COMPORTAMENTO MEIÓTICO E VIABILIDADE POLÍNICA DE *Averrhoa carambola* L. (OXALIDACEAE) POR MEIO DE TESTES COLORIMÉTRICOS

Catiane dos Santos Braga¹, Gêssica Tais Zanetti¹, Joameson dos Santos Lima¹, Carlos Alberto da Cunha Oliveira¹; Isane Vera Karsburg²

¹Mestranda (o) do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas-PGMP, Universidade do Estado de Mato Grosso-UNEMAT, *Campus* de Alta Floresta, MT-Brasil. E-mail katianedossantos16@hotmail.com

²Doutora em Genética e Melhoramento Vegetal. Professora do Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade do Estado de Mato Grosso-UNEMAT. *Campus* de Alta Floresta, MT-Brasil

Recebido em: 14/07/2018 – Aprovado em: 28/07/2018 – Publicado em: 31/07/2018
DOI: 10.18677/Agrarian_Academy_2018a47

RESUMO

A análise da viabilidade dos grãos de pólen é uma importante área de estudo da biologia reprodutiva. O uso desse método permite a seleção de espécies vegetais com características potencialmente promissoras e empregá-las em programas de melhoramento genético. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o índice meiótico e a viabilidade polínica de três genótipos de *A. carambola* L. através de testes colorimétricos. Anteras de *A. carambola* foram maceradas em orceína acética 2% para estimar o índice meiótico. Para avaliação da viabilidade polínica foram testados três corantes (Verde Malaquita 1%, Lugol 2% e Reativo de Alexander) e para cada corante 10 lâminas foram preparadas e, contabilizados 250 grãos de pólen por lâmina. Em relação ao índice meiótico não houve diferença estatística para os três genótipos, contudo o genótipo 2 apresentou a maior porcentagem de regularidade meiótica (97,35%). Os produtos pós-meióticos irregulares observados foram díades e tríades, enquanto mônades e políades não foram observados. A análise da viabilidade polínica revelou diferença estatística para o reativo de Alexander, a maior porcentagem de polens viáveis foi verificada no Genótipo 2 (97,64%), não diferindo estatisticamente do genótipo 1 (97,64%). O reativo de Alexander permitiu a melhor visualização de polens viáveis e polens inviáveis, já o uso do verde Malaquita dificultou a distinção dos polens. Assim, os três genótipos de *A. carambola* apresentaram alto índice meiótico revelando regularidade do processo meiótico. O corante reativo de Alexander se destacou na avaliação da viabilidade é polínica e, possibilitou a melhor distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Botões florais; Grãos de pólen; Genótipo.

MEYOTIC BEHAVIOR AND POLYNICAL VIABILITY OF *Averrhoa carambola* L. (OXALIDACEAE) BY COLORIMETRIC TESTS

ABSTRACT

The analysis of the viability of pollen grains is an important area of study of reproductive biology. The use of this method allows the selection of plant species with potentially promising characteristics and uses them in breeding programs. Therefore, the objective of this study was to evaluate the meiotic index and the pollen viability of three *A. carambola* L. genotypes by colorimetric tests. Anthers of *A. carambola* were macerated in acetic orcein 2% to estimate the meiotic index. To evaluate the pollen viability, three dyes were tested (Malachite green 1%, Lugol 2% and Alexander's stain) and for each dye 10 slides were prepared and counted 250 pollen grains per slide. In relation to the meiotic index there was no statistical difference for the three genotypes, however genotype 2 presented the highest percentage of meiotic regularity (97.35%). The irregular post-meiotic products observed were dyads and triads, while monads and polyads were not observed. The pollen viability analysis revealed a statistical difference for the Alexander's stain, where the highest percentage of viable pollens was verified in Genotype 2 (97.64%), and did not differ statistically from genotype 1 (97.64%). The Alexander's stain allowed the best visualization of viable pollens and infeasible pollen, and the use of Malachite Green made it difficult to distinguish pollen. Thus, the three genotypes of *A. carambola* presented a high meiotic index revealing regularity of the meiotic process. Alexander's stain dye stood out in the evaluation of pollen viability and allowed a better distinction between viable and non-viable pollen.

