



VIABILIDADE POLÍNICA E RECEPTIVIDADE ESTIGMÁTICA EM VARIEDADES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

Auana Vicente Tiago¹; Vinicius Delgado da Rocha²; Poliana Vicente Tiago¹; Joameson dos Santos Lima³; Ana Aparecida Bandini Rossi⁴

¹Mestrandas do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos - PPGBioAgro, UNEMAT, *Campus* de Alta Floresta MT, e-mail: auana_bio@hotmail.com

²Graduando do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Mato Grosso - UNEMAT. *Campus* de Alta Floresta, MT.

³Graduando do curso de Engenharia Florestal da Universidade do Estado do Mato Grosso - UNEMAT. *Campus* de Alta Floresta, MT.

⁴Doutora em Genética e Melhoramento. Laboratório de Genética vegetal e Biologia Molecular. Professora da faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, PPGBioAgro, PMGP e PPG- Bionorte. UNEMAT, *Campus* de Alta Floresta, MT, Brasil.

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

O presente estudo objetivou estimar a viabilidade polínica por meio de testes colorimétricos e avaliar a receptividade estigmática em genótipos de *Manihot esculenta* Crantz. Foram utilizados grãos de pólen de três variedades de mandioca: IAC-56-170, IAC-14 e IAC-CAAPORA e três corantes: Reativo de Alexander, Carmim Acético e Lugol. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$) com o auxílio do programa estatístico SISVAR 5.0. A receptividade do estigma foi avaliada utilizando-se H₂O₂ a 3% em 90 flores em três estádios de desenvolvimento: pré-antese, antese e 24 horas pós-antese. Os Corantes foram eficientes em diferenciar os pólenes viáveis dos inviáveis. A variedade IAC-56-170 apresentou a menor média de viabilidade polínica no teste com Reativo de Alexander diferindo-se estatisticamente dos demais corantes. Nas variedades IAC-14 e IAC-CAAPORA não foi observado diferença significativa entre corantes e variedades, porém o Lugol apresentou as maiores médias de pólenes viáveis. As três variedades avaliadas, IAC-56-170, IAC-14 e IAC-CAAPORA, apresentaram maior receptividade estigmática no estádio de pré-antese em relação ao estádio de antese e pós-antese. Os resultados demonstraram alta viabilidade polínica (> 77%) e receptividade do estigma (> 75%) para ambas as variedades, independente do corante e do estádio floral.

PALAVRAS-CHAVE: Hibridizações Controladas; Melhoramento Vegetal; Testes Colorimétricos.

POLLEN VIABILITY AND STIGMA RECEPTIVITY IN VARIETIES OF CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz)

ABSTRACT

This study aimed estimate the pollen viability by colorimetric tests and evaluate the stigma receptivity of *Manihot esculenta* Crantz genotypes. Were used the pollen

grains of three varieties of cassava: IAC-56-170, IAC-14 e IAC-CAAPORA and three dyes. Alexander Reactive, acetic carmin and lugol. Data were subjected to analysis of variance and averages were compared by Tukey test ($p \leq 0.05$) with the help SISVAR 5.0 statistical program. The stigma receptivity was evaluated using H_2O_2 3% in 90 flowers in three developmental stages: pre-anthesis, anthesis and post-anthesis 24 hours. The dyes were effective in differentiating the viable pollen and unviable. The IAC 56-170 variety showed the lowest average pollen viability in the test with Alexander Reactive so different statistically from the other dyes. IAC-14 and IAC-Caapora were not observed significant differences between dyes and varieties, but the Lugol showed the highest average of viable pollen. The three varieties evaluated, 56-170 IAC, IAC-14 and IAC-Caapora showed higher stigmatic receptivity at stage of pre-anthesis relative to anthesis and post-anthesis. The results demonstrated high pollen viability ($> 77\%$) and stigma receptivity ($> 75\%$) for both, varieties, regardless of the dye and floral stage.

KEYWORDS: Controlled hybridizations; Plant Breeding; Colorimetric tests.

