

Análise citológica de cultivares tolerantes e sensíveis de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell) em resposta à presença de alumínio em solução

19

**Circular
Técnica**
on-line

Passo Fundo, RS
Dezembro, 2005

Autores

Sandra Patussi Brammer
Pesquisadora da Embrapa
Trigo, Passo Fundo - RS

Sandra Maria Mansur
Scagliusi
Técnica de Nível Superior da
Embrapa Trigo

Alfredo do Nascimento
Junior
Pesquisador da Embrapa Trigo,
Passo Fundo - RS

Ana Lídia Variani Bonato
Pesquisadora da Embrapa
Trigo, Passo Fundo - RS

Andréia Caverzan
Acadêmica de Ciências
Biológicas da Universidade de
Passo Fundo

Maira Zanotto
Acadêmica de Ciências
Biológicas da Universidade de
Passo Fundo



Embrapa
Trigo



Introdução

O trigo é cultivado anualmente em grande extensão territorial, sendo considerado um dos principais alimentos da dieta humana, e usado, direta ou indiretamente por 35% da população mundial. Em forma de pão e de outros derivados, o trigo constitui um dos alimentos mais importantes da cesta básica brasileira. Sendo que o consumo médio de trigo no Brasil é de, aproximadamente, 58 kg/habitante ano, contra 120 kg na Argentina, apresentaram um levantamento do consumo per capita de derivados do trigo na Região Metropolitana de Curitiba - Paraná (Silva et al., 1996). Devido à importância desse cereal, estudos detalhados, nas mais variadas áreas da ciência, vêm sendo realizados no intuito de contribuir e auxiliar o melhorista nas diferentes etapas dos programas de melhoramento genético.

Um dos aspectos considerados é o efeito do alumínio (Al) solúvel, constituindo um dos principais fatores limitantes da produtividade das culturas em solos ácidos, que constituem cerca de 40% das terras agricultáveis no mundo (Camargo et al., 2000). No Rio Grande do Sul, o trigo é cultivado principalmente na metade norte do Estado, em sua quase totalidade, em solos que apresentam grande variação em parâmetros químicos, em função do material de origem e do sistema de cultivo. A calagem eleva o pH do solo e insolubiliza o Al. Porém, por tratar-se de um clima úmido, a reacidificação do solo e o aumento do teor solúvel e trocável de Al é um processo natural. A presença de Al

em elevado teor nessas formas químicas no solo afeta o desenvolvimento do sistema radicular e pode reduzir drasticamente a produção de grãos.

A capacidade de cultivares brasileiras de trigo se desenvolverem adequadamente em condições de solo ácido é reconhecida mundialmente. Trabalhos realizados por Rosa & Camargo (1991) demonstraram que as cultivares BH 1146, IAC 5-Maringá, IAC 21 e IAC 24 são tolerantes e Anahuac 75, cultivar originária do México, é sensível ao Al no solo. Inúmeros outros trabalhos foram e vêm sendo conduzidos com as cultivares BH 1146 e Anahuac, em solução hidropônica contendo alumínio (Camargo & Oliveira, 1981; Camargo, 1984), bem como os relacionados com aspectos moleculares e, mais recentemente características genômicas associadas ao efeito do Al.

Os estudos realizados em relação a esta característica mostram que as raízes das plantas se tornam menores, engrossam e perdem a ramificação fina, reduzindo sua capacidade de absorver água e nutrientes (Foy & Silva, 1991) quando na presença deste elemento em níveis tóxicos. Além do mencionado, Delhaize et al. (1993) destacam que a injúria causada pelo alumínio, especificamente, reduz a produção de matéria seca, com os efeitos se fazendo sentir de forma mais acentuada sobre o sistema radicular.

De acordo com Abichequer et al. (2003) a tolerância ao alumínio, classicamente é explicada por dois mecanismos, sendo o primeiro designado como mecanismo de exclusão, no qual o Al é impedido de alcançar seus sítios de toxicidade na planta. O segundo, refere-se aos mecanismos internos, ou seja, de reparo, que possibilitam a penetração do alumínio no interior da célula, tendo, no entanto, sua ação fitotóxica neutralizada, conforme estudos de Cançado et al. (1999). Outros mecanismos bioquímicos também têm sido propostos para explicar a tolerância.

