



## Aplicação de testes colorimétricos para determinação da viabilidade polínica em *Catharanthus roseus* [L.] G. Don (Gentianales)

Noel Barbosa da Silva <sup>1,\*</sup> e Cláudio Lúcio Fernandes Amaral <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, BA, Brasil; nbsilvaesb@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, BA, Brasil; claudio.amaral@uesb.edu.br

\*Autor Correspondente: nbsilvaesb@gmail.com

Recebido: 08/07/2021; Aceito: 08/09/2021.

**Resumo:** A avaliação da viabilidade do grão de pólen, por métodos colorimétricos, configura-se em importante técnica por sua facilidade de aplicação em programas de melhoramento genético, em especial por cruzamentos (hibridação) e baixo custo. Este estudo objetivou estimar a viabilidade polínica em *Catharanthus roseus* por meio de testes colorimétricos. Foram utilizados grãos de pólen de flores coletadas de cinquenta indivíduos escolhidos com base no aspecto fitossanitário, e seis corantes (Carmim Acético, Eosina, Lugol, Verde Sólido, Vermelho Congo e 2,3,5 Trifeniltatrazólíio). 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 BioEstat. Os métodos empregados demonstraram alta viabilidade polínica ( $>70\%$ ) para todos os corantes, tendo o verde sólido e o Carmim Acético apresentado as maiores médias em relação aos demais corantes ( $>90\%$ ). 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. Cabe ainda ressaltar que o corante Eosina, utilizado em estudos animais, apresentou resultados exitosos e, por tanto, pode ser utilizado também em estudos com plantas.

**Palavras-chave:** Melhoramento; Planta medicinal; Pólen.

## Application of colorimetric tests to determine pollen viability in *Catharanthus roseus* [L.] G. Don (Gentianales)

**Abstract:** The evaluation of pollen grain viability, by colorimetric methods, is an important technique due to its ease of application in genetic improvement programs, especially through crossings (hybridization) and low cost. This study aimed to estimate pollen viability in *Catharanthus roseus* through colorimetric tests. Pollen grains from flowers collected from fifty individuals chosen based on the phytosanitary aspect, and six dyes (Acetic Carmine, Eosin, Lugol, Solid Green, Congo Red and 2,3,5 Triphenyltatrazolum) were used. The experimental design used was completely randomized, and the data were submitted to analysis of variance and means were compared by the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ), with the aid of the statistical program BioEstat. The methods used showed high pollen viability ( $>70\%$ ) for all dyes, with Solid Green and Acetic Carmine showing the highest means in relation to the other dyes ( $>90\%$ ). Most dyes showed easy distinction between viable and non-viable grains, therefore, they were efficient for the evaluation of pollen viability in *C. roseus*. However, the Congo Red dye, although it has shown high viability, is not recommended, as it has little distinction between viable and non-viable pollen grains. It is also worth mentioning that the Eosin dye, used in animal studies, showed successful results and, therefore, can also be used in studies with plants.

**Key-words:** Improvement; Medicinal plant; Pollen.

### 1. INTRODUÇÃO

A família Apocynaceae se caracteriza por apresentar ampla variabilidade morfológica em seus órgãos florais, presença de vasos laticíferos que contém uma gama enorme de substâncias resultantes do seu metabolismo

secundário que, na maioria das vezes, possuem propriedades farmacológicas. No látex, são encontrados triterpenos, fitosteróis e alcaloides de elevada relevância medicinal (RIZZINI & MORS, 1995).

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 (LORENZI & SOUZA, 2008), é bastante empregada na medicina popular para tratar diabetes, pressão arterial elevada e câncer (FERREIRA, 2003). Nesta importante espécie, já foram obtidos cerca de 70 alcaloides (MARINHO, 2001), sendo vimblastina e vincristina utilizados no tratamento oncológico (MELO & ALVARENGA, 2009; BARRALES-CUREÑO, 2015).

Tendo em vista o 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 colorimétricos para a viabilidade polínica são a rapidez e o baixo custo que estes proporcionam, sendo utilizados em diversas pesquisas nos últimos anos (MACEDO et al., 2016; NACHBAR & SOUZA 2018). Portanto, objetivou-se neste estudo estimar a viabilidade polínica de *Catharanthus roseus* por meio de 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 (UESB), Campus Jequié - BA, Brasil. Foram utilizadas 50 plantas, previamente, selecionadas com base em seus aspectos fitossanitários na área institucional (13° 51' 27"S; 40° 05' 01"W, altitude 216m).