INTRODUÇÃO

Manihot esculenta Crantz é um arbusto conhecido popularmente como mandioca, pertence à classe das Dicotiledôneas, família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot* que é composto por aproximadamente 98 espécies, sendo a *Manihot esculenta* a única do gênero cultivada para comercialização, tendo em vista a produção de raízes comestíveis ricas em amido (EMBRAPA, 2011).

Tanto as raízes como a parte aérea pode ser aproveitada para o consumo humano ou animal, e utilizados para a produção de farinha ou composição de diversos outros produtos e subprodutos, desta forma a utilização da mandioca tem contribuído com os países em desenvolvimento, onde as deficiências calóricas e a subnutrição são generalizadas (SILVA et al., 2011).

A mandioca é cultivada em todos os estados brasileiros, considerada uma cultura que apresenta fácil adaptação, ocorrendo em regiões de clima quente (SEAB, 2013). É classificada em espécies doces e amargas de acordo com o teor de ácido cianídrico (HCN) contido em suas raízes. As doces são também conhecidas como aipim, macaxeira ou mandioca mansa e são comumente utilizadas para consumo fresco humano. As amargas, destinadas principalmente para a indústria, são conhecidas como mandioca brava (FUKUDA et al., 2006).

No Brasil existe grande diversidade genética da espécie, que está disponível em muitas variedades cultivadas por agricultores e conservadas em banco de germoplasma, permitindo o conhecimento da variabilidade genética da espécie e sua utilização em programas de melhoramento (MEZETTE, 2013).

Essa cultura vem sendo propagada vegetativamente pela atuação humana, entretanto, ainda mantém sua reprodução sexuada, promovendo a variabilidade genética da espécie (SILVA et al., 2001). Segundo NOLASCO, (2011) a mandioca é uma planta monóica, com flores masculinas e femininas presentes na mesma inflorescência. Suas flores são protogínicas (flores femininas abrem antes das flores masculinas) e geralmente exibem maior número de flores masculinas e menor número flores femininas e são polinizadas por insetos, principalmente abelhas e vespas.

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 (MARTINS, 2010). 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).

A avaliação da viabilidade do grão de pólen é um fator elementar para que ele venha a ter oportunidade de germinar no estigma da flor, sendo um estágio decisivo para fertilização (DAFINI, 1992). Desta forma essa avaliação pode ser realizada com base em parâmetros citológicos, como a reação a corantes. Os métodos colorimétricos utilizam corantes químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes nos grãos de pólen maduro, como por exemplo, o lugol e o carmim acético (PAGLIARINI & POZZOBON, 2004).

Além de estudos de viabilidade polínica, avaliar a receptividade do estigma é fundamental para auxiliar o melhoramento genético da espécie e o desenvolvimento de hibridizações controladas (OLIVEIRA et al., 2012). Segundo SILVA et al. (2010) a receptividade do estigma é resultado da maturação do gameta feminino e pode influenciar na taxa de fecundação e no sucesso da polinização. De acordo com OLIVEIRA, (2012) a receptividade do estigma pode ser um fator decisivo no desenvolvimento de hibridizações controladas, garantindo dessa maneira maior probabilidade de produção de sementes em um cruzamento.

Neste contexto, o presente estudo objetivou estimar a viabilidade polínica por meio de testes colorimétricos e avaliar a receptividade estigmática em genótipos de *Manihot esculenta* Crantz.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de grãos de pólen de três variedades de *Manihot esculenta*, obtidas no campo experimental da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, Campus Universitário de Alta Floresta, MT. As variedades avaliadas foram: IAC-56-170, IAC-14 e IAC-CAAPORA.

Foram coletados 20 botões florais em pré-antese de cada variedade, no período da manhã. Em seguida foram fixados no fixador de Carnoy (três partes de álcool absoluto e uma parte de ácido acético glacial), mantidos em temperatura ambiente por 24 horas e posteriormente transferido para álcool 70% e armazenado em geladeira até uso posterior.