O excesso de alumínio se relaciona também com distúrbios na divisão celular. Moraes-Fernandes (1982) aborda que há alta correlação entre os níveis de alumínio no solo e a elevada frequência de anormalidades cromossômicas na divisão celular e anormalidades citológicas em micrósporos de cultivares de trigo, principalmente naquelas com germoplasma introduzido do CIMMYT.

Dentre os mais variados métodos de análise citológica, Boscardin (2005) destaca as pesquisas realizadas em células metafásicas das Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs), bem como do volume nucleolar em espécies distintas, visando relacionar tais organelas quanto à biogênese dos ribossomos, controle do ciclo celular, caracterizações cromossômicas em estudos evolutivos ou genéticos e, mais recentemente, em respostas a estresses, uma vez que o tamanho do nucléolo varia em função de sua atividade biológica.

Material e métodos

Com o objetivo de detectar variações no volume nucleolar em cultivares de trigo na presença de alumínio em solução, foi realizado um experimento no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, usando as seguintes cultivares: BH 1146 (tolerante ao alumínio) e Anahuac (sensível). Sementes de ambas as cultivares foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo. A seguir serão descritos os principais passos envolvidos na técnica:

1) Semeadura e coleta de raízes em solução com alumínio:

Para cada cultivar foram preparadas placas de petri contendo fina camada de algodão e, sobre estas, papel germitest, a fim de permitir a germinação das sementes. As sementes foram embebidas com 80 mL de solução de alumínio, sendo realizados quatro diferentes tratamentos: a) controle com água destilada, b) solução contendo 2 mg Al/L, c) solução contendo 4 mg Al /L; e d) solução contendo 20 mg Al/L.

Antes da semeadura, as sementes foram desinfectadas com solução de hipoclorito de sódio a 50%, seguida de lavagem com álcool a 70 %. As placas com as sementes foram mantidas em germinador a 20 °C, por 5 dias, ou até que tivesse sido emitida a raiz e esta apresentasse a região meristemática bem desenvolvida.

2) Coleta de raízes e pré-tratamento:

A coleta das raízes foi realizada quando estas apresentavam aproximadamente 2 cm de comprimento. As raízes foram cortadas e mergulhadas em água destilada, permanecendo a 4 °C, por 24 h, no escuro.

3) Fixação das pontas de raízes:

A fixação foi feita utilizando-se três partes de álcool etílico (P.A.) para uma parte (3:1) de ácido acético glacial (P.A.), por 24 horas em temperatura ambiente. Após a fixação do material, as raízes foram transferidas para álcool 70%, conservando as mesmas a temperatura de -20 °C.

4) Preparo de lâminas:

Para a análise do volume nucleolar, foram consideradas 10 células bem individualizadas de cada cultivar, em três repetições. Primeiramente, fez-se a lavagem das raízes em água destilada, por três vezes, trocando-se a água a cada 5 minutos, a fim de eliminar resíduos do fixador e/ou do álcool 70%. Após, realizou-se a hidrólise das raízes, imergindo as mesmas em HCl 5N, por 1 minuto, em câmara úmida a 60° C. Para o preparo das lâminas, foi retirado somente a ponta das raízes, mantendo a integridade da região meristemática. O esmagamento do material foi realizado, colocando uma única gota de ácido acético 45% sobre a lâmina, quando foram realizados pequenos cortes, com

auxílio de um bisturi. Em seguida, colocou-se a lamínula sobre o tecido macerado e pressionou-se esta por meio de uma prensa específica para confecção de lâminas. As lâminas, foram então armazenadas a -20°C até o momento da coloração.

5) Separação lâmina-lamínula e coloração:

Separou-se a lâmina da lamínula mergulhando cada uma delas em nitrogênio líquido e removendo-a com o auxílio de um bisturi. Após esta etapa, fez-se a coloração, na qual foi primeiramente usada uma gota de solução de gelatina e duas gotas de solução de AgNO_3 , colocando-se imediatamente a mesma lamínula, que foi retirada anteriormente, mantendo-se em câmara úmida a 60°C , até que a coloração obtivesse aspecto "marron-amarelado", conforme o método descrito por Boscardin (2005).

