

# Efeitos de Acido 2-Cloroetilfosfônico (Ethrel) Sobre o Pólen de Aveia<sup>1</sup>

R. J. B. Pinto\*, F. E. F. de Carvalho\*\*, M. J. C. de M. S. Tavares\*\*\*, L. C. Federizzi\*\*\*\*

## ABSTRACT

The effects of 2-chloroethylphosphonic acid (Ethrel) on oat pollen grains were evaluated in four trials in the field and greenhouse, in 1985 and 1986. The andro-sterilizing action of Ethrel seems to vary according to the different genotypes, doses and stages of plant development at the time of pulverization. Increasing doses of Ethrel gave rise to a higher percentage of defective pollen, especially when applied before the pre-boot growth stage. On the other hand, cytological analysis indicated that breakdown in microsporogenesis was a consequence of disturbances in starch accumulation and distribution in the three-nucleus stage of the pollen grains.

## INTRODUÇÃO

Alguns trabalhos de pesquisa (2, 3) relacionam a ação gametocida do ácido 2-cloroetilfosfônico (Ethrel) com a liberação de etileno no interior das plantas tratadas. Desta forma, os efeitos desta substância sobre a expressão sexual dos cereais de estação fria têm sido estudados por vários pesquisadores (9, 3, 7, 1, 8). Basicamente estes trabalhos procuram avaliar a viabilidade de emprego deste produto químico na indução de androesterilidade, de forma a facilitar a obtenção de híbridos. Assim, a exploração prática da heterose traria reflexos positivos no incremento da produtividade de espécies autógamas como o trigo, aveia e cevada.

Em aveia, o uso do ácido 2-cloroetilfosfônico na indução da esterilidade de pólen parece promissor, de acordo com o genótipo, com a dose de Ethrel empregada e com o estágio de desenvolvimento das plantas no momento de sua pulverização (8). No entanto, persiste uma carência de informações mais detalhadas

## RESUMO

Com o objetivo de avaliar os efeitos do ácido 2-cloroetilfosfônico (Ethrel) sobre o pólen de aveia, foram conduzidos quatro experimentos, a campo e em casa de vegetação, nos anos de 1985 e 1986. A ação gametocida do produto dependeu do genótipo utilizado, da dose empregada e do estágio de desenvolvimento das plantas durante a pulverização. De maneira geral, doses crescentes de Ethrel corresponderam a maiores percentuais de pólen inviável, especialmente quando aplicado antes do pré-emborrachamento. Paralelamente, as análises citológicas indicam que o colapso na microsporogênese foi basicamente resultado de distúrbios no acúmulo e distribuição de amido nos grãos de pólen em fase de três núcleos.

sobre a real natureza dos distúrbios causados pelo produto à microsporogênese. Assim, o presente trabalho objetivou contribuir para um melhor entendimento dos efeitos do ácido 2-cloroetilfosfônico sobre as anteras de aveia, ressaltando sua participação no surgimento de anormalidades citológicas de vários tipos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos 1 (1985), 3 e 4 (1986) foram conduzidos a campo na Estação Experimental Agrônoma da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, situada em Guaíba, RS. O experimento no 2 foi estabelecido em casa de vegetação da Faculdade de Agronomia da referida Universidade em Porto Alegre, RS. Alguns detalhes da metodologia adotada estão incluídas na Tabela 1.

O genótipo UFRGS 79A03 é uma linhagem e os genótipos UFRGS 5, UFRGS 6 e UFRGS 7 são variedades comerciais também desenvolvidas no programa de melhoramento genético da UFRGS, provenientes dos seguintes cruzamentos:

UFRGS 7903 = Cocker 234 x X 2616-2  
UFRGS 5 = Cocker 234 x RIT 230  
UFRGS 6 = Swam x 2616-2  
UFRGS 7 = X 1205 x FLA 1093

Em cada experimento, as panículas destinadas à análise citológica dos grãos de pólen foram coletadas de 5 a 10 dias após a última aplicação do ácido 2-cloroetilfosfônico. A seguir, foram fixadas em uma solu-

1 Recebido para publicação em 26 de janeiro de 1988. Contribuição do Setor de Plantas de Lavoura de Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FA/UFRGS).