A viabilidade polínica foi estimada utilizando três corantes: Reativo de Alexander (ALEXANDER, 1980) que indica a viabilidade dos grãos de pólen pela coloração do protoplasma inteiro de púrpura e a parede celular corada de verde; Carmim Acético 2% indicando a viabilidade do pólen pela coloração vermelha (KEARNS e INOUYE, 1993) e o Lugol 1%, que indica a viabilidade pela coloração marrom (DAFINI, 1992).

Foram confeccionadas oito lâminas para cada genótipo com cada corante, sendo contabilizados 250 grãos de pólen por lâmina, pelo método de varredura, utilizando um microscópio binocular com lente objetiva de 10x (Bel Frotonics e Primo Star Zeiss), totalizando 2.000 grãos de pólen por variedade, com cada corante utilizado. Com os dados obtidos, calculou-se a porcentagem de pólen viáveis obtidos pela equação: Viabilidade do pólen (%) = N° de grãos corados / N° de grãos contados * 100.

Para comparar as médias entre os genótipos dentro de cada corante e analisar diferenças estatísticas entre os corantes, os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey considerando

nível de significância de 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$). As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2011).

Para avaliar a receptividade estigmática foram utilizadas 90 flores femininas (Caapora, IAC-14 e IAC 56-170). As flores foram coletadas em três estádios florais: pré-antese; antese; e 24 horas após antese. Foram utilizadas 10 flores para cada estágio floral, totalizando 30 flores por variedade. Estigmas danificados ou com pólen na superfície não foram utilizados, evitando-se resultado falso positivo.

A receptividade do estigma foi avaliada com solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% proposto por ZEISLER (1938). O estigma de cada flor foi submerso em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3%) por 10 segundos com o auxílio de uma pinça e visualizados com o auxílio de uma lupa de mão (10 x). A receptividade foi estimada de acordo com a formação de bolhas na superfície estigmática, sendo classificada em: 0; 25; 50; 75 e 100% de intensidade da atividade da reação de peroxidase.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três corantes utilizados no estudo, Reativo de Alexander, Carmim Acético e Lugol, foram eficientes na distinção entre pólenes viáveis e inviáveis nas variedades de *M. esculenta* conforme demonstrado na figura 01.

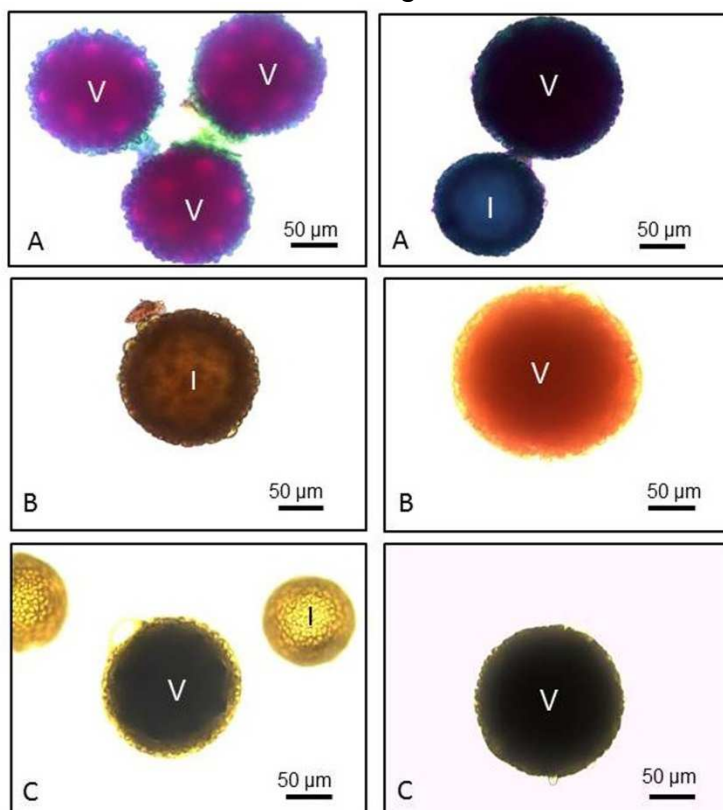


FIGURA 1- Grãos de pólen de *M. esculenta*, corados com diferentes corantes. A) Pólenes corados com reativo de Alexander; B) Pólenes corados com Carmim Acético; C) Pólenes corados com Lugol. V- Viáveis e I- Inviáveis.

