



Teste de coloração de grãos de pólen de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) para verificação de sua viabilidade

Bruna Natália Veloso dos Santos^{1,*} , Weslaine de Almeida Macedo² , Jenifer Fernanda Damasio³ ,
Vanessa dos Santos de Mello² , Isane Vera Karsburg² 

¹Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

²Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT, Brasil.

³Escola Estadual Rui Barbosa, Nova Mutum, MT, Brasil.

*Autor correspondente: bruna_nataliavs@hotmail.com

Recebido: 13/11/2016; Aceito: 12/03/2018

Resumo: A espécie *Costus spiralis* possui potencial ornamental e propriedades fitoterapêuticas. O presente trabalho objetivou avaliar a viabilidade do pólen de *Costus spiralis*, fornecendo dados para subsidiar os estudos de melhoramento genético, e comparar diferentes testes colorimétricos usualmente utilizados para avaliação de viabilidade polínica. Para tal, foram utilizados botões florais, de onde foram retiradas as anteras, que permaneceram em solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) sob duas concentrações: 0,075 e 0,30% durante 12 e 24 horas. Diferentes corantes também foram submetidos à análise, com a retirada da antera, posterior maceração sobre a lâmina, com uma gota do corante a ser testado (fucsina 1%, verde malaquita 1%, lugol 2%, azul de astra 1%, carmim acético 2%, reativo de Alexander e orceína acética 2%). Foram avaliadas 5 lâminas por corante e contabilizados 300 grãos de pólen por lâmina pelo método de varredura. Verificou-se que os corantes orceína acética, TTC nas concentrações de 0,30 e 0,075%, lugol 2% e azul de astra 1% obtiveram as maiores médias, não apresentando diferença significativa entre os corantes verde malaquita e reativo de Alexander. O teste colorimétrico com TTC foi o mais eficiente na estimativa da viabilidade polínica, permitindo distinguir facilmente os grãos de pólen viáveis, com coloração avermelhada a tons de escuro, dos inviáveis, com tons mais claros a transparentes. Por meio dos diferentes corantes utilizados em *Costus spiralis*, observou-se que as médias não se diferenciaram para os corantes orceína acética, TCC 0,075 e 0,30% e lugol 2%, porém, de acordo com a eficiência de cada corante, indica-se a utilização do TTC para a estimativa da viabilidade polínica por estar relacionado com a respiração celular.

Palavras-chave: biologia reprodutiva; cana-do-brejo; zingiberales.

Staining test in pollen grains of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) for verifying its viability

Abstract: The species *Costus spiralis* has ornamental potential and phytotherapeutic properties. The objective of this work was evaluate the viability of the pollen of *Costus spiralis*, comparing different colorimetric tests and aiming to provide data to support genetic improvement studies. For this, we used flower buds of which the anthers were removed. They were stored in 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) solution in the concentrations: 0.075% for 24h and 0.30% for 12 h. Different dyes were subjected to analysis. After the anthers removal, they were macerated on the slide with a drop of dye to be tested (fuchsin 1%, malachite green 1%, lugol 2%, astra blue 1%, carmine acetic acid 2%, Alexander reactive and acetic orcein 2%). We evaluated five slides per dye, with three hundred pollen grains per slide. According to the data, it was observed that acetic orcein, TTC in the concentrations 0.30% and 0.075%, lugol 2%, astra blue 1% presented the highest averages, but they were not significantly different from malachite green and reactive Alexander. The colorimetric test with TTC showed to be the most efficient in estimating pollen viability, easily distinguishing the viable pollen grains which presented reddish color to dark tones while non-viable show light-to-transparent tones. By means of the different dyes used in *Costus spiralis*, it was observed that the averages were not different for acetic orcein, TCC 0.075% / 0.30% and lugol 2%, but according to the efficiency of each dye we indicated use TTC for the estimation of pollen viability, since it is related to cellular respiration

Keywords: reproductive biology; cana-do-brejo; zingiberales.

1. INTRODUÇÃO

As espécies de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe são herbáceas, pertencentes à família Costaceae, nativas da América do Sul, incluindo o Brasil, onde ocorrem em ambientes de floresta chuvosa, savanas e afloramentos graníticos (MAAS, 1972; SANTANA et al., 2011). A maioria das espécies do gênero *Costus* possui inflorescências terminais que produzem de uma a duas flores por dia, apresentando taxa de polinização baixa, indicando alto grau de especialização quanto aos seus polinizadores (MAAS, 1977; ARAÚJO & OLIVEIRA, 2007).

