



AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE POLÍNICA EM GENÓTIPOS DE *Theobroma cacao* L. COM BASE EM TESTES COLORIMÉTRICOS

EVALUATION POLLEN VIABILITY IN CLONES *Theobroma cacao* L. BASED ON TESTS COLORIMETRIC

CABRAL¹, Juliane Costa; KLEIN², Marcia Elisabete; ROSSI³, Ana Aparecida Bandini VIEIRA⁴, Felipe Sakamoto; RIBEIRO⁵, Denise Santos de Souza; MESQUITA⁶, Jaqueline Silva

¹Bióloga – Universidade do Estado de Mato Grosso – Campus de Alta Floresta, MT. e-mail: julianecostacabral@hotmail.com

²Mestre em Física Ambiental, Laboratório Didático – UNEMAT, Alta Floresta.

³Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular - PPGBioAgro- PGMP- UNEMAT - Campus de Alta Floresta – MT, Brasil.

⁴Mestrando do Curso de Genética e Melhoramento de Plantas – UNEMAT.

⁵Acadêmica de Ciências Biológicas, Bolsista no Laboratório Didático – UNEMAT, Alta Floresta

⁶Acadêmica de Engenharia Florestal, Estagiária no Laboratório Didático – UNEMAT, Alta Floresta

Resumo – O presente estudo objetivou avaliar a viabilidade polínica de sete genótipos de *Theobroma cacao* L. Para estimativa da viabilidade polínica, botões florais em pré-antese e antese foram coletados e fixados em etanol:ácido acético (3:1), e posteriormente transferido para álcool 70%. A coloração dos grãos de pólen foi realizada utilizando os corantes carmim acético e lugol. Na avaliação da viabilidade dos polens advindos dos botões florais em pré-antese não houve diferença significativa entre os genótipos e nem entre os corantes, apresentando uma média de viabilidade acima de 95% na estimativa com os dois corantes. Enquanto que nos polens das flores em antese os dois corantes revelaram diferenças significativas entre os genótipos, porém com viabilidade acima de 70% para os mesmos, com uma média acima de 80% nos dois corantes. Observou-se também diferenças significativas para a viabilidade polínica em relação aos estádios de desenvolvimento da flor, para alguns dos genótipos estudados.

Palavras-chave - Cacau; Pólen; Carmim Acético 2%; Lugol.

Abstract - This present study objectived to assess pollen viability from seven genotypes of *Theobroma cacao* L. For estimation of pollen viability, pre-anthesis flower button and anthesis was collected and fixed in ethanol:acid acetic (3:1), and after transferred for ethanol 70%. The coloration of pollen grains was performed using the dyes acetic carmim and lugol. In the avaliation of pollen viability form pre-anthesis flowers buttons not have significant difference between the genotypes and dyes with viability mid above of 95% estimated with the twos dyes. While in the flowers pollen in atthesis, the dyes reveled significant differences between the genotypes, but with viability above 70% for the same, with mid above of 80%. Observed significant differents for pollinic viability from differents stages of flower development, for some genotypes.

Keywords - Cocoa; Pollen; 2% Acetic Carmim; Lugol.

INTRODUÇÃO



Theobroma cacao L. (cacaueiro) pertence à família Malvaceae e se encontra distribuído naturalmente na Floresta Amazônica, apresenta importância econômica no mundo todo, sendo a matéria prima para a fabricação do chocolate (SANTOS, 2003). As populações de cacau ao longo da sua distribuição natural na Amazônia brasileira apresentam ampla variabilidade genética. O desenvolvimento de trabalhos de coleta, conservação e avaliação de germoplasma permitem o conhecimento desta variabilidade e sua utilização em programas de melhoramento genético (KOBAYASHI et al., 2001).

Os programas de melhoramento vegetal estão fundamentados na obtenção de cultivares superiores, a partir do potencial reprodutivo dos gametas e da manipulação da variabilidade genética existente no germoplasma de determinada espécie. Dentre os fatores responsáveis pelo sucesso desses programas destaca-se a seleção de genótipos e os cruzamentos cuja eficácia depende diretamente da viabilidade do pólen (TECHIO et al., 2006).

Informações sobre a viabilidade polínica são fundamentais para os estudos da biologia reprodutiva de espécies vegetais, permitindo a comprovação e o entendimento de resultados decorrentes de determinados cruzamentos (DAFNI, 1992). Estimativas da viabilidade polínica constituem um importante parâmetro em análises de fluxo gênico e em programas de melhoramento genético de plantas (MARTINS et al., 1981).