Fonte: Lima, 2014.

De acordo com PAGLIARINI & POZZOBON, (2004) as técnicas colorimétricas utilizam corantes específicos que reagem com componentes celulares presentes no grão de pólen maduro. Como por exemplo, a coloração com lugol baseia-se em uma reação química que acontece entre o iodo e a molécula de amido, dando aos grãos de pólen viáveis uma coloração marrom e aos inviáveis, devido à ausência de amido, uma coloração amarela-clara, é indicado para espécies cujo material de reserva do grão de pólen é o amido (PAGLIARINI & POZZOBON, 2004). De acordo com os resultados obtidos neste estudo com o lugol, pode-se inferir que os grãos de pólen de mandioca possuem amido como reserva.

Os resultados médios da viabilidade polínica por genótipo para o teste com os três corantes: reativo de Alexander, carmim acético e lugol, encontram-se descritos na Tabela 1.

O percentual médio de viabilidade polínica entre as três variedades de mandioca não diferiram estatisticamente quando avaliados com os corantes carmim acético e lugol, porém houve diferença estatística quando os genótipos foram avaliados com o reativo de Alexander, sendo que o genótipo IAC-56-170 apresentou a menor média de pólen viáveis (77,55%) diferindo-se estatisticamente dos demais.

Quando as comparações foram realizadas entre os corantes, apenas o genótipo IAC-56-170 apresentou diferença estatística significativa, porém todos os corantes revelaram uma alta viabilidade polínica em todos os genótipos, pois a média da viabilidade dos grãos de pólen variou de 77,55% a 98,47% (Tabela 1).

De acordo com SILVA et al. (2001) a produção de grãos de pólen é uma característica muito variável entre as cultivares de *M. esculenta*, esse fato pode explicar a menor média apresentada pela variedade IAC- 56-170, em relação às outras cultivares.

Segundo SOUZA et al. (2002), é considerado como alta viabilidade do pólen valores acima de 70%; como média, valores de 31 a 69% e valores até 30% como baixa viabilidade. Dessa forma os resultados obtidos com as técnicas colorimétricas para as três variedades de mandioca avaliadas neste estudo se mostraram eficientes, obtendo alta viabilidade.

TABELA 1- Percentuais médios da viabilidade de grãos de pólen utilizando o corante Reativo de Alexander, carmim acético e lugol para os três genótipos de mandioca analisados.

Corantes	Variedades		
	IAC-56-170	IAC-14	IAC- CAAPORA
Reativo de Alexander	77,55 bB	93,70 aA	97,35 aA
Carmim acético	90,75 aA	96,40 aA	96,00 aA
Lugol	92,95 aA	97,60 aA	98,47 aA

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

Quando as análises foram realizadas em nível de espécie, sem considerar os genótipos separados, os resultados revelaram diferença estatística entre os percentuais médios de viabilidade polínica entre os corantes (Figura 2).

