

# Testes de Viabilidade Polínica em Mandioca pelo Método Colorímetro

*Pollen Viability Tests in Cassava Using the Colorimeter Method*

Letícia Z. G. Silva, Amanda G. Guimarães, Euriann L. M. Yamamoto, Livia Maria C. Davide, Leandro E. Dalarosa & Éder J. Oliveira

O objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade polínica com base em teste colorímetro de dois genótipos de mandioca cultivados em Dourados-MS. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com esquema fatorial 2x5, em que dois são genótipos de mandioca (BRSCS01 e BRS399) e cinco são corantes químicos (Carmim acético 2%, Lugol 1%, Rosa bengala, Sudan IV e Solução Verde de malaquita), em cinco repetições. Os colorantes e a interação entre os genótipos e os corantes não tiveram diferença entre a porcentagem de viabilidade de pólen. O genótipo BRSCS01 (72,06%) teve a maior porcentagem de viabilidade dos grãos de pólen do que o genótipo BRS399 (57,66%).

**Palavras-chave:** *Manihot esculenta crantz; grãos de pólen; melhoramento vegetal.*

The objective was to evaluate the political forecast based on a colorimeter test of two cassava genotypes cultivated in Dourados-MS. The experimental design used was properly randomized, in a 2x5 factorial scheme, with two cassava genotypes (BRSCS01 and BRS399) and five chemical dyes (Acetic Carmine 2%, Lugol 1%, Rose Bengal, Sudan IV and Malachite Green Solution), in five repetitions. The colorants and the interaction between genotypes and dyes had no difference between the percentage of pollen accuracy. The BRSCS01 genotype (72.06%) had the highest percentage of pollen grain than the genotype BRS399 (57.66%).

**Keywords:** *Manihot esculenta crantz; pollen grains; plant breeding.*

## Introdução

*Manihot esculenta* conhecida como mandioca, é uma planta arbustiva que produz raízes tuberosas que são utilizados para a produção de alimentos tanto para animais quanto para humanos, sendo uma importante fonte energética, com alto teor de amido, fibras, incluindo minerais como potássio, cálcio, fósforo, sódio e ferro.<sup>1</sup> A mandioca é frequentemente propagada assexuadamente através de caule para produção comercial, mas se for utilizada as sementes (reprodução via sexual) poderá obter novas combinações entre os genitores e poderá proporcionar melhor desempenho agrônomo.<sup>2,3</sup>

Nos programas de melhoramento de plantas a reprodução sexuada tem sido utilizada<sup>4</sup> e para isso é preciso verificar a porcentagem de grãos de pólen viáveis, trazendo a possibilidade dos genótipos em gerar novos descendentes.<sup>5</sup> A análise da viabilidade do grão de pólen auxilia na identificação de gametas masculinos com potencial para serem usados na hibridação sem perder a capacidade de germinar e o melhor momento para fertilizar.<sup>6</sup>

Uma das maneiras de medir a viabilidade do pólen é por meio de parâmetros citológicos, como a reação a corantes que reagem com componentes celulares presentes nos grãos de pólen maduros.<sup>7</sup> Entre os principais fatores que afetam a viabilidade polínica estão àqueles relacionados com o genótipo, o período e horário da coleta dos botões florais, a temperatura e condições ambientais, o manuseio no preparo das lâminas sendo observado que a maceração realizada antes de colocar os corantes, tende a danificar os grãos de pólen rompendo toda a sua estrutura celular.<sup>2,8</sup>

Diante do exposto, não há muitas informações a respeito dos corantes utilizados, suas metodologias explícitas e todo o funcionamento das reações dos corantes nos grãos de pólen de mandioca, assim como na determinação da viabilidade polínica. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade polínica de dois genótipos de mandioca cultivados na região de Dourados-MS, através do método indireto do teste de coloração histoquímica, sendo estes genótipos devidamente desenvolvidos e adaptados para outros estados do Brasil.