KEYWORDS: Floral buds; Pollen grains; Genotype.

INTRODUÇÃO

A *Averrhoa carambola* L. é popularmente conhecida como carambola, uma planta frutífera pertencente à família Oxalidaceae originária da Ásia (DONADIO et al., 2001). Trata-se de uma planta com raízes e folhas que possuem propriedades antimicrobianas, antiglicêmica e com propriedades antipirética e oftálmica (MADALENO, 2015; OLIVEIRA et al., 2015; NDUKWE; OKHIKU, 2018).

A cultura da caramboleira possui grande potencial, devido à capacidade de rápido desenvolvimento, alta produtividade, seleção de clones doces e possibilidade de cultivo, em sistemas protegidos (MUSTAFA et al., 2016). Em virtude dessas características torna-se necessária à realização de estudos sobre a biologia reprodutiva da espécie para fins de melhoramento genético da cultura.

O sucesso reprodutivo de uma espécie depende em grande parte da regularidade da meiose, pois esta informa se há produção de gametas viáveis para a reprodução (WIJNKER; JONG, 2008). Contudo, esse evento é controlado por vários genes, podendo então gerar desarmonia e anormalidade da meiose, tendo como resultado produtos pós-meióticos anormais que causam a infertilidade da planta (SOUZA et al., 2003), mas que podem ser verificados através do índice meiótico.

O estudo da viabilidade do grão de pólen é uma das formas de obter informações sobre a biologia reprodutiva das espécies vegetais. Também é um importante método para a análise de fluxo gênico em plantas porque evidencia o potencial masculino de reprodução e pode ser útil em diversos estudos (FRESCURA et al., 2012).

O emprego e a escolha dos diferentes corantes, tanto em citogenética clássica como molecular, é de extrema importância, uma vez que permitem corar regiões distintas das células, bem como diferentes grupos celulares para posterior

identificação no microscópio (BRAMMER et al., 2015). Não há na literatura, de acordo com Hister e Tedesco (2016), um teste de viabilidade universal que utilize apenas um corante específico, por isso, existe a necessidade de testar mais de um tipo de corante, visando encontrar o mais adequado para cada espécie.

Tendo em vista, que o estudo da biologia reprodutiva é fundamental no melhoramento genético e pouco se sabe sobre a biologia reprodutiva da caramboleira, o presente artigo teve por objetivo avaliar o índice meiótico e a viabilidade polínica de três genótipos de *Averrhoa carambola* L. por meio de testes colorimétricos.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT *campus* de Alta Floresta, MT. Foram coletados botões florais em pré-antese de três genótipos de *A. carambola*, localizados no perímetro urbano do município de Alta Floresta, MT. Botões florais de diferentes tamanhos foram coletados e fixados em solução de ácido acético 4%, mantidos em temperatura ambiente por 24 horas e posteriormente transferidos para o álcool 70% e armazenados em geladeira.

Para estimar o índice meiótico, anteras dos botões florais foram maceradas em orceína acética 2%, e 10 lâminas foram preparadas por genótipo de *A. carambola* totalizando 2.500 células observadas e contabilizadas em microscópio óptico com aumento de 40X. As células observadas que estavam em tétrades foram consideradas produtos pós-meióticos normais, enquanto que mônades, díades, tríades e políades foram consideradas produtos pós-meióticos anormais. O cálculo do índice meiótico foi realizado de acordo com Love (1951).

A avaliação da viabilidade polínica foi realizada utilizando três corantes: lugol 2%, verde malaquita 1% e o reativo de Alexander. Os genótipos foram testados com os três corantes e para cada corante 10 lâminas foram preparadas e, contabilizados 250 grãos de polens por lâmina, totalizando 2.500 células analisadas por corante e 7.500 células por genótipo. As lâminas foram analisadas utilizando o método de varredura com o auxílio de um microscópio óptico com aumento de 40X.