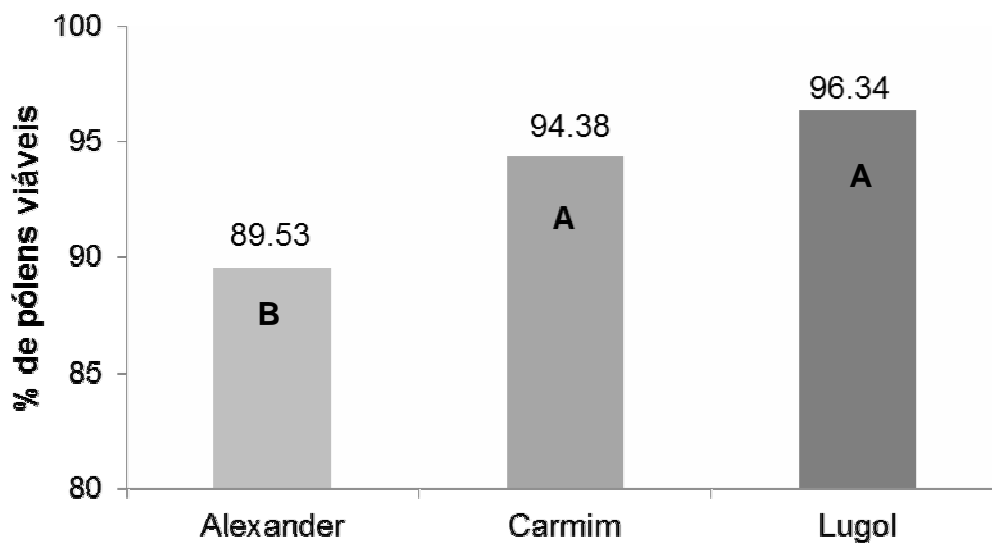


FIGURA 2- Percentual médio de pólenes viáveis para a espécie *M. esculenta* com os corantes Alexander, Carmim e Lugol.

O corante lugol revelou a maior média de pólenes viáveis (96,34%), porém não diferiu estatisticamente do percentual médio de viabilidade revelado pelo corante carmim acético (94,38%). O corante reativo de Alexander revelou a menor média de pólen viável para a espécie *M. esculenta* (89,53%), diferindo-se estatisticamente dos outros dois corantes utilizados (Figura 2).

A viabilidade polínica é importante para o melhoramento genético de plantas, pois quanto mais alta esta for, maior será o índice de fertilização da espécie (SOUZA et al., 2002). Os três genótipos avaliados neste estudo apresentaram altos percentuais médios de viabilidade dos grãos de pólen, acima de 77%, revelando que o gameta masculino possui uma alta capacidade de fertilização. Os três estádios florais de cada variedade de mandioca utilizados para a avaliação da receptividade estigmática, estão representadas na figura 3.

Em todos os estádios florais avaliados, nas três variedades de *M. esculenta*, os estigmas apresentaram-se receptivos (Figuras 4, 5 e 6). Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os resultados de OLIVEIRA et al. (2012) que verificaram receptividade nos três estádios florais (pré-antese, antese e 24 horas após a antese) de *Manihot esculenta* spp. *Flabelifolia*.

A variedade IAC 56-170 apresentou um percentual médio de 80% de receptividade na pré-antese; 75% nos estádios de antese e pós-antese (Figura 4). Na variedade IAC-14 o percentual médio de receptividade para o estádio de pré-antese foi de 82,5%, de 77,5% para antese e pós-antese (Figura 5). Em relação às flores da variedade Caapora, constatou-se um percentual médio de 90% para pré-antese, 77,5% para antese e 75% para pós-antese (Figura 6).

As flores exibiram maior média de receptividade na pré-antese independente da variedade, sugerindo que esse estágio floral é o mais indicado para a realização de experimentos de cruzamentos artificiais. O conhecimento do estágio floral de maior receptividade nas distintas variedades é importante para o sucesso nos cruzamentos envolvendo essas variedades. De acordo com MOURA, (2012) a receptividade em flores antes da antese é um dado importante, pois permitem aos

melhoristas fazerem cruzamentos controlados, nesta fase quando as flores ainda não foram polinizadas, possibilitando assim um maior controle da hibridação.

