

COMPARAÇÃO DOS CORANTES CARMIM ACÉTICO E AZUL DE TRIPAN ® NA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE POLÍNICA

EDUARDA NACHTIGALL DOS SANTOS¹; REJANE PETER²; LUCAS SCHNEIDER LOPES²; BEATRIZ HELENA GOMES ROCHA²; VERA LUCIA BOBROWSKI³

¹*Universidade Federal de Pelotas –duda.nachtigal@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – anne.sovage@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – luks-s-l@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – biahgr@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas-IB- DEZG– vera.bobrowski@gmail.com - orientadora*

1. INTRODUÇÃO

Análise de viabilidade polínica constitui um importante parâmetro na caracterização de fluxo gênico e em programas de melhoramento genético de plantas, especialmente quando se utilizam técnicas de polinização artificial para hibridação de espécies (MUNHOZ et al., 2008). O conhecimento das características florais no germoplasma disponível, tais como a viabilidade e a capacidade germinativa do pólen, é de grande importância para a seleção dos progenitores a serem utilizados nas hibridações (CHAGAS et al., 2010; SILVA et al., 2017).

Segundo EINHARDT (2006), podem-se agrupar em quatro tipos os métodos para testar a viabilidade do pólen: (1) por meio de corantes, (2) germinação in vitro, (3) germinação in vivo e (4) porcentagem de frutificação efetiva, obtida com a utilização do pólen em teste. Porém, considera-se que o método do corante superestima a porcentagem de germinação do pólen, enquanto o teste in vitro a subestima (RODRIGUEZ-RIANO; DAFNI, 2000).

Uma grande variedade de corantes tem sido usada para testar a viabilidade do pólen, mas poucos estudos testaram o risco potencial destes corantes em corar pólen morto e produzir falso positivo.

Neste contexto utilizamos pólen de mamona (*Ricinus communis* L.) como modelo biológico, pela fácil deiscência do pólen, para avaliarmos o uso de diferentes corantes na determinação da viabilidade polínica.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Vegetal (LabGen), do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética (DEZG) do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Para realização dos ensaios foram utilizadas 15 inflorescências de mamona (*Ricinus communis* L.) coletadas no bairro Fragata em Pelotas (RS) nas coordenadas S 31°45,469' W052°21,606' e S 31°45,815' W052°22,624', no mês de julho de 2017, quando ocorreu a floração, no estádio de antese. Após, foram transportadas para o laboratório e colocadas individualmente em recipiente coberto com papel laminado com o caule em contato com água. Conforme as anteras liberavam os grãos de pólen, esses eram coletados com um pincel de cerdas macias e acondicionados.

Os grãos de pólen deiscentes frescos foram coletados diariamente e separados em dois eppendorfs, dos quais um era analisado imediatamente e o

outro submetido a tratamento de calor para ocasionar a morte das células, empregando-se estufa de secagem a 60°C, por 72h.

Para análise da viabilidade, o pólen era colocado sobre uma lâmina de microscopia com auxílio de um pincel, colocada uma gota de corante e então macerado com bastão de vidro. Após a maceração, era colocada uma lamínula sobre a lâmina e visualizada sob microscopia óptica com aumento de 100X no microscópio Olympus CX40. Para cada corante foram confeccionadas quatro lâminas, e em cada uma eram contados 250 grãos, num total de 1000.

Os corantes utilizados para este trabalho foram o carmim acético 2% e o azul de tripan ®. A variação foi analisada pelo método ANOVA e a comparação de médias efetuada através do teste de Tukey a 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparando a viabilidade do pólen de mamona através do método colorimétrico, podemos observar que não houve diferença significativa entre o pólen fresco (97%) e o pólen morto (97%) pelo calor a 60°C, quando utilizado o corante carmim acético a 2%, diferentemente do corante azul de tripan que identificou 76% de viabilidade no pólen fresco e 9% no pólen morto (Fig.1).

