resultado de intenso programa de cruzamentos entre trigo, centeio e triticales adaptados, que estão sendo mantidos pela Embrapa Trigo.

2.2. Melhoramento Genético

2.2.1 Potencialidade genética

Considerado um anfiploide, por conter os genomas de ambos os parentais, triticales são ditos octoploides quando o trigo comum (*Triticum aestivum*, AABBDD) é cruzado com o centeio (*Secale cereale*, RR), ou hexaploides, quando provém do cruzamento do trigo duro (*Triticum durum*, AABB) com o centeio (*Secale cereale*, RR). Triticales octoploides são os mais comuns e foram os primeiros a serem descritos, contendo 56 cromossomos (ou 28 pares), sendo 42 do trigo: 14 do genoma “A”, 14 do genoma “B” e 14 do genoma “D” e 14 cromossomos do centeio: todos do genoma “R”. Já os triticales hexaploides possuem os 14 cromossomos do genoma “A”, os 14 do genoma “B” e os 14 do genoma “R” (BAIER et al., 1994).

Os diversos cruzamentos realizados resultaram em uma ampla variabilidade de híbridos com genomas e níveis de ploidia diferentes. De acordo com sua origem, o triticales distingue-se em primário e secundário. É considerado primário, quando provém diretamente do cruzamento entre espécies ancestrais (trigo e centeio) e secundário, quando resulta do cruzamento entre primários, primários com algum dos parentais, ou primários com outros secundários (Figura 2) (CARVALHO et al., 2008).

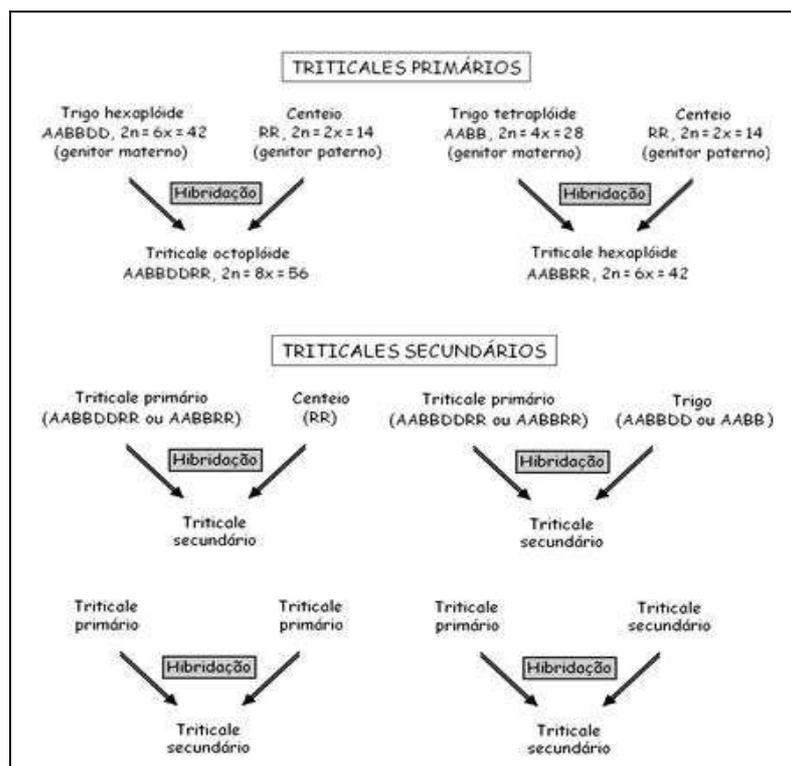


Figura 2 – Representação do processo de formação dos triticales primários e secundários (Fonte: CARVALHO et al., 2008).

Segundo Oettler (2005), os triticales primários não responderam da forma esperada pelos melhoristas, assim como os octoploides, que apresentaram instabilidade citológica, baixa fertilidade e reduzida performance agrônômica. Ela ressalta que triticales octoploides podem ser reduzidos para o nível hexaploide, através do cruzamento com outros triticales hexaploides, obtendo-se descendência com melhor arranjo cromossômico, o que reflete em melhor produção de plantas com menor instabilidade fenotípica e maior produção de sementes. Isto permitiu avanços com a comercialização da forma hexaploide. Entretanto, triticales octoploides, com elevado valor de produção de forragem de planta, estão sendo largamente utilizados para alimentação animal e cobertura de solo.

Outros trabalhos foram realizados com o intento de criar triticales tetraploides, contento a mesma proporção de cromossomos oriundos do trigo e do centeio. O objetivo era incorporar mais características desejáveis do centeio. Todavia, apesar do esforço de mais de trinta anos tentando torná-lo comerciável, até hoje triticales tetraploides, continuam sendo utilizados apenas para a manipulação de genes e de cromossomos (OETTLER, 2005).

Triticales decaploides, obtidos do cruzamento de trigo hexaploide com centeio tetraploide, com posterior duplicação cromossômica (AABBDDRRRR), também possuíram pouca utilidade agrônômica, devido ao baixo vigor do seu grão e baixa fertilidade (SINGH, 2003). Por isso, quase todas as linhas “avançadas” são hexaploides.

Outra classificação leva em conta a origem dos cromossomos constituintes dos híbridos. Dessa forma, os triticales hexaploides que contêm todos os pares de sete cromossomos dos genomas “A”, “B” e “R” são denominados completos, enquanto que os triticales com um ou mais cromossomos de centeio trocados por cromossomos de trigo são denominados substituídos (ROYO, 1992). Entretanto, Ammar et al. (2004) realçam que, por definição, os triticales primários ou também conhecidos como originais são os considerados férteis, verdadeira progênie de uma hibridização entre diferentes gêneros, seguida por uma duplicação cromossômica, em que o trigo é o genitor feminino e o centeio o genitor masculino.

Segundo Nascimento Junior (2007), o conhecimento da base genética e a herança gênica de determinadas características permitem o planejamento dos cruzamentos, do número mínimo de indivíduos a ser trabalhado e do índice de seleção a ser utilizado, na busca de melhores combinações nas plantas.

2.2.2 Variabilidade e Diversidade

Variabilidade genética é caracterizada pela alteração das frequências gênicas e alélicas em uma população. Estudá-la é imprescindível para elucidar a biologia, conhecer a diversidade e obter informações sobre a evolução das espécies, pois mutação, recombinação e fluxo gênico são forças atuantes sobre a geração de variabilidade genética, sendo fundamentais no processo evolutivo, na adaptação de cada espécie ao seu ambiente, ao longo das gerações na qual atua a seleção natural (BRAMMER, 2002).

Diversidade genética refere-se à existência de diferentes formas, em qualquer nível ou categoria. No entanto, há uma tendência de associar diversidade com o nível macro (VALOIS et al., 1999). Ou seja, é na diversidade genética entre espécies que se encontra variabilidade genética da espécie.

Bered (1999) salienta que a variabilidade genética é o ponto de partida para o melhoramento de plantas. No caso do triticales, a variabilidade, apesar de poder contar com toda a diversidade das espécies parentais (trigo e centeio), depende dos objetivos do melhorista e dos processos de seleção. Comparativamente, o triticales possui apenas pouco mais de um século de existência e de desenvolvimento, fruto da imaginação e inspiração humana, ao contrário de dezenas de milhares de anos de cruzamentos, de mutações, de recombinações e da seleção (natural e artificial) dos parentais (OETTLER, 2005).

De modo geral, a base genética de triticales disponível no mundo é restrita quando comparada a outras espécies de cereais de inverno e por isso ela deve ser ampliada. Royo (1992) destaca que há um esforço entre os melhoristas para ampliar a variabilidade genética. O mesmo pode ser aplicado para o Brasil (CARVALHO et al., 2008).

De acordo com Mergoum et al. (2004), por ser uma espécie recente e criada pelo homem, o triticales apresenta deficiências na evolução natural. Por isso, encontrar variabilidade genética suficiente para dar continuidade aos programas de melhoramento é uma das dificuldades encontradas por pesquisadores. A manutenção e a geração de diversidade genética são estratégias necessárias para

aumentar a qualidade do cereal e garantir a presença de alelos favoráveis, que são encontrados em baixas frequências no genoma.

Cruzamentos interespecíficos (entre trigos e triticales) ou intraespecíficos (entre triticales de primavera e de inverno) possibilitam o acesso a genes de trigo e centeio. Além disso, a variabilidade também pode ser garantida através de cruzamentos entre triticales hexaploides e octoploides. Através dos próprios cruzamentos ou de técnicas biotecnológicas, substituições e translocações nos cromossomos e transferência de alelos oriundos de trigos estrangeiros é possível gerar diversidade genética (MERGOUM et al., 2004).

A seleção ou a combinação de materiais e de genes com potencial é possibilitada somente quando há diversidade suficiente entre os genótipos. Assim, através de combinações híbridas, novos cultivares de triticales, cada vez mais adaptados, podem ser desenvolvidos. Além disso, a manutenção, a recombinação e a introdução de genes que determinem caracteres adaptativos, a exemplo dos que conferem resistência às doenças e às alterações climáticas, também são importantes para garantir o sucesso dos programas de melhoramento no futuro.

2.2.3 Melhoramento de triticales

O melhoramento de plantas é a ciência de modificar as plantas em benefício do homem exigindo que o melhorista tenha conhecimentos de genética, botânica, estatística, bioquímica, fisiologia e outras áreas (BERED, 1999).

Federizzi et al. (1999, p.105) abordam que

[...] melhoramento de plantas, fundamentado na genética, tem produzido variedades superiores, de grande utilidade para a agricultura. O uso e a importância de princípios de genética para o melhoramento, contudo, nem sempre é ressaltado de forma direta, havendo às vezes, dificuldades na compreensão da íntima ligação dessas duas áreas da ciência.

Os métodos de melhoramento para triticales têm por base os sistemas clássicos para espécies autógamas, apesar de se saber que a polinização cruzada natural pode ocorrer. Linhas puras são desenvolvidas por meio de sistema genealógico de condução de populações segregantes (BANASZAK & MARCINIAK, 2002 apud CARVALHO et al., 2008).

Cultivares lançadas em escala comercial estão próximas da homozigose apresentando alta homogeneidade. No entanto, isto só é possível depois de várias gerações no processo de melhoramento, devido à ocorrência da polinização cruzada que pode ocorrer. Além disso, a seleção de heterozigotos, que apresentam alto desempenho agrônômico contribui para retardar a obtenção de homozigose no processo (OETTLER, 2005).

Carvalho et al. (2008) relatam que o incremento da variabilidade na Embrapa Trigo tem sido desenvolvido com base em triticales hexaploides e octoploides, derivados de cruzamentos entre trigos e centeios nacionais. Neste caso, o desenvolvimento de

octoploides não visa o lançamento de cultivares, mas sim a ampliação da variabilidade genética e introdução de características positivas do trigo e do centeio.

O triticales é uma espécie difundida praticamente por todo o mundo, estando em fase de introdução e expansão em muitos países. Existem vários programas de melhoramento de triticales, tanto privados como públicos e, em geral, há uma certa correspondência entre a superfície de triticales cultivado de um país e a intensidade na melhora que se eleva ao final do mesmo (ROYO, 1992).

No Brasil, há cinco instituições que trabalham com melhoramento ou introdução sistemática de triticales, cuja fonte do germoplasma provém do CIMMYT. São elas: Embrapa Trigo (Embrapa), Instituto Agrônomo do Paraná (Iapar), Fundação Centro de Experimentação e Pesquisa (Fundacep Fecotrigo), Cooperativa Central Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico Ltda (Coodetec) e Instituto Agrônomo de São Paulo (IAC) (CARVALHO et al., 2008).

Segundo Royo (1992), no melhoramento de triticales, alguns trabalhos foram fundamentados em eliminar os genes de sensibilidade ao fotoperíodo da cultura (que se encontram no genoma 2R) e ampliar a adaptabilidade do germoplasma. Nos materiais já selecionados em um ampla variedade de ambientes, há o melhoramento focado principalmente na melhoria da qualidade. Além disso, o melhoramento da espécie também fundamenta-se na melhoria para tolerância do alumínio e introdução de reparos para evitar a germinação da espiga, na melhoria de resistência a enfermidades e na melhoria do triticales para diferentes usos, como o de forragem.

Cada vez mais os programas de melhoramento de plantas fazem-se necessários. A crescente demanda de alimentos cria continuamente uma necessidade de se aproveitar melhor as características herdáveis disponíveis nas plantas (PAGLIARINI, 2001).

Baggio (1999) ressalta que na pesquisa agrícola o melhoramento é estratégico para aumentar os rendimentos, estabilizar e reduzir os custos de produção, melhorar a qualidade dos produtos, diminuindo os riscos para a saúde e meio ambiente. No entanto, ele é um processo contínuo, complexo e oneroso, que demanda muito tempo, recursos e mão de obra. Desse modo, tecnologias que simplifiquem o processo são extremamente importantes.

Visando acelerar o processo de melhoramento convencional de plantas, a seleção assistida, através de técnicas citológicas e de marcadores genéticos e moleculares pode ser uma excelente ferramenta, tanto na eliminação de genótipos indesejáveis e/ou instáveis, como na seleção daqueles com elevadas características superiores, economizando desta forma, tempo, recursos físicos e financeiros ao melhorista (NASCIMENTO JUNIOR, 2007).

2.3 A Citogenética no Melhoramento de Triticale

2.3.1 Conceito e importância

A citogenética, ramo da ciência que superpõe os conhecimentos da citologia e da genética, estudando os cromossomos

em seus mais diferentes aspectos, tem contribuído muito para o melhoramento de plantas cultivadas (PAGLIARINI, 2001). Isso porque, marcadores citogenéticos têm sua expressão independente das variações ambientais ou da ativação gênica, tornando-os caracteres muito confiáveis (BRAMMER et al., 2007).

Segundo Guerra (1988), estudos citogenéticos, de um modo geral, compreendem todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução.