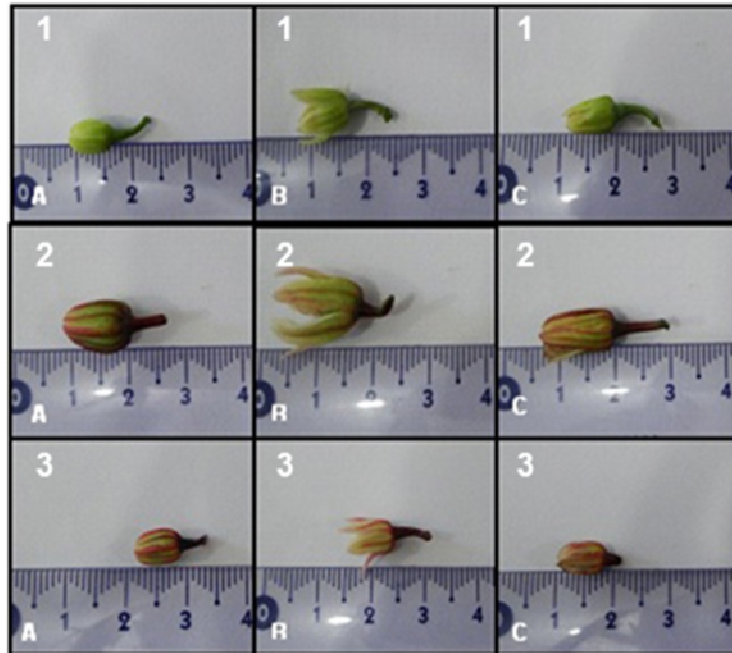


FIGURA 3- Estágios florais das variedades de *Manihot esculenta*: 1- variedade IAC-56-170; 2- variedade IAC-14; 3- variedade Caapora. A – pré-antese; B – antese; e C –24 horas após antese.

Fonte: Rocha, 2014.

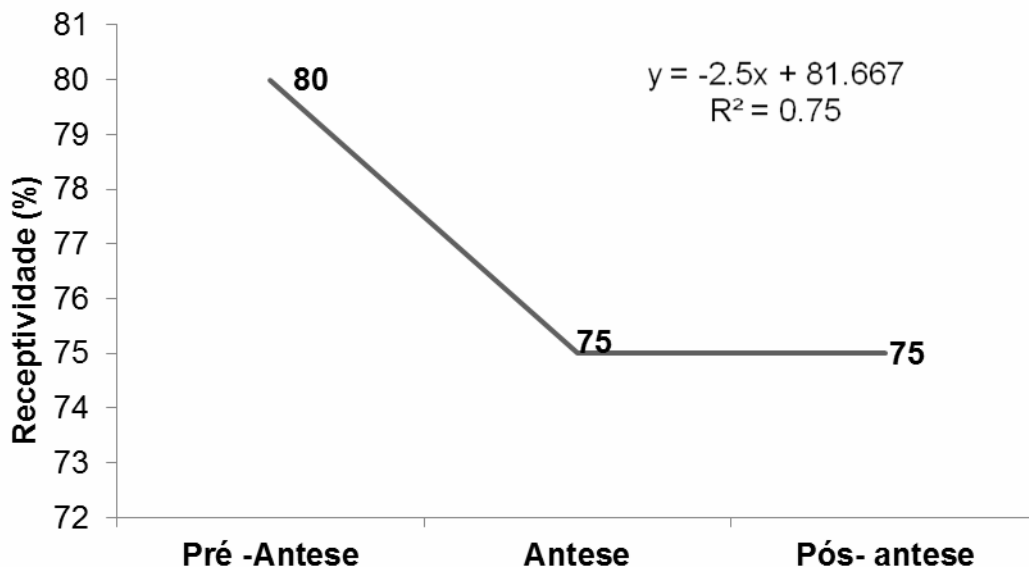


FIGURA 4- Resultado da Regressão dos valores médios percentuais da receptividade estigmática da variedade IAC 56-170 de *M. esculenta*, nos três estádios avaliados: pré-antese; antese e pós-antese.