Os métodos colorimétricos utilizam corantes químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes nos grãos de pólen maduro (PAGLIARINI & POZZOBON, 2004). Corantes como o carmim acético, lugol e orceína acética são utilizados como indicativos de viabilidade polínica (DOMINGUES et al., 1999; RIGAMOTO & TYAGI, 2002).

Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade polínica em sete genótipos de *T. cacao*, com base em testes colorimétricos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados sete clones de *T. cacao* de diferentes origens conforme Tabela 1, obtidos no campo de produção de sementes da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) Estação Experimental Ariosto da Riva em Alta Floresta – MT.

Tabela 1. Relação dos Genótipos, com as respectivas identificações e origens.

GENÓTIPO	IDENTIFICAÇÃO	ORIGEM
ICS1	Imperial College Selection 1	Trinidade
MA15	Manaus 15	Brasil
SIAL505	Seleção do Instituto Agrônomo do Leste 505	Brasil
CAB0028	Cacau da Amazônia Brasileira	Brasil
SCA6	Scavina	Equador
MO1	Mocorongo 1	Brasil
PA121	Parinari 121	Peru

Foram coletadas botões florais em dois estádios de desenvolvimento fisiológico: botões - B (pré-antese) e flores - F (antese) dos sete clones. O material foi fixado em etanol:ácido acético (3:1), mantidos em temperatura ambiente por 24 horas, posteriormente transferido para álcool 70% e armazenado em geladeira até uso posterior.

A estimativa da viabilidade dos polens foi comparada com base na reação de coloração de dois corantes: solução de carmim acético 2% e lugol nos dois estádios de desenvolvimento fisiológico (botões e flores).

Foram preparadas cinco lâminas de cada genótipo para cada corante, sendo contados, pelo método de varredura, sob microscópio fotônico binocular com lente objetiva de 40x (BEL Photonics e Primo Star Zeiss) 300 grãos de pólen por lâmina, totalizando 1.500 grãos de pólen por genótipo avaliado. Com os dados obtidos em cada genótipo, calculou-se a porcentagem de polens viáveis pela equação:

$$\text{Viabilidade do pólen (\%)} = \text{N}^{\circ} \text{ de grãos corados} / \text{N}^{\circ} \text{ de grãos contados} * 100$$

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p=0,05$). As análises foram realizadas pelo programa estatístico SISVAR 4.6 (FERREIRA, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois corantes utilizados foram capazes de distinguir os pólenes viáveis dos inviáveis de *T. cacao*, conforme demonstrado na Figura 01. Constatou-se neste estudo que o corante lugol apresentou uma melhor distinção dos polens viáveis dos inviáveis, proporcionando dados mais acurados pela diferenciação de coloração.

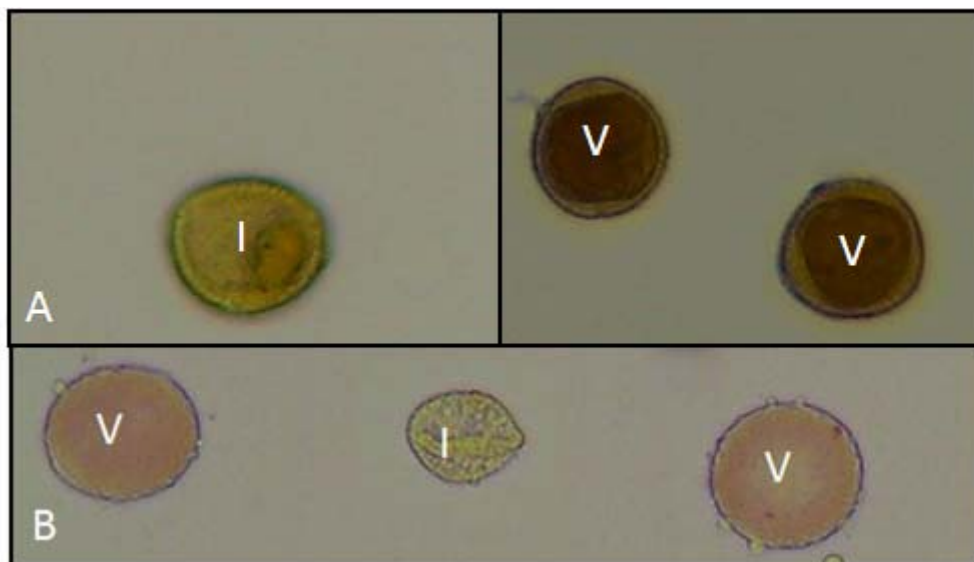


Figura 01. Polens viáveis e inviáveis de *T. cacao*. A) Corados com lugol B). Corados com carmim acético 2%; V=Viável e I= Inviável.