\* Eng. Agr., Mag. Sc., Pesquisador do Instituto de Pesquisas Agronômicas-RS.

\*\* Eng. Agr., Ph.D., Professor Titular, Faculdade de Agronomia Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caixa Postal 776, C. E. P. 90 001, Porto Alegre, RS.

\*\*\* Bióloga, Mag. Sc., Professora Assistente, FA/UFRGS, Pesquisador do CNPq.

\*\*\*\* Eng. Agr., Ph.D., Professor Adjunto, FA/UFRGS, Pesquisador do CNPq.

Tabela 1. Alguns detalhes da metodologia empregada nos experimentos a campo e em casa de vegetação-1985/86.

Metodologia	Experimentos			
	1	2	3	4
Delineamento experimental	PSSD*	BC**	PSD***	PSD
Genótipos avaliados	UFRGS 6; UFRGS 79A03	UFRGS 79A03	UFRGS 5	UFRGS 7
Doses de Ethrel (kg s.a./ha)	0, 3, 6, 12	0, 1, 5, 3, 0, 6, 0	0, 1, 5, 3, 0, 6, 0	0, 1, 5, 3, 0, 6, 0
Estádios de desenvolvimento das plantas quando da pulverização****	41; 45	38; 41; 43	38; 43	38; 43
Área útil da unidade experimental (m <sup>2</sup> )	4,50	0,05	1,80	1,80
Número de repetições	4	3	3	3

\* Parcelas subdivididas

\*\* Blocos casualizados

\*\*\* Parcelas subdivididas

\*\*\*\* Segundo a escala de Zadoks *et al* (10)

ção de álcool 99° e ácido acético na proporção de 3 para 1, sendo transferidas para álcool 70° e mantidas em congelador, dois dias após a coleta. Lewis e John (4) descreveram a técnica empregada no preparo das lâminas citológicas, sendo utilizado como corante uma solução de carmim propiônico. Foram analisadas duas lâminas por panícula, sendo observados em cada lâmina 200 grãos de pólen. Como critério para a classificação dos grãos de pólen em normais ou anormais, foram considerados viáveis somente os microgametófitos que possuíam um formato externo arredondado, distribuição regular de amido e bom aspecto dos 2 ou 3 núcleos existentes, conforme o grau de maturação das anteras analisadas. A Fig. 1 mostra as principais classes morfológicas de pólen nas plantas tratadas. Por outro lado, a proporção do número de grãos de pólen dividida por 200 indicou a frequência de pólen normal obtida.

Após a aplicação dos testes de Shapiro-Wilk e de Kolmogorov, destinados à comprovação da distribuição normal dos dados, foi procedida a análise de variância convencional, seguida da separação das médias de frequência de pólen viável por meio do teste de Duncan, com  $P > 0,05$ . No caso da Tabela 5, a separação das médias dentro de cada classe morfológica de pólen teve por base os respectivos intervalos de confiança calculados com dois desvios padrão, na média dos 2 genótipos.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados obtidos em 1985 (Tabela 2), há evidências de um comprometimento na microsporogênese das plantas tratadas, especialmente com

aplicações no pré-emborrachamento. Neste estádio e sob a dose máxima, o ácido 2-cloroetilfosfônico fez com que as plantas tratadas produzissem apenas 3,59% do percentual detectado na respectiva testemunha. O efeito do produto foi sensivelmente menor, sob qualquer dose efetiva (3,6 e 12 kg/ha), quando aplicado durante o emborrachamento.

Os efeitos fitotóxicos observados em 1985 sugeriram o uso de doses menores de Ethrel no experimento 2. Mesmo assim, o efeito de doses sobre a microsporogênese novamente teve grande magnitude, ocorrendo diferenças significativas entre todas as médias de doses (Tabela 3). Por outro lado, Lougheed e Franklin (5) apontaram que a quantidade de etileno liberada pelo Ethrel era diretamente relacionada com o incremento da temperatura. Conseqüentemente, as altas temperaturas observadas em cas de vegetação poderiam ter contribuído para um efeito intenso do gametocida utilizado. Da mesma forma, uma comparação entre os percentuais de pólen viável nas testemunhas, a campo (Tabela 2) e em casa de vegetação (Tabela 3), parece ter confirmado o efeito das altas temperaturas sobre a promoção de anormalidades meióticas em plantas não tratadas, conforme indicado por Zanettini *et al* (11).