Os dados de índice meiótico e viabilidade polínica foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico R, versão 3.3.2 (R CORE TEAM, 2016), com o auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA et al., 2013). O gráfico dos dados de índice meiótico foi confeccionado no programa Sigmaplot (versão 11).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo não houve diferença significativa à 5% de probabilidade entre os três genótipos de *A. carambola* quanto ao índice meiótico (FIGURA 1). Contudo, o Genótipo 2 apresentou a maior porcentagem média de regularidade meiótica de 97,35%, seguida pelo Genótipo 1 com 89,94% e o Genótipo 3 com 84,96%.

FIGURA 1. Índice Meiótico (IM) de três genótipos de *A. carambola*. Médias com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade via teste tukey. CV (%) = 11,69.

A regularidade na meiose gera como resultado um alto percentual de tétrades normais e consequentemente alta viabilidade polínica (LIMA et al., 2016). A estabilidade desse processo pode ser verificada através do índice meiótico, que indica o quanto a divisão celular meiótica foi estável e regular (PEREIRA et al., 2017).

De acordo com Love (1951) as plantas devem obter índices meióticos que fiquem acima de 90%, valores abaixo podem ter uso restrito no melhoramento genético. Os genótipos em estudo apresentaram índices meióticos próximos de 90%, valores que são considerados satisfatórios, pois resultaram em alta porcentagem de viabilidade polínica e dessa maneira apresentam potencial para o planejamento de programas de melhoramento genético (LAVINSCKY et al., 2017).

Na literatura, estão disponíveis vários estudos que verificam o índice meiótico em espécies vegetais, porém para *A. carambola* são poucos estudos relacionados. Em diferentes espécies vegetais são encontrados resultados de índice meiótico variáveis e satisfatórios. Pereira et al. (2017) estudando o índice meiótico de duas espécies de gênero *Passiflora* (*P. cristalina* Vanderpl. & Zappi e *P. miniata* Vanderpl.) obtiveram valores de índice meiótico acima de 90,00% para ambas as espécies.

Fleck et al. (2015) em *Vasconcellea quercifolia* A. St. Hill. encontraram índice meiótico superior a 99,00%. Os produtos pós-meióticos anormais observados foram díades e tríades, outros produtos pós-meióticos como mônades e políades não foram observados (Tabela 1; Figura 2).

TABELA 1. Total de produtos pós-meióticos anormais observados em *A. carambola*, Alta Floresta-MT.

Genótipos	Produtos Pós-Meióticos anormais				Tétrades anormais (%)
	Mônade	Díade	Tríade	Políade	
1	0	58	201	0	10,36
2	0	03	64	0	2,68
3	0	31	345	0	15,04
TOTAL	0	92	610	0	28,08

FIGURA 2. Produtos pós-meióticos de *A. carambola*. A- díade (anormal); B- tríade (anormal); C- tétrade (normal). Barra = 10µm. Fonte: os autores.

Na avaliação da viabilidade polínica dos genótipos de *A. carambola* foram detectadas diferenças significativas à 5% de probabilidade apenas para o teste colorimétrico com o reativo de Alexander (Tabela 2). A espécie apresentou altas taxas de viabilidade polínica, visto que Souza et al. (2002) definem como alto os percentuais de viabilidade do grão de pólen que fiquem acima de 70%.

TABELA 2. Médias percentuais de viabilidade polínica em três genótipos de *Averrhoa carambola* L., Alta Floresta-MT.

Genótipos	Corantes		
	Reativo de Alexander	Lugol	Verde malaquita
01	97,64a	88,88b	95,40a
02	97,68a	89,58b	95,08a
03	82,00b	77,60b	89,44a
CV (%)	8,19	15,30	9,36

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O uso do reativo de Alexander proporcionou a maior porcentagem de viabilidade polínica do genótipo 2 com 97,68% de polens viáveis, não se diferenciando estatisticamente do genótipo 1 com 97,64%. Enquanto que a menor taxa de viabilidade foi observada no genótipo 3 com 82,00% de grãos de polens viáveis (Tabela 2). O corante também se mostrou o mais eficiente para diferenciar polens viáveis de inviáveis (Figura 3).

