



ESTIMATIVA DA VIABILIDADE POLÍNICA EM ACESSOS DE *Theobroma cacao* L. BASEADA EM TESTES CALORIMÉTRICOS

Juliane Costa Cabral¹; Ana Aparecida Bandini Rossi²; Marcia Elisabete Klein³; Felipe Sakamoto Vieira⁴; Luana Della Giustina⁴

¹Bióloga – Universidade do Estado de Mato Grosso- UNEMAT- *Campus* de Alta Floresta, MT, Brasil. e-mail: julianecostacabral@hotmail.com

²Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, Professora da Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, - PPGBioAgro e PGMP- Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular -UNEMAT - *Campus* de Alta Floresta – MT, Brasil.

³Mestre em Física Ambiental, Laboratório Didático – UNEMAT *Campus* de Alta Floresta – MT, Brasil.

⁴Mestrandos do Curso de Genética e Melhoramento de Plantas PGMP – UNEMAT *Campus* de Alta Floresta – MT, Brasil.

Recebido em: 30/09/2013 – Aprovado em: 08/11/2013 – Publicado em: 01/12/2013

RESUMO

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) pertence à família Malvaceae. O presente estudo objetivou avaliar a viabilidade polínica de sete genótipos de *Theobroma cacao* L. Para estimativa da viabilidade polínica, botões florais em pré-antese e antese foram coletados e fixados em carnoy, e posteriormente transferidos para álcool 70%. e armazenados a 4°C até uso posterior. Testes de viabilidade foram realizados utilizando os corantes carmim acético e lugol. Para comparar as médias de viabilidade entre os genótipos e as medias submetidas a análise de variância pelo teste de tukey a 5% de significância. Na avaliação da viabilidade dos polens advindos dos botões florais em pré-antese não houve diferença significativa entre os genótipos e nem entre os corantes, apresentando uma média de viabilidade acima de 95% na estimativa com os dois corantes. Enquanto que nos polens das flores em antese os dois corantes revelaram diferenças significativas entre os genótipos, porém com viabilidade acima de 70% para os mesmos, com uma média acima de 80% nos dois corantes. Observou-se também diferenças significativas para a viabilidade polínica em relação aos estádios de desenvolvimento da flor, para alguns dos genótipos estudados.

PALAVRAS-CHAVE: Cacao; Pólen; Carmim Acético 2%; Lugol.

ESTIMATE POLLEN VIABILITY IN ACCESS OF *Theobroma cacao* L. BASED CALORIMETER TESTING

ABSTRACT

The cacao (*Theobroma cacao* L.) belongs the Malvace family. This study objected to assess pollen viability from seven genotypes of *Theobroma cacao* L. For estimation of pollen viability, pre-anthesis flower button and anthesis was collected and fixed in carnoy, after transferred for ethanol 70% and stored at 4°C until further use. Viability tests were made with acetic carmim and lugol. The average was subjected to analysis of variance by tukey test at 5% of significance. In the avaliation

of pollen viability from pre-anthesis flowers buttons not have significant difference between the genotypes and dyes with viability mid above of 95% estimated with the twos dyes. While in the flowers pollen in atthesis, the dyes reveled significant differences between the genotypes, but with viability above 70% for the same, with mid above of 80%. Observed significant different for pollinic viability from different stages of flower development, for some genotypes.

KEYWORDS: Cocoa; Pollen; 2% Acetic Carmim; Lugol.

INTRODUÇÃO

O cacaueiro pertence à ordem Malvales, família Malvaceae, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L., é originário da América do Sul, provavelmente das Bacias dos rios Amazonas e Orinoco (AFOAKWA, 2010; OETTERER, 2006). A espécie é utilizada comercialmente para a produção de chocolate. Os astecas e outros grupos de língua nahuatl denominavam o cacaueiro de “cacaohoaquahuitl”, os frutos de “cachocentli” e suas sementes de “cacaoatl”, nome utilizado atualmente para a espécie. Em 1737, Lineu denomina o gênero de *Theobroma*, que significa alimento dos deuses, em referência à origem divina atribuída ao cacaueiro pelos povos mesoamericanos (LOPES et al., 2011; EFRAIM, 2009).