Os resultados obtidos nos experimentos 3 e 4 (Tabela 4), embora não apontem significância estatística para as diferenças entre as médias de distintos estádios no genótipo UFRGS 5, mostram que, em UFRGS 7, aplicações antes do pré-emborrachamento foram significativamente mais prejudiciais à microsporogênese do que pulverizações posteriores. Ao mesmo tempo, foi detectado que as doses efetivas tiveram idêntica ação gametocida em UFRGS 5. Já para

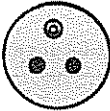
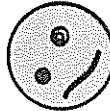


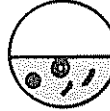

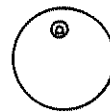


Nº da classe	Apresentação esquemática	Observações
1		Pólen binucleado. normal em anteras imaturas
2		Pólen binucleado de anteras imaturas. anormal por degeneração de um dos núcleos
3		Pólen trinucleado maduro. normal
4		Pólen trinucleado, considerado normal ou não de acordo com a extensão da deficiência amídica e o aspecto geral dos núcleos
5		Pólen trinucleado, anormal. com grande deficiência de amido
6		Pólen anormal. com distribuição muito irregular de amido
7		Pólen vazio. com ausência total de amido
8		Pólen com micronúcleos. anormal
Outros tipos:		Tipos anormais pouco frequentes, como grãos de pólen com forte carência de amido ou núcleos não distinguíveis

Fig 1 Classes morfológicas de pólen, em aveia, observadas nos experimentos de 1985/86, em decorrência de pulverizações com Ethrel

UFRGS 7, as plantas tratadas com as maiores doses produziram cerca da metade da percentagem de pólen normal detectada no tratamento padrão. Desta forma, em UFRGS 7, a comparação entre as médias da testemunha e da dose máxima mostra que a frequência de pólen inviável aumentou em 1120 %

Tabela 2. Percentagem média de pólen viável entre os genótipos de aveia UFRGS 6 e UFRGS 79A03 testados a campo com 4 doses de Ethrel aplicadas em 2 estádios de desenvolvimento de planta (1985).

Doses (kg/ha)	Percentagem de pólen viável com aplicações		Média
	No pré-emborrachamento	No emborrachamento	
0	95.19 <sup>a</sup>	94.58 a	94.88 a
3.0	33.63 b	66.26 bc	49.95 b
6.0	3.36 c	71.09 b	37.22 c
12.0	3.42 c	60.13 c	31.77 c
Média	33.90 <sup>**</sup> <sub>B</sub>	73.01 <sub>A</sub>	53.46

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si (P > 0.05)

\*\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si (P > 0.05)

A carência de informações sobre as propriedades gametocidas do ácido 2-cloroetilfosfônico exige o estabelecimento de uma análise mais detalhada sobre as anormalidades citológicas observadas. Desta forma, os dados da Tabela 5 mostram a distribuição percentual de cada classe morfológica de pólen sobre o total observado em cada estágio e dose na média dos dois genótipos, uma vez que não foram constatadas diferenças significativas entre UFRGS 5 e UFRGS 7

Tabela 3. Frequência de pólen normal do genótipo de aveia UFRGS 79A03 testado em casa de vegetação com 4 doses de Ethrel, na média de 3 estádios (1986).

Dose (kg/ha)	Frequência de pólen normal
0	0.82 <sup>a</sup>
1.5	0.51 b
3.0	0.40 c
6.0	0.23 d
Média	0.49

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (P > 0.05)

Tabela 4. Freqüência de pólen normal dos genótipos de aveia UFRGS 5 e UFRGS 7 testados a campo com 4 doses de Ethrel aplicadas em 2 estádios de desenvolvimento de planta (1986).