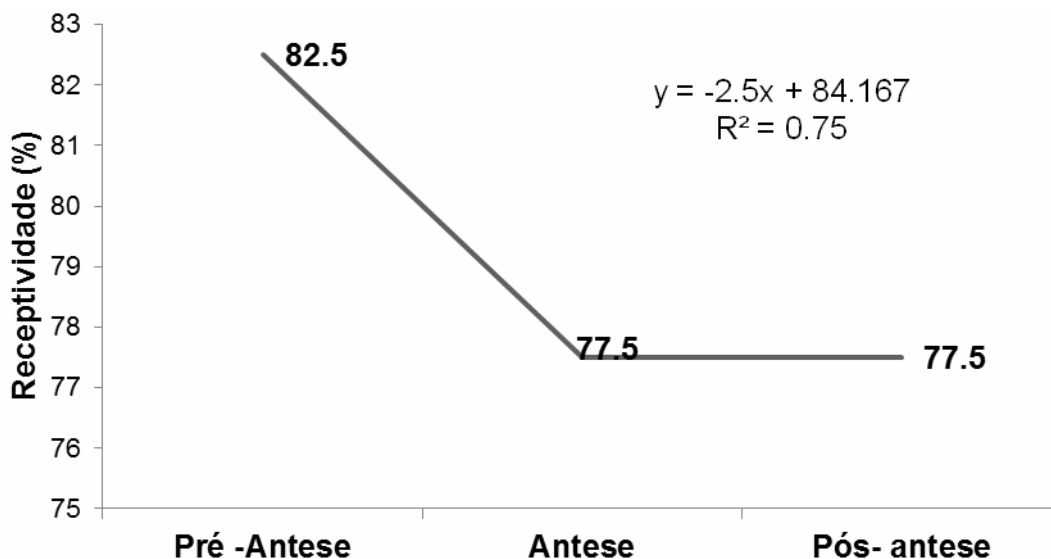


FIGURA 5- Resultado da Regressão dos valores médios percentuais da receptividade estigmática da variedade IAC-14 de *M. esculenta*, nos três estádios avaliados: pré-antese; antese e pós-antese.

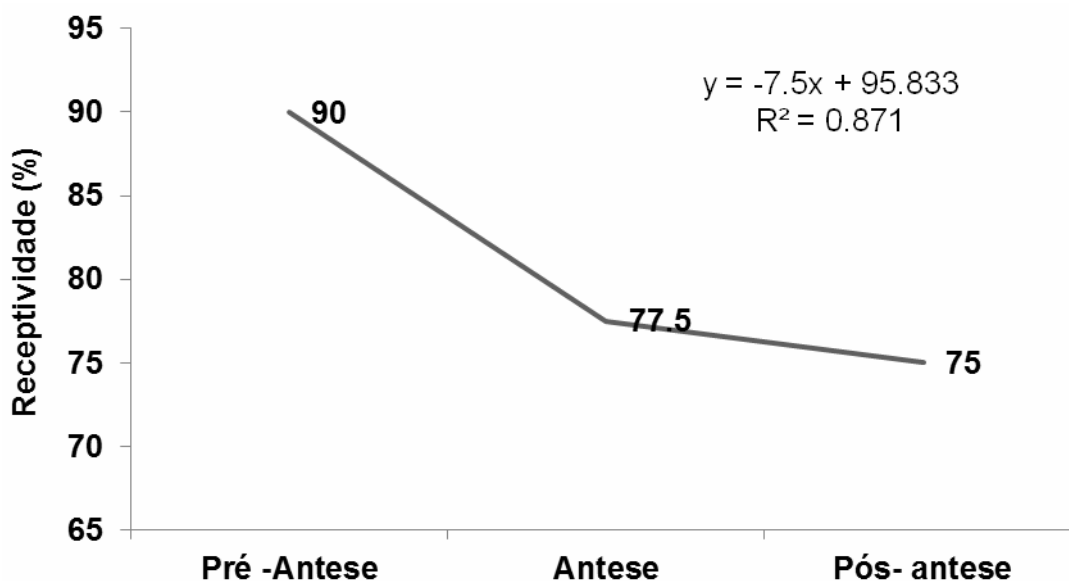


Figura 6- Resultado da Regressão dos valores médios percentuais da receptividade estigmática da variedade Caapora de *M. esculenta*, nos três estádios avaliados: pré-antese; antese e pós-antese.