Segundo PARENTE (2010), o cacau é uma planta que atinge entre 5 e 8 metros de altura e 4 a 6 metros de diâmetro de copa, em florestas pode alcançar até 20 metros de altura. Os frutos estão sustentados por pedúnculos lenhosos, tendo coloração que varia entre verde e amarelo ou roxo e laranja. Um fruto contém de 30 a 40 sementes, com formato elipsóide ou ovóide medindo 2 a 3 cm de comprimento.

O Brasil, até a chegada da vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) em 1989, era o segundo maior produtor de cacau do mundo caindo para a quinta posição, responsável por 4% do total mundial depois do aparecimento desta doença. A Bahia ainda é o maior produtor de cacau no Brasil, com 64% do total produzido, seguido por Pará (25%), Rondônia (8%) e Espírito Santo (3%) (MARTINI, 2004, LOPES et al., 2011).

O cacau foi introduzido na Bahia com sementes do Baixo Amazonas em 1756. Por mais de dois séculos, os agricultores plantaram sementes destas introduções iniciais (Cacau Comum). Em 1940 e 1950 as primeiras seleções foram feitas por parte das instituições de pesquisa, ou seja, o ICB (Instituto do Cacau da Bahia), SIAL (Estação Instituto Agrônômico do Leste) e EEG (Estação Experimental de Goitacazes) que foram liberadas aos agricultores (LOPES et al., 2011). Com a criação da Comissão Executiva Comissão do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), o foco foi voltado para a produção de híbridos interclonais, e a execução de um programa de coleta e conservação de recursos genéticos, estabelecendo coleções de germoplasma que tem como principal finalidade preservar a diversidade natural de *T. cacao*, dispersa na Amazônia e selecionar genótipos mais interessantes, principalmente quanto ao aspecto de resistência a doenças, assegurando a disponibilização de uma ampla base genética aos melhoristas (MAFRA et al., 2012).

O desenvolvimento de trabalhos de coleta, conservação e avaliação de germoplasma de cacau permitem o conhecimento da variabilidade genética do material e sua utilização em programas de melhoramento genético (KOBAYASHI et al., 2001).

Os programas de melhoramento vegetal estão fundamentados na obtenção

de cultivares superiores, a partir do potencial reprodutivo dos gametas e da manipulação da variabilidade genética existente no germoplasma de determinada espécie. Dentre os fatores responsáveis pelo sucesso desses programas destaca-se a seleção de genótipos e os cruzamentos cuja eficácia depende diretamente da viabilidade do pólen (TECHIO et al., 2006). A viabilidade polínica é um dos fatores que têm influência direta sobre o sucesso da fertilização.

De acordo com DAFNI (1992), a avaliação da viabilidade do grão de pólen é fator primário para que ele venha a ter oportunidade de germinar no estigma da flor, sendo um estágio decisivo à fertilização. Essa avaliação pode ser realizada com base em parâmetros citológicos, como a reação a corantes. Os métodos colorimétricos utilizam corantes químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes nos grãos de pólen maduro, como por exemplo, o lugol e o carmim acético (PAGLIARINI & POZZOBON, 2004).

A fertilidade do pólen nos indivíduos utilizados como progenitores masculinos em experimentos de polinizações, visando à produção de sementes, como o trabalho que é desenvolvido pela CEPLAC com o *Theobroma cacao*, é de grande importância, pois a esterilidade do pólen ou mesmo a baixa fertilidade são fatores negativos para a hibridação artificial ou autofecundação.

Devido a importância da fertilidade masculina nos genótipos de *T. cacao* utilizados pela CEPLAC na produção de sementes, este trabalho objetivou avaliar a viabilidade polínica de sete acessos de cacau com a utilização de dois diferentes testes colorimétricos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de grãos de pólen de sete acessos de *T. cacao* de diferentes origens conforme Tabela 1, obtidos no campo de produção de sementes da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) Estação Experimental Ariosto da Riva em Alta Floresta – MT.