Brasileiro-Vidal et al. (2005; 2002) destacam que a citogenética tem contribuído significativamente para caracterização de germoplasma, visando à diferenciação tanto de acessos quanto de tipos cromossômicos. Por consequência, tem auxiliado em programas de melhoramento através da identificação de cromossomos ou mesmo de segmentos homeólogos, provenientes de cada parental em cruzamentos interespecíficos ou intervarietais.

Desde o surgimento da Citologia, no início do século XVII, até os dias atuais, a citogenética avançou muito, proporcionando análises melhores e mais confiáveis. Durante o século XX, ela expandiu-se, colaborando no desenvolvimento de diversos ramos da Biologia, tais como a taxonomia, bioquímica, melhoramento vegetal e animal, evolução e medicina clínica. Atualmente, vai muito além do entendimento da transmissão e continuidade dos genes e dos cromossomos. Relaciona-se com a arquitetura molecular do cromossomo e tenta compreendê-la em termos de função genética, colaborando em diversas áreas da pesquisa biológica (PEÑALOZA &

POZZOBON, 2007). Estas autoras também relatam que a citogenética, quando aplicada aos recursos genéticos vegetais, pode contribuir em estudos de evolução, citotaxonomia, no auxílio à caracterização molecular pela localização de sequências específicas de DNA por meio da hibridização *in situ*, pode servir como instrumento de avaliação das plantas regeneradas *in vitro* e das plantas transformadas, pode fornecer dados importantes para estudos sobre a instabilidade cromossômica do material conservado identificando possíveis modificações no número e estrutura dos cromossomos e principalmente, apoiar trabalhos de pré-melhoramento e melhoramento de plantas por meio da análise dos híbridos.

Inicialmente, a caracterização cromossômica baseou-se especialmente em parâmetros morfológicos, como o tamanho dos braços, posição dos centrômeros e localização das constrições secundárias. Com a implantação de técnicas de bandeamento, que permitem a visualização de blocos de coloração diferenciada (bandas), a caracterização cromossômica foi melhorada significativamente (BRASILEIRO-VIDAL & GUERRA, 2002). Assim sendo, a citogenética impulsionou as demais áreas da biotecnologia, associando-se a estas como valiosa ferramenta para as pesquisas científicas, tanto básicas como aplicadas (BRAMMER, 2007).

Em sua revisão sobre os avanços da citogenética, Brammer et al. (2007) abordam que, apesar da revolução provocada pela genética molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, fáceis de serem mensurados, diferenciados em subunidades e manipulados de

diferentes formas, pois de nenhuma outra forma o material genético é tão claramente observado.

Para um programa de melhoramento vegetal a citogenética é uma importante ferramenta de auxílio porque caracteriza o germoplasma de forma simples e prática, proporcionando informações acerca da estabilidade dos materiais, contribuindo no melhoramento tanto na eliminação de genótipos indesejáveis e/ou instáveis, como na seleção daqueles com elevadas características superiores (BRAMMER et al., 2007; ROSA et al., 2006).

Segundo Brasileiro-Vidal e Guerra (2002), a manipulação citogenética é um dos métodos mais importantes no melhoramento de cereais, usado principalmente para o monitoramento da transferência de variabilidade genética entre espécies.

Love (1949), já afirmava que há uma estreita relação entre a citologia e o melhoramento genético vegetal e é por este motivo que o pesquisador da citologia e o melhorista devem trabalhar juntos, complementando-se um ao outro. Segundo o autor, isso acontece porque a segregação mendeliana dos genes depende em primeiro lugar do comportamento meiótico dos cromossomos. Quando partes de cromossomos ou os cromossomos inteiros estão incompletos ou duplicados, a expressão fenotípica é anormal. Se durante a meiose, no zigóteno da prófase I, os homólogos não se pareiam, não haverá a sinapse entre eles e na fase subsequente, paquíteno, não haverá a ligação de dois homólogos para formar um bivalente e, conseqüentemente, não ocorrerá o *crossing-over*. Além disso, se esta ligação for imperfeita, mais adiante acarretará em uma separação desigual dos homólogos na anáfase, gerando no final de toda a

meiose, a formação de univalentes e outras anormalidades citogenéticas (FALCÃO, 1978; JOUVE & SOLER, 1996). Por isso, o alinhamento dos homólogos no zigóteno é um dos fatores cruciais para garantir uma perfeita segregação dos genes na meiose. Por outro lado, fatores externos, como ambientais, também podem interferir no processo meiótico.

Analisando-se a mitose e/ou meiose do material, eliminam-se os materiais instáveis com anormalidades citológicas, aumentando a probabilidade de que aqueles mais estáveis sejam escolhidos em etapa anterior à multiplicação de sementes genética, básica, etc., permitindo um maior avanço na seleção, economizando assim, tempo e recursos físicos e financeiros. Além disso, é possível, por meio das informações obtidas pela citogenética, utilizar os genótipos estáveis como genitores para geração de variabilidade, evitando que anomalias sejam repassadas de geração para geração.

No caso do triticales, seu melhoramento é dificultado pelo fato de ser um híbrido intergenérico, pois geralmente apresenta elevada instabilidade meiótica, que associada a anormalidades genéticas e/ou aberrações cromossômicas pode resultar na formação de plantas atípicas, macho-estéreis ou incapazes de produzir grãos. Isto impede o alcance dos padrões exigidos para a produção de sementes. E é devido a este motivo que torna-se necessário que somente linhagens que possuam a devida estabilidade de produção de plantas típicas sejam avançadas no processo de melhoramento (CORRÊA et al., 2006; ROSA et al., 2006).

Citologicamente, o triticales pode apresentar quatro desordens reprodutivas: instabilidade meiótica, alta frequência de

aneuploidias, baixa fertilidade e grãos enrugados, características que supostamente estão interligadas. Na tentativa de resolver esses problemas, houve um grande aumento nas pesquisas em citologia e citogenética de triticales (OETTLER, 2005). Além do mencionado, em sua revisão, Guerra (2008) relata que a presença de aneuploides pode ser uma das causas da esterilidade parcial de triticales.

Falcão (1978) aborda que, quanto aos aspectos citológicos e genéticos, inúmeras são as informações da literatura a respeito de associação entre fertilidade de semente e anomalias meióticas, sendo muitas delas contraditórias. Ela enfatizou 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 desta relação.

Em trabalho realizado por Rosa et al. (2006), avaliando genótipos de triticales brasileiros, concluiu-se que estes apresentavam diferenças quanto à frequência de tétrades irregulares e que aqueles que apresentam irregularidades meióticas podiam, entretanto, produzir pólen viável e em quantidade elevada. Nascimento Junior (2007) relatou que os genótipos estudados por Rosa et al. (2006), que

apresentaram elevada ocorrência de células anormais em tétrades, cromossomos retardatários e pontes anafásicas, geralmente estavam associados à elevada desordem fenotípica nos campos de multiplicação de semente. Neste sentido, o ambiente também exerce uma forte pressão de seleção, pois variações ambientais podem alterar a perfeita segregação dos genes na meiose.

Apesar de não haver um consenso em relação aos eventos citogenéticos do triticales que influenciam ou não em determinadas características fenotípicas, a disponibilização de resultados corretos sobre a caracterização citogenética do germoplasma contribui para que melhoristas venham a tomar decisões acertadas sobre o uso de diferentes materiais em programas de melhoramento.

2.3.2 Instabilidades cromossômicas

Os cromossomos foram observados pela primeira vez em 1842, por Nägeli que descreveu o comportamento de “estruturas alongadas”, localizadas no núcleo da célula. Descrição esta, do primeiro relato da divisão mitótica, mas que só foi detalhada em 1882, por Flemming. Em 1883, Roux concluiu ao examinar cromossomos meióticos que estes se relacionavam com o mecanismo da herança. Contudo, foi apenas em 1888 que Waldery propôs o termo alemão, *Chromosomen* (do Grego: corpo corado) para denominar as “estruturas alongadas” até então observadas (PEÑALOZA & POZZOBON, 2007).

Segundo Walker e Rapley (1999), por ocasião do início do século XX, o estudo microscópico de células em divisão mostrava que

o número de cromossomos era constante no interior de células de mesma espécie, mas variava um número, geralmente entre as espécies. Em uma célula os cromossomos variavam em tamanho e forma, com duas cópias de cada tipo presentes em cada célula somática. Também, observou-se que seu número dobrava (para dois pares) antes da divisão celular, e que cada célula filha recebia um dos pares (mantendo o número normal de cromossomos).

Atualmente, sabe-se que a constância do número de cromossomos em eucariotos é de tal importância que pode ser usada como um parâmetro na identificação de espécies. Todavia, variações cromossômicas somáticas em plantas têm sido descritas em mais de 240 espécies. Esta ocorrência, chamada de mosaicism, consiste na presença simultânea de células diploides, poliploides e/ou aneuploides em diferentes partes da planta ou de um mesmo tecido, sendo frequentes em raízes, meristemas apicais e tapetum (PAGLIARINI, 2001).

Em plantas de reprodução assexuada, o mosaicism é uma força potencial na evolução e diferenciação de raças cromossômicas, gerando diversidade citológica. Em plantas propagadas sexualmente, a instabilidade somática canalizada nos tecidos reprodutivos leva à produção de gametas com número não balanceado de cromossomos, os quais podem se tornar abortivos ou serem efetivos na fertilização. Neste caso, podem formar plantas hipo ou hiperploides na próxima geração, as quais poderão apresentar problemas de fertilidade devido às irregularidades meióticas. Além do mencionado, a instabilidade somática pode levar também à desuniformidade varietal (PAGLIARINI, 2001).

No Brasil, a instabilidade meiótica responsável pela desuniformidade varietal tem sido amplamente estudada em trigo e triticales. Oscilações climáticas drásticas, baixa insolação, excesso de água, moléstias fúngicas, uso de defensivos agrícolas e acidez do solo são fatores importantes no aumento de anormalidades cromossômicas, responsáveis pela ocorrência de tipos desviantes. Dentre as anormalidades meióticas, as mais frequentes são cromossomos univalentes, bivalentes não orientados na placa, pontes cromossômicas acompanhadas por fragmentos, aderências cromossômicas, segregações irregulares gerando aneuploidia e micronúcleos em tétrades oriundos da ocorrência de cromossomos retardatários na anáfase (PAGLIARINI, 2001; GUERRA, 2008).

Tratando-se do triticales, a primeira revisão enfocando seu sistema genético foi publicado por O'Mara em 1953, com o título "*The Cytogenetics of Triticales*" (JOUVE & SOLER, 1996). Por ser um híbrido intergenérico, observou-se em triticales diversas anomalias meióticas ao longo de extensivos anos de pesquisa, sendo que um dos distúrbios mais frequentes é a ocorrência de univalentes, que podem resultar tanto da falha de pareamento dos cromossomos no zigóteno, quanto da separação precoce dos cromossomos já pareados, devido a não formação de quiasmas. A não inclusão destes cromossomos nos gametas conduzirá, obviamente, à formação de células com um número desviante do normal (n) (FALCÃO, 1978; JOUVE & SOLER, 1996).

Em virtude de o triticales ser poliploide, os efeitos relacionados às anormalidades cromossômicas podem ser "mascarados" por outro genoma, diferente do que ocorreria em uma

espécie diploide. Este é o chamado efeito tampão da poliploidia, que compensa parcialmente as perdas de material genético. Moraes-Fernandes et al. (1984) apud Pagliarini (2001), ressalta que as anormalidades cromossômicas podem levar a perda de genes. Se os genes perdidos não estiverem relacionados com funções vitais para o desenvolvimento do pólen ou da semente, não deverá afetar a viabilidade do portador, mas pode evidenciar-se melhor na sua descendência. Falcão (1978) ao analisar progênies de plantas estáveis e instáveis previamente selecionadas de diversas cultivares de tritcale, observou alta correlação entre os resultados obtidos para a média das plantas mães comparados com as médias de cada progênie, em relação à ocorrência de univalentes.

Translocações, caracterizadas pela transferência de um segmento cromossômico de sua posição original para outro cromossomo do complemento, onde não há perda e nem ganho de material genético para a planta e apenas uma redistribuição normal de material genético entre os cromossomos, também afetam a viabilidade da planta (PAGLIARINI, 2001).

Quando apenas um segmento do cromossomo é translocado a outro, a translocação é dita como simples, e recíproca quando dois cromossomos trocam partes entre si. Esta última é o tipo mais frequente. Raramente, a expressão de um gene envolvido no fragmento translocado é alterada quando transferido para um cromossomo não-homólogo. Esta expressão diferencial do gene na nova localização é conhecida como efeito de posição. A problemática desta alteração estrutural encontra-se após a separação dos homólogos na meiose. Enquanto os indivíduos homocigotos para cromossomos

translocados formam bivalentes normais, têm segregação regular e cada gameta recebe um conjunto completo de genes, os heterozigotos vão ter uma configuração meiótica característica, podendo aparecer conectados, unidos pelas seções translocadas (ZANNETTI & LAUXEN, 2003).

Metade dos gametas serão não-balanceados, contendo duplicações e deficiências que os inviabilizam e, para a outra metade, 25% dos gametas conterão o mesmo rearranjo translocado do genitor e 25% serão normais (PAGLIARINI, 2001).

No paquíteno, um tetravalente em cadeia tem geralmente a forma alongada e irregular. Dependendo da homologia entre os cromossomos envolvidos, a cadeia adquire um formato de anel. O anel, no entanto, assume uma configuração em forma de cruz nesta fase. Com a repulsão dos homólogos, a partir do diplóteno, esses cromossomos tendem a assumir a forma de um anel. Na metáfase I esta forma só é mantida se houver pelo menos um quiasma em cada braço da cruz para manter os cromossomos presos entre si. Caso isto não ocorra, ou haja uma terminalização precoce em um dos braços cromossômicos, o anel se rompe e assume uma configuração idêntica à de um tetravalente em cadeia (GUERRA, 1989).