Os polens advindos dos botões florais não apresentaram diferenças estatísticas, quando comparados entre os genótipos e entre os corantes, apresentando uma média de viabilidade acima de 95% na estimativa com os dois



corantes (Tabela 02). Enquanto que nos polens provenientes das flores os dois corantes revelaram diferenças significativas entre os genótipos. A presença de diferenças significativas em diferentes genótipos dentro de uma mesma espécie são indicativos de que existe variabilidade genética entre os mesmos.

Porém, os polens das flores apresentaram uma viabilidade polínica acima de 70% para todos os genótipos, com uma média acima de 80% nos dois corantes (Tabela 02), podendo então a viabilidade dos polens ser considerada alta para os botões e para as flores, tanto com o carmim quanto com o lugol, pois segundo Souza et al. (2002) a viabilidade polínica é considerada alta para valores acima de 70%. Esses percentuais encontrados não causariam danos em trabalhos de melhoramento da espécie em estudo, uma vez que a viabilidade polínica é considerada uma medida de fertilidade masculina.

Tabela 02. Média da viabilidade do pólen de *Theobroma cacao* pela coloração de dois diferentes corantes em botões florais em pré-antese e flores em antese.

Genótipos	Carmim Acético 2%		Lugol	
	B	F	B	F
ICS1	93,33 Aa	76,73 BCDb	93,93 Aa	72,80 Bb
MA15	90,33 Aa	75,13 CDb	92,80 Aa	90,53 Aa
SIAL505	94,80 Aa	84,60 ABCDb	96,53 Aa	87,53 Aa
SCA06	98,20 Aa	87,07 BCDb	96,53 Aa	90,73 Aa
CAB0028	96,33 Aa	88,13 ABb	94,60 Aa	93,00 Aa
MO1	96,40 Aa	72,60 Db	95,80 Aa	89,27 Aa
PA121	97,27 Aa	92,93 Aa	96,27 Aa	82,13 ABb
Média	95,24	82,46	95,21	86,57

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se diferenças significativas para a viabilidade polínica em relação aos estádios de desenvolvimento da flor, para alguns genótipos (Tabela 02). A perda da viabilidade polínica em função do tempo após a abertura da flor foi também observada por Souza et al. (2002), em maracujá amarelo utilizando-se de análise histoquímica (solução de Alexander e lugol). Outros fatores, tais como umidade relativa, temperatura, pressão osmótica do conteúdo celular do pólen e resistência da parede polínica podem afetar a viabilidade polínica (VARA PRASAD, 1999).

A viabilidade dos polens dos botões não apresentou diferença estatística significativa quando comparada entre corantes, sendo que todos os genótipos apresentaram uma viabilidade acima de 90% (Figura 02).

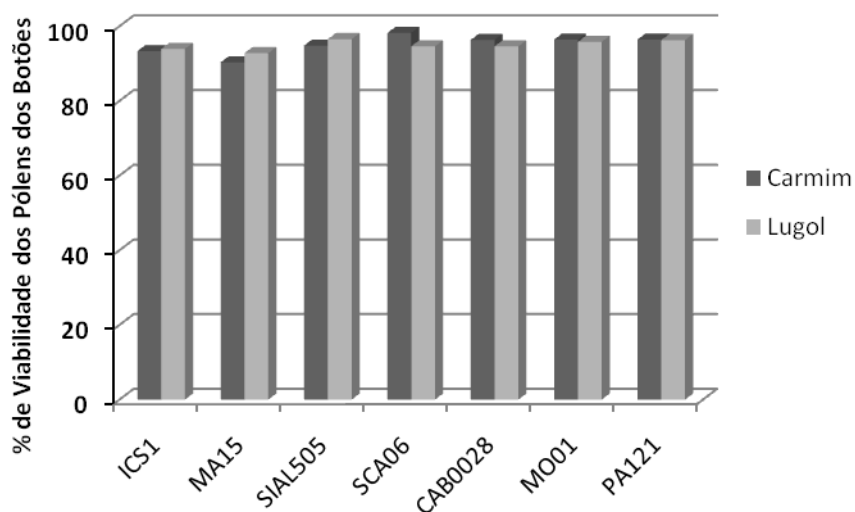


Figura 02. Representação gráfica da viabilidade dos polens dos botões dos sete genótipos de *T. cacao* estimada com os dois corantes: carmim e lugol.

Os grãos de polens das flores dos genótipos MA15, MO1 e o PA121 apresentaram diferenças estatísticas significativas quanto à viabilidade quando comparados entre os corantes (Figura 03).