FIGURA 3. Viabilidade polínica de *A. carambola* com diferentes testes colorimétricos. A - reativo de Alexander (pólen viável), B - (pólen inviável); C – lugol 2% (pólen viável), D - (pólen inviável); E - verde malaquita 1% (pólen viável), F - (pólen inviável). Barra = 10µm. Fonte: os autores.

Outros autores também relataram alto percentual de viabilidade polínica utilizando o reativo de Alexander. Hister e Tedesco (2016) obtiveram valores superiores a 80% na maioria dos 20 acessos de *Psidium cattleianum* Sabine. E Arenas-de-Souza et al. (2016) ao estudarem a viabilidade polínica de *Theobroma subincanum* Mart. encontraram altas porcentagens de viabilidade polínica (> 98%) em diferentes horários de coleta.

A viabilidade polínica com lugol baseia-se na detecção de amido, e o uso desse corante revelou a presença de amido em 89,58% dos grãos de polens do genótipo 2, seguido por 88,88% do genótipo 1 e 77,60% do genótipo 3. O uso do lugol não revelou diferenças estatísticas significativas, porém, permitiu uma boa distinção entre polens viáveis e não viáveis. Munhoz et al. (2008) ao analisarem a viabilidade polínica de *Carica papaya* L. obtiveram porcentagem de 91,20% dos grãos de pólen viáveis usando o corante lugol, e também mostrando elevada taxa de viabilidade polínica.

Diferenças significativas também não foram observadas quando a viabilidade polínica dos três genótipos foi testada com o corante verde malaquita. As porcentagens de grãos de pólen viáveis dos genótipos 1, 2 e 3 de *A. carambola* foram respectivamente de 95,40%, 95,08% e 89,44%. Observou-se que a coloração obtida pelo uso desse corante não permitiu uma distinção precisa dos grãos de polens viáveis e inviáveis dificultando a contagem (Figura 3).

Os dados obtidos mostram que as porcentagens de viabilidade polínica variam conforme a espécie e o genótipo estudado. Sendo assim, é um importante parâmetro para as análises de fluxo gênico e estudos da biologia reprodutiva das espécies vegetais, visto que, permitem estabelecer correlações com as anormalidades meióticas (DIEGUES et al., 2015). E associado a outros trabalhos

permite identificar genótipos com características superiores que podem ter aplicabilidade nos programas de melhoramento genético.

CONCLUSÃO

Os genótipos de *A. carambola* apresentaram alto índice meiótico revelando regularidade meiótica e, conseqüentemente altas porcentagens de viabilidade polínica.

O reativo de Alexander foi o corante mais eficiente para distinguir diferenças de viabilidade polínica entre os genótipos de *A. carambola*, e possibilitou a melhor distinção entre grãos de pólen viáveis e não viáveis.

REFERÊNCIAS

ARENAS-DE-SOUZA, M. D.; ROSSI, A. A. B.; VARELLA, T. L.; SILVEIRA, G. F. D.; SOUZA, S. A Stigmatic receptivity and pollen viability of *Theobroma subincanum* Mart.: fruit species from the amazon region. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 4, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452016757>>. doi: 10.1590/010029452016757

BRAMMER, S.P.; TONIAZZO, C.; POERSCH, L.B. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 82, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000192013>>. doi: 10.1590/1808-1657000192013

DIEGUES, I. P.; JUNIOR-DAMASCENO, P. C.; RIBEIRO, N. V. S.; REIS, M. V. M.; ABOUD, A. C. S. Comportamento meiótico e viabilidade polínica na espécie *Jatropha curcas* L. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n1p141>>. doi: 10.5433/1679-0359.2015v36n1p141.

DONADIO, L.C.; SILVA, J. A.A.; ARAÚJO, P.S.; PRADO, R.M. **Caramboleira (*Averrhoa carambola* L.)**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2001. 81p. (Série Frutas Potenciais).

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: Experimental Designs package**. R package version 1.1.2. 2013.

