

## VIABILIDADE DE PÓLEN DE SUB-ESPÉCIES DE *Manihot esculenta*

Thamyres Cardoso da Silveira<sup>1</sup>, Livia de Jesus Vieira<sup>2</sup>, Fernanda Vidigal Duarte Souza<sup>3</sup>; Carlos Alberto da Silva Ledo<sup>3</sup> e Alfredo Augusto Alves Cunha<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Estudante de graduação do Curso de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, BA, Brasil. [tessilveira@gmail.com](mailto:tessilveira@gmail.com).

<sup>2</sup> Estudante de Doutorado em Biotecnologia - Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, BA Brasil. [liviabiol@gmail.com](mailto:liviabiol@gmail.com)

<sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas, BA, Brasil. Email: [fernanda@cnpmf.embrapa.br](mailto:fernanda@cnpmf.embrapa.br); [ledo@cnpmf.embrapa.br](mailto:ledo@cnpmf.embrapa.br); [alfredoalves3@gmail.com](mailto:alfredoalves3@gmail.com)

### Introdução

A mandioca pertence à classe das Dicotiledôneas, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot*. Três subespécies da mandioca são conhecidas, *Manihot esculenta* Crantz ssp. *esculenta*, *Manihot esculenta* Crantz ssp. *flabellifolia* (Pohl) e *Manihot esculenta* Crantz ssp. *peruviana* (Mueller Argoviensis) (ALLEM, 2001), sendo que a primeira é a única cultivada comercialmente para a produção de raízes comestíveis ou para indústria (FUKUDA, 2002).

Ao longo do tempo, a mandioca vem sendo propagada vegetativamente mantendo, entretanto, sua capacidade de reprodução sexuada ativa, o que mantém e amplifica a variabilidade genética (SILVA, 2001). As subespécies silvestres de *Manihot esculenta* são fonte de diversidade genética e podem ser utilizadas em programas de melhoramento com a finalidade de incorporar alelos de interesse em variedades de mandioca cultivada. Apesar disso, pouco se conhece a respeito das estruturas reprodutivas dessas subespécies, demandando estudos sobre a capacidade germinativa do pólen, assim como os métodos para aferir esta viabilidade.

A viabilidade dos grãos de pólen pode ser estimada por vários métodos colorimétricos, utilizando-se diversos corantes, como solução de lugol, método de reação fluorocromática (Fluorochromatic Reaction - FCR), solução tripla de Alexander e corantes vitais, como o carmim acético, carmim propiônico, sudan IV, 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Aliadas a esses métodos podem ser realizadas ainda a germinação *in vivo* e *in vitro*, como ferramentas para teste de viabilidade (MARCELLÁN e

CAMADRO, 1996, GEETHA et al., 2004; CHIAI et al., 2009). Entretanto, em mandioca, os resultados obtidos a partir da avaliação de distintos meios de cultivo para a germinação do pólen não se mostraram promissores, demandando novos esforços nesse sentido (ORREGO & HERSLEY, 1984; MBAHE & HAHN, 1994).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de grãos de pólen de subespécies de *Manihot esculenta* por testes *in vivo* e colorimétrico

### **Material e métodos**

Foram realizados cruzamentos segundo a metodologia utilizada por Mendes (1982) para os testes de viabilidade do pólen *in vivo*, envolvendo duas variedades de mandioca *Manihot esculenta* Crantz ssp. *esculenta* (BGM 940 e BGM 728) e um genótipo da subespécie *Manihot esculenta* Crantz ssp. *flabellifolia* (FLA 005-01) mantidas na coleção de trabalho da Embrapa Mandioca e Fruticultura. A escolha dos acessos foi realizada de acordo com a capacidade de produção de flores. Para a realização dos cruzamentos, flores pistiladas e estaminadas foram cobertas com sacos de pano de 20 x 15 cm de comprimento, a fim de protegê-las da contaminação por pólen exógeno no momento da abertura floral. Foram eliminados frutos, flores estaminadas e flores pistiladas já fecundadas presentes na mesma inflorescência com o auxílio de uma tesoura. O pólen foi colhido entre 11:00 da manhã e 14:00 horas, horário já designado como ideal para a realização de cruzamentos (VIEIRA, 2010).

A polinização foi alcançada a partir do contato das anteras sobre o estigma da flor pistilada. A flor foi coberta após a polinização e logo em seguida foi realizada a identificação dos tratamentos com o uso de etiquetas contendo informações sobre o nome dos parentais, o número de flores polinizadas e a data da polinização. A viabilidade do pólen foi estimada após a contagem do número frutos que originaram sementes e a média de sementes por fruto.

No teste colorimétrico, foram utilizados grãos de pólen do acesso de mandioca BGM 940 e um genótipo da subespécie *M. flabellifolia* (FLA 005-01). Os grãos foram aspergidos com o auxílio de um pincel sobre lâminas de vidro adicionando em seguida cinco gotas de três corantes distintos: lugol 1%, carmim acético 3% e oceína acética 1%. Após cinco minutos, as lâminas foram levadas ao microscópio óptico para avaliação. Foi utilizado o método de varredura para se obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados, sendo contabilizados 100 grãos de pólen/lâmina/genótipo com três repetições cada, perfazendo um total de 300 grãos de pólen para cada corante investigado com auxílio de um microscópio óptico *Leica* usando-se uma lente objetiva de 10x.