Estádio	Dose (kg/ha)	Freqüência de pólen normal		Média dos experimentos
		UFRGS 5 (experimento 3)	UFRGS 7 (experimento 4)	
Antes do pré-emborrachamento	0	0.95* a	0.95 a	0.95
	1.5	0.85 a	0.64 ab	0.74
	3.0	0.70 b	0.33 b	0.51
	6.0	0.60 bc	0.22 b	0.41
	Média	0.77** <sub>A</sub>	0.53 <sub>A</sub>	0.65
Após o pré-emborrachamento	0	0.93 a	0.95 a	0.94
	1.5	0.83 a	0.86 ab	0.84
	3.0	0.85 a	0.70 ab	0.87
	6.0	0.64 b	0.67 b	0.65
	Média	0.81 <sub>A</sub>	0.79 <sub>A</sub>	0.82

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si ( $P > 0.05$ ).

\*\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ( $P > 0.05$ ).

Inicialmente, pela Tabela 5, a observação das médias das duas primeiras colunas sugere que as doses crescentes de Ethrel estejam associadas a freqüências progressivamente menores de pólen binucleado normal, e maiores de pólen binucleado anormal. Ainda que as diferenças entre estádios não tenham sido significativas, parece ter ocorrido um percentual maior de pólen binucleado, normal ou não, com aplicações de Ethrel anteriores ao pré-emborrachamento, talvez

porque no estádio mais avançado a maior parte dos micrôsporos já tivesse formado os três núcleos definitivos.

Os dados da Tabela 5 mostram que, em ambos os estádios, as classes morfológicas três e quatro foram inequivocamente as mais visualizadas, confirmando que a ação do produto foi basicamente direcionada à indução de deficiências de amido localizadas nos

Tabela 5. Distribuição percentual média de pólen entre os genótipos de aveia UFRGS 5 e UFRGS 7 em distintas classes morfológicas, após aplicações de Ethrel a campo (1986).

Estádio de aplicação do Ethrel	Dose (kg/ha)	Classes morfológicas de grãos de pólen (%)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	Outros
Antes do pré-emborrachamento	0	17.08*a	0.00 b	76.31 a	4.98 b	0.00 b	0.00 b	1.61 b	0.00 b	0.00 b
	1.5	5.56 ab	3.47 ab	18.71 ab	57.12 ab	0.47 ab	7.17 ab	6.52 b	0.97 a	0.00 b
	3.0	0.90 b	3.29 ab	11.87 ab	61.37 ab	8.02 a	9.96 ab	3.16 ab	0.67 ab	0.73 ab
	6.0	9.25 ab	4.98 a	4.54 b	60.84 a	0.54 ab	15.69 a	2.35 ab	0.49 ab	1.31 a
	Média	8.20** <sub>B</sub>	2.93 <sub>B</sub>	27.86 <sub>AB</sub>	46.07 <sub>A</sub>	2.26 <sub>B</sub>	8.20 <sub>B</sub>	3.41 <sub>B</sub>	0.53 <sub>B</sub>	0.51 <sub>B</sub>
Após o pré-emborrachamento	0	0.00 b	0.00 b	93.11 a	4.44 b	0.00 b	0.00 b	2.25 ab	0.00 b	0.00 b
	1.5	5.05*ab	0.41 ab	20.53 ab	63.12 ab	0.75 ab	5.77 a	2.56 a	0.00 b	1.88 ab
	3.0	1.58 ab	0.00 b	11.79 ab	75.53 a	0.55 ab	1.62 ab	1.95 b	6.95 a	0.00 b
	6.0	5.66 a	1.75 a	6.37 b	71.53 ab	0.98 a	3.63 ab	1.97 b	1.28 ab	6.84 a
	Média	3.07 <sub>B</sub>	0.54 <sub>B</sub>	32.95 <sub>AB</sub>	53.65 <sub>A</sub>	0.57 <sub>B</sub>	2.75 <sub>B</sub>	2.18 <sub>B</sub>	2.06 <sub>B</sub>	2.13 <sub>B</sub>

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si ( $P > 0.05$ ).