Na metáfase I, os quatro centrômeros envolvidos na translocação podem se orientar para a separação anafásica de três maneiras diferentes. Os centrômeros podem se orientar de forma a migrar dois homólogos adjacentes para o mesmo pólo e os outros dois para o outro. Podem migrar os dois adjacentes não-homólogos para um pólo e os outros dois para o outro. Ou, podem migrar de forma alternada, isto é, cada cromossomo migra para um pólo oposto ao de

seus adjacentes. Este último arranjo dos centrômeros leva a que o anel se dobre, assumindo a forma de um oito. Isto significa que se o centrômero de um tetravalente se orientasse ao acaso para qualquer dos pólos, $2/3$ dos gametas seriam provavelmente inviáveis (GUERRA, 1989).

2.3.3 Viabilidade polínica e seleção assistida

As angiospermas, caso do triticales, são vegetais que se caracterizam pela presença de frutos, estruturas que dão abrigo às sementes. A planta adulta representa o esporófito ($2n$), que em determinado momento floresce. As flores, quando são perfeitas, apresentam androceu, formado pelos estames (anteras + filetes), e gineceu que pode obter um ou mais carpelos (estigma + estilete + ovário). No interior das anteras, células especiais, os microesporócitos sofrem meiose e originam células haploides chamadas de micrósporos. Após, os micrósporos dividem-se por mitose e originam duas células haploides, sendo uma delas chamada de célula vegetativa e outra célula generativa. Nesse estágio, os micrósporos passam a ser denominados de grãos de pólen. A célula vegetativa ocupa, quase que totalmente o interior dos grãos de pólen, embora que a generativa possui quantidade reduzida de citoplasma. Esta diferença é resultado da mitose assimétrica ocorrida nos micrósporos. A célula generativa ainda sofrerá nova mitose, que poderá ocorrer antes ou durante a germinação do tubo polínico, originando as células espermáticas que farão o papel de gametas masculinos no processo de fecundação (CARVALHO & RECCO-PIMENTEL, 2001).

Em determinados genótipos de triticales e de acordo com a sua constituição, hexaploide ou octoploide, instabilidades genéticas podem ser observadas através 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 viabilidade polínica, para detecção de possíveis anormalidades, que possam refletir na desuniformidade de plantas selecionadas ou linhas avançadas, visando contribuir ao melhoramento genético, e à multiplicação de sementes durante o desenvolvimento da cultivar (ZANOTTO et al., 2009).

Para determinar a estabilidade e/ou instabilidade genética da planta, que será transmitida às próximas gerações, uma das análises mais importante, simples e rápida, e que deve ser utilizada como seleção assistida em um programa de melhoramento genético é a análise de viabilidade polínica.

Desde a década de 40, a técnica vem sendo empregada para muitas espécies agrícolas. Love (1949) descreve 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 micrósporos contendo um ou mais micronúcleos. Assim, rapidamente pode-se examinar uma centena de polens 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 elevada percentagem de grãos de pólen viáveis indica alta fertilidade masculina. Balbinot (2007) realizou uma estimativa em 64 acessos de *Paspalum notatum*, encontrando uma viabilidade polínica relativamente alta, variando de 72% a 98%. Da mesma forma, Zanotto et al. (2009) ao analisarem a viabilidade de grãos de pólen de 52 genótipos de triticales, oriundos do bloco de cruzamentos do programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo, do ano de 2005, concluíram que a grande maioria dos genótipos apresentou viabilidade polínica superior a 90 %. Eles destacam que 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 grãos de pólen inviáveis resultarão em plantas estéreis e numa menor produção de grãos.

2.3.4 Hibridização *In Situ*

Durante a década de 90, a Hibridização *In Situ* (HIS) ou *In Situ Hybridization* (ISH), tornou-se uma técnica essencial no estudo da biologia celular e molecular (SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON, 2000). O desenvolvimento da HIS, com a publicação dos trabalhos de Gall e Pardue em análises cromossômicas, assim

como de Buongiorno-Nardeli e Amaldi em cortes histológicos, ambos no ano de 1969, marcou a transição da era da citogenética clássica para a era da citogenética molecular, uma vez que a mesma proporciona a interação entre os conhecimentos da biologia celular, citogenética clássica e genética molecular (GUERRA, 2004; BRAMMER et al., 2007; PEÑALOZA & POZZOBON, 2007).

A HIS consiste no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA com uma sequência de nucleotídeos complementar situada dentro da célula, visando verificar sua localização precisa, tanto em cromossomos quanto em núcleos interfásicos, caso a célula apresente a sequência em questão. A técnica baseia-se no fato do DNA ser formado por duas fitas complementares, as quais podem ser facilmente desnaturadas e posteriormente renaturadas, voltando ao estado de fita dupla. Se no momento da renaturação das fitas de DNA houver fragmentos de DNA ou RNA marcados disponíveis, os mesmos competirão com o DNA cromossômico e hibridizarão na região de homologia dentro da célula (GUERRA, 2004).

Essa técnica envolve a preparação de lâminas, o isolamento e a marcação da sequência de DNA que se deseja localizar *in situ* e a sua hibridização nos cromossomos. O DNA marcado funciona como uma sonda para encontrar as sequências do DNA cromossomal complementar a ela, chamada de DNA alvo. Guerra (2004) ressalta que o híbrido sonda/alvo pode ser DNA/DNA, RNA/RNA ou DNA/RNA. Para visualizar as regiões hibridizadas, é preciso associar um corante (fluorocromo) à sonda e um outro ao restante dos cromossomos (BRASILEIRO-VIDAL & GUERRA, 2002). Devido à utilização de fluorocromos para a visualização da

sonda, a HIS começou a ser chamada também por FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*).

Atualmente, a marcação da sonda, que antigamente era com isótopos radioativos, pode ser realizada de duas maneiras: de forma direta ou indireta. No primeiro caso, os nucleotídeos estão ligados diretamente a fluorocromos. No segundo caso, os nucleotídeos são acoplados a uma molécula marcadora, a qual é posteriormente detectada por uma molécula contendo um fluorocromo ou um outro sistema de coloração. Biotina e digoxigenina são as moléculas marcadoras mais utilizadas na marcação indireta (GUERRA, 2004).

FISH tem sido utilizada amplamente para localizar diferentes sequências de DNA em cromossomos mitóticos ou meióticos, em núcleos interfásicos e em fibras de cromatina estendidas. A detecção dessas sequências tem originado grandes avanços na citogenética de plantas, destacando-se a construção de mapas físicos, a investigação detalhada da estrutura, função e evolução dos cromossomos, o auxílio no reconhecimento dos homólogos e na comparação entre espécies, localização de transgene na célula, acompanhamento da quantidade de cromatina introgridida em cruzamentos interespecíficos, a análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas (BRASILEIRO-VIDAL & GUERRA, 2002; SCHWARZACHER, 2008; PEÑALOZA & POZZOBON, 2007).

Iorczeski e Zanatta (2002) confirmam que técnicas como a produção e caracterização citológica, via hibridização *in situ*, de híbridos intergenéricos e interespecíficos, vêm auxiliando a transferência de características de interesse e confirmação e a

localização individualizada por célula, da introgressão da espécie alvo, tornando-se nos últimos anos, o método mais promissor dentro da citogenética e em especial, ao melhoramento de plantas.

Os primeiros trabalhos com FISH utilizaram como sondas sequências de DNA em tandem muito conservadas evolutivamente, como DNAr 5S e 45S, fornecendo marcadores importantes para compreender a evolução e as relações interespecíficas em diferentes gêneros de plantas (GUERRA, 2004). Peñaloza e Pozzobon (2007), destacam que a correspondência entre o número de sítios de DNAr 5S e 45S revelados por FISH, e o nível de ploidia tem sido objeto de estudo em diversas espécies, permitindo inferências quanto à origem bem como sobre a possibilidade de silenciamento gênico. Além do DNA ribossômico, DNAs telomérico e o centromérico, DNAs satélites e microssatélites também estão sendo estudados como sonda. Sondas como as de DNA repetitivo disperso e de sequências únicas ou de poucas cópias também vem sendo trabalhadas (GUERRA, 2004; MUKAY, 2005).

Em plantas, tem-se utilizado em muitos trabalhos, uma variação da FISH: a hibridização genômica *in situ* ou GISH (*Genomic In Situ Hybridization*), na qual as sondas marcadas são formadas pelo DNA genômico total de uma espécie, possibilitando distinguir os cromossomos oriundos de diferentes parentais, em híbridos interespecíficos ou em espécies aloploides, pois permite que os cromossomos de diferentes pais/ancestrais/genomas em plantas híbridas, sejam coloridos com diferentes cores (RAINA & RANI, 2001; GUERRA, 2004).

Como os genomas que formam um híbrido interespecífico geralmente são muito semelhantes, o DNA marcado (sonda) de um deles poderá hibridizar indistintamente com os dois genomas (Figura 3). Para evitar que isso ocorra, prepara-se uma mistura de hibridização, na qual é adicionado DNA marcado de uma espécie parental junto com o DNA não marcado de outra espécie e em concentração mais alta. Desta forma, o DNA não marcado funcionará como um bloqueador das sequências exclusivas desta espécie e das sequências comuns a ambas (GUERRA, 2004). Com a GISH, a obtenção da sonda é mais facilmente obtida, não necessitando de amplificação, pois a quantidade de DNA é ilimitada (PENÃLOZA & POZZOBON, 2007), sendo necessária apenas a extração, fragmentação e marcação do DNA genômico.

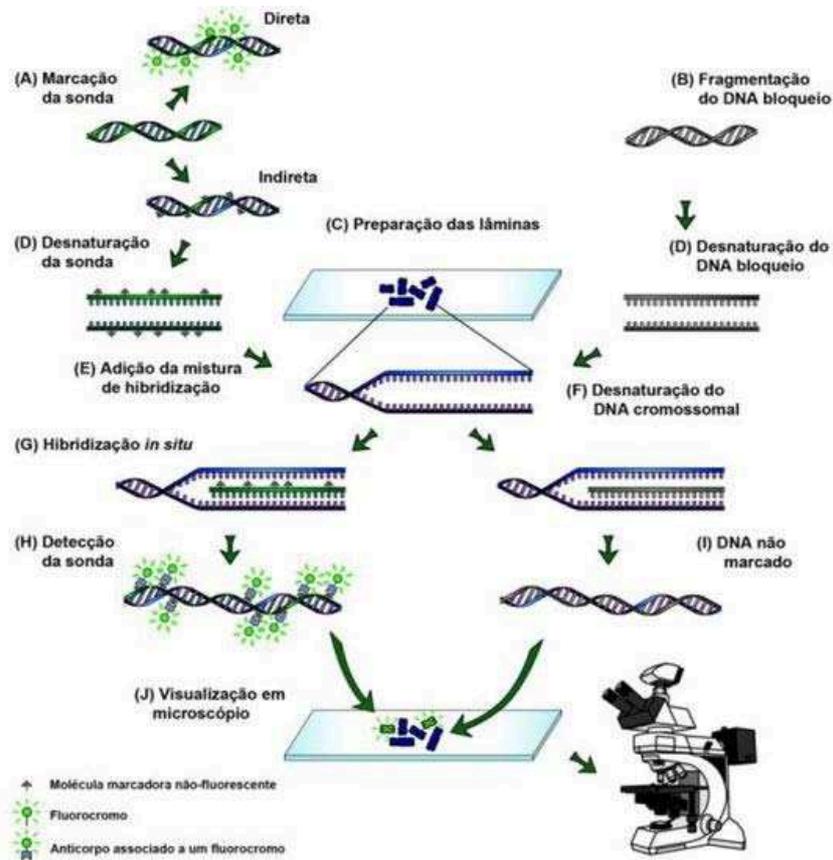


Figura 3 - Principais etapas da hibridização genômica *in situ* (GISH). **(A)** Marcação da sonda via direta ou indireta. **(B)** Fragmentação do DNA bloqueio. **(C)** Preparação das lâminas. **(D)** Desnaturação do DNA da sonda e do bloqueio. **(E)** Adição da mistura de hibridização contendo sonda e bloqueio à lâmina. **(F)** Desnaturação do DNA cromossomal. **(G)** Hibridização *in situ* (sonda e bloqueio). **(H)** Detecção da sonda caso a marcação tenha sido indireta. **(I)** Molécula de DNA não-marcada associada ao DNA bloqueio. **(J)** Visualização dos sinais de hibridização em microscopia de fluorescência nos cromossomos associados à sonda (verde). Os cromossomos não-marcados são visualizados com o contra-corante (azul). Quando a marcação sonda é direta, a etapa de detecção na GISH é excluída, pois a sonda hibridizada já apresenta nucleotídeos com fluorocromos associados. Os fluorocromos são denominados moléculas sinalizadoras e podem ser visualizados diretamente em microscópio de fluorescência, usando um filtro apropriado (Fonte: Santelmo Vasconcelos & Ana Christina Brasileiro-Vidal. In: BRAMMER et al., 2009).

Esta técnica foi desenvolvida por Schwarzacher et al. em 1989, com a finalidade de demonstrar que os genomas parentais de um híbrido entre *Hordeum chilense* e *Secale africanum* podiam ser reconhecidos durante todo o ciclo celular e que ocupavam diferentes domínios no núcleo interfásico (GUERRA, 2004).

A hibridização genômica *in situ* aplica-se igualmente no melhoramento genético vegetal, adquirindo grande importância principalmente nos programas de melhoramento de cereais, por permitir o monitoramento da quantidade de cromatina externa introgridida nas sucessivas gerações de retrocruzamentos e de autofecundações. Da mesma forma, esta técnica permite localizar os pontos de quebra e translocação, cada um separadamente, ou em combinação com o bandeamento C e/ou FISH (RAINA & RANI, 2001). No entanto, a sensibilidade de GISH para distinguir genomas de híbridos não se aplica a todas as espécies devido ao pequeno nível de divergência entre os parentais, como ocorreu em milho (TAKAHASHI et al., 1999).