6) Avaliações:

Todas as análises foram realizadas em microscópio óptico, e as células digitalizadas por meio do programa Pixel View. Como critério de seleção, usou-se células individualizadas e bem definidas com somente um nucléolo, ou seja, forma mais esférica possível. O programa computacional empregado foi o Adobe Photo Deluxe. Todas as medidas foram convertidas em micrômetros. Em todos os casos foram realizadas medidas dos eixos perpendiculares e transversais. A análise do volume nucleolar foi realizada de acordo com Martini & Flavel (1985) em que o volume (V) do nucléolo é calculado pela fórmula $[\pi * 4(D + d)^3 / 3] / 64$, em que **D** representa diâmetro maior e **d** representa diâmetro menor. Os resultados foram analisados estatisticamente usando a ANOVA e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

No presente estudo todas as células, de ambas as cultivares, foram analisadas em interfase mitótica, o que propiciou a determinação do volume nucleolar, bem como o número de nucléolos por célula. De modo geral, poucas variações foram encontradas quanto ao número de nucléolos entre as cultivares e entre os tratamentos. O padrão obtido foi de acordo com o esperado, sendo que células contendo até três nucléolos, foram as mais comumente observadas, o que para espécies hexaplóides como o trigo (*Triticum aestivum*) pode-se ter, no máximo seis nucléolos.

A capacidade de germinação e crescimento das sementes das cultivares BH 1146 (tolerante) e Anahuac (sensível) foi avaliada em todos os tratamentos. Os resultados observados mostraram que não houve diferença significativa na capacidade de germinação das sementes da cultivar BH 1146. No entanto, pôde-se observar que houve uma diminuição significativa na capacidade de germinação e crescimento das sementes da cultivar Anahuac, quando as mesmas foram tratadas

com soluções de 2 e 4 mg de Al/L, efeito este provavelmente associado à toxicidade do alumínio presente nas soluções (Figura 1).

Além disso, a variação do volume nucleolar também foi nítida entre os tratamentos e entre as cultivares. Comparando-se com o controle, pôde-se notar que a germinação ocorreu sem problema algum, bem como na análise citológica, nenhum resultado foi significativo, ao contrário dos demais tratamentos.

Com relação a outros estudos citológicos em genótipos de trigo quando submetidos a estresse com alumínio, houve a ocorrência de instabilidade mitótica e meiótica, altos níveis de polimorfismo dos micrósporos, mosaicismo cromossômico, distúrbios de pareamento, aderências, cromossomos dicêntricos e micronúcleos nas células mitóticas (Santos Guerra & Moraes-Fernandes, 1977; Del Duca, 1980; Bodaneze-Zanettini et al., 1993).

Diferenças genótípicas também foram observadas entre cultivares derivadas da fonte de nanismo Norin 10, as quais apresentaram maior incidência de instabilidade meiótica, responsável, entre outros fatores, pela ocorrência de tipos desviantes do padrão da cultivar e pela desuniformidade varietal. As principais anormalidades citológicas observadas nos micrósporos de trigo, relacionadas com a resposta diferencial dos genótipos em solos com quatro níveis de correção da acidez, foram distúrbios da polaridade e de orientação do fuso, produção de pólen-p menores e com exina fina, produção de micronúcleos, pólenes vazios e pólenes com dois poros (Zinn et al., 1992).



Figura 1. Germinação das sementes da cultivar Anahuac somente em presença de água.