TABELA 1: Relação dos sete acessos utilizados neste estudo, com as respectivas identificações e origens.

ACESSOS	IDENTIFICAÇÃO	ORIGEM
ICS1	Imperial College Selection 1	Trinidade
MA15	Manaus 15	Brasil
SIAL505	Seleção do Instituto Agrônomo do Leste 505	Brasil
CAB0028	Cacau da Amazônia Brasileira	Brasil
SCA6	Scavina	Equador
MO1	Mocorongo 1	Brasil
PA121	Parinari 121	Peru

O material vegetal foi coletado em cada acesso em dois estádios de desenvolvimento fisiológico: botões florais em pré-antese (BF) e flores abertas (FA). O material foi fixado em solução carnoy, mantidos em temperatura ambiente por 24 horas, posteriormente transferido para álcool 70% e armazenado em geladeira até uso posterior.

Os testes de viabilidade polínica foram realizados utilizando dois diferentes corantes: carmim acético 2% (KEARNS & INOUE, 1993), que indica a viabilidade do pólen pela coloração vermelha e lugol (DAFINI, 1992) que indica a viabilidade

pela coloração marrom. A estimativa da viabilidade dos pólenes foi comparada com base na reação de coloração de dois corantes nos dois estádios de desenvolvimento fisiológico (BF e FA).

Foram preparadas cinco lâminas de cada genótipo para cada corante, sendo contabilizados, pelo método de varredura, sob microscópio fotônico binocular com lente objetiva de 40x (BEL Photonics e Primo Star Zeiss) 300 grãos de pólen por lâmina, totalizando 1.500 grãos de pólen por genótipo avaliado. Com os dados obtidos em cada genótipo, calculou-se a porcentagem de pólenes viáveis pela equação:

$$\text{Viabilidade do pólen (\%)} = \text{N}^\circ \text{ de grãos corados} / \text{N}^\circ \text{ de grãos contados} * 100$$

Para comparar as médias entre os acessos dentro de cada corante e analisar as diferenças entre os corantes e entre os estádios de desenvolvimento fisiológico, os resultados foram submetidos a uma análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$). As análises foram realizadas pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois corantes utilizados foram capazes de distinguir os pólenes viáveis dos inviáveis de *T. cacao*, conforme demonstrado na Figura 01. Constatou-se neste estudo que o corante lugol apresentou uma melhor distinção, pela diferenciação de coloração, entre pólenes viáveis e inviáveis quando comparado com a coloração resultante do carmim acético. A coloração com lugol baseia-se em uma reação química que acontece entre o iodo e a molécula de amido, dando aos grãos de pólen viáveis uma coloração marrom e aos inviáveis, devido à ausência de amido, uma coloração amarela-clara e são transparentes. É indicado para espécies cujo material de reserva do grão de pólen é o amido (PAGLIARINI & POZZOBON, 2004), assim pode-se concluir que a reserva do grão de pólen de cacau é o amido.