Brasileiro-Vidal et al. (2005) caracterizaram, via citogenética molecular, uma linhagem de trigo: PF 839197, um acesso de *Thinopyrum ponticum* e seis acessos de híbridos derivados de cruzamentos com as espécies mencionadas anteriormente. Utilizaram várias sondas: duas para marcar sítios de DNAr 5S e 45S (pTa794 e pTa71, respectivamente), uma para marcar sequências altamente repetitivas em centeio (pSc119.2), oligonucleotídeos sintéticos (AAG)₅ e DNA genômico de centeio. Eles encontraram, na linhagem PF 839197, uma translocação envolvendo um braço cromossômico inteiro de centeio, do tipo 1BL.1RS, que também é encontrado no

trigo ancestral desta linhagem (cultivar Alondra). Além disso, foi revelado instabilidade mitótica entre os acessos analisados com um número diferente de 56 cromossomos, mas que, entretanto, pareceu não afetar a formação dos gametas que irão formar a geração seguinte.

Peñaloza e Pozzobon (2007) destacam as aplicações de GISH na caracterização de genomas e cromossomos em poliploides híbridos, plantas híbridas, alopoliploides parciais, hipo-haploides, assim como na identificação de translocações e inversões, contribuindo desta forma para o entendimento dos processos que levaram à especiação. No melhoramento, a GISH também é utilizada para caracterizar linhas recombinantes e detectar o grau de introgressão, importantes quando retrocruzamentos são realizados. Além disso, a técnica tem possibilitado novas considerações para a variação somaclonal, sobre a origem do cromossomo B, controle do pareamento (homeologia, homologia) e outros aspectos da evolução cromossômica.

Segundo MuKay (2005), a hibridização genômica *in situ* superou os problemas associados aos métodos clássicos de análise do genoma, discriminando com sucesso os genomas de muitos grãos e também de espécies madeireiras, onde é necessário um longo tempo para observar a associação dos cromossomos na meiose.

GISH isolado ou em combinação com o bandeamento C e/ou FISH tem sido útil para a identificação, localização e determinação do tamanho da cromatina externa introgridida, dos pontos de translocação e para acompanhar o cromossomo externo ou o segmento de cromossomo durante a retrocruza e seleção, fornecendo resultados mais precisos. Existe uma série de exemplos de sucesso,

como em híbridos da tribo Triticeae (CARVALHO et al., 2009; FRADKIN et al., 2009; NKONGOLO et al., 2009; SEPSI et al., 2009; LI et al., 2007; DOU et al., 2006; LI et al., 2006; SILKOVA et al., 2006; LEONOVA e tal., 2005), híbridos de *Lolium festuca* (ZWIERYKOWSKI et al., 2008), híbridos de *Silene* sp. (MARKOVA et al., 2007), *Lilium* (BARBA-GONZALEZ et al., 2006), *Nicotiana* sp. (KITAMURA et al., 2003), híbridos de tomate-batata (JI & CHETELAT, 2007), cana-de-açúcar (PIPERIDIS & D'HONT, 2001) entre outros.

Guerra (2004) destaca a utilização de ambas as técnicas. Há casos em que é importante reconhecer não apenas os dois genomas ancestrais no híbrido, mas também os cromossomos de cada genoma. Para isso tem sido utilizado, simultaneamente ou sequencialmente, uma sonda para GISH e outra, FISH no caso, para determinada sequência que identifique um ou mais pares cromossômicos. Este autor cita o trabalho realizado por Moscone et al. (1996), onde puderam visualizar os rearranjos entre os dois genomas ancestrais de tabaco e simultaneamente mapear o local de inserção de um transgene.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

O presente estudo constituiu de dois grupos de materiais, os quais foram usados nas diferentes análises.

O grupo I referiu-se à viabilidade polínica, em que foram analisados 29 genótipos de triticales (Tabela 1), oriundos do bloco de cruzamentos do programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo do ano de 2009, sendo que a semeadura foi efetuada a campo, na área I da Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS, em três diferentes épocas.

O segundo grupo (grupo II) referiu-se aos cinco genótipos de triticales utilizados na hibridização genômica *in situ* (GISH). Destes, quatro fizeram parte do bloco de cruzamento, do programa de melhoramento do ano de 2009, da Embrapa Trigo (Tabela 2). O quinto genótipo foi o PFT 112, linhagem candidata à futura cultivar.

Estes genótipos foram escolhidos devido à expressiva importância e uso em programas de melhoramento, assim como na produção agrícola atual, e à relevância deste tipo de estudo para a compreensão da constituição genômica dos principais parentais e nos indivíduos gerados a partir destes.

Tabela 1. Genótipos de triticale (*X Triticosecale* Wittmack) utilizados para estudos de viabilidade polínica e suas respectivas genealogias e origens. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2009

Genótipo	Genealogia	Origem das Sementes ¹
BRS 148	Yogui/Tatu	800.001
BRS 203	LT-1/Rhino	800.002
BRS Minotauro	OCTO92-3(PF89358/CBR1)/TCLBR4	800.003
BRS Netuno	POLLMER//2*ERIZO/BULL1	800.004
BRS Ulisses	ERIZO/NIMIR	800.005
Embrapa 18	Tapir/Yogui//2*MUS	800.006
Embrapa 53	LT1117.82/Civet//Tatu	800.007
IAC 2-Tarasca	TEJON/BGL	800.008
IAC 3-Bantengue	BANTENG "S"	800.009
IAC 5-Canindé	LT 978.82/ASAD//TARASCA	800.010
IPR 111	Anoas5/Stier13	800.011
PFT 0407	ERIZO 11*2/MILMAN*2//PICUS	800.012
PFT 0505	Emb53//PFT116/Hoh-87102-6-1	800.013
PFT 0608	CAAL/RA23	800.017
PFT 0609	Emb53//PFT116/Hoh-87102-6-1	800.018
PFT 0610	Emb53//PFT116/Hoh-87102-6-1	800.019
PFT 0704	Emb53//PFT116/Hoh-87102-6-1	800.021
PFT 0705	Emb53//PFT116/Hoh-87102-6-1	800.022
PFT 0706	LT-1/Rhino	800.023
PFT 0709	POLLMER_3/FOCA_2-1//POLLMER_4	800.024
PFT 0710	T1502_WG/MOLOC_4//RHINO_3/BULL_1-1	800.025
PFT 0802	BRS148*2/Hoh85107-2-3	L:1017/08
PFT 0803	BRS148//PFT215*2//Hoh86007-1-2	800.026
PFT 0804	PFT211*2/Hoh-85102-2-2	800.027
PFT 0809	PFT215/Emb53	L:1024/08
PFT 0811	PFT701(6TA876/.../4/2*Erizo)//Emb18*2	800.031
PFT 307	PFT312/PFT511	800.032
Triticale BR 1	Maya*2Armadillo/Camel	800.033
Triticale BR 4	BGL/CIN//MUS	800.034

¹ 800.001 – 800.034 (bloco de cruzamentos de 2008 do programa de melhoramento genético de triticale da Embrapa Trigo); L:1017/08 e L:1024/08 (semente genética de 2008 da Embrapa Trigo)

Tabela 2. Genótipos de triticales (*X Triticosecale* Wittmack) utilizados na hibridização genômica *in situ* e suas respectivas genealogias e origens. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2009

Genótipo	Genealogia	Origem das Sementes ¹
BRS Minotauro	OCTO92-3(PF89358/CBR1)/TCLBR4	800.003
BRS Ulisses	ERIZO/NIMIR	800.005
PFT 0803	BRS148//PFT215*2//Hoh86007-1-2	800.026
PFT 112	PFT512/CEP28 - GUARÁ	700.026
Triticale BR4	BGL/CIN//MUS	800.034

¹ Bloco de cruzamentos de 2008 (800.003-800.034) e 2007 (700.026) do programa de melhoramento genético de triticales da Embrapa Trigo.

3.2 Métodos

3.2.1 Viabilidade Polínica

3.2.1.1 Semeadura e coleta das espigas

O solo, no qual foi realizada a semeadura, é do tipo latossolo vermelho distrófico húmico, de textura argilosa, profundo (STRECK et al., 2008). Efetuou-se a primeira semeadura no dia 28 de maio de 2009 e a segunda e terceira a intervalos de 18 e 29 dias da primeira, respectivamente. As parcelas eram compostas de seis linhas de três metros e cinco centímetros de comprimento, com espaçamentos de 20 cm entre linhas e de 40 cm entre parcelas nas laterais. A distância média entre os grãos foi de sete centímetros na linha.

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 foram estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.2 Preparo das lâminas e análise citológica

A análise citológica visando à viabilidade polínica foi realizada no Laboratório de Biotecnologia, área de citogenética molecular, da Embrapa Trigo. As lâminas foram confeccionadas usando as três anteras da mesma flor, oriundas da região mediana da espiga, com cinco repetições (cinco espigas por genótipo). A técnica utilizada foi a de “squash” fazendo-se pressão entre a lâmina e a lamínula. A coloração foi realizada com carmim acético (1%), devido ao fato de que o referido corante é usado rotineiramente em estudos de viabilidade polínica de cereais de inverno (Figura 4).

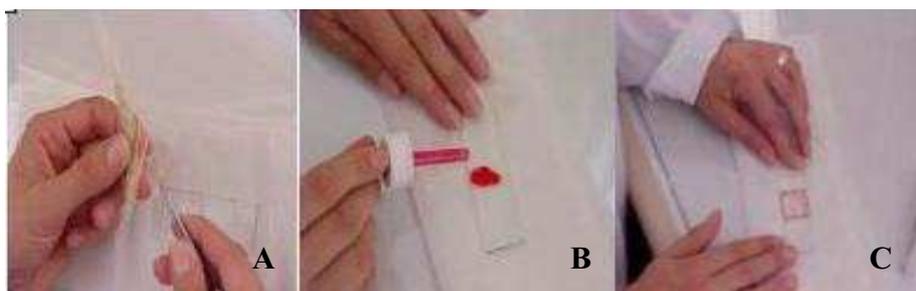


Figura 4- Preparo de lâminas de triticale (*X Triticosecale* Wittmack) para análise de viabilidade polínica. (A) retirada das anteras da espiga; (B) coloração com carmim acético 1% após maceração das anteras; (C) inserção da lamínula e vedação da lâmina (Fotos: Embrapa Trigo).

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Analisou-se 29 genótipos, sendo que cada genótipo representou um tratamento, totalizando 29 tratamentos. De cada tratamento, foram realizadas cinco repetições (cada repetição foi representada por uma espiga). As espigas foram coletadas de plantas diferentes em cada parcela. E, de cada espiga, foi confeccionada uma lâmina com as três anteras da flor, totalizando cinco lâminas por genótipo. As análises foram realizadas ao microscópio óptico, sendo analisados 200 grãos de pólen por lâmina, totalizando 1000 grãos de pólen por indivíduo.

As variáveis analisadas foram: 1) grãos de pólen binucleados e trinucleados, considerados viáveis, 2) grãos de pólen com pouco amido, 3) grãos de pólen vazios (inviáveis), 4) grãos de pólen com mais de um poro e 5) grãos de pólen com tamanhos diferentes, quando visualizados na mesma lâmina/genótipo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA (Statistical Analysis System – SAS Institute - versão 9.1, ano 2004) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1 %. Realizou-se posteriormente a correlação dos dados, utilizando o teste de Pearson.

A captura das melhores imagens foi realizada pelo programa Pinnacle Studio Plus, utilizando-se o microscópio óptico Zeiss – Axiolab, com aumento de 400x.

3.2.2 Hibridização Genômica *In Situ* - GISH

Para GISH utilizou-se DNA genômico de centeio, cultivar Centeio BR 1, como sonda, e DNA de trigo, cultivares IAC 5 Maringá ou Trigo BR 35, como bloqueio. Inicialmente, realizou-se extração de DNA genômico da sonda e do bloqueio, utilizando tecido foliar jovem, segundo método de CTAB, descrito em Bonatto (2008). Em seguida, foi realizada a purificação do material extraído, para deixá-los livre de polissacarídeos e o mais íntegro possível, conforme Michaels et al. (1994). Os DNAs, tanto sonda como bloqueio, foram quantificados em gel de agarose 0,8%, usando como referência alíquotas de DNAs lambda (Promega) de pesos moleculares nas concentrações de 50 ng/μL, 100 ng/μL e 150 ng/μL.

A etapa seguinte consistiu na clivagem do DNA bloqueio em autoclave a 121 °C por 5 minutos, conforme Brammer et al. (2009), para fragmentá-lo em torno de 300 pb. Após, concentrou-se este DNA a 500 ng/μL, uma vez que era a concentração desejada para a etapa posterior.

A sonda de centeio foi marcada por *nick translation* (Roche) (Figura 5), em termociclador a 15 °C por, aproximadamente, 1h e 30min, de modo direto, utilizando os fluorocromos fluoresceína 12-dUTP (Roche) ou Cy3-dUTP (GE – Amersham), ou indireto com digoxigenina-11-dUTP (Roche).

Após a marcação, a sonda foi estocada a -20 °C, a qual foi utilizada posteriormente na mistura de hibridização na proporção de 1:10, em relação ao DNA bloqueador de trigo.