De cada indivíduo, foi coletada uma única flor no período de antese, sendo estas colocadas em recipiente devidamente identificado, totalizando 50 frascos, e posteriormente levadas para o laboratório, onde, com a ajuda de uma agulha, foram retiradas anteras que posteriormente foram fixadas em solução de álcool a 70% e mantidas sobre refrigeração até a realização do experimento.

Para a preparação das lâminas, foi utilizada a técnica de esmagamento das anteras (GUERRA, 2002) 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%, Lugol 1% a 5% e solução de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 3%, adaptado de Santos et al. (2018), Vermelho Congo 1%, com base em Nascimento et al. (2014) e dois novos corantes, Eosina 0,1% e Verde Sólido 2%. Para teste com TCC, os grãos de pólen foram corados logo após serem coletados.

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. Este procedimento foi válido para os seguintes corantes, quais sejam: Eosina, Lugol, Verde Sólido e Vermelho Congo. Por outro lado, para o Carmim Acético e para o TTC, o tempo de exposição foi de 24 horas.

Foram confeccionadas um total de quinze lâminas, três para cada um dos cinco corantes estudados, avaliando-se os grãos de pólen pelo método de varredura em microscópio óptico, em objetiva de 40x. O procedimento consistiu na deposição de uma gota de solução contendo os grãos de pólen, após homogeneização. 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 analisados quanto a normalidade (Shapiro-Wilk), e tendo atendido os pressupostos, 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 et al., 2007).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

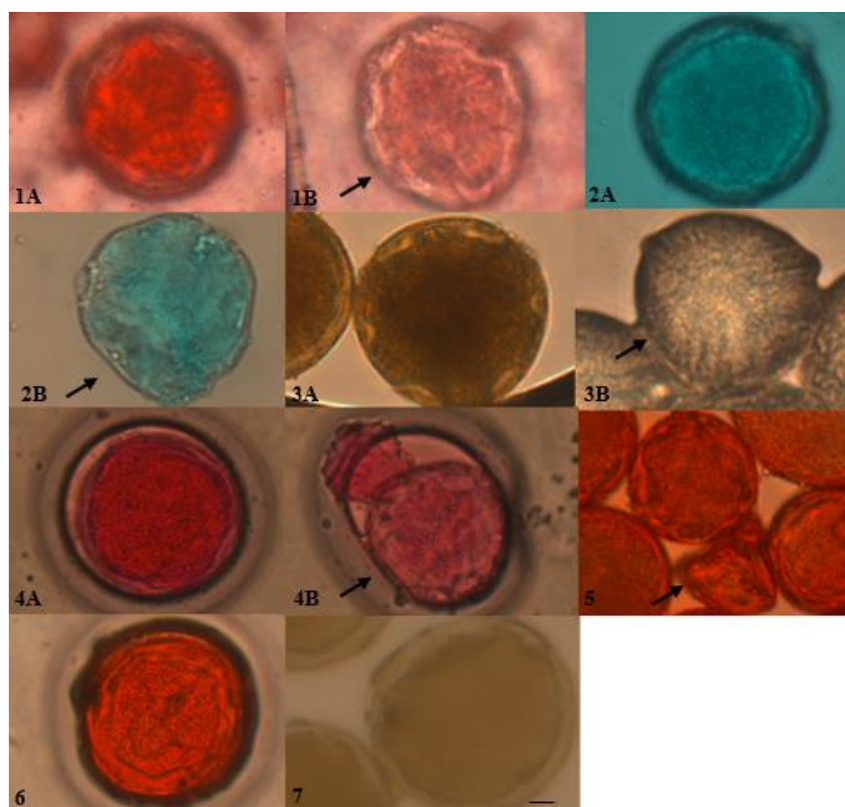
As médias de grãos de pólen viáveis em *C. roseus*, demonstram viabilidade superior a 70% para todos os corantes utilizados (Tabela 1). De acordo com Brito et al. (2010), porcentagem acima deste valor é considerada alta, desta forma a espécie possui elevada viabilidade polínica, sendo que esta informação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