## Materiais e Métodos

O trabalho foi realizado na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), na região de Dourados-MS. Os genótipos de mandiocas, BRS 399 e BRS CS01, utilizados se encontram no campo (Latitude: 22° 13' S, Longitude: 54° 59' W, Altitude: 411 m), em solo do tipo Latossolos Vermelhos Distroféricos, com uma variação de temperatura de 25°C a 35°C, sendo Dourados uma região de clima tropical.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com esquema fatorial 2x5, em que dois são os genótipos de mandioca (BRSCS01 e BRS399) e cinco são corantes químicos (Carmim acético 2%, Lugol 1%, Rosa bengala, Sudan IV e Solução Verde de malaquita), em cinco repetições, representadas cada uma com uma lâmina.

Os botões florais masculinos foram coletados no ramo da segunda e terceira ramificação simpodial nos dois genótipos de mandioca em pré-antese, no período da manhã por volta das 7h00min às 7h20min. Posteriormente, foram levados ao Centro de Biotecnologia e Melhoramento de Cana de Açúcar, localizado na Unidade I da UFGD, para fazer as análises de viabilidade de pólen. No período que é feito a preparação do corante foram deixados os botões florais sobre uma placa de petri com álcool 70%.

As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento das anteras para a liberação do grão de pólen, no qual uma flor foi utilizada por lâmina, sendo confeccionadas cinco lâminas para cada corante analisado. Os botões florais foram retirados do álcool 70% e secados em papel-filtro. Posteriormente, sobre uma lâmina, foram retiradas 10 anteras em cada botão floral com auxílio de uma pinça e de um estilete de precisão bisturi. Nas lâminas já com as anteras foram colocados os corantes, que foi preparado de acordo com os protocolos. Para se obter maior eficiência na coloração foi feito um corte com o estilete de precisão bisturi sobre cada antera, com a intenção de aumentar a coloração enquanto espera o tempo de ação do corante; em seguida, foi colocada à lamínula. Depois, com o bastão de vidro, foram realizadas leves macerações para liberar maior quantidade de grãos de pólen, sendo

visualizado em microscópio óptico em objetiva de 4x. Posteriormente, a contagem de 400 grãos de pólen foi realizada dentre eles viáveis e inviáveis em cada lâmina, sendo realizada a contagem de 2000 grãos de pólen por corante. Essas etapas estão de acordo com os autores.<sup>5,9,10</sup>

A porcentagem dos pólenes viáveis foi obtida pelo número de grãos corados (viáveis) (Tabela 1) divididos pelo número de grãos contados. Os resultados foram submetidos à análise de variância, e, quando detectada a diferença significativa pelo teste F a 1% de probabilidade entre os genótipos de mandioca, os corantes químicos e a interação dos genótipos com os corantes foram adotadas a comparação de médias através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), com o uso do *software* Genes.<sup>11</sup>

**Tabela 1.** Determinação por metodologias de coloração de grão de pólen.

Coloração do grão de pólen			
Corante	Viável	Inviável	Autor
Carmim acético	Marrom café	Marrom claro	16
Lugol 1%	Marrom avermelhado	Amarelo	17
Rosa bengala	Rosa escuro intenso	Rosa claro	17
Sudan IV	Marrom alaranjado	Alaranjado	18
Verde de Malaquita	Azul escuro	Verde claro	17

## Resultados e Discussões

Os corantes químicos foram eficientes na distinção da viabilidade de pólen, sendo que suas cores foram visíveis em microscópio óptico, tendo colorações e tamanhos diferentes. Os grãos de pólen viáveis foram relativamente maiores e mais escuros que os inviáveis.

Houve diferença significativa somente entre os genótipos de mandioca na verificação da porcentagem de pólenes viáveis (Tabela 2). Os corantes químicos de coloração e a interação entre os genótipos e os corantes não diferiram entre si, ou seja, para os testes analisados neste

estudo todos os corantes foram eficazes para a detecção da viabilidade de pólen de cada genótipo de mandioca.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância para a característica da porcentagem de pólenes viáveis em dois genótipos de mandioca em cinco corantes. UFGD, Dourados-MS, 2021.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrados médios
Genótipo (G)	1	2592,00**
Corantes (C)	4	152,81 <sup>ns</sup>
G x C	4	111,43 <sup>ns</sup>
Erro	40	97,34
Total	49	
Média (%)	64,86	
C V (%)	15,21	

ns, \*\*: não significativo e significativo a 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste F.