FLECK, M.; BIONDO, E.; SANT'ANNA, V.; KOLCHINSKI, E.; KRYCKY, K. C.; CEMIN, P.; ZAMBIASI, I. C. Número cromossômico, comportamento meiótico e viabilidade de grãos de pólen em populações de *Vasconcellea quercifolia* A. St. Hill. (CARICACEAE) nativas do Vale do Taquari/RS. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 1, n. 1, p. 19-24, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21674/2448-0479.11.19-24>>. doi: 10.21674/2448-0479.11.19-24

FRESCURA, V. D. S.; LAUGHINGHOUSE, I. V.; DAIL, H.; DOROW, T. S. D. C.; TEDESCO, S. B. Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different staining methods. **Biocell**, v.36, n.3, p.143-145, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032795452012000300007>.

HISTER, C.A.L.; TEDESCO, S.B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, p.135-141, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_081>. doi: 10.1590/1983-084X/15_081
LAVINSCKY, M. P.; SOUZA, M. M.; SILVA, G. S.; MELO, C. A. F. Contributions of classical and molecular cytogenetic in meiotic analysis and pollen viability for plant breeding. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039582>>. doi: 10.4238/gmr16039582

LIMA, D. C.; G. T.; DOS REIS, G. B.; TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; ABREU, A. F.B. A Implications of mitotic and meiotic irregularities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 2, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15027749>>. doi: 10.4238/gmr.15027749

LOVE, R. M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian Wheats. **Agronomy Journal**. v.43, n.2, p.72-76, 1951. <http://agron.sciijournals.org/cgi/reprint/43/2/72?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Love%2C+RM&title=Varietal+differences+in+meiotic+chromosomes+behavior+of+Brazilian+wheats&andorexacttitle=and&andorexacttitleabs=and&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype=HWCIT>

MADALENO, I.M. Plantas medicinais consumidas em Cochim, no século XVI e na atualidade. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 10, n. 1, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1981-81222015000100006>>. doi: 10.1590/1981-81222015000100006

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**, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042008000200003>>. doi: 10.1590/S0100-84042008000200003

MUSTAFA, M. A.; ALI, A.; SEYMOUR, G.; TUCKER, G. Enhancing the antioxidant content of carambola (*Averrhoa carambola*) during cold storage and methyl jasmonate treatments. **Postharvest Biology and Technology**, v. 118, p. 79–86, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.03.021>>. doi: 10.1016/j.postharvbio.2016.03.021

NDUKWE, G. I.; OKHIKU, J. O. Chemical composition and anti-microbial activity of the volatile oils of *Averrhoa carambola* L. (star fruit) grown in Nigeria. **Journal of Chemical Society of Nigeria**, vol. 43, n. 2, p. 141 – 150, 2018. Disponível em: <<http://journals.chemsociety.org.ng/index.php/jcsn/article/view/159/215>>.

OLIVEIRA, F. A.; CONDE, B.E.; GOMES, F.T.; FONSECA, A.S.; CAMPOS, B. C.; Potencial de cura e segurança do uso de plantas medicinais na utilização do método da biodigital como tratamento alternativo no grupo de medicina alternativa em Juiz de Fora, MG. **Biológicas & Saúde** v. 5, n. 17, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.25242/88685172015634>>. doi: 10.25242/88685172015634

PEREIRA, T. N. S.; GERONIMO, I. G. D. C.; ROSSI, A. A. B.; PEREIRA, M. G. *Passiflora cristalina* and *Passiflora miniata*: meiotic characterization of two wild species for use in breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 273-279, 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332017v17n3n41>> doi: 10.1590/1984-70332017v17n3n41

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2016.

SOUZA, M. D.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/site/_adm/upload/revista/26-6-2002_13.pdf>.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N.; VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G.; BERNACCI, L. C.; SUDRÉ, C. P.; CRUZ SILVA, L. Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). **Caryologia**, v. 56, n. 2, p. 161-169, 2003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/00087114.2003.1010589320>>. doi: 10.1080/00087114.2003.1010589320

WIJNKER E.; JONG H. Managing meiotic recombination in plant breeding. **Trends in Plant Science**. v.13, n.12, p.640-646, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.09.004>>. doi: 10.1016/j.tplants.2008.09.004