**Tabela 1.** Média de viabilidade polínica de *Catharanthus roseus* por corantes.

Corantes	Viabilidade (%)
Lugol	85,67ab
Verde Sólido	96,33a
Eosina	90,33ab
Vermelho Congo	91,33ab
Carmim Acético	94,33a
TTC	70,33 b
CV (%)	4,46%

$p = 0,017$

De acordo com os dados apresentados a Tabela 1, pode-se observar que não houve diferença entre os corantes Lugol, Eosina e Vermelho Congo. No entanto, o Verde Sólido e o Carmim Acético apresentaram diferença em relação ao TTC. Testes com os corantes Verde Sólido e Carmim Acético são utilizados para evidenciar material nuclear (GUERRA, 2002). Estes indicaram as maiores taxas de viabilidade polínica, sendo que o primeiro corante resultou em coloração verde-escura (Figura 2A) e, o segundo, vermelho escuro (Figura 1A) para os grãos de pólen viáveis.



**Figura 1.** Fotomicrografias de grãos de pólen de *Catharanthus roseus*- 1. Carmim Acético; 2. Verde Sólido; 3. Lugol; 4. Eosina; 5. Vermelho Congo; 6. TTC e 7. Grão sem corante. (A seta indica grãos de pólen inviáveis). Escala = 10  $\mu$ m.

O teste do TTC é utilizado como teste bioquímico ao indicar a presença das enzimas desidrogenases ativas na estrutura observadas, corando-a de vermelho (Figura 6), sugerindo desta maneira possível viabilidade do pólen. Estudos que tratam desta temática defendem que a estimativa da viabilidade polínica por este corante é confiável, sendo próximas àquela fornecida pelos testes de germinação in vitro (MUNHOZ et al., 2008).

Os resultados encontrados pra os corantes Lugol, Eosina e Vermelho Congo foram satisfatórios. Lugol é um indicador de viabilidade polínica de acordo com Nascimento et al. (2014) e Munhoz et al. (2008), uma vez que os mesmos apresentaram estimativas que não diferiram estatisticamente da estimativa apontada para o TTC. O Lugol

corou o pólen de marrom escuro (Figura 3A), indicando que este é amiláceo. Este reagente é bastante empregado em estudos histoquímicos e vem sendo apontado como bom indicador da viabilidade polínica por diversos autores, como de espécies como *Carica papaya* L (MUNHOZ et al., 2008), *Manihot esculenta* Crantz. (TIAGO et al., 2014) e *Bertholletia excelsa* Bonpl. (SANTOS et al., 2015).

O Vermelho Congo é usado para corar fibras de cellulose (REIS, 2009) e foi utilizado por Nascimento et al. (2014), evidenciando o menor percentual de grãos de pólen viáveis, o que pode ser justificado pelo fato deste corante não oferecer contraste nítido entres os viáveis e inviáveis (Figura 5), podendo gerar erros na análise. Nesta pesquisa a distinção de grãos de pólen viáveis e inviáveis se deu pela análise dos aspectos morfológicos, como tamanho e formato, pois o Vermelho Congo corou todos os grãos de pólen de forma similar, como ilustrado abaixo.

O corante Eosina é muito utilizado em estudos histológicos com animais, corando o citoplasma e os espaços intercelulares de rosa, atestando dessa forma que não há má formação e/ou lesões na célula (TSUNEDA, 2015). O referido corante apresentou estimativa confiável para determinação da viabilidade polínica (Figura 4A), ao ser comparado com os outros corantes, o quais são bastante empregados em estudos citológicos em plantas.

#### 4. CONCLUSÕES

Os testes adotados são simples, rápidos e demonstraram eficiência. Os corantes Carmim Acético, Verde Sólido e Vermelho Congo apresentaram as maiores taxas de viabilidade polínica, devendo-se considerar que os dois primeiros coram elementos fundamentais do material genético do pólen. Levando em conta que alguns corantes são mais caros, deve-se optar pela utilização de corantes com valor mais acessível, sendo este o Carmim Acético.

Cabe ressaltar ainda que o corante Vermelho Congo, embora tenha demonstrado aparente eficiência, o mesmo não oferece bom contraste para avaliação e, por tanto, deve ser evitado. Na presente pesquisa foi constatada a eficiência do corante Eosina na avaliação da viabilidade polínica, sendo mais um corante a ser utilizados na avaliação da viabilidade polínica.