Poucos são os estudos relacionados à biologia floral desse gênero, visto que são espécies que exigem um trabalho árduo na análise de sua estrutura reprodutiva. Dados que evidenciam a viabilidade dos grãos de pólen ainda são escassos para essa família, porém são importantes porque evidenciam o potencial reprodutor masculino da espécie, contribuem com os estudos taxonômicos, ecológicos, palinológicos, destinados à aplicação na conservação genética e no planejamento de possíveis programas de melhoramento (AULER et al., 2006).

A viabilidade dos grãos de pólen está entre os fatores que afetam a produção de frutos e sementes, podendo comprometer programas bem-sucedidos de melhoramento de plantas que necessitam da formação de gametas viáveis e balanceados. Várias são as metodologias que permitem estimar direta ou indiretamente a qualidade dos grãos de pólen e, entre as colorações histoquímicas, os corantes reagem com componentes da estrutura química do grão de pólen, resultando em mudanças de cor que permitem distinções entre grãos viáveis e inviáveis (JESUS et al., 2018).

Entre os corantes utilizados para estimar a viabilidade polínica estão: orceína acética, lugol, azul de astra, verde malaquita, reativo de Alexander, fucsina básica, carmim acético, cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), sudão IV e rosa bengala. De acordo com a literatura, existem corantes que estão associados apenas à detecção de substâncias constituintes dos grãos de pólen ou à integridade da estrutura celular, como núcleo e membrana plasmática. Por outro lado, o TTC é um corante relacionado com a respiração celular, e quanto maior a atividade enzimática, mais intensa sua coloração (MUNHOZ et al., 2008).

O presente trabalho teve dois objetivos:

1. avaliar a viabilidade do pólen de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe, fornecendo dados para subsidiar os estudos de melhoramento genético;
2. comparar diferentes testes colorimétricos usualmente utilizados para avaliação de viabilidade polínica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os botões florais foram obtidos de uma população de *C. spiralis* em estágio de pré-antese, no município de Alta Floresta, Mato Grosso, sob as coordenadas S 09°52.590" W 056°05.868". As análises foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Campus de Alta Floresta.

Para a análise da viabilidade polínica utilizando TTC, os botões florais foram cortados transversalmente com o auxílio de um bisturi para a retirada das anteras, que foram maceradas levemente com um bastão de vidro para a liberação dos grãos de pólen e permaneceram na solução de TTC sob duas concentrações: 0,075% durante 12 e 24 horas e 0,30% durante 12 e 24 horas, em ambiente com temperatura controlada de 25°C. Para esse corante, a viabilidade foi determinada de modo qualitativo, sendo considerados viáveis os pólenes que apresentaram tonalidades mais escuras e inviáveis aqueles que apresentaram tonalidades mais claras ou ausência de coloração.

Buscando comparar o TTC com demais corantes também utilizados para se obter a viabilidade dos grãos de pólen, anteras foram maceradas sobre a lâmina com uma gota do corante a ser testado (fucsina 1%, verde malaquita 1%, lugol 2%, azul de astra 1%, carmim acético 2%, reativo de Alexander e orceína acética 2%). Para esses corantes, a capacidade de coloração dos grãos de pólen também foi determinada de modo qualitativo, sendo os viáveis com tonalidades mais escuras e os inviáveis aqueles de tons mais claros, de acordo com a característica e a constituição química de cada corante, presentes na literatura.

Foram avaliadas cinco lâminas por corante e contabilizados 300 grãos de pólen por lâmina pelo método de varredura, observados em microscópio óptico com aumento de 40x. As médias obtidas com os diferentes corantes foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade através do programa estatístico Sisvar 5.1® (FERREIRA, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados, verificou-se que os corantes orceína acética 2%, TTC na concentração de 0,30% e 0,075%, lugol 2% e azul de astra 1% obtiveram as maiores médias, não apresentando diferença significativa entre os corantes verde malaquita e reativo de Alexander (Tabela 1). Ruggiero et al., (1996) consideram um alto percentual de viabilidade acima de 70%, sem danos aos estudos de melhoramento genético. Portanto, todos os corantes utilizados no presente estudo se mostraram eficientes para estimar a viabilidade polínica de *C. spiralis*, indicando que a espécie possui viabilidade polínica alta.