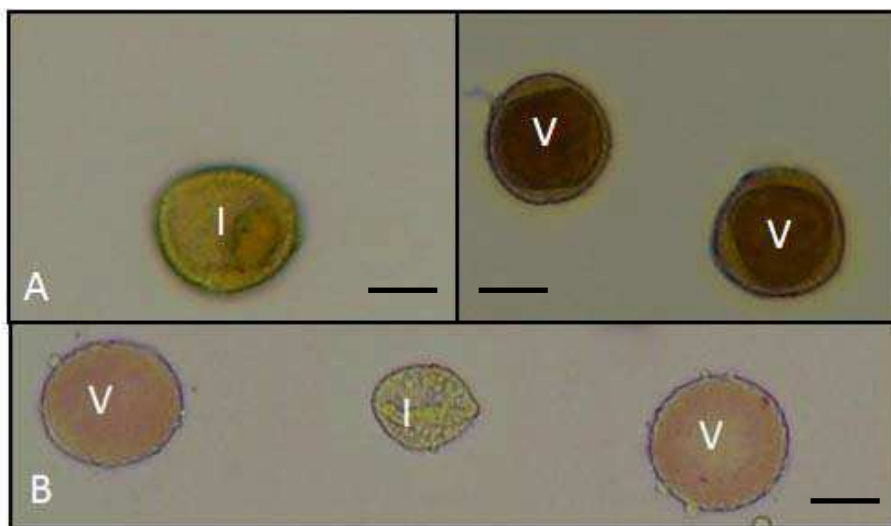


FIGURA 1: Polens viáveis e inviáveis de *T. cacao*. A) Testes com o lugol; B) Testes com o carmim acético 2%. V=Viável e I= Inviável. Barra = 40 μ m.

Na tabela 2 estão sumariados os resultados médios da viabilidade polínica por acesso para o teste com o corante carmim acético 2%. Os pólenes advindos dos botões florais não apresentaram diferenças estatísticas, quando comparados entre

os acessos, enquanto que nas flores abertas, para este mesmo corante, a média da viabilidade polínica apresentou diferença estatística significativa entre os acessos, sendo que o acesso MO01 apresentou a menor viabilidade (72,6%) e o acesso PA121 a maior viabilidade (92,9%), as quais são consideradas altas. JUSTO et al. (2008) realizando uma análise da viabilidade do pólen de cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.), com os corantes carmim acético 2% também encontrou alta viabilidade polínica, assim como KIYOSHI et al. (2012) ao avaliar Waseoba, NUNES et al. (2012) e TECHIO et al. (2010) ao analisarem *L. multiflorum*. Quando a média da viabilidade foi comparada entre os dois estádios fisiológicos de desenvolvimento, os acessos apresentaram maior média de viabilidade polínica no estágio de botão floral em relação ao estágio de flores abertas, apenas as médias do acesso PA121 não diferiram estatisticamente entre os dois estádios.

TABELA 2: Média da viabilidade do pólen pela coloração com o corante carmim acético 2% em botões florais (BF) e flores abertas (FA) de *Theobroma cacao*.

Acessos	Botões florais		Flores abertas	
	Polens Viáveis	% Média	Polens Viáveis	% Média
ICS1	1400	93,33 Aa	1151	76,73 BCDb
MA15	1355	90,33 Aa	1127	75,13 CDb
SIAL505	1422	94,80 Aa	1269	84,60 ABCDb
SCA06	1473	98,20 Aa	1306	87,07 BCDb
CAB0028	1445	96,33 Aa	1322	88,13 ABb
MO01	1446	96,40 Aa	1089	72,60 Db
PA121	1459	97,27 Aa	1394	92,93 Aa
Média	1423,5	95,24	1210,67	82,46

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No teste com o corante lugol não houve diferença estatística significativa entre as médias de viabilidade polínica dos acessos no estágio de botão floral, enquanto que no estágio de flores abertas as médias apresentaram diferenças entre os acessos, sendo que o genótipo ICS1 apresentou a menor média (72,8%). A viabilidade do pólen pode variar consideravelmente entre indivíduos de uma espécie e entre amostras de um mesmo indivíduo (NETO et al., 2006). Quando as médias de viabilidade do pólen foram comparadas entre os dois estádios de desenvolvimento apenas dois acessos apresentaram diferenças estatísticas o ICS1 e o PA121 (Tabela 3).