\*\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ( $P > 0.05$ ).

bordos dos micrósporos trinucleados. Paralelamente, doses crescentes de Ethrel corresponderam a percentuais cada vez menores de grãos de pólen normais (classe 3). Da mesma forma, na classe 4, houve diferenças expressivas entre a frequência deste tipo de pólen nas plantas tratadas e não tratadas com o produto químico, não tendo ocorrido, porém, significância estatística para as diferenças entre as médias das doses efetivas (1,5, 3,0 e 6,0 kg/ha).

O ácido 2-cloroetilfosfônico parece ter induzido pequenos aumentos nos percentuais de pólen tipos 5 e 6 (Tabela 5), ratificando a existência de efeitos diretos ou indiretos sobre o acúmulo e distribuição de amido nos grãos de pólen das plantas tratadas. Por outro lado, os valores da classe 6 sugerem uma certa independência entre a ocorrência de grãos de pólen vazios e as aplicações do produto químico. Ao mesmo tempo, os dados da classe 8 sugerem uma ação discreta do gametocida sobre o surgimento de micronúcleos, os quais, por serem constituídos de DNA nuclear (6), podem estar associados a perdas de material genético, caracterizando, se houvesse viabilidade de tais micrósporos, uma ação até certo ponto mutagênica do 2-cloroetilfosfônico sobre a aveia. Por último, a grande ocorrência de valores nulos, na coluna relativa aos demais tipos morfológicos, indica que a divisão das observações de pólen em 8 classes morfológicas básicas foi adequada aos propósitos do trabalho.

#### CONCLUSÃO

Parece estar comprovada a ação gametocida do ácido 2-cloroetilfosfônico, em aveia. Assim, doses crescentes de Ethrel corresponderam a percentuais progressivamente maiores de anormalidades citológicas, induzidas pela ação do etileno sobre os processos meióticos e mitóticos, nas anteras das plantas tratadas. Paralelamente, as análises citológicas mostraram que o colapso na microsporogênese foi basicamente resultado de distúrbios no acúmulo e na distribuição de amido dos grãos de pólen em fase de três núcleos.

#### LITERATURA CITADA

1. BARBOSA NETO, J.F. 1985. Esterilidade de trigo induzida pelo ácido 2-cloroetilfosfônico (Ethrel). Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, Bra., Faculdade de Agronomia da UFRGS 104 p.
2. COOKE, A.R.; RANDALL, D.I. 1968. 2-Haloethane phosphonic acids as ethylene releasing agents for the induction of flowering in pineapples. *Nature (G.B.)* 218:974.
3. HUGHES, W.G. 1975. Use of Ethephon in wheat breeding. *Annual Applied Biologists (G.B.)* 81:112-114.
4. LEWIS, K.R.; JOHN, B. 1964. The matter of mendelian heredity. London, Churchill 169 p.
5. LOUGHEED, E.C.; FRANKLIN, E.W. 1972. Effects of temperature on ethylene evolution from Ethephon. *Canadian Journal of Plant Science (Can.)* 52:769-773.
6. LOVE, R.M. 1949. Trigos riograndenses. *Agros (Bra.)* 11:66-85.
7. NELSON, L.R. 1975. Effect of Ethrel on sterility in triticale. *Crop Science (EE.UU.)* 15:727-728.
8. PINTO, R.J.B. 1987. Indução de androesterilidade em aveia pelo uso do ácido 2-cloroetilfosfônico (Ethrel). Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, Bra., Faculdade de Agronomia da UFRGS 114 p.
9. STOSKOPF, N.C.; LAW, J. 1972. Some observations of Ethrel as a tool for developing hybrid cereals. *Canadian Journal of Plant Science (Can.)* 52:680-683.
10. ZADOKS, J.C.; CHANG, T.T.; KONZAK, C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research Organization (G.B.)* 14:415-421.
11. ZANETTINI, M.H.B.; FERNANDEZ, M.I.B.M.; SALZANO, F.M. 1979. Cytogenetic studies in two Brazilian wheat cultivars under natural and controlled temperature conditions. *Revista Brasileira de Biologia (Bra.)* 39:551-557.