As análises de receptividade estigmática são essenciais, uma vez que, a fecundação só terá êxito quando o pólen desenvolver seu tubo sob a superfície estigmática receptiva, assim como afirma SILVA et al. (2010).

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram alta viabilidade polínica (> 77%) e receptividade do estigma (> 75%) para ambas as variedades, independente do corante e do estádio floral, porém o corante Lugol apresentou as maiores médias em relação aos outros corantes para todas as variedades. A maior média de receptividade estigmática para as três variedades (IAC-56-170, IAC-14 e IAC-CAAPORA) foi observada no estádio de pré-antese.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M.P. A. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **StainTechnology**, v. 5, n. 1, p. 13-18, 1980.

DAFINI, A. **Pollination ecology**: a practical approach (the practical approach series). New York, Oxford: University press, 1992. 250p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Mandioca no cerrado**. p.204, 2011. Disponível em: <www.fbb.org.br/data/files/.../manual_mandioca_no_cerrado.pdf>Acessado em: 30 de ago. 2014.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FUKUDA, W.M.G.; FUKUDA, C.; DIAS, M.C.; XAVIER, J.J.B.N.; FIALHO, J.F. Variedades. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, p. 433-454.

KEARNS, C.A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 1993.

MARTINS, K. C. PALINOLOGIA DE *Capsicum* spp. **Caracterização, divergência genética e viabilidade polínica**. 2010. 124. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF, CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ, 2010.

MEZETTE, T. F. **Diversidade agrônômica, bioquímica e molecular de acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) coletados em diferentes regiões do Brasil**. 2013. 113p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

MOURA, H.C.P. **Caracterização da fenologia reprodutiva e da viabilidade gamética associada ao tamanho do botão floral em genótipos elite de mamoeiro (*Caricapapaya* L.)**. 2012. 70p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2012.

NOLASCO, C. A. **Caracterização citogenética e morfológica de híbridos de mandioca (*Manihotesculenta*)**. 2011. 46p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2011.

OLIVEIRA, T. da S; VIEIRA, L de J; PASSOS, R. R; SANTANA, J. R.F. de; MARTINS, M.L.L; LEDO, C.A. da S; ALVES, A.A.C; SOUZA, F.V.D. avaliação da receptividade de estigmas de *Manihotesculentaspp. Flabellifolia*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2012, Belém, PA. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. Meiose em vegetais: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: II Curso de citogenética aplicada a recursos vegetais, 2, 2004, Brasília. **Anais...** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília: EMBRAPA, 2004. 86p.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Mandiocultura – Análise da Conjuntura Agropecuária**. 2013.

SILVA, K. V. P. da.; ALVES, A. A. da. C.; MARTINS, M. I. G.; MELO, C. A. F. de.; CARVALHO, R. de. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.9, p.1082-1088, 2011.

SILVA, L. A. C DA; PAGLIARINI, M. S; SANTOS, S.A; VALLE, C. B DO. (2010) Receptividade dos Estigmas de Acessos da grama-do-cerrado (*MesosetumchaseaeLuces*), Pantanal. 5º Simpósio sobre recursos naturais e socioeconômicos do pantanal. Corumbá, MS. Disponível em: < <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/869600/1/038R.pdf>.> Acesso em: 27 de set. 2014.

SILVA, M.J.; ROEL, A. R.; MENEZES, G. P. **Apontamento dos cursos de cultivo da mandioca e derivados e engorda de frango caipira**. Campo Grande – MS, 2001. 100 p.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis*Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras v.26, n.6, p.1209-1217, 2002.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEDROZO, C. A.; PEREIRA, A. V. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Acta Sci. Biol. Sci**, v. 28, n. 1, p. 7-12, 2006.

ZEISLER, M. Über die abgrenzung der igtentlichen narbenfläche mit hilf von reaktionen. **Beih. Bot Zentralbl**, v. 58, p. 308-318, 1938.