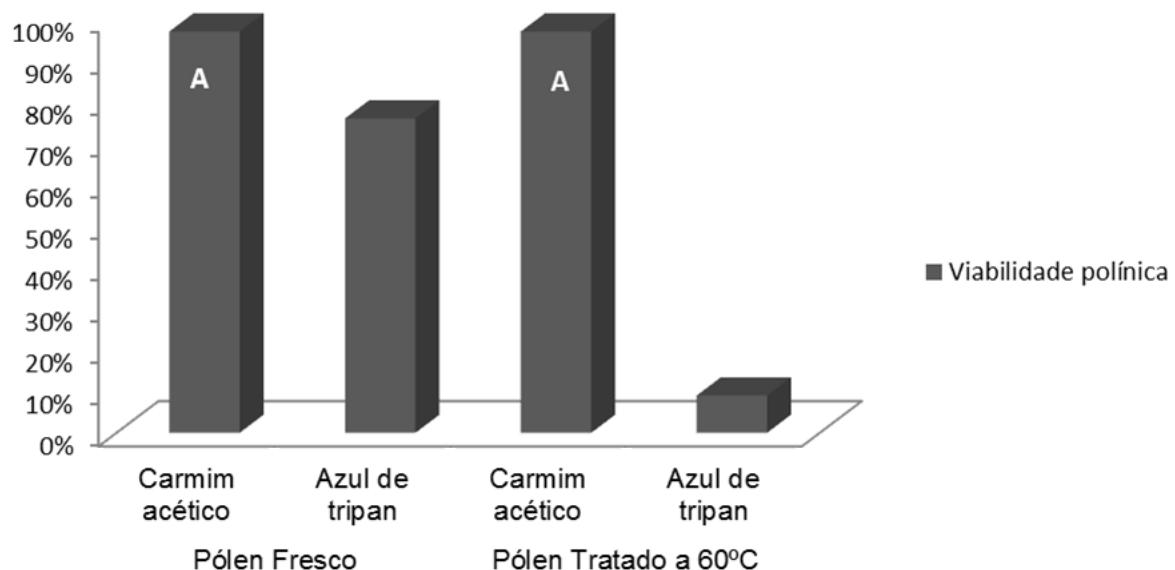


Figura 1. Comparação do percentual de viabilidade polínica de pólen de mamona submetido aos tratamentos com os corantes carmim acético e azul de tripan.

Os resultados observados neste trabalho, sobre o corante carmim acético 2% superestimar a viabilidade dos grãos de pólen, estão de acordo com os relatos de EINHARDT (2006) em macieira. O estudo da viabilidade polínica constitui-se em um dos fatores de grande importância no melhoramento de plantas, pois reflete a potencialidade do gameta masculino na eficiência da fecundação e posterior fertilização (BIONDO; BATTISTIN, 2001).

De acordo com MUNHOZ et al., (2008), corantes como o carmim acético refletem a integridade de estruturas celulares, como núcleo, cromossomos e membrana plasmática. Para análise com este corante os grãos de pólen foram classificados em normais/viáveis, com citoplasma corado e anormais/inviáveis, aqueles com pouco ou nenhum citoplasma evidenciado (Fig. 2A).

A coloração com azul de tripan baseia-se no fato de que o corante não pode passar para o interior das células que apresentam membrana plasmática intacta. Portanto, os grãos viáveis não são corados. Contudo, quando a membrana plasmática é danificada, o corante penetra por ligação a proteínas presentes no citoplasma celular, resultando na coloração dos grãos não viáveis com intensa cor azul-violeta (Fig. 2B). Essa coloração geralmente tem sido utilizada em estudos de viabilidade de células cultivadas *in vitro*, sendo recentemente aplicada em estudos de viabilidade de pólen (REJON et al., 2010)

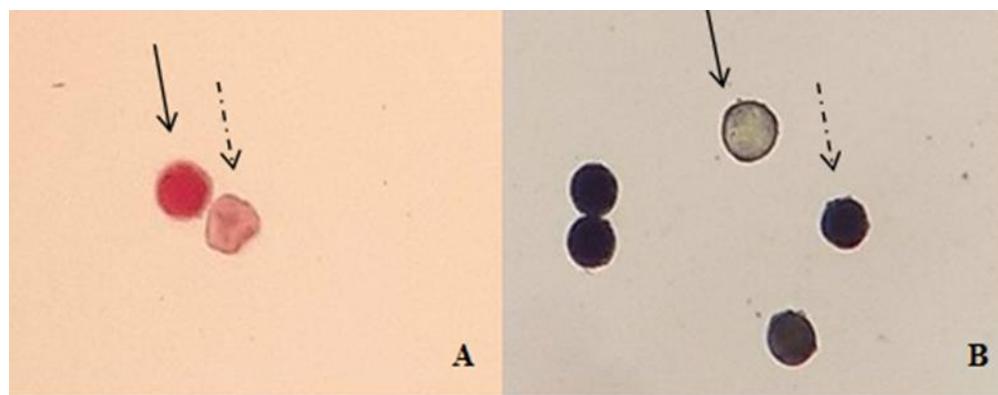


Figura 2. Análise da viabilidade polínica através do método colorimétrico. A - Corante carmim acético (pólen viável indicado pela seta contínua e o inviável pela seta descontínua). B - Corante azul de tripan (pólen viável sendo indicado pela seta contínua e o inviável pela seta descontínua).

4. CONCLUSÕES

O corante carmim acético não permitiu a adequada diferenciação entre pólen vivo e pólen morto, diferentemente do corante azul de tripan que apresentou poucos falsos positivos. Portanto, consideramos que este trabalho deva ter continuidade com a utilização de outros corantes que permitam uma eficiente distinção entre pólen viável e inviável.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIONDO, E.; BATTISTIN, A. Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) G.Don e *Rhynchosia* Lour (Leguminosae – Faboideae), nativas na Região Sul do Brasil. **Bioikos**, Campinas, SP, v.15, n.1, p.39-44, 2001.

CHAGAS, E. A. et al. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, Santa Maria - RS, v.40, n.2, p.231-266, 2010.

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

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P. da, MEISSNER FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo – SP, v.31, n.2, p.209-214, 2008.

REJÓN, J. D.; SUÁREZ, C. G.; ALCHÉ, J. D.; CASTRO, A. J.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. Evaluación de diferentes métodos para estimar La calidad Del pólen en distintos cultivares de olivo (*Olea europaea*L.). **Polen**, Salamanca, v.20, p.61-72, 2010.

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A. New procedure to asses pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, v.12, p.241-244, 2000.

SILVA, D. F. da; PIO, R.; NOGUEIRA, P. V.; SILVA, P. A. O.; FIGUEIREDO, A. L. Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza - CE, v.48, n.2, p.365-373, 2017.