As lâminas previamente selecionadas no item 3.2.2.2, foram pré-tratadas para a GISH (Figura 6). Foram submetidas à imersão em álcool etílico absoluto: ácido acético glacial (3:1, v/v), seguido de uma série alcoólica 70% e 100% e secas em estufa a 50-60°C. Em seguida, adicionou-se HCl 10mM por 5 minutos e pepsina (15µg/mL), diluída em HCl 10mM, isto porque a pepsina, em meio ácido, atua melhor na limpeza do citoplasma degradando proteínas. Após, as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37 °C por 20 minutos. Decorrido o tempo, realizou-se a lavagem em 2x SSC, seguido de tratamento em paraformaldeído 4% cuja função é ajudar a firmar o cromossomo que foi “mexido” com a pepsina, e lavagem em 2x SSC. Posteriormente, realizou-se a desidratação do material em série etílica de 70% e 100%, deixando-as, em seguida, inclinadas para a secagem em temperatura ambiente, por no mínimo uma hora.

A desnaturação dos cromossomos e das sondas, os banhos pós-hibridização e a detecção foram efetuados de acordo com Heslop-Harrison et al. (1991), com estringência de 77%, ou seja, o quão correto foi o pareamento dos genomas. As misturas de hibridização consistiram de: formamida 100% (v/v), dextran sulfato 50% (p/v), 20x SSC, 0,5ng/µL de sonda e 0,5ng/µL de bloqueio. A formamida desestabiliza a molécula de DNA, auxiliando na desnaturação. Em contrapartida, o dextran sulfato ajuda no encaminhamento da sonda ao alvo. Realizada a mistura, as lâminas foram desnaturadas por 7 min a 73 °C, colocadas em câmara úmida e hibridizadas por 18 horas a 37°C.

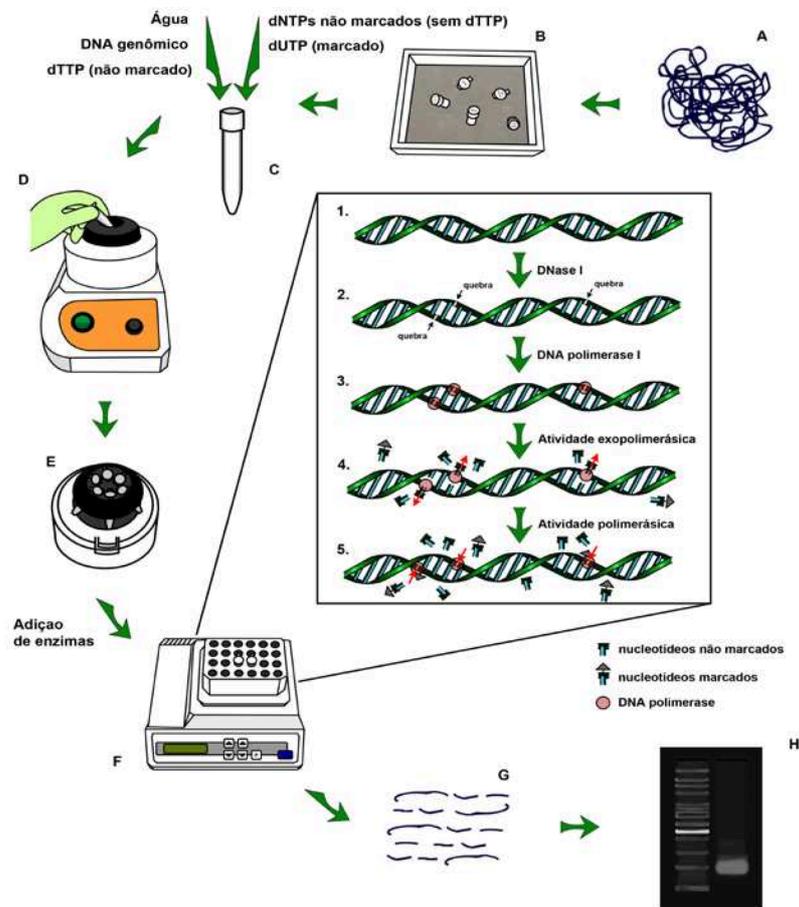


Figura 5- Esquema marcação da sonda, pela reação de *nick translation*. A) DNA genômico total a ser marcado. (B) Componentes da reação em gelo picado. (C) Preparo da mistura de reação sem a solução enzimática. (D) Mistura da reação em vórtex. (E) Centrifugação rápida da mistura e adição das enzimas. (F) Reação de *nick translation* em termobloco a 15-16 °C, de acordo com recomendação do fabricante. (G) DNA fragmentado e marcado. (H) Gel de agarose, mostrando DNA com fragmentos de aproximadamente 200-300 pb (Fonte: Santelmo Vasconcelos & Ana Christina Brasileiro-Vidal, In: Brammer et al., 2009).

Após os banhos pós-hibridização, as lâminas que tiveram as sondas com marcação direta foram montadas com 2 µg/mL de 4, 6-

diamidino-2-fenilindol (DAPI) em Vectashield (Vector), na proporção de 1:1. A vedação da lâmina-lamínula foi feita com o uso de esmalte incolor. Para as lâminas que tiveram as sondas marcadas com digoxigenina, estas foram detectadas usando anti-digoxigenina conjugada com fluoresceína isotiocianato (FITC; Boehringer Mannheim) crescida em ovelha (Roche) e amplificadas com anti-ovelha conjugada com FITC (Serotec), ambos em BSA 1% (p/v). A montagem dessas lâminas foi idêntica às de marcação direta.

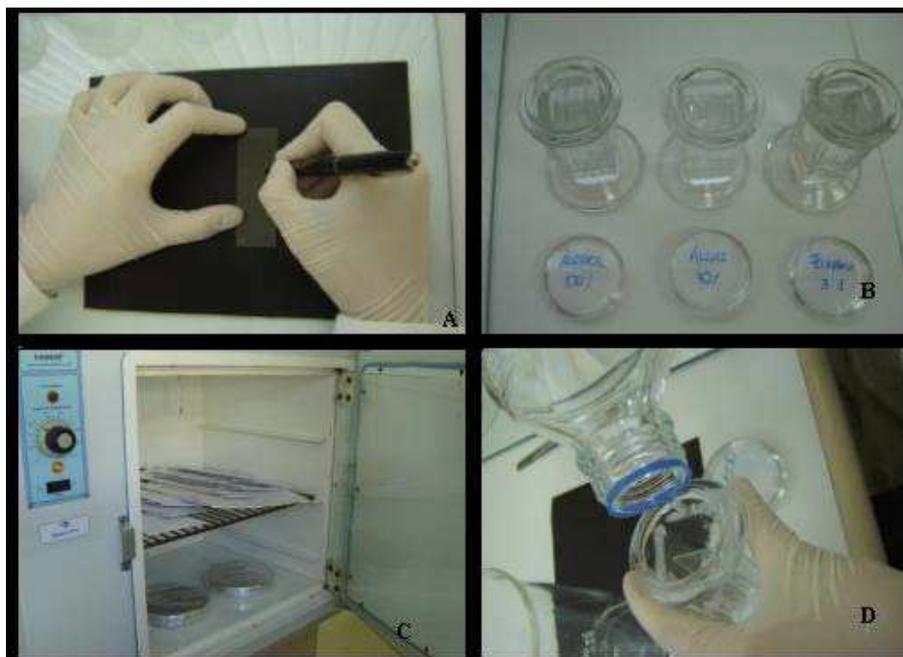


Figura 6 – Preparo das lâminas antes de receberem a mistura de hibridização (A) marcação da lâmina com lápis diamante no local onde havia a lamínula e será realizada a hibridização; (B) lavagens com ácido acético glacial (3:1, v/v), seguido de uma série alcoólica de 70% e 100%; (C) lâminas contendo enzima – pepsina (15µg/mL) - em de câmara úmida a 37 °C; (D) lavagens posteriores: 2 x SSC, paraformaldeído seguido de uma série etílica de 70% e 100% (Fotos: Embrapa Trigo).

3.2.2.1 Documentação fotográfica e análise das imagens

As imagens foram capturadas em fotomicroscópio DMLB Leica mediante uma câmera Leica DFC 340FX, utilizando o programa Leica CW 4000 (Departamento de Genética, UFPE).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Viabilidade Polínica

Os resultados obtidos, quanto à viabilidade polínica, para os 29 genótipos de triticales, pertencentes ao bloco de cruzamentos, são abordados a seguir.

Em relação à análise de variância, os resultados mostraram que houve diferença significativa a 1% considerando as variáveis pólen binucleado e/ou trinucleado, vazio, com pouco amido, com mais de um poro e com tamanho diferente (Figura 7). Entre as repetições não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 3).



Figura 7 – Diversidade de grãos de pólen encontrados. (A) pólen binucleado, (B) pólen com pouco amido e coloração fraca do citoplasma, (C) pólen com dois poros (setas) (D) grãos de pólen com tamanhos diferentes, (E) pólen vazio.

Tabela 3. Análise de variância F para diferentes categorias de grãos de pólen.
Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2009

Causas de variação	Pólen binucleado/ trinucleado	Pólen vazio	Pólen com pouco amido	Pólen com mais de um poro	Pólen com tamanho diferente
Genótipo	459,25*	221,30*	114,12*	10,86*	5,01*
Repetição	181,37	30,72	91,94	3,11	3,87
Erro	134,65	62,93	43,03	2,99	1,85

* significativo a 1 %.

A porcentagem de grãos de pólen binucleados e/ou trinucleados, nos genótipos analisados, considerados viáveis, variou de 74% a 97% (Tabela 4). BRS Ulisses, que apresentou a menor porcentagem de grãos de pólen viáveis (74%) não diferiu de Embrapa 18, Embrapa 53, PFT 0608, PFT 0609, PFT 0610, PFT 0705 e PFT 0803, mas diferiu estatisticamente dos demais para esta variável.

Para a variável grãos de pólen vazios, considerada inviável, BRS Ulisses também diferiu estatisticamente da grande maioria dos genótipos, não havendo diferença apenas entre Embrapa 18, Embrapa 53, PFT 0608 e PFT 0610.

As linhagens PFT 0505, PFT 0609, PFT 0610, PFT 0704 e PFT 0705, filhas da cultivar Embrapa 53, obtiveram uma taxa menor de grãos de pólen com tamanhos diferentes, estatisticamente diferente da progenitora, inferindo-se que tal fato pode ser fruto do processo de seleção.

De acordo com o teste de Pearson, as variáveis grãos de pólen vazios e grãos de pólen com pouco amido apresentaram-se correlacionadas positivamente. Isto se deve, provavelmente, aos mesmos processos de formação e anomalias desses grãos. Do mesmo

Tabela 4. Viabilidade polínica obtida para os genótipos de triticales analisados pelo teste de Tukey a 1%.
Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2009

Genótipos	Pólen binucleado/ trinucleado		Pólen vazio		Pólen com pouco amido		Pólen com mais de um poro		Pólen com tamanho diferente	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
BRS 148	179,2	89,6 a	12,2	6,1 b	6,0	3,0 abc	1,0	0,5 bc	1,6	1,0 ab
BRS 203	187,2	93,6 a	8,4	4,2 b	3,4	1,7 bc	0,8	0,4 c	0,2	0,1 b
BRS Minotauro	181,8	90,9 a	3,4	1,7 b	14,2	7,1 abc	0,4	0,2 c	0,2	0,1 b
BRS Netuno	188,4	94,2 a	7,2	3,6 b	3,0	1,5 bc	0,0	0,0 c	1,4	0,7 ab
BRS Ulisses	147,4	73,7 b	32,8	16,4 a	19,4	9,7 a	0,2	0,1 c	0,2	0,1 b
Embrapa 18	172,0	86,0 ab	15,0	7,5 ab	13,0	6,5 abc	0,0	0,0 c	0,0	0,0 b
Embrapa 53	167,4	83,7 ab	13,4	6,7 ab	14,2	7,1 abc	0,6	0,3 c	4,4	2,2 a
IAC 2 – Tarasca	188,4	94,2 a	1,6	0,8 b	9,6	4,8 abc	0,2	0,1 c	0,4	0,2 b
IAC 3 – Bantengue	175,8	87,9 a	11,0	5,5 b	11,8	5,9 abc	1,2	0,6 bc	0,2	0,1 b
IAC 5 – Canindé	188,0	94,0 a	7,8	3,9 b	1,0	0,5 c	0,0	0,0 c	3,2	1,6 ab
IPR 111	186,8	93,4 a	6,8	3,4 b	6,2	3,1 abc	0,0	0,0 c	0,4	0,2 b
PFT 0407	186,6	93,3 a	7,2	3,6 b	6,2	3,1 abc	0,0	0,0 c	0,0	0,0 b
PFT 0505	183,0	91,5 a	6,0	3,0 b	8,6	4,3 abc	2,2	1,1 abc	0,2	0,1 b
PFT 0608	167,0	83,5 ab	20,0	10,0 ab	9,4	4,7 abc	3,2	1,6 abc	0,4	0,2 b
PFT 0609	171,8	85,9 ab	8,8	4,4 b	18,2	9,1 ab	1,2	0,6 bc	0,0	0,0 b
PFT 0610	170,2	85,1 ab	15,0	7,5 ab	9,4	4,7 abc	5,0	2,5 ab	0,6	0,3 b
PFT 0704	177,6	88,8 a	7,4	3,7 b	13,8	6,9 abc	1,2	0,6 bc	0,0	0,0 b
PFT 0705	174,2	87,1 ab	12,2	6,1 b	12,0	6,0 abc	1,4	0,7 bc	0,2	0,1 B

PFT 0706	194,0	97,0	a	3,0	1,5	b	3,0	1,5	bc	0,0	0,0	c	0,0	0,0	b
PFT 0709	188,6	94,3	a	7,4	3,7	b	4,0	2,0	abc	0,0	0,0	c	0,0	0,0	b
PFT 0710	179,6	89,8	a	8,0	4,0	b	10,8	5,4	abc	0,4	0,2	c	1,2	0,6	ab
PFT 0802	188,0	94,0	a	1,4	0,7	b	9,6	4,8	abc	1,0	0,5	bc	0,0	0,0	b
PFT 0803	174,8	87,4	ab	5,2	2,6	b	13,6	6,8	abc	6,0	3,0	a	0,4	0,2	b
PFT 0804	185,2	92,6	a	3,0	1,5	b	11,8	5,9	abc	0,0	0,0	c	0,0	0,0	b
PFT 0809	187,4	93,7	a	2,4	1,2	b	10,0	5,0	abc	0,0	0,0	c	0,8	0,4	b
PFT 0811	186,6	93,3	a	4,4	2,2	b	8,6	4,3	abc	0,2	0,1	c	0,4	0,2	b
PFT 307	175,8	87,9	a	2,6	1,3	b	18,6	9,3	ab	1,6	0,8	bc	1,4	0,7	ab
Triticale BR 1	182,0	91,0	a	4,0	2,0	b	13,4	6,7	abc	0,0	0,0	c	0,6	0,3	b
Triticale BR 4	185,4	92,7	a	1,0	0,5	b	12,8	6,4	abc	0,8	0,4	c	0,2	0,1	b
TOTAL	5220,2	90,0		238,6	4,11		295,6	5,10		28,6	0,49		18,6	0,33	

* Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna ou nível de 1% de probabilidade.
N significa o número médio das cinco repetições por genótipo.

modo, grãos de pólen binucleado e trinucleado e grãos de pólen vazios apresentam-se correlacionados negativamente (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de correlação, por meio do Teste de Pearson, entre as variáveis analisadas: grão de pólen vazio, grão de pólen com mais de um poro, grãos de pólen com pouco amido, grãos de pólen com tamanho diferente e grãos de pólen binucleado e/ou trinucleado.
Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2009

	Vazio	Mais de um poro	Pouco amido	Tamanho diferente	Binucleado/trinucleado
Vazio	1,00	–	–	–	–
Mais de um poro	0,01	1,00	–	–	–
Pouco amido	0,24*	0,14	1,00	–	–
Tamanho diferente	0,07	-0,08	-0,07	1,00	–
Binucleado/trinucleado	-0,82*	-0,23	-0,72*	-0,11	1,00

* significativo a 1 %.