Independente do corante usado para o teste histoquímico, todos apresentaram uma taxa superior a 50% na distinção da viabilidade polínica (com média de 64,86%) (Tabela 3). De acordo com alguns autores,<sup>12,7,13</sup> o corante Lugol 1%, Solução Verde de Malaquita e de Alexander são excelentes na determinação da viabilidade polínica através das análises histoquímicas independentes das espécies analisadas.

Segundo os autores,<sup>8</sup> a viabilidade polínica está associada a vários fatores, sendo desde a coleta dos botões florais até o processamento. Em que, o horário de coleta pode influenciar na porcentagem, sendo, recomendado fazer a coleta pela manhã entre os horários da 7h00 até no máximo 9h30min. Pois, é nesse período da manhã que os botões florais masculinos se encontram em deiscentes, fazendo com que a viabilidade esteja no máximo.

De acordo com os autores,<sup>13</sup> o corante carmin acético ademais com seu estudo e com esse, mesmo se tratando de espécie diferente em que se utilizou em testes de viabilidade a espécie *Bertholletia excelsa*, obteve uma

média de porcentagem inferior aos demais corantes. O corante carmim acético reage diretamente com o material genético presente no citoplasma.<sup>14</sup>

**Tabela 3.** Média da viabilidade de grãos de pólen utilizando corantes químicos e genótipos diferentes de mandioca. UFGD, Dourados-MS, 2021.

Corantes	Viabilidade de grãos de pólen (%)	Genótipos	Viabilidade de grãos de pólen (%)
Carmim acético	59,63 A	BRSCS01	72,06 A
Lugol 1%	67,35 A	BRS399	57,66 B
Rosa bengala	61,73 A		
Sudan IV	68,25 A		
Verde de Malaquita	67,35 A		

Letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste F a 1% de probabilidade.

Em alguns trabalhos de mandioca, há diferenças na viabilidade de pólen quanto aos corantes utilizados. Por exemplo,<sup>9</sup> encontraram a porcentagem de viabilidade de pólen acima de 70% utilizando três variedades (IAC-56-170; IAC-14; IAC- CAAPORA) com base nos testes colorímetros reativo de Alexander, carmim acético e lugol, em estudos realizados no município de Alta Floresta - MT.

Já os autores,<sup>10</sup> encontraram a porcentagem de viabilidade de pólen entorno de 35% utilizando o corante carmim acético 2%, na etnovarietade de mandioca (Cacau copinha), sendo coletado também no município de Alta Floresta- MT, no qual o procedimento diferiu do presente trabalho, já que os botões florais permaneceram sobre temperatura ambiente com duração de 24h sendo colocados em solução de álcool 70% e acondicionados sob refrigeração com +/- 4°C, até o preparo das lâminas.

No presente trabalho, houve diferença na viabilidade de pólen se baseia apenas no genótipo de mandioca, sendo o genótipo BRSCS01 teve a maior porcentagem (72,06%) em relação ao genótipo BRS399 (57,66%) (Tabela 3). A viabilidade de pólen acima de 70% é considerada alta, entre 31 e 69% valores médios para esta análise.<sup>15</sup> Assim,

o genótipo BRSCS01 é considerado de alta viabilidade e o genótipo BRS399 de média viabilidade.

## Conclusão

O genótipo de mandioca BRSCS01 teve a maior porcentagem da viabilidade dos grãos de pólen (72,06%) em relação ao genótipo BRS399 (57,66%). Não houve diferença entre os cinco testes histoquímicos (Carmim acético, lugol 1%, Rosa bengala, Sudan IV e solução verde de malaquita), podendo ser utilizado qualquer um na detecção da viabilidade de pólen dos dois genótipos de mandioca.