Em todos os testes colorimétricos testados, obtivemos um alto índice de grãos de pólen corados. A orceína acética possui uma alta viabilidade polínica, apresentando seus grãos de pólen viáveis com protoplasma vermelho escuro e os inviáveis com tonalidades mais claras, em virtude da ausência de protoplasma (HISTER & TEDESCO, 2016). Já com a utilização do lugol 2%, os grãos de pólen se diferenciaram de maneira considerável, na qual os viáveis se apresentaram com uma coloração mais intensa e os inviáveis com uma cor mais transparente ou clara. O corante azul de astra 1% mostrou seus pólenes viáveis em tonalidade azul escuro e os inviáveis estavam ausentes de coloração (Figura 1).

Em estudos realizados com espécies do mesmo gênero por Santos et al., (2017) foram observados que *Costus arabicus* L. apresentou média de viabilidade polínica acima de 80% para os corantes fucsina ácida 0,5%, carmim acética 2%, orceína acética 2%, azul de astra 1%, verde malaquita 1% e lugol 2%, porém, nota-se uma menor discriminação entre grãos de pólen viáveis e inviáveis. Macedo et al. (2016), na análise da viabilidade polínica de *Alpinia zerumbet*, verificaram que o reativo de Alexander foi o que melhor diferenciou os grãos de pólen, pois conforme Alexander (1980), a solução permite diferenciar os grãos de pólen abortados dos não abortados, pois os abortados não possuem o núcleo e apenas a celulose contida na parede apresentará coloração.

O teste colorimétrico com TTC mostrou ser o mais eficiente na estimativa da viabilidade polínica, permitindo distinguir facilmente os grãos de pólen viáveis, com coloração avermelhada a tons de escuro, dos inviáveis, com tons mais claros a transparentes. Segundo França Neto et al. (1988) e Zonta et al. (2009), o corante reage com a atividade enzimática desidrogenase do ácido málico, envolvida na respiração celular dos tecidos vivos, assim, quanto maior a taxa de respiração celular, mais intensa será a coloração adquirida pelo pólen (Figura 2).

Tabela 1. Valores médios percentuais de viabilidade polínica de *Costus spiralis*, com os corantes orceína acética 2%, cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 0,30 e 0,075%, lugol 2%, azul de astra 1%, verde malaquita 1%, reativo de Alexander, fucsina 1% e carmim acético 2%.

Corantes	Viabilidade* (%)
Orceína acética	97,33 ^a
TTC 0,30%	97,20 ^a
TTC 0,075%	96,20 ^a
Lugol 2%	95,39 ^a
Azul de Astra 1%	95,33 ^a
Verde malaquita 1%	91,33 ^{ab}
Reativo de Alexander	91,00 ^{ab}
Fucsina 1%	86,80 ^b
Carmim acético 2%	85,26 ^b
CV (%)	3,48

TTC: cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio; *médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância; CV: coeficiente de variação.

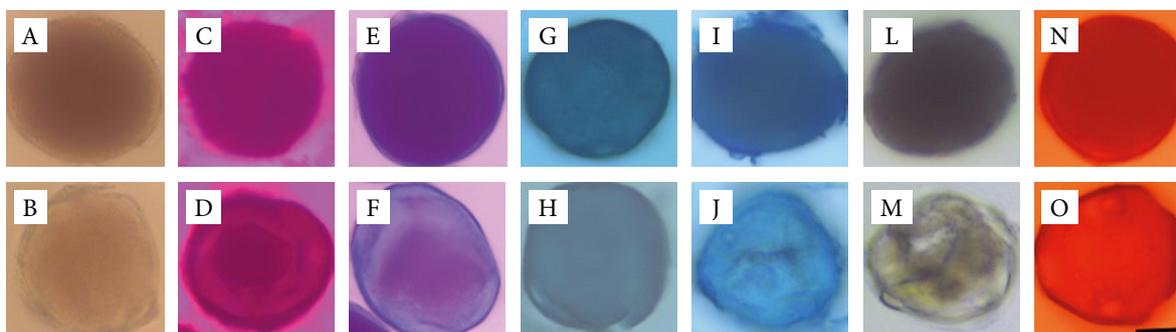


Figura 1. Grãos de pólen de *Costus spiralis* corados com diferentes corantes. Carmim acético 2% (A) viável, (B) inviável; fucsina 1% (C) viável, (D) inviável; reativo de Alexander (E) viável, (F) inviável; verde malaquita 1% (G) viável, (H) inviável; azul de astra 1% (I) viável, (J) inviável; lugol 2% (L) viável, (M) inviável; orceína acética 2% (N) viável, (O) inviável. Barra = 10 µm.