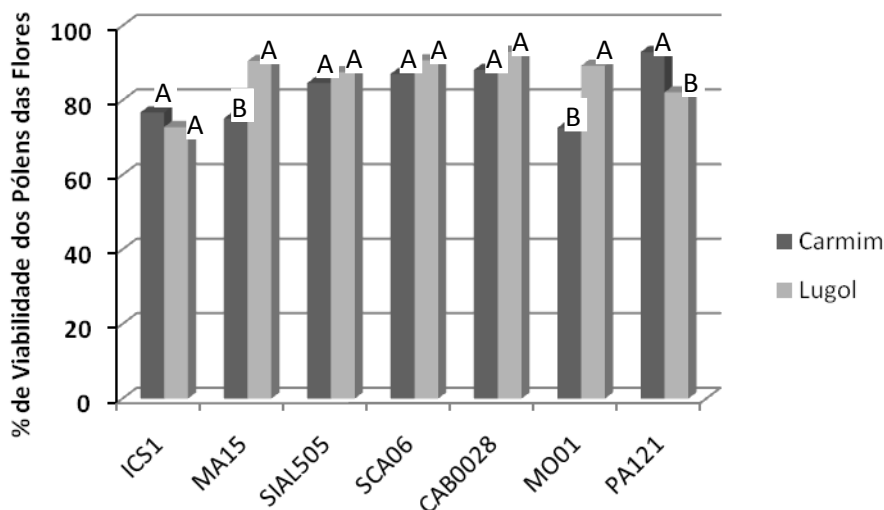


Figura 03. Representação gráfica da viabilidade dos polens das flores dos sete genótipos de *T. cacao* estimada com os dois corantes: carmim e lugol.

CONCLUSÕES

Os corantes carmim acético 2% e lugol foram capazes de distinguir com segurança os pólenes de *T. cacao* viáveis dos inviáveis. Os genótipos utilizados neste estudo apresentaram uma taxa de viabilidade polínica alta, independente do corante utilizado. Observou-se diferenças significativas para a viabilidade polínica em relação aos estádios de desenvolvimento da flor para alguns genótipos, sendo nestes o botão floral superior a flor.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAFNI, A. 1992. **Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series)**. New York, Oxford: University press. 250p.
- DOMINGUES, E. T.; TULMANN NETO, A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. (1999) Viabilidade do pólen em cultivares de laranja doce. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 56, n.2, p.265-272. Anais, Jaboticabal: UNESP, 1999.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar** 4.3. 2003. Disponível: <http://www.dex.ufla.br/danielff/sisvar>. Acesso em 13 de nov. de 2008.
- KOBAYASHI, R. S.; SANTOS, A. O. da S.; BASTOS, C.N.; SILVA, F. C. O. da e SCERNE, R. M. C. 2001. **Caracterização Morfológica de Frutos e Sementes de Clones de Cacaueiros (Theobroma cacao L.) Silvestres da Amazônia Brasileira. Belém, PA, Brasil**, CEPLAC/SUPOR. Boletim Técnico nº 19 p58.
- MARTINS, M.E.; PRERA, L.E.H.; KAGEYANA, P. Y. 1981. Manejo de pólen de *Pinus* para fins de melhoramento genético. **Circular Técnica n. 18**, IPEF, Piracicaba.
- PAGLIARINI, M.S.; POZZOBON, M. T.(2004) II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF.
- RIGAMOTO, R. R.; TYAGI, A. P. (2002) Pollen Fertility Status in Coastal Plant Species of Rotuma Island. S pac. *J.Nat.Sci.*20:30-33.
- SANTOS, S. F. **Estrutura Histoquímica de Sementes do Gênero *Theobroma* L. (Sterculiaceae)**. Trabalho de Conclusão de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Ciências Agrárias. UFSC. p. 8-10. 2003.
- SOUZA, M. M. de; PEREIRA, T.N.S; MARTINS, E.R.(2002) Microsporogênese e micrigametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degemer). **Ciê. Agrotec.**, Lavras. v.26, n.6,p.1209-1217.
- TECHIO, V. H.; DAVIDE, I. C; PEDROZO, C. A.; PEREIRA, A.V. 2006 Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho) **Acta Sci. Biol. Sci.**, v.28, n. 1, p. 7-12.
- VARA PRASAD, P. V., Craufurd PQ e Summerfield RJ (1999) Fruit number in relation to pollen production and viability in Groundnut exposed to short episodes of heat stress. **Annals of Botany** 84: 381-386.