TABELA 3: Média da viabilidade do pólen pela coloração com o lugol em botões florais (BF) e flores abertas (FA) de *Theobroma cacao*

Acessos	Botões florais		Flores abertas	
	Polens Viáveis	% Média	Polens Viáveis	% Média
ICS1	1409	93,93 Aa	1092	72,80 Bb
MA15	1358	92,80 Aa	1392	90,53 Aa
SIAL505	1448	96,53 Aa	1313	87,53 Aa
SCA06	1448	96,53 Aa	1361	90,73 Aa
CAB0028	1419	94,60 Aa	1395	93,00 Aa
MO01	1437	95,80 Aa	1339	89,27 Aa
PA121	1444	96,27 Aa	1232	82,13 ABb
Média	1423,29	95,21	1303,43	86,57

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se diferenças significativas para a viabilidade polínica em relação aos estádios de desenvolvimento da flor, para alguns genótipos nos dois testes (Tabela 2 e 3). A perda da viabilidade polínica em função do tempo após a abertura da flor foi também observada por SOUZA et al. (2002), em maracujá amarelo utilizando-se de análise histoquímica (solução de Alexander e lugol).

Na tabela 4 estão apresentados os resultados médios de viabilidade polínica da comparação entre os corantes carmim acético 2% e o lugol. É possível verificar que não houve diferença significativa entre os corantes em nenhum dos dois estádios de desenvolvimento fisiológico, porém observa-se uma maior viabilidade polínica nos polens advindos dos botões florais para o carmim acético e lugol (95,24% e 95,21% respectivamente) em comparação com as médias das flores abertas (82,46% e 86,57% respectivamente).

Mesmo os pólenes das flores, que tiveram uma média inferior, apresentaram uma viabilidade polínica acima de 70% para todos os acessos, com uma média acima de 80% nos dois corantes (Tabela 4), podendo então a viabilidade dos polens ser considerada alta para os botões e para as flores, tanto com o carmim quanto com o lugol, pois segundo SOUZA et al. (2002) a viabilidade polínica é considerada alta para valores acima de 70%. Esses percentuais encontrados não causariam danos em trabalhos de melhoramento da espécie *T. cacao* que utilizarem esses acessos no cruzamento, uma vez que a viabilidade polínica é considerada uma medida de fertilidade masculina.

TABELA 4: Resultado da comparação da estimativa da viabilidade polínica de *T. cacao* entre os corantes carmim acético 2% e o lugol nos dois estádios de desenvolvimento fisiológico da flor

Corante	Estádio Fisiológico	Grãos de pólen viáveis	Nº de Grãos de pólen observados	% Média por corante
Carmim Acético	BF	10000	10500	95,24 A
Lugol	BF	9963	10500	95,21 A
Carmim Acético	FA	8658	10500	82,46 B
Lugol	FA	9124	10500	86,57 B

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A viabilidade dos polens dos botões não apresentou diferença estatística significativa quando comparada entre corantes, sendo que todos os genótipos apresentaram uma viabilidade acima de 90% (Figura 2).

Os grãos de polens das flores abertas dos genótipos MA15, MO01 e o PA121 apresentaram diferenças estatísticas significativas quanto à viabilidade quando comparados entre os corantes (Figura 3).