#### REFERÊNCIAS

- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **Bioestat aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**, 5.0, Belém:2007.Software
- BARRALES-CURENO, H.J. Pharmacological applications and in vitro biotechnological production of anticancer alkaloids of *Catharanthus roseus*. **Biocientífica Aplicada**, v.32, n.1, p.1101-1110, 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. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v.12, n.2, p. 208-214, 2010. DOI: dx.doi.org/10.1590/S1516-05722010000200013
- FERREIRA, M.M. **Avaliação das características de crescimento e desenvolvimento da vinca (*Catharanthus roseus*) em relação à adubação e época de colheita**. Lavras-MG: Universidade Federal de Lavras, 2003. 75p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Lavras, 2003.
- GUERRA, M. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal, e human**. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002.131p.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2008. **Plantas Medicinai**s no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.
- 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 alpinia. **Ciência & Tecnologia**, v.8, n.1, p.1-5, 2016.
- MARINHO, S.R.M. **Função dos alcalóides indólicos monoterpenóides de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don**. Porto-Portugal: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2001. 68p. Tese (Mestrado em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal), Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2001.
- MELO, A.A.M.; ALVARENGA, A.A. Sombreamento de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 'Pacifica White' por malhas coloridas: desenvolvimento vegetativo. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.2, p.514-520, 2009. DOI: dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000200024
- 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 Botânica**, v.31, n.2, p.209-214, 2008. DOI: dx.doi.org/10.1590/S0100-84042008000200003
- NACHBAR, L.A.; SOUZA, S.A.M. Estimativa da viabilidade polínica e polinização controlada de variedades tradicionais de *Cucurbita moschata* Duchesne. **Enciclopédia Biosfera**, v.15, n.27, p.220-229, 2018.
- NASCIMENTO, L.S.; BENEVENUTI, A.; LEITE, D.M.; SILVA, D.D.; MOURA, E.A.; MIRANDA, D.; MELLO, V.; DAHMER, N.; KARSBURG, I.V. Estimativa da viabilidade polínica e índice meiótico de *Delonix regia*. **Estudos**, v.41, n. especial, p.83-88, 2014.
- KUHN, A.W. **Viabilidade polínica, genotoxicidade, efeito antiproliferativo e compostos fenólicos de *Peltodon longipes* Kunthex Benth. (Lamiaceae)**. Santa Maria-RS. Universidade Federal de Santa Maria. 2015, 58p. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia), Universidade Federal de Santa Maria, 2015.

- 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: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018.19. Disponível em: <https://www.infotec.cnptia.embrapa.br>
- REIS, L.G.T. **Degradação do corante vermelho congo em solução aquosa através de plasma obtido por eletrólise de alta tensão.** Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa, 2009, 117p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. (1995). **Botânica econômica brasileira.** Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995.241.p.
- SANTOS, T.A.; TIAGO, P.V.; SCHMITT, K.F.M.; MARTINS, K.C.; ROSSI, A.A.B. Viabilidade pólinica em *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Lecythidaceae) baseada em diferentes testes colorimétricos. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, n.22, p.3136-3144, 2015.
- SANTOS, B.N.V.; MACEDO, W.A.; DAMASIO, J.F.; MELLO, V.S.; KARSBURG, I.V. Teste de coloração de grãos de pólen de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) para verificação de sua viabilidade. **Revista de Ciências Agroambientais**, v.16, n.2, p.135-138, 2018. DOI: [dx.doi.org/10.5327/Z1677-60622019549](https://doi.org/10.5327/Z1677-60622019549)
- TIAGO, A.V.; ROCHA, V.D.; TIAGO, P.V.; LIMA, J.S.; ROSSI, A.A.B. Viabilidade polínica e receptividade estigmática em variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Enciclopédia Biosfera**, v.10, n.19, p.1957-1966, 2014.
- TSUNEDA, P.P.; DUARTE JUNIOR, M.F.; SILVA, L.E.S.; JORGE, A.A.; HATAMOTO-ZERVOUDAKIS, L.K.; PAZ, R.C.R. Análise seminal e padronização da coloração eosina-nigrosina em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 3-4, p.198-201, 2015. DOI: [dx.doi.org/10.4322/RBCV.2016.014](https://doi.org/10.4322/RBCV.2016.014)