Grãos de pólen com tamanhos diferentes são comumente encontrados nas Triticeae (ROSA et al., 2006), sendo que na maior parte dos genótipos avaliados, eles apresentaram quantidade adequada de amido, estando em estádios binucleados ou trinucleados.

Grãos de pólen com pouco amido, embora correlacionados positivamente com grãos de pólen vazios, aparentemente estavam em estágio mais precoce de desenvolvimento, em alguns genótipos, indicando que provavelmente estes não apresentariam problemas durante a maturação e viabilidade no momento da fertilização. Outros, no entanto, devido a sua conformação podiam ser considerados inviáveis.

Quanto à variável grão de pólen com mais de um poro, o presente estudo foi incipiente para inferências quanto à viabilidade, sendo recomendado estudos *in vitro*, para a obtenção de uma resposta mais precisa quanto à formação do tubo polínico.

Variações interespecíficas são comumente encontradas e esperadas, principalmente quando utilizadas dentro de um programa de melhoramento vegetal, considerando-se o fato dos genótipos possuírem origens distintas e serem oriundos de diferentes cruzamentos. Rosa et al. (2006), analisando tétrades, viabilidade e tamanho do grão de pólen de triticales hexaploides, verificaram que a frequência de grãos irregulares variava conforme o genótipo, além de variar no tamanho (de 8,28 a 75,25 μm), embora apresentasse alta viabilidade polínica.

BRS Ulisses e BRS Minotauro também foram analisados por Rosa et al. (2006), os quais apresentaram uma viabilidade polínica de 98,4 e 100%, respectivamente. Estes dados diferiram dos resultados obtidos no presente trabalho, ou seja, 74 e 91%. Quanto ao BRS Minotauro, Zanotto et al. (2009) também o estudaram e encontraram uma viabilidade de 72%. Estas discrepâncias nos resultados para esta cultivar pode ser em virtude de fatores bióticos e abióticos que influenciam na formação do grão de pólen e da interação genótipo/ambiente/ano. Contudo, deve-se levar em conta que em ambos os anos, as referidas cultivares mantiveram a mesma classificação, ou seja, BRS Minotauro apresentou melhores dados de viabilidade polínica que BRS Ulisses.

Tecchio et al. (2006) afirmam que a perda da viabilidade do grãos de pólen em diferentes espécies tem sido correlacionada também com a perda de água, tanto em condições naturais como de laboratório. Outro aspecto que precisa ser considerado é que a viabilidade do grão de pólen pode variar consideravelmente entre indivíduos de uma espécie e entre amostras de um mesmo indivíduo.

O estudo da viabilidade polínica é comumente empregado no melhoramento genético vegetal de diversas espécies, em virtude da facilidade, rapidez, baixo custo financeiro e confiabilidade da técnica (CARDOSO et al., 2009; MUNHOZ et al., 2008; EINHARDT et al., 2006; CORRÊA et al., 2005; VARGAS et al., 2005; SOUZA et al., 2002; DOMINGUES et al., 1999). No entanto, em relação aos cereais – o grupo mais importante economicamente dentre os vegetais – Terra (2009) aborda que informações a respeito dos grãos de pólen são muitas vezes fragmentadas.

Vale ressaltar que o melhoramento genético vegetal, mesmo não se utilizando de todas as ferramentas adequadas para a seleção daqueles tipos melhor adaptados e com estabilidade de planta e produtividade de grãos, tende a selecionar aqueles que agregam o menor número de características indesejáveis. Embora com a ocorrência de valores diferentes nas pesquisas citadas com o BRS Minotauro, não existem padrões de valores críticos para a seleção assistida ao programa de melhoramento (NASCIMENTO JUNIOR, informação verbal).

Além dos trabalhos já mencionados com relação à viabilidade polínica, Zinn (1992), estudando cultivares de trigo,

concluiu que foram encontrados na mesma antera, em proporções diferentes, grãos de pólen apresentando desenvolvimento normal e grãos de pólen apresentando anormalidades que podiam ser considerados estéreis para efeitos de fertilização.

Outra Poaceae muito estudada citogeneticamente são as pertencentes ao gênero *Paspalum* L. Dentre várias pesquisas com espécies deste gênero, um trabalho recente realizado por Dahmer et al. (2008), constatou variação quanto à viabilidade polínica, especialmente em relação a espécies diploides das tetraploides. Espécies diploides obtiveram uma maior porcentagem de grãos de pólen viáveis do que as espécies tetraploides.

Cardoso (2007) constatou que em trigo e espécies associadas, havia uma correlação positiva entre o tamanho do grão de pólen e ploidia com a viabilidade polínica. Um acesso de *Aegilops tauschii*, diplóide ($2n=2x=14$) apresentou grãos de pólen com o menor diâmetro (39,14 μm). Quatro cultivares brasileiros, assim como quatro acessos sintéticos de *Triticum aestivum*, hexaploides ($2n=6x=42$) apresentaram os maiores grãos de pólen, com diâmetros variando de 55,82 a 59,87 μm . Quatro variedades comerciais de *Triticum durum*, tetraplóide ($2n=4x=28$), obtiveram diâmetros intermediários entre *Ae. taushii* e *T. aestivum* (46,57 a 47,64 μm). Além disso, analisando tamanho associado à viabilidade, grãos de pólen viáveis obtiveram os maiores diâmetros em comparação aos inviáveis.

Com base nos resultados das análises de viabilidade polínica, obtidos no presente trabalho, confirma-se que a técnica pode

ser utilizada rotineiramente no programa de melhoramento genético de triticales.

Portanto, dentre as técnicas da citogenética, o estudo da viabilidade polínica é considerado uma medida de fertilidade masculina, herdável, e capaz de representar o grau de estabilidade dos genótipos. Quando empregada em programas de melhoramento, a presente técnica fornece subsídios na tomada de decisão pelo melhorista, no momento dos cruzamentos, uma vez que possibilita a escolha de genótipos estáveis.

4.2 Hibridização Genômica *In Situ* (GISH)

Os resultados da GISH estão representados nas figuras 8 a 10 para os cinco genótipos analisados. Quanto ao nível de ploidia, todos foram hexaploides ($2n = 6x = 42$). Comparando-se todas as imagens digitalizadas e analisando cada genótipo individualmente, as cultivares BRS Ulisses, Triticale BR 4, assim como as linhagens PFT 0803 e PFT 112, apresentaram o padrão cromossômico normal e dentro do esperado para o triticales, ou seja, a presença de 28 cromossomos de trigo, corados com DAPI e de 14 cromossomos de centeio, nitidamente marcados com fluoresceína e com as extremidades não marcadas, pois estas são constituídas de DNA repetitivo, comuns a ambos genomas, e neste caso são corados somente com DAPI.

Contudo, em BRS Minotauro o padrão cromossômico foi diferenciado, demonstrando a existência de possíveis translocações

cromossômicas. No entanto, no presente estudo, não pode-se verificar quais braços cromossômicos, bem como quais genomas de trigo estão associados a estas translocações com o genoma do centeio.

Sondas que poderiam elucidar com maior precisão os genomas e braços cromossômicos envolvidos na translocação encontrada no presente trabalho, é relatada no trabalho de Cuadrado et al. (2008) cujo objetivo foi caracterizar genótipos de trigo, via FISH, utilizando sondas específicas que marcam sequências repetitivas simples em cada um dos sete cromossomos do genoma A, B e D de trigo, assim como do genoma R de centeio.

Estudos realizados por Costa et al. (2007), que utilizando 42 marcadores SSR (*Simple Sequence Repets*), visando à detecção de regiões microssatélites de trigo, na análise da diversidade molecular de 54 genótipos de triticales brasileiros, obtiveram resultados que sugeriram uma possível translocação trigo-centeio em triticales hexaploides, pois os microssatélites que mapeavam o genoma D do trigo foram amplificados. Teoricamente triticales hexaploides possuem constituição genética AABBRR. No entanto, os resultados obtidos por estes autores sugerem que alguns dos genótipos avaliados deveriam ser hexaploides substituídos (AABBDR), uma vez que os marcadores SSR eram específicos para o genoma D.

Outras pesquisas realizadas com diferentes triticales especulam a hipótese de que os cromossomos 1D e 2D podem estar associados com a presença de uma translocação trigo-centeio ou trigo-trigo (LUCASZEWSKI & GUSTAFSON, 1983; LEONOVA et al., 2005 apud COSTA et al., 2007). Porém, nenhum trabalho realizado

com triticales brasileiros confirmou esta hipótese, que pode ser verificada com a utilização da técnica de FISH, utilizando-se uma sonda específica para o genoma D, assim como sonda de DNA genômico de centeio.

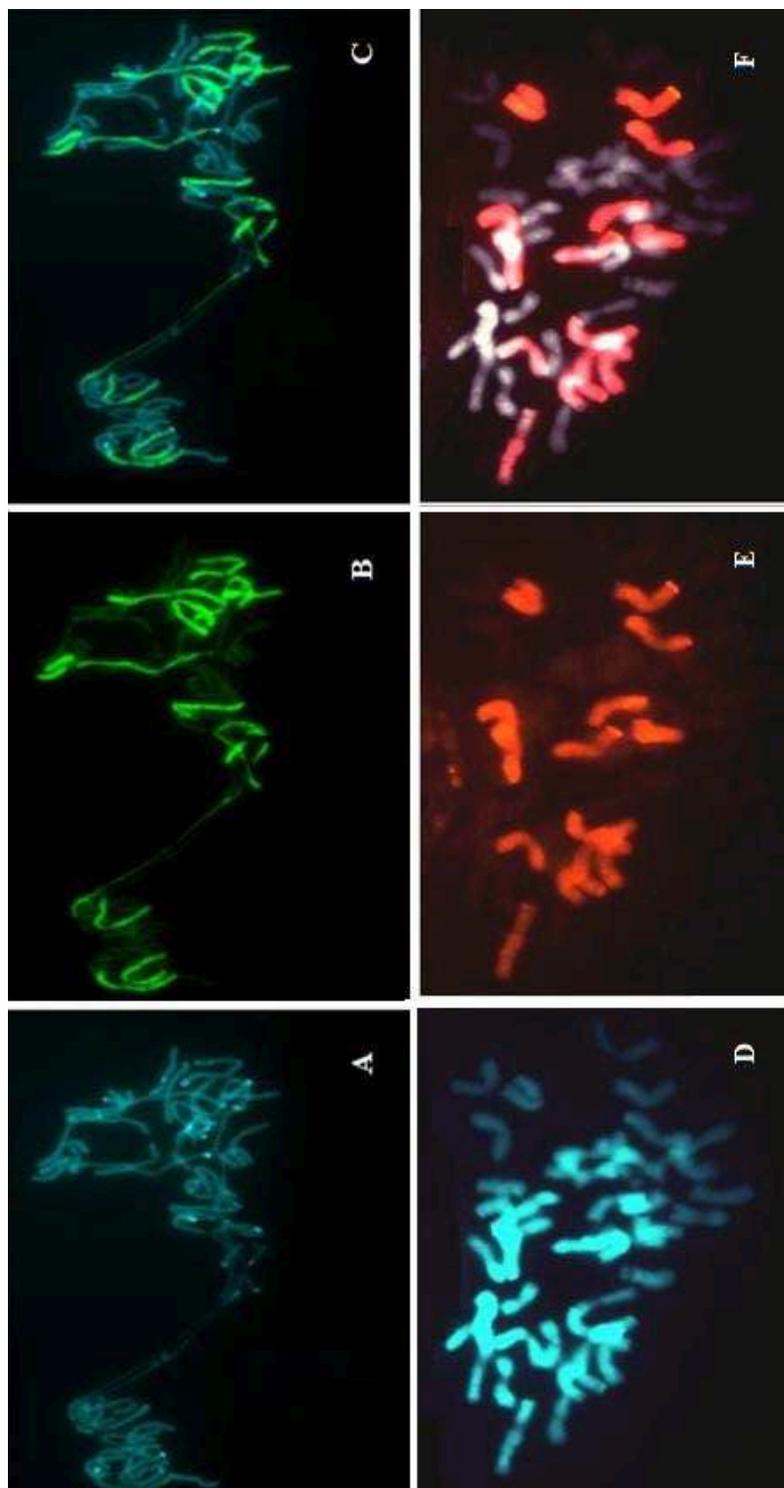


Figura 8 - Híbridização genômica *in situ* (GISH) em células de triticale ($2n = 6x = 42$), genótipos BRS Ulisses (A, B, C) e PFT 112 (D, E, F), usando DNA de centeio como sonda (verde/vermelho) e de trigo como bloqueio. Os cromossomos das células A e D foram contra-corados com DAPI (azul). Em seguida os mesmos foram corados com FITC (células B) e Cy3 (célula E). C e F apresentam a sobreposição das imagens A e B; D e E, respectivamente.