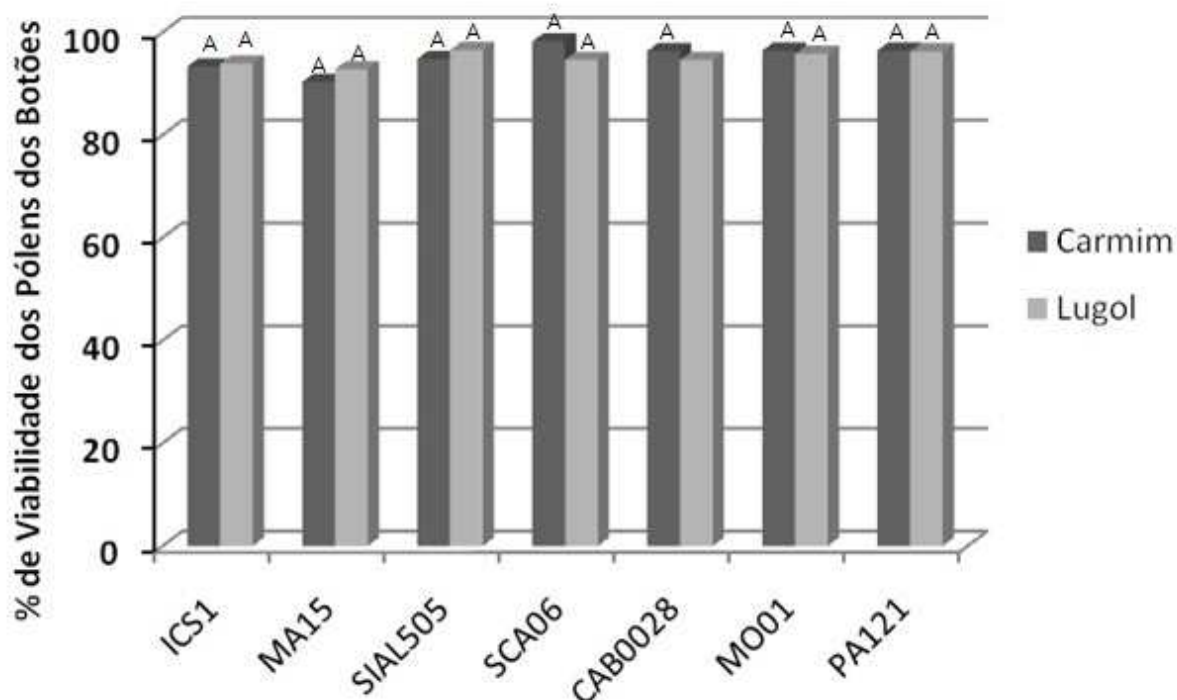


FIGURA 2: Representação gráfica da viabilidade dos polens dos botões fechados nos sete acessos de *T. Cacao* estimada com os dois os dois corantes: carmim e lugol. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