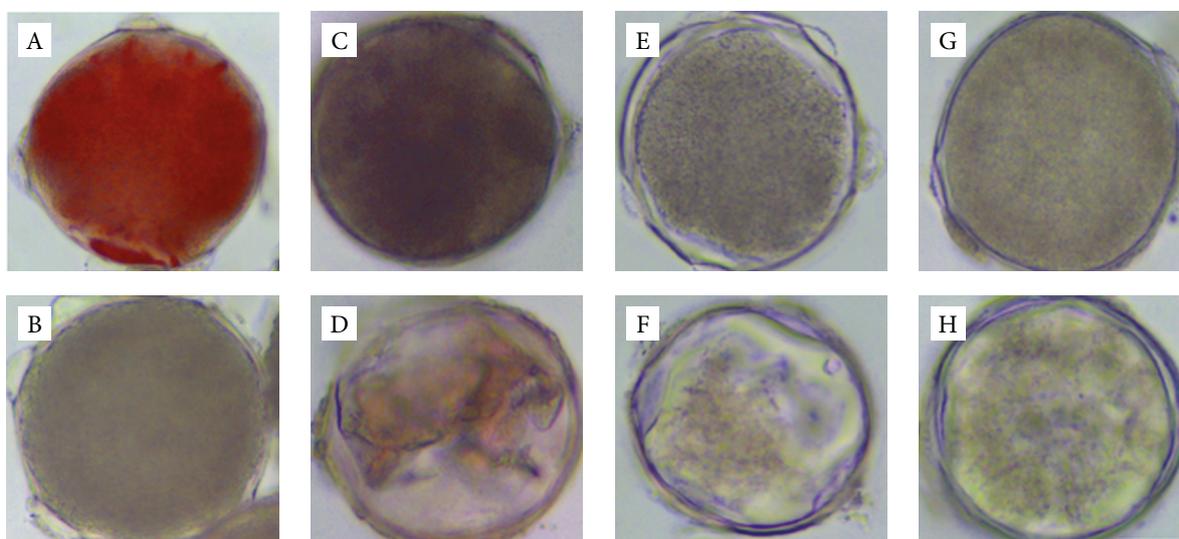


Figura 2. Grãos de pólen de *Costus spiralis* corados com tetrazólio. TTC 0,30% exposição de 12 horas (A) viável, (B) inviável; TTC 0,30% exposição de 24 horas (C) viável, (D) inviável. TTC 0,075% exposição de 12 horas (E) viável, (F) inviável; TTC 0,075% exposição 24 horas (G) viável, (H) inviável. Barra = 10 µm.

Vários são os autores que defendem que o teste do TTC é uma estimativa confiável, estando os resultados próximos da germinação *in vitro*. Além disso, é um método relativamente rápido e simples, permitindo resultados satisfatórios e morfológicamente distintos entre os grãos de pólen viáveis e inviáveis (JESUS et al., 2011; DAMASIO et al., 2016). No estudo de Santos et al., (2016), o corante TTC foi eficiente ao distinguir com segurança os pólenes de *Passiflora alata*, diferenciando os viáveis dos inviáveis, corroborando o presente estudo.

No estudo de Munhoz et al., (2008), ao avaliar a viabilidade polínica de *Carica papaya* L., foi observado que o teste com TTC foi o único método colorimétrico que forneceu resultados semelhantes à estimativa de viabilidade polínica dada pelos testes de germinação *in vitro*, mostrando ser uma ferramenta confiável para estimativa rápida de viabilidade polínica, corroborando o presente estudo, se sobressaindo em relação a alguns corantes testados.