Referências bibliográficas

- ABICHEQUER, A. D.; BOHNEN, H.; ANGHINONI, I. Absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo submetidas à toxidez de alumínio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 373-378, 2003.
- BODANESE-ZANETTINI, M. H.; ZANELLA, C. C.; SILVA ZARY, A. M.; MORAES FERNANDES, M. I. B.; CALLEGARI-JACQUES, S. M. Aneuploidy and chromosome mosaics in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. Thell.) cultivars. **Cereal Research Communications**, Szeged, v. 21, n. 4, p. 269-275, 1993.
- BOSCARDIN, D. S. **Volume nucleolar em genótipos brasileiros de aveia (*Avena sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*)**. 2005. 62 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.
- CAMARGO, C. E. O. Melhoramento do trigo. VI. Hereditariedade da tolerância a três concentrações de alumínio em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v. 43, p. 279-291, 1984.
- CAMARGO, C. E. O.; FERREIRA FILHO, A. W. P.; FELICIO, J.C. Herança da tolerância ao alumínio em populações híbridas de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2000.
- CAMARGO, C. E. O.; OLIVEIRA, O. F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, Campinas, v. 40, p. 21-31, 1981.
- CANÇADO, G. M. A.; LOPES, M. A.; PAIVA, E. Genética e bioquímica da tolerância das plantas ao alumínio. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA-DCS, 1999. 819 p.
- DEL DUCA, L. J. A.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. Meiotic instability in some Brazilian common wheat cultivars. **Cereal Research Communications**, Szeged, v. 8, n. 4, p. 619-625, 1980.
- DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C. D.; BENNET, R. J.; JAGADISH, V. C.; RANDALL, P. J. Aluminum Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Part I. Uptake and Distribution of Aluminum in Root Apices. **Plant Physiology**, v. 103, p. 685-693, 1993.
- FOY, C. D.; SILVA, A. R. Tolerance of wheat germplasm to acid subsoil. **Journal of Plant Nutrition**, Oxfordshire, v. 14, p. 1277-1295, 1991.
- MARTINI, G.; FLAVELL, R. The control of nucleolus volume in wheat, a genetic study at three developmental stages. **Genetical Society of Great Britain**, v. 54, p. 11-120, 1985.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. **Citogenética**. In: OSÓRIO, E. A. **Trigo no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1982. p. 620.

ROSA, O. S., CAMARGO, C. E. O. Wheat breeding for better efficiency in phosphorus use. In: SAUNDERS, D. A. (Ed.). **Wheat for the nontraditional warm areas**. Mexico: CIMMYT, 1991. p. 333-351. Proceedings of the International Conference, Fóz do Iguaçu, 1990.

SANTOS-GUERRA, M.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. Somatic instability in the Brazilian semi-dwarf wheat variety IAS 54. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 19, p. 225-230, 1977.

SILVA, D. B.; GUERRA, A. F.; REIN, T. A.; ANJOS J. DE R. N. DOS; ALVES, R. T.; RODRIGUES, G. C.; CARDOSO E SILVA, I. A. **Trigo para o abastecimento familiar: do plantio à mesa**. Brasília: Embrapa – SPI, 1996.

ZINN, D. M.; MORAES-FERNANDES, M. I. B.; SIQUEIRA, O. J. F. Polimorfismo dos grãos de pólen das cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L. Thell), CNT 10 e PAT 7392 em resposta a aplicação de calcário x fósforo ao solo ácido "Passo Fundo". In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 44., 1992, São Paulo. **500 anos: memória e diversidade: anais**. p.791.



**Circular
Técnica Online, 19**

Embrapa Trigo
Caixa Postal, 451, CEP 99001-970
Passo Fundo, RS
Fone: (54) 311 3444
Fax: (54) 311 3617
E-mail: sac@cnpt.embrapa.br

Expediente

Comitê de Publicações
Presidente: Silvío Túlio Spera
Beatriz Marti Emygdio, Gilberto Omar Tomm, José
Maurício Cunha Fernandes, Luiz Eichelberger, Maria
Imaculada P. Lima, Martha Zavaris de Miranda, Sandra
Patussi Brammer

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Referências bibliográficas: Maria Regina Martins
Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

BRAMMER, S. P.; SCAGLIUSI, S. M. M.; NASCIMENTO JÚNIOR, A. do; BONATO, A. L. V.; CAVERZAN, A.; ZANOTTO, M. **Análise citológica de cultivares tolerantes e sensíveis de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell) em resposta à presença de alumínio em solução**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005. 8 p. html. (Embrapa Trigo. Circular Técnica Online, 19). Disponível: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/ci/p_ci19.htm