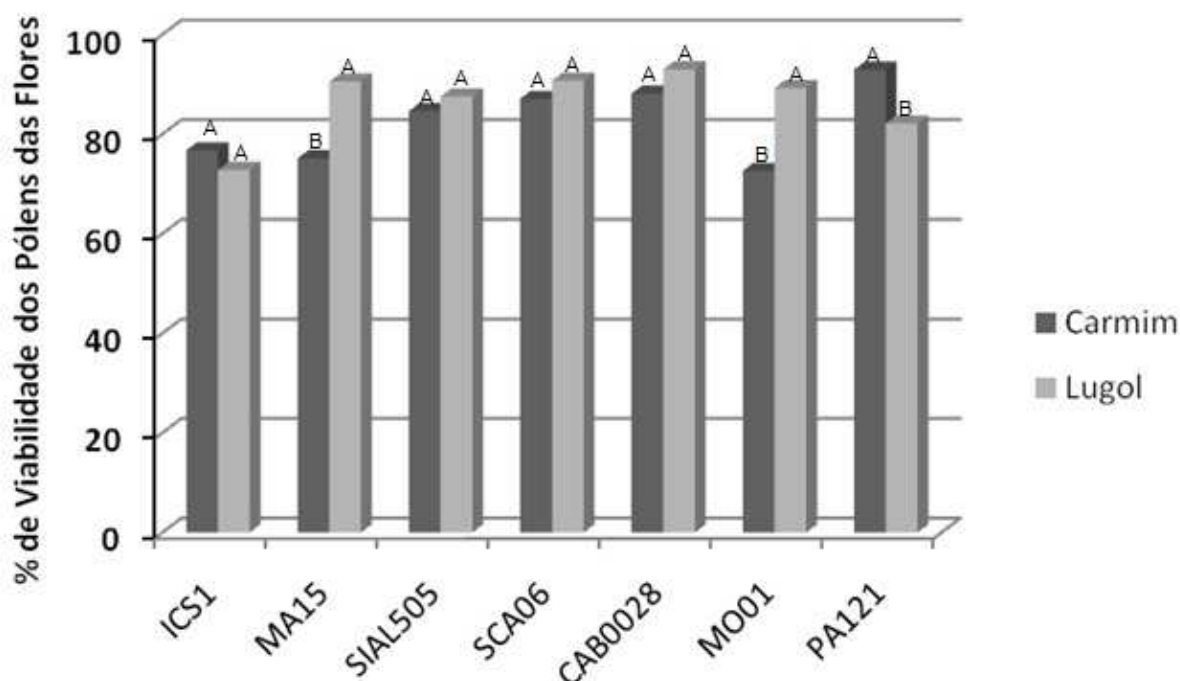


FIGURA 03: Representação gráfica da viabilidade dos polens das flores abertas nos sete acessos de *T. Cacao* estimada com os dois os dois corantes: carmim e lugol. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

Os corantes carmim acético 2% e lugol foram capazes de distinguir com segurança os pólenes de *T. cacao* viáveis dos inviáveis. Os genótipos utilizados neste estudo apresentaram uma taxa de viabilidade polínica alta, independente do corante utilizado. Observou-se diferenças significativas para a viabilidade polínica em relação aos estádios de desenvolvimento da flor para alguns genótipos, sendo nestes o botão floral superior a flor.

AGRADECIMENTOS

A FAPEMAT pelo auxílio financeiro e pela concessão da bolsa de iniciação científica. A CEPLAC pela cedência do material vegetal, e aos estagiários do Laboratório Didático pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, A.; RYAN, A. Sabor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v. 48, n. 9, p. 840-857, 2008.

DAFNI, A. 1992. **Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series)**. New York, Oxford: University press. 250p.

EFRAIM, P. Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, através da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo. Campinas, 2009. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

FERREIRA, D. F.. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

KEARNS, C.A.; INOUE, D. (1993) **Techniques for pollinations biologists**. Niwot: University Press of Colorado.

KIYOSHI, T.; ARAKAWA, A.; UCHIYAMA, K.; FUJIMORI, M.; MIZUNO, K.; CAI, H., Exceptionally high fertility observed in three F1 hybrids between *Lolium multiflorum* Lam. and *L. temulentum* L. *Japanese Society of Grassland Science, Grassland*, v. 58, n. 2, p. 66-72, 2012.

KOBAYASHI, R. S.; SANTOS, A. O. da S.; BASTOS, C.N.; SILVA, F. C. O. da e SCERNE, R. M. C. 2001. **Caracterização Morfológica de Frutos e Sementes de Clones de Cacaueiros (*Theobroma cacao* L.) Silvestres da Amazônia Brasileira. Belém, PA, Brasil, CEPLAC/SUPOR. Boletim Técnico nº 19 p58.**

LOPES, U. V.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; CLEMENT, D.; YAMADA, M. M.; GRAMACHO, K. P. Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results. *Crop*

Breeding and Applied Biotechnology, v. 1, p. 73-81, 2011.

MAFRA, G. S.; GUSMÃO, A.; M. T.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; SILVA, C. R. S., Diversidade genética de populações de cacauzeiros de várzea alta do estado do Amazonas Anais do 10º Seminário Anual de Iniciação Científica da UFRA, 26 à 29 de setembro de 2012

MARTINI, M. H. Caracterização das sementes de seis espécies de *Theobroma* em relação ao *Theobroma cacao* L. 2004. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2004.

NETO, O. D. S.; KARSBURG, I. V.; YOSHITOME, M. Y. (2006) Viabilidade e germinabilidade polínica de populações de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.4, n.1, p.67-74.

NEVES, E.; SILVA F. C. O. Panorama atual do polo cacauzeiro no município de alta floresta e perfil do produtor familiar *Agrotrópica* 25 (1): p 17 - 32. 2013.

NUNES, R. C.; BUSTAMANTE, F. O. TECHIO, V. H. MITTELMANN¹ A. Morphology and pollen viability of *Lolium multiflorum* lam. **Ciência e agroctécologia**, Lavras, v. 36, n. 2, p. 180-188, mar/ abril.2012

PAGLIARINI, M. S., POZZOBON, M. T. (2004) