

TESTES CITOQUÍMICOS PARA AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE POLÍNICA EM VINCA (*CATHARANTHUS ROSEUS* [L.] G. DON)

Noel Barbosa da Silva¹

Cláudio Lúcio Fernandes Amaral¹

Resumo

Este estudo objetivou avaliar a eficácia de corante ácidos e básicos na determinação da viabilidade polínica em *Catharanthus roseus*. Foram utilizados grãos de pólen de flores coletadas de cinquenta indivíduos escolhidos com base no aspecto fitossanitário e quatro corantes: Carmim Acético, *Fast Green*, Eosina e Vermelho Congo, sendo os dois primeiros corantes básicos e os dois últimos corantes ácidos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo que 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 *PAST*. Os Corantes apresentaram bons percentuais de viabilidade polínica e foram eficientes em diferenciar os pólenes viáveis dos inviáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Planta medicinal, melhoramento e pólen.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Catharanthus roseus*, também conhecida como boa-noite, vinca, ou maria -sem-vergonha, é uma planta herbácea, nativa de Madagascar, com ampla dispersão em áreas tropicais e subtropicais do planeta; inclusive no Brasil. Além de ser cultivada como ornamental em parques, jardins e bosques (MOURA; AGRA, 1989), é bastante empregada na medicina popular para tratar diabetes, pressão arterial elevada e câncer. Nesta importante espécie, já foram obtidos cerca de 70 alcalóides (MARINHO, 2001), sendo vimblastina e vincristina utilizados no tratamento oncológico (MELO, ALVARENGA, 2009; BARRALES-CUREÑO, 2015)

Tendo em vista o grande potencial terapêutico que a referida espécie possui, torna-se necessário à realização de pesquisas que visem conhecer sua biologia reprodutiva, em especial, a viabilidade polínica, sobretudo, na avaliação e seleção de genótipos em programas de melhoramento vegetal (POZZOBON et al., 2018). Pesquisas sobre viabilidade polínica visam estimar o potencial de reprodução masculina das espécies destinadas à indústria farmacêutica, permitindo caracterizar recursos genéticos com vistas a trabalhos de melhoramento genético baseados em hibridação (KUHN, 2015).

As vantagens do emprego de testes citoquímicos para estimar a viabilidade polínica são rapidez e baixo custo que estes proporcionam, sendo utilizados em diversas pesquisas nos últimos anos (MACEDO et al, 2016, NACHBAR; SOUZA, 2018). Portanto, foi objetivo deste trabalho, estimar a viabilidade polínica de *C. roseus* utilizando diferentes corantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Experimental (LABGENEX) do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

¹ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Departamento de Ciências Biológicas- DCB/Laboratório de Genética Experimental, Grupo de Pesquisa PLANTGEN (UESB - CNPq). (nbsilvauesb@gmail.com)

(UESB), Campus Jequié - BA, Brasil. Foram utilizadas 50 plantas, previamente, selecionadas com base em seus aspectos fitossanitários na área institucional (Lat. 13° 51'27"S, Long. 40°05'01"W, altitude 216m).

De cada indivíduo, foi coletada uma única flor no período de antese. Esta foi colocada em recipiente devidamente identificado, totalizando 50 frascos. Estes foram levados para o laboratório, onde foram retiradas as anteras, com a ajuda de uma agulha, as quais foram, posteriormente, fixadas em solução de álcool a 70%.

Para a preparação das lâminas, foi utilizada a técnica de esmagamento das anteras para liberação dos grãos de pólen. Uma gota de solução homogeneizada contendo os grãos de pólen foi depositada em cada lâmina, tendo-se repetido o mesmo procedimento para a aplicação do corante. Para o teste de viabilidade, foram utilizados os seguintes corantes: Carmim Acético a 1%, *Fast Green* 2%, Eosina 0,1%, Vermelho Congo 1%.

Para estabelecer os critérios utilizados para classificar os grãos de pólen em viáveis e inviáveis foi observado a tonalidade apresentada, tendo em vista a reação específica de cada corante. Os grãos de pólen corados foram considerados viáveis e, os não corados ou com morfologia anômala, inviáveis.

Para que houvesse a coloração, foi aguardado um tempo de 10 minutos de modo a permitir a penetração dos corantes, bem como que eles pudessem agir sobre as estruturas polínicas, corando-as, sendo logo em sequência analisadas.

Foram confeccionadas um total de doze lâminas, três para cada um dos quatro corantes estudados, avaliando-se os grãos de pólen pelo método de varredura em microscópio óptico, em objetiva de 40x. A viabilidade polínica foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade do pólen (\%)} = \frac{\text{Nº de grãos de pólen corados}}{\text{Nº de grãos pólen total}} \times 100$$

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade pelo Programa Estatístico BioEstat 5.3 (AYRES, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias de grãos de pólen viáveis em *C. roseus*, demonstram viabilidade superior a 70% para todos os corantes utilizados (TABELA 1). De acordo com Brito *et al* (2010), porcentagem acima deste valor é considerada alta, desta forma esta espécie possui elevada viabilidade polínica, sendo que esta informação é desejada pelos melhoristas em seus programas de melhoramento genético, via hibridação (BRITO *et al*, 2010).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, pode-se observar que não houve diferença entre os corantes carmim acético e o verde rápido bem como entre os corantes eosina e vermelho congo. Testes com os corantes carmim acético e verde rápido são utilizados para evidenciar material de natureza ácida, como histonas e cromossomos, por tanto são corantes básicos. Estes indicaram as maiores taxas de viabilidade polínica, sendo que o

primeiro corante resultou em coloração vermelho escuro (FIGURA1-A1), o segundo, verde-escuro (FIGURA1-B1), para os grãos de pólen viáveis.

Tabela- 1 Média de viabilidade polínica de *C. roseus* por corantes.

Corantes	Viabilidade (%)
Carmim Acético	94,33a
Verde Rápido	96,33a
Eosina	90,33a
Vermelho Congo	91,33a
CV (%)	3,71%

F= 2.9043 p= 0.1011

Os corantes eosina e vermelho congo, são bons indicadores de viabilidade polínica, uma vez que os mesmos apresentaram estimativas que não diferiram estatisticamente da estimativa apontada pelos demais corantes. No entanto, o vermelho congo foi utilizado por Nascimento et al. (2014), tendo evidenciado o menor percentual de grãos de pólen viáveis, o que pode ser justificado pelo fato deste corante não oferecer contraste nítido entre os viáveis e inviáveis (FIGURA1-D), podendo gerar erros na análise.

O corante eosina é muito utilizado em estudos histológicos com animais, corando o citoplasma e os espaços intercelulares de rosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Por outro lado, ele apresentou estimativa confiável para determinação da viabilidade polínica, ao ser comparado com os outros corantes, o quais são bastante empregados estudos citológicos em plantas.

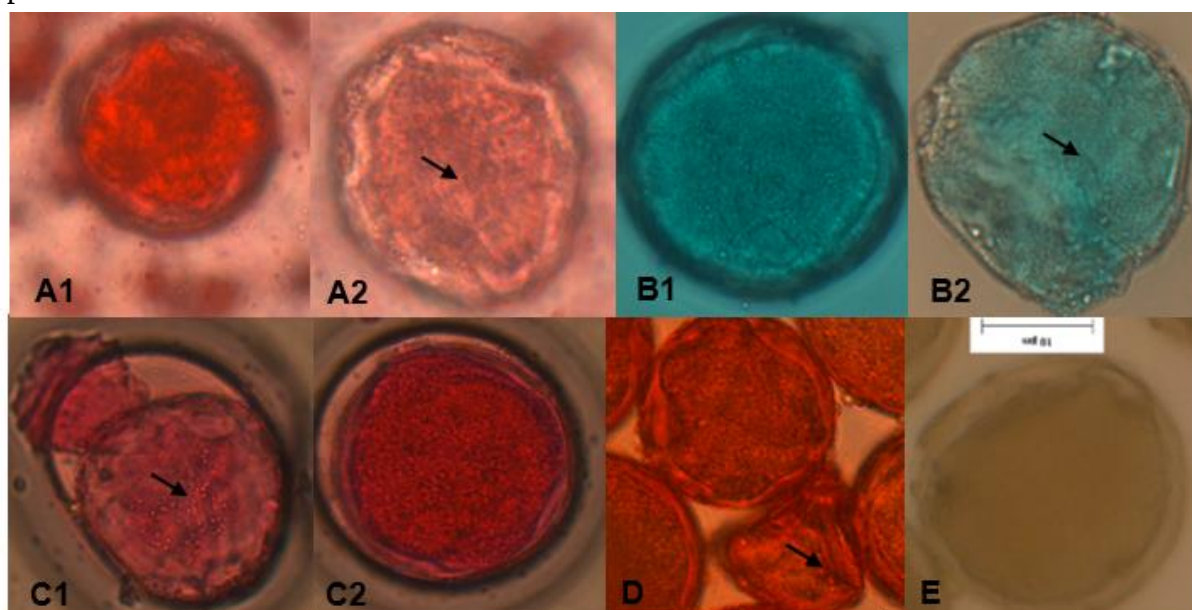


Figura 1. Fotomicrografias de grãos de pólen de *C. roseus*. A. Carmim Acético; B. Fast Green; C. Eosina; D. Vermelho Congo; E. Grão de pólen sem coloração. (A seta indica grãos de pólen inviáveis).

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram alta viabilidade polínica (>70%) para todos os corantes. A maioria dos corantes demonstrou fácil distinção entre os grãos viáveis e inviáveis, portanto foram eficientes para a avaliação da viabilidade polínica em *C. roseus*.

No entanto, o corante vermelho congo, embora tenha apresentado alta viabilidade, não é recomendado, pois o mesmo apresenta pouca distinção entre grãos de pólen viáveis e não viáveis.

REFERÊNCIAS

- AYRES, M.; AYRES Jr, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **Bioestat 5.0** aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: IDSM, 2007.364p.
- BARRALES-CUREÑO, H. J. Pharmacological applications and in vitro biotechnological production of anticancer alkaloids of *Catharanthus roseus*. **Biotechnol Apl**, vol.32, n°.1, La Habana, 2015.
- BRITO, A.C.; SOUZA, J.D.; REBOUÇAS, T.N.H.; AMARAL, C.L.F. Propriedades do pólen e do estigma de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) para aumentar a eficiência de cruzamentos em programas de melhoramento. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.12, n.2, p.208-214, 2010.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9ª. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1999.
- MACEDO, W.A.; SANTOS, B. N. V., MELLO, V. S., DAMASIO, J. F., SANTOS, L. C. B., LEITE, D. M., KARSBURG, I. V. Uso de testes colorimétricos na estimativa da viabilidade polínica de alpínia. **Ciência& Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal**, v. 8, n.1, 2016. Núm. especial 2.
- MELO, A. A. M.; ALVARENGA, A.A. Sombreamento de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don ‘Pacifica White’ por malhas coloridas: desenvolvimento vegetativo. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 514-520, 2009.
- MOURA, M. D., AGRA, M.F. Apocynaceae tóxicas e medicinais ocorrentes nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil. **Acta boto bras.** 3(2): 1989 supL.
- MARINHO, S. R. M. **Função dos Alcalóides Indólicos Monoterpenóides de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don**. 2001.Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- NACHBAR, L.A.; SOUZA, S. A. M. Estimativa da viabilidade polínica e polinização controlada de variedades tradicionais de *Cucurbita moschata* Duchesne. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.15 n.27; 2018.
- POZZOBON, M. T.; SANTOS, S.; MELO, L. A. M. P.; CARVALHO, S. I. C.; RIBEIRO, C. S.C. Análise da viabilidade polínica na avaliação e seleção de genótipos de *Capsicum* spp.

para o melhoramento genético. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2018. 18 p.

KUHN, A. W. **Viabilidade polínica, genotoxicidade, efeito antiproliferativo e compostos fenólicos de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. (Lamiaceae)**, 2015, 58p., Dissertação (Mestrado em Agrobiologia- Universidade Federal de Santa Maria), Santa Maria, RS, 2015.