A porcentagem de pólen viável foi estimada pelo número de grãos corados, de tamanho grande ou médio e formato regular e os dados de viabilidade foram expressos em porcentagem.

## Resultados e discussões

Na Tabela 1 são apresentados os resultados dos testes colorimétricos. A maior porcentagem de pólen viável foi observada nos grãos de *M. flabellifolia* em todos os corantes avaliados, porém foi observado uma alta porcentagem de pólen viável na subespécie *M. esculenta*. Segundo Scorza e Sherman (1995), um bom pólen deve apresentar 50 a 80% de pólen viável. Os grãos de pólen avaliados neste trabalho apresentaram uma viabilidade ainda superior a esta porcentagem.

**Tabela 1.** Viabilidade (%) dos grãos de pólen de *Manihot* mediante o uso de três corantes distintos.

Tratamento	Carmim acético	Lugol	Oceína acética
<i>M. flabellifolia</i>	96	96	97
<i>M. esculenta</i>	90	94	94

Na Tabela 2 são apresentados os resultados dos cruzamentos entre variedades da subespécie *Manihot esculenta* Crantz ssp. *esculenta*, e entre as subespécies *Manihot esculenta* Crantz ssp. *esculenta* e *Manihot esculenta* Crantz ssp. *flabellifolia*. O maior número de sementes foi observado no cruzamento envolvendo acessos da mesma subespécie como progenitor feminino e masculino, os BGMs 940 e 728 respectivamente. Esta hibridação mostrou maior número de frutos e sementes obtidos, com uma produção média de duas sementes por fruto.

**Tabela 2.** Viabilidade *in vivo* de pólen fresco observada entre variedades da subespécie *M. esculenta* e entre as subespécies *M. esculenta* e *M. flabellifolia*.

Progenitor feminino	Progenitor masculino	Nº de flores cruzadas	Nº de Frutos formados	Frutos com sementes (%)
BGM 940	FLA 005-01	15	9	60
BGM 940	BGM 728	15	12	80

No cruzamento entre as duas subespécies distintas, a porcentagem de frutos formados foi inferior, demonstrando que a interação entre os genótipos progenitores influenciaram na produção de frutos e sementes.

Não houve a ocorrência de frutos sem sementes em nenhum dos acessos avaliados. A média de sementes formadas por fruto em ambos os cruzamentos foi igual a duas sementes por fruto.

### **Conclusão**

Considerando os testes colorimétricos, os valores obtidos foram muito superiores aos que foram observados com a fertilização *in vivo*, evidenciando a maior fragilidade destes métodos para aferição de viabilidade polínica.

### **Agradecimento**

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica

### **Referências**

- ALLEM, A.C., 2001. The primary gene pool of cassava (*Manihot esculenta* Crantz subspecies *esculenta*, Euphorbiaceae). **Euphytica** 120, 127–132.
- CHIAI, G. S. et al. Germinação *in vitro* de pólen de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. **Ciencia Rural**. Santa Maria, v. 39, n. 5, 2009.
- FUKUDA, W.M.G.; SILVA, S.O. **Melhoramento de Mandioca no Brasil**. In: Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americano, 2ª ed., SP. v. 2, p. 242-57, 2002.
- GEETHA, K.; VIJAYABASKARAN, S.; JAYARAMAN, N. *In vitro* studies on pollen germination and pollen tube growth in maize. **Food, Agriculture, Environment**. v. 2, p. 205-207, 2004.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado. 579p. 1993.
- MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**. Amsterdam, v. 67, p.101-104. 1996.

MBAHE, R. E., AKEN'OVA, M. E. AND HAHN, S. K. Germination of cassava(*Manihot esculenta* Crantz) pollen. **Acta Horticulturae**. p. 172-177. 1994.

MENDES, R. A. 1982. Melhoramento genético da mandioca no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical. p.142-145. In: Anais do Congresso Brasileiro de Mandioca, 2., SBM, Vitória.

ORREGO, J. I.; HERSHEY, C. H. Almacenamiento del polen de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) por medio de liofilizacion y varios regimenes de humedad y temperatura. **Acta Agronomica**, v. 34, p. 21-24, 1984.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: John; Sons, p. 325-440, 1995.

SHIVANNA, K. R.; SAWHNEY, V. K. Pollen biotechnology for crop production and improvement. SHIVANNA, K. R.; CRESTI, M.; CIAMPOLINI, F. (ed), Pollen development and pollen-pistil interaction. Cambridge. p. 15-39. 1997.

SILVA, R.M. BANDEL, G. FARALDO, M.I.F. & MARTINS, P.S. 2001. Biologia reprodutiva de etnovariedades de mandioca. **Scientia Agricola**, 58(1): 101-107.

VIEIRA, L.J. Uso de recursos genéticos do gênero *Manihot* no pré-melhoramento genético de mandioca. 2008. 61f. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2010.