4. CONCLUSÕES

Por meio dos diferentes corantes utilizados em *Costus spiralis*, observa-se que as médias de viabilidade não se diferenciaram para os corantes orceína acética, TTC 0,075 e 0,30% e lugol 2%, porém, de acordo com a eficiência de cada corante, indica-se a utilização do TTC para a estimativa da viabilidade polínica por estar relacionado com a respiração celular.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Gujarav, v.55, n.1, p.13-18, 1980. <https://doi.org/10.3109/10520298009067890>
- ARAÚJO, F.P.; OLIVEIRA, P.E. Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) e mecanismos para evitar a autopolinização. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.30, n.1, p.61-70, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042007000100007>
- AULER, N.M.F.; BATTISTIN, A.; REIS, M.S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.2, p.55-63, 2006.
- DAMASIO, J.E.; MELLO, V.S.; KARSBURG, I.V.; SANTOS, B.N.V.; MACEDO, W.A.; LEITE, D.M.; SANTOS, L.C.B. Uso do 2,3,5 Cloreto de Trifeniltetrazólio na Estimativa da Viabilidade Polínica de Algodão Bravo. In: CURSO DE INVERNO DE GENÉTICA, 7., 2016. Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, **Anais...** Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2016. p. 1-5.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

- FRANÇA NETO, J.B.; PEREIRA, L.A.G.; COSTA, N.P.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. **Metodologia do teste de tetrazólio em semente de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1988. 32 p.
- HISTER, C.; TEDESCO, S.B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum Sabine*) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.18, n.1, p.135-141, 2016. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_081
- JESUS, L.G.A.; SILVA, R.N.O.; GOMES, M.F.C.; VALENTE, S.E.S.; GOMES, R.L.F.; LOPES, A.C.A.; COSTA, M.F. Efficiency of colorimetric tests to determine pollen viability in peppers. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, Viçosa, v.8, n.2, p.77-82, 2018. <http://dx.doi.org/10.21206/rbas.v8i2.497>
- JESUS, O.N.; SOARES, T.L.; OLIVEIRA, E.D.; MARTINS, C.A.D.; SANTOS-SEREJO, J.N. Comportamento germinativo e viabilidade polínica de Passifloras oriundos de flores coletadas em diferentes estádios e horários. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 6., 2011, Búzios. **Anais...** Campos dos Goytacazes: SBMP, 2011. p. 1-4.
- MAAS, P.J.M. Costoideae (Zingiberaceae). New York: Hafner Publishing Company, 1972. 140 p. (Flora Neotropica Monographs, n. 8).
- MAAS, P.J.M. Renealmia (Zingiberaceae-Zingiberoideae) Costoideae (Additions)(Zingiberaceae). Nova York: Hafner Press, 1977. 218 p. (Flora Neotropica, n.18).
- MACEDO, A.W.; SANTOS, B.N.V.; MELLO, V.D.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, p.1-5, 2016.
- MUNHOZ, M.; LUZ, C.F.P.; MEISSNER FILHO, P.E.; BARTH, O.M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.31, n.2, p.209-214, 2008.
- RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A.; OLIVEIRA, J.C. de; DURIGAN, J.F.; BAUMGARTNER, J.G.; SILVA, J.R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M.E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V.P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: Embrapa, 1996. 64 p.
- SANTANA, E.A.; GUATIMOSIM, E.; FUGA, C.A.G.; GLIENKE, C.; BARRETO, R.W. First record of *Pyricularia grisea* causing leaf blight of *Costus spiralis* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, Austrália, v.6, n.1, p.46-48, 2011. <http://doi.org/10.1007/s13314-011-0016-8>
- SANTOS, B.N.V.; MACEDO, W.A.; MELLO, V.S.; LEITE, D.M.; KARSBURG, I.V. Estimativa da viabilidade dos grãos de pólen de *Costus arabicus* L. (Costaceae) baseada em distintos métodos de coloração. In: ENCONTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROSSUSTENTÁVEIS; JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA AGROSSILVIPASTORIL, 6., 2017. **Anais...** Sinop, 2017, p.1-4.
- SANTOS, L.C.B.; FERNANDES, L.; MACEDO, W.A.; SANTOS, B.N.V.; LEITE, D.M.; KARSBURG, I.V.; PRAÇA-FONTE, M.M. Uso de cloreto de trifêniltetrazólio para teste de viabilidade polínica de maracujazeiro doce. **Ciência & Tecnologia Fatec-JB**, Jaboticabal, v.8, n.1, 2016.
- ZONTA, J.B.; SOUZA, L.T.; DIAS, D.C.F.S.; ALVARENGA, E.M. Comparação de metodologias do teste de tetrazólio para sementes de cafeeiro. **Idesia**, Arica, v.27, n.2, p.17-23, 2009. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292009000200002>