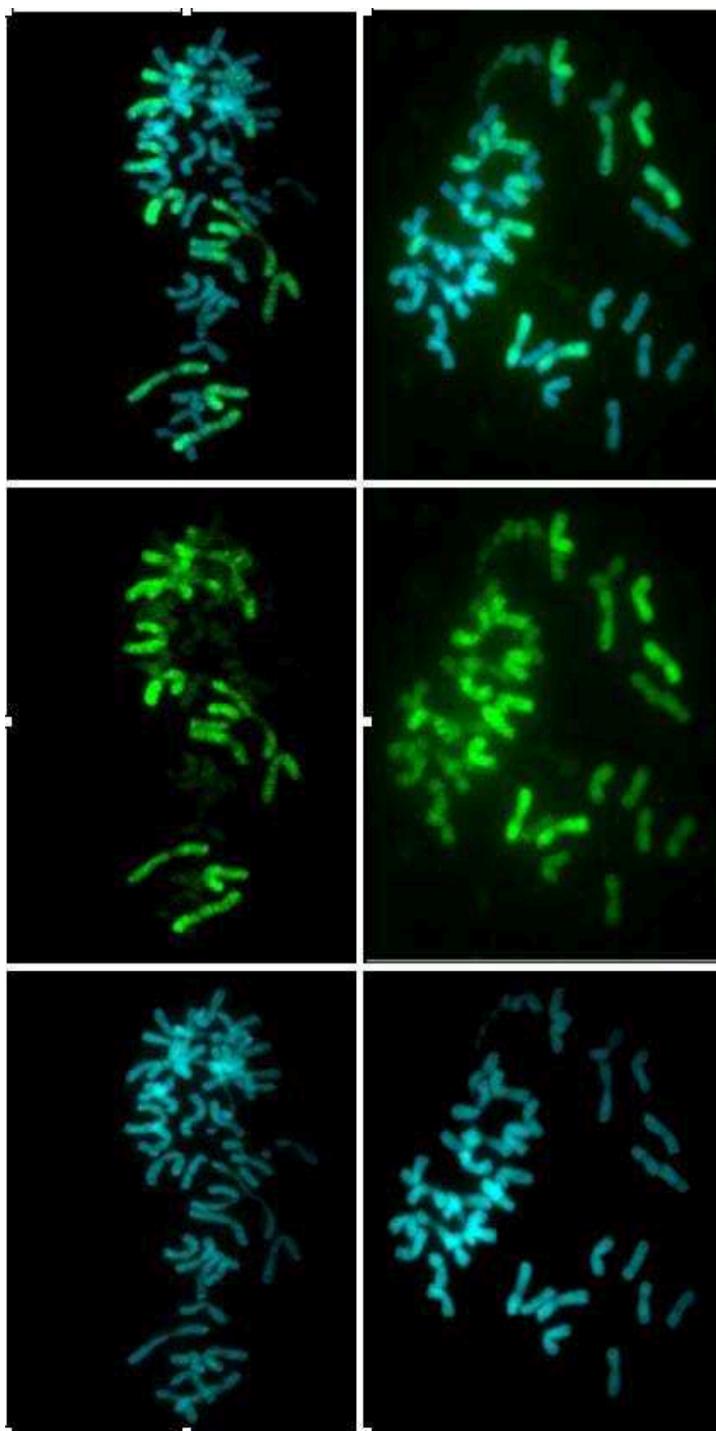


Figura 9 – Hibridização genômica *in situ* (GISH) em célula de triticale ($2n = 6x = 42$), genótipos Triticale BR 4 (A,B,C) e PFT 0803 (D,E,F), usando DNA de centeio como sonda (verde) e de trigo como bloqueio. Os cromossomos das células A e D foram contra-corados com DAPI (azul). Em seguida os mesmos foram corados com FITC (células B e E). C e F apresentam a sobreposição das imagens A e B; D e E, respectivamente.

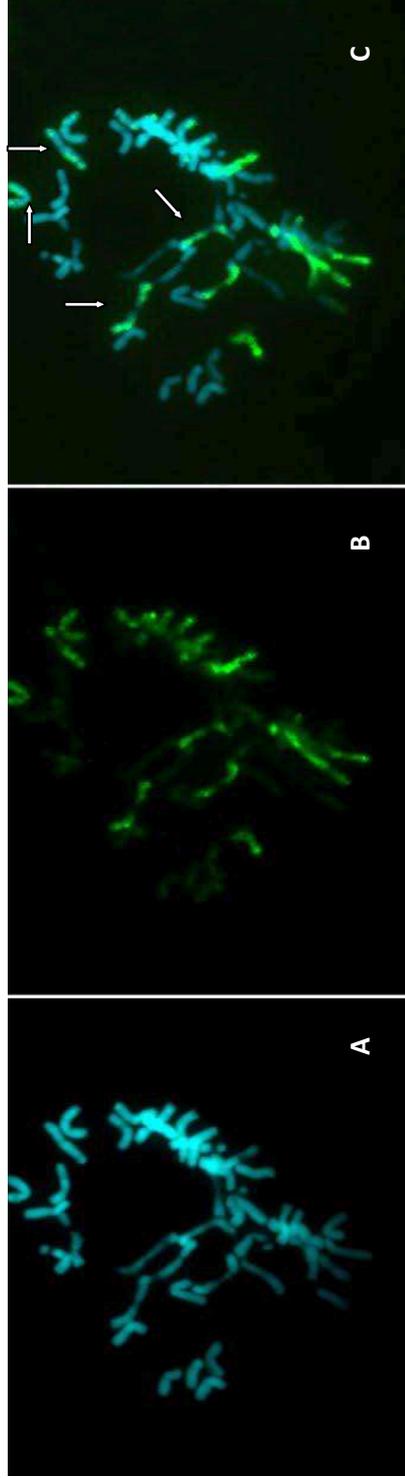


Figura 10 - Híbridização genômica *in situ* (GISH) em célula de triticale ($2n = 6x = 42$), genótipo BRS Minotauro, usando DNA de centeio como sonda (verde) e de trigo como bloqueio. Os cromossomos da célula A foram contra-corados com DAPI (azul). Em seguida, os mesmos foram corados com FITC (célula B). A sobreposição das imagens está representada na célula C. As setas representam possíveis translocações.

Translocações cromossômicas são encontradas em várias espécies da família Triticeae. Brasileiro-Vidal et al. (2005), encontraram em linhagem de trigo translocação do tipo 1RS.1BL que foi confirmada por GISH utilizando como sonda DNA genômico de centeio. Berzonsky & Francki (1999) apresentam uma revisão sobre a referida translocação, pelo fato de que no braço curto do cromossomo 1 de centeio, 1RS, são encontrados importantes genes de resistência a doenças e pragas, embora a sua presença nem sempre seja benéfica, pois afeta negativamente a qualidade tecnológica de uso final em trigo, uma vez que afeta a composição das proteínas de armazenamento desta espécie (ANGELOVA & GEORGIEV, 2006).

Wang et al. (1995) apud Raina e Rani (2001), usaram a GISH para caracterizar seis linhas duplo-haploides de híbridos de triticales octoploide cruzados com trigo, derivadas por cultura de anteras. As linhas variaram na sua composição do genoma de trigo e centeio e ambas foram linhas de adição múltipla trigo/centeio ou tiveram substituição espontânea e/ou translocação trigo/centeio. A maior parte das linhas continha cromossomos 4R, enquanto o 1R ou 7R também estavam presentes em outras. Os resultados mostraram a presença da translocação de trigo/centeio durante ambos os produtos meióticos femininos e masculinos dos híbridos, indicando, portanto, que o pareamento trigo/centeio e a troca genética podem ocorrer na meiose tanto feminina como masculina.

Carvalho et al. (2009), em revisão sobre o assunto, destacam a translocação espontânea 7BS/7RL em híbridos de triticales, do gene *Pr2*, dominante e resistente à ferrugem da folha em centeio.

Indicando, portanto, nestes híbridos, uma “ponte” para o melhoramento de trigo.

Sepsi et al. (2009) utilizaram GISH e marcadores microssatélites para analisar a constituição genômica de um híbrido de trigo com *Thinopyrum ponticum* e confirmar a translocação do braço longo do cromossomo 7A no braço longo do cromossomo 7D, presente no referido híbrido. Utilizaram 25 marcadores SSR específicos para os cromossomos 7A e 7D e aliado à GISH, com sondas genômicas que marcavam os genomas A, D, S e J, forneceram informações detalhadas a respeito destas translocações. Com isto, os autores demonstraram que técnicas como hibridização *in situ* aliada a marcadores microssatélites, são extremamente úteis para detectar e identificar rearranjos intergenômicos, no genoma de trigo. Esses resultados são relevantes uma vez que, esta translocação cromossômica abre possibilidades de construção de um mapeamento físico mais preciso nas regiões terminais do braço longo dos cromossomos 7D e 7A.

Muitos outros trabalhos analisaram com precisão, por meio da associação de GISH e FISH ou GISH e marcadores moleculares do tipo microssatélites, a constituição genômica de linhagens híbridas de triticales com outros cereais da família Triticeae, encontrando translocações e visando o seu uso em programas de melhoramento (FRADKIN et al., 2009; NKONGOLO et al., 2009; DOU et al., 2006; LEONOVA et al., 2005).

Quanto ao presente estudo, os resultados indicam uma estabilidade cromossômica na maioria das plantas analisadas. A

cultivar BRS Minotauro, embora com a presença de translocações, não pode ser indicativo de irregularidade no processo meiótico em virtude de que as células analisadas eram somáticas, e não gaméticas. Para comprovar que esta alteração estrutural é herdável e não apenas fruto da interação genótipo/ambiente, sugere-se dar prosseguimento à pesquisa utilizando os parentais da referida linhagem, da mesma forma um maior número de genótipos, tanto híbridos hexaploides e octoploides e demais parentais, focando principalmente as análises de translocações. Além disso, para todos os genótipos que nas análises posteriores apresentarem translocações, sugere-se a estratégia de reibridização das lâminas, por meio do uso de sondas específicas para os genomas A, B e D de trigo, visando à detecção do(s) genoma(s) envolvido(s) para esta alteração genética. Portanto, tais avanços possibilitarão a caracterização precisa do germoplasma de triticales, o qual poderá ser usado nos programas de melhoramento ou em estudos de citogenética e evolução desta espécie.

5 CONCLUSÕES

Nas condições em que a pesquisa foi desenvolvida, os resultados possibilitam concluir que:

- a) Os materiais avaliados apresentam-se estáveis quanto à viabilidade polínica e nível de ploidia.
- b) A presença de translocação cromossômica em células mitóticas não representa uma instabilidade genotípica herdável, pois a mesma só pode ser comprovada por meio de estudos em células meióticas e/ou dos parentais e demais ancestrais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMAR, K.; MERGOUM, M.; RAJARAM, S. The history and evolution of triticale. In: MERGOUM, M.; GOMEZ-MACPHERSON, H. (Org.). *Triticale Improvement and Production*. 179. Roma: FAO, 2004. p. 1-10.

ANGELOVA, Z. & GEORGIEV, S. Visualization of *secale cereale* DNA in wheat germ plasm by genomic *in situ* hybridization. *Biotechnol. & Biotechnol.*, [s.l.], p. 26-29. mar. 2006.

BAGGIO, M. I. Produção de alimentos mais baratos, sadios e saudáveis: a genética e as novas biotecnologias. In: SACCHET, A. M. (Org.). *Genética para que te quero?* 1ª. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1999. p. 149-158.

BAIER, A. C. et al. *Triticale: cultivo e aproveitamento*. 1ª. ed. Passo Fundo: Ed. Embrapa-CNPT, 1994.

BAIER, A. C. *Uso potencial de triticale para silagem*. 1ª. ed. Passo Fundo: Ed. Embrapa –CNPT, 1997.

_____. Melhoramento do triticale. In: BORÉM, A. *Melhoramento de espécies cultivadas*. 1ª. ed. Viçosa: UFV, 1999. p. 573-588.

BALBINOT, N. D. *Variabilidade citogenética em uma coleção de acessos de Paspalum notatum Flüggé*. 2007. Dissertação (Mestrado em Zootecnia/Plantas Forrageiras). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BARBA-GONZALEZ, R. et al. Progenies of allotriploids of Oriental × Asiatic lilies (*Lilium*) examined by GISH analysis. *Euphytica*, Netherlands, v. 151, n. 2, p. 243–250. set. 2006.

BERED, F. Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas. In: SACCHET, A. M. (Org.). *Genética para que te quero?* 1ª. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1999. p. 99-106.

BERZONSKY, W. A. & FRANCKI, M. G. Biochemical, molecular, and cytogenetic technologies for characterizing 1RS in wheat: A review. *Euphytica*, Netherlands, v.108, n.1, p. 1-19. jul. 1999.

BONATO, A. L. V. *Extração de DNA genômico de cereais de inverno na Embrapa Trigo*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 11 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 235). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co235.htm>. Acesso em: 20 jan. 2010.