## Bibliografia

1. OLIVEIRA, E. J. D.; OLIVEIRA, O. S. D.; SANTOS, V. D. S. Selection of the most Informative morphoagronomic descriptors for cassava germplasm. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **2014**, 49, 891.
2. BANDEIRA, S. M.; ANDRADE, L. R. B. D.; SOUZA, E. H. D.; ALVES, A. A. C.; OLIVEIRA, E. J. Reproductive barriers in cassava: Factors and implications for genetic improvement. *PLoS One.* **2021**, 16 e0260576.
3. RAMOS ABRIL, L. N.; PINEDA, L. M.; WASEK, I.; WEDZONY, M.; CEBALLOS, H. Reproductive biology in cassava: stigma receptivity and pollen tube growth. *Commun. Integr. Biol.* **2019**, 12, 96.
4. HERSHEY C. H. Drivers of change for cassava's multiple roles in sustainable development. Hershey C., ed. *Achieving sustainable cultivation of cassava*. Philadelphia: Burleigh Dodds Series on Agricultural Science, **2017**.
5. FURINI, T.; DOMINGUES, S. C. O.; SCATOLA, L. F.; SCHMITT, J. P. M.; BARROS, J. O.; PECEGUEIRO, M.; KARSBURG, I. V. Estimativa de viabilidade polínica da *Chenopodium ambrosioides* L. através de métodos colorimétricos. *Braz. J. Dev.* **2020**, 6, 42386.
6. DAMASCENO JÚNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G. Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Ver. Ceres.* **2008**, 55, 433.
7. SOARES, J.A.G. SOARES, F.S.; KARSBURG I.V. Viabilidade de grãos de pólen: métodos de investigação da viabilidade de grãos de pólen. *Membro do Omniscryptum: Novas Edições Acadêmicas*, **2019**.
8. MELLONI, M. L. G.; SCARPARI, M. S.; MENDONÇA, J. R.; PERECIN, D.; LANDELL, M. G. A.; PINTO, L. R. .

Comparison of Two Staining Methods for Pollen Viability Studies in Sugarcane. Sugar Tech. **2013**, 15, 107.

9. 9. TIAGO, A.; ROCHA, V. D.; TIAGO, P.; LIMA, J.; ROSSI, A. A. Viabilidade polínica e receptividade estigmática em variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Encicl. Biosf. **2014**, 10, 1957.
10. 10. WOLF, M. S.; SANTOS, L. L.; PEDRI, E. C. M.; TIAGO, A. V.; ROSSI, A. A. B. Citoquímica e viabilidade polínica de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Encicl. Biosf. **2020**, 17, 214.
11. 11. CRUZ, C. D. Genes Software - extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. Acta Sci. Agron. **2016**, 38, 547.
12. 12. SILVA, H. E.; COLARES, D. S.; BRITO, R. F. F.; FERREIRA, V. E.; SILVA J. A. J. S.; Campos, G. A. Desempenho agrônômico de variedades de mandioca em sistema irrigado. Agri-Environmental Sciences, **2021**, 7, 10.
13. 13. SANTOS, T.A.; TIAGO, P.V.; SCHMITT, K.F.M.; MARTINS, K.C.; Rossi, A.A.B. Viabilidade pólinica em *Bertholletia excelsa* Bonpl. (LECYTHIDACEAE) baseada em diferentes testes colorimétricos. Encicl. Biosf. **2015**, 11, 3136.
14. 14. PAGLIARINI, M.S.; POZZOBON, M.T. Meiose vegetal: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais, 2. Anais: Brasília, **2004**.
15. 15. SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogenese associadas ao tamanho do botao floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiroamarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). Cienc. Agrotecnol. **2002**, 26, 1209.
16. 16. STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. Pollen: biology, biochemistry, management. Berlin: Heidelberg, **1974**.
17. 17. ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. Stain Technol. **1980**, 55, 13.
18. 18. BAKER, H. G.; BAKER, I. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. Am. J. Bot. **1979**, 66, 591.

---

## Letícia Z. G. Silva<sup>1</sup>, Amanda G. Guimarães<sup>2\*</sup>, Euriann L. M. Yamamoto<sup>1</sup>, Livia Maria C. Davide<sup>1</sup>, Leandro E. Dalarosa<sup>1</sup> & Éder J. Oliveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Grande Dourados. Rodovia Dourados/Itahum, Km 12, Cidade Universitária, Dourados/MS, Caixa Postal: 364, CEP: 79.804-970

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos. Rodovia Ulysses Gaboardi, 3000, Curitibanos/SC, CEP: 89520-000

<sup>3</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua da Embrapa s/n, CP007, Cruz das Almas/BA, CEP:44380-000

\*E-mail: amanda.goncalves@ufsc.br