BRAMMER, S. P. *Variabilidade e diversidade genética vegetal: requisito fundamental em um programa de melhoramento*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 9p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online; 29). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do29.htm>. Acesso em: 20 nov. 2009.

BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. *Citogenética vegetal: da era clássica à molecular*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 9p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 85). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm>. Acesso em: 20 nov. 2009.

BRAMMER S. P.; et al.. *Hibridização genômica in situ em triticeae: um enfoque metodológico*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 15p.html. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico on line, 270). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co270.htm>. Acesso em: 20 jan. 2010.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C. et al. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 28, n. 2, p. 308-313, abr./jun. 2005.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C. & GUERRA, M. Citogenética Molecular em Cereais. In: BRAMMER, S. P. & IORCZESKI, E. J. (Org.). *Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal*. 1ª. ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 277-298.

CARDOSO, B. M. *Análises citogenéticas em linhagens sintéticas de Triticum aestivum (T. durum X T. tauschii) e seus cruzamentos com cultivares de trigo, visando à introgressão de resistência à ferrugem da folha*. 2007. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

CARDOSO, R. D. L. et al. Caracterização citogenética, viabilidade de pólen e hibridação artificial em gébera. *Horticultura Brasileira*, Campinas, v. 27, n. 1, p. 40-44, jan.-mar. 2009.

CARVALHO, A. et al. Identification of the spontaneous 7BS/7RL intergenomic translocation in one F1 multigeneric hybrid from the Triticeae tribe. *Plant Breeding*, Berlin, v. 128, n. 1, p. 105-108, fev. 2009.

CARVALHO, F. I. F.; NASCIMENTO JUNIOR, A. do; PIANA, C. F. B. Triticale. In: BARBIERI, R. L. & STUMPF, E. R. T. (Org.). *Origem e evolução de plantas cultivadas*. 1ª ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 853-890.

CARVALHO, H. F. & RECCO-PIMENTEL, S. M. *A célula*. 1ª ed. São Paulo: Ed. Manole, 2001.

COSTA, T.C. et al. Genetic diversity of Brazilian triticales evaluated with genomic wheat microsatellites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.42, n.11, p.1577-1586. nov. 2007.

CORRÊA, M. G. S. et al. Meiose e viabilidade polínica na família *Araceae*. *Revista Acta Botanica Brasílica*, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 295-303. jun. 2005.

CORRÊA, S. G. et al. *Comportamento Meiótico de Genótipos de Triticale Hexaplóide*. [artigo científico]. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2006/arquivos/CB_00891.rtf>. Acesso em: 20 nov. 2009.

CUADRADO, A.; CARDOSO, M. B.; JOUVE, N. Increasing the physical markers of wheat chromosomes using SSRs as FISH probes. *Genome*, v. 51, p. 809-815, 2008.

DAHMER, N. et al. Cytogenetic data for *Paspalum notatum* flügge accessions. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 65, n. 4, p. 381-388, jul./ago. 2008.

DOMINGUES, E. T. et al. Viabilidade do pólen em variedades de laranja doce. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, vol. 56, n. 2, p. 265-272, abr./jun. 1999.

DOU, Q. W. et al. Molecular cytogenetic analyses of hexaploid lines spontaneously appearing in octoploid Triticale. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 114, n.1, p. 41-47, dez. 2006.

EINHARDT P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 5-7, abr. 2006.

FALCÃO, T. M. M. A. *Influência genotípica no comportamento meiótico e relação entre aberrações cromossômicas e fertilidade em triticales hexaplóide (Triticosecale Wittmack)*. 1978. Dissertação (Mestrado em Genética/Genética Vegetal) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1978.

FEDERIZZI, L. C.; PACHECO, M.; MILACH, S. C. Melhoramento de plantas: genética aplicada à agricultura. In: SACCHET, A. M. (Org.). *Genética para que te quero?* 1ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 1999. p. 105-120.

FRADKIN, M. et al. Cytological analysis of hybrids among triticales and trigopiros. *Genetic and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.32, n.4, p.797-801, ago. 2009.

GUERRA, D. *Caracterização fenotípica e citogenética da macho-esterilidade em triticales*. 2008. Dissertação (Mestrado em

Fitotecnia/Plantas de Lavoura). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GUERRA, M. (Org.). *FISH – conceitos e a aplicações na citogenética*. 1ª ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

GUERRA, M. *Introdução à citogenética geral*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

GUPTA, P.K. & PRIYADARSHAN, P.M. Triticale: present status and future prospects. *Advances in Genetics*, [S.l.], v. 21, p. 255-345, 1982.

HESLOP-HARRISON, J. S. et al. *In situ* hybridization with automated chromosome desnaturation. *Technique*, [S.l.], v. 3, p. 109-115, 1991.

IORCZESKI, E. J. et al. Aveia, cevada, triticales e centeio. In: ALBUQUERQUE, A. C. S. & SILVA, A. G. *Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas*. Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, p. 185-198.

IORCZESKI, E. J. & ZANATTA, A. C. Melhoramento genético de cereais de inverno no Brasil: organização da produção em um contexto tecnológico dinâmico. In: BRAMMER, S. P. & IORCZESKI, E. J. (Org.). *Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal*. 1ª ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 55-67.

JI, Y. & CHETELAT, R. T. GISH analysis of meiotic chromosome pairing in *Solanum lycopersicoides* introgression lines of cultivated tomato. *Genome*, Toronto, v. 50, n. 9, p. 825-833, set. 2007.

JOUBE, N. & SOLER, C. Triticales genomic and chromosomes' history. In: GUEDES-PINTO, H.; DARVEY, N.; CARNIDE, V. P. (Org.). *Triticale: Today and Tomorrow*. [S.l.]: Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 91-109.

KITAMURA, S. et al. Chromosomal rearrangements in interspecific hybrids between *Nicotiana glauca* Domin and *N. tabacum* L., obtained

by crossing with pollen exposed to helium ion beams or gamma-rays. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, [S.l.], v. 206, p. 548-552, maio. 2003.

KULEUNG, C. et al. Evaluating the Genetic Diversity of Triticale whit Wheat and Rye SSR Markers. *Crop Science*, Madison, v. 46, n. 4, p.1692-1700, jul. 2006.

LEONOVA, I. N. et al. Molecular Analysis of the Triticale Lines with Different *Vrn* Gene Systems Using Microsatellite Markers and Hybridization In Situ. *Genetika*, Moscou, v. 41, n. 9, p. 1236-1243, set. 2005.

LI, H. et al. Characterization of Wheat-Triticale Lines Resistant to Powdery Mildew, Stem Rust, Stripe Rust, Wheat Curl Mite, and Limitation on Spread of WSMV. *Plant Disease*, [S.l.], v. 91, n. 4, p. 368-374, abr. 2007.

LI, X. F. et al. Cytogenetic study of a trigeneric (triticale \times tritileymus) hybrid. *Euphytica*, Netherlands, v. 150, n. 1/2, p. 117–122. jul. 2006.

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.

MARCOVA, M. et al. An interspecific hybrid as a tool to study phylogenetic relationships in plants using the GISH technique. *Chromosome Research*, Netherlands, n. 8, v. 15, p. 1051–1059, dez. 2007.

MENDES-BONATO, A. B. et al. *Caracterização citogenética de acessos de Brachiaria brizantha (Gramineae)*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 31p. pdf. (Embrapa Gado de Corte. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15). Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/bp/bp24/BP24.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

MERGOUN, M. et al. Triticale cop improvement: the CIMMYT programme. In: MERGOUN, M. & GOMEZ-MACPHERSON, H. (Org.). *Triticale Improvement and Production*. 179. Roma: FAO, 2004. p. 11-22.

MICHAELS, S. D.; JOHN, M. C.; AMASINO, R. M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques*, v.17, p. 274-276, 1994.

MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 209-214, abr./jun. 2008.

MUKAY, Y. Perspectives in molecular cytogenetics of wheat. In: Tsunewaki, K. (Ed.). *Frontiers of Wheat Bioscience – Memorial Issue, Wheat Information Service N°100*. [S.l.]:[s.n.], 2005. p.17-30.

NASCIMENTO JUNIOR, A. do. *Oferta de milho no mercado interno reduz safra de triticale*. 2009. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/obs_trigo/inf_tecnicas/Oferta%20de%20milho%20no%20mercado%20interno%20reduz%20safra%20de%20triticale.pdf>. Acesso em: 31 nov. 2009.

_____. *Melhoramento e desenvolvimento de triticale e de centeio para a maior competitividade e sustentabilidade dos sistemas agropecuários sulbrasileiros*. Projeto de Pesquisa aprovado pelo CNPT – Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, 2007. 95p.

NASCIMENTO JUNIOR, A. do et al. Triticale in Brazil. In: MERGOUN, M. & GOMEZ-MACPHERSON, H. (Org.). *Triticale Improvement and Production*. 179. Roma: FAO, 2004. p. 93-98.

NKONGOLO, K. K. Molecular cytogenetic and agronomic characterization of advance generations of wheat x triticale hybrids resistant to *Diuraphis noxia* (Mordvilko): application of GISH and microsatellite markers. *Genome*, Toronto, v. 52, n. 3, p. 353-360, mar. 2009.

OETLLER, G. The fortune of a botanical curiosity – Triticale: past, present and future. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge, v. 143, n. 5, p. 329-346, out. 2005.

PAGLIARINI, M. S. Citogenética aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L. et al. (Eds.). *Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas*. 1ª ed. Rondonópolis, MT: Fundação MT, 2001. p. 871-910.

PEÑALOZA, A. D. P. S. & POZZOBON, M. T. Caracterização Citogenética de Germoplasma Vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). *Recursos Genéticos Vegetais*. 1ª ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 308-342.

PIPERIDIS, G. & D'HONT, A. Chromosome composition analysis of various *Saccharum* interspecific hybrids by genomic *in situ* hybridisation (GISH). In: CONGRESSO INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 14, 2001, Brisbane. *Anais...*[S.l.]:[s.n.], 2001. p. 17-21

RAINA, S. N. & RANI, V. GISH technology in plant genome research. *Methods in Cell Science*, Burlington, v. 23, n. 1-3, p. 83-104, mar. 2001.

ROSA, S. P. et al. *Análise de Tétrades e Grãos de Pólen em Triticale Hexaplóide*. [artigo científico]. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2006/arquivos/CB_00895.rtf>. Acesso em 20 nov. 2009.

ROYO, C. *El Triticale: bases para el cultivo y aprovechamiento*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1992.

SCHWARZACHER, T. Fluorescent In Situ Hybridization to Detect Transgene Integration into Plant Genomes. In: JONES, H. J.; SHEWRY, P. R. (Eds.). *Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats*. 1ª ed. New York: ©Humana Press; Springer Science; Business Media; LLC. 2008. p. 227-245.

SCHWARZACHER, T. & HESLOP-HARRISON, P. *Practical in situ Hybridization*. 1ª ed. USA: Springer-Verlag; UR: © BIOS Scientific Publishers Limited, 2000.

SEPSI, A.; MOLNÁR, I.; MOLNÁR-LÁNG, M. Physical mapping of a 7A.7D translocation in the wheat-*Thinopyrum ponticum* partial amphiploid BE-1 using multicolour genomic in situ hybridization and microsatellite marker analysis. *Genome*, Toronto, v. 52, n. 9, p. 748-754, set. 2009.

SILKOVA, O. G. et al. Production of Wheat–Rye Substitution Lines and Identification of Chromosome Composition of Karyotypes Using C-banding, GISH, and SSR Markers. *Genetika*, Moscou, v. 42, n. 6, p. 793–802, jun. 2006.

SINGH, R. J. *Plant Cytogenetics*. 2ª ed. Nova York: CRC PRESS LLC, 2003.

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 e Agrotecnologia*, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, nov./dez. 2002.

STRECK, E. V. et al. *Solos do Rio Grande do Sul*. 2. ed. rev. e ampl, Porto Alegre: Emater/RS, 2008.

TECHIO, V. H. et al. 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.

TERRA, F. T. *Viabilidade genética em populações de teosinto (Zea mays subsp. mexicana) a partir de análises fenotípicas, isoenzimáticas e moleculares visando à contribuição para o melhoramento genético de milho (Zea mays subsp. mays)*. 2009. Tese (Doutorado em Fitotecnia/Plantas de Lavoura). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

VALOIS, A. C. C.; SALOMAO, A. N.; ALLEM, A. C. (Orgs.) *Glossário de Recursos Genéticos Vegetais*. 1999. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/glossario/welcome.html>>. Acesso em 20 jan. 2010.

VARGAS, D. P. et al. *Viabilidade polínica de Ricinus communis var. IAC-80, Cafelista, Al-Preta e Al-Guarani*. [artigo científico]. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2005/arquivos/CB_00316.rtf>. Acesso em 20 jan. 2010.

WALKER, M. R. & RAPLEY, R. *Guia de rotas na tecnologia do gene*. 1ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1999.

ZANNETTI, M. H. B. & LAUXEN, M. S. Alterações cromossômicas estruturais e numéricas: consequências e aplicações. In: FREITAS, L. B. & BERED, F. (Orgs.) *Genética e Evolução Vegetal*, 1ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p. 217-240

ZANOTTO, M. et al. Viabilidade polínica como seleção assistida no programa de melhoramento genético de triticales. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 33, n. pse, 2009.

ZINN, D. M. *Influência da aplicação de calcário e de fósforo no polimorfismo dos grãos de pólen binucleados de duas cultivares de trigo Triticum aestivum L. Thell, CNT₁₀ e PAT₇₃₉₂*. 1992. Dissertação (Mestrado em Genética/ Genética Vegetal). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1992.

ZWIERZYKOWSK, Z. et al. Chromosome pairing in allotetraploid hybrids of *Festuca pratensis* _ *Lolium perenne* revealed by genomic in situ hybridization (GISH). *Chromosome Research*, Netherlands, v. 16, n. 4, p. 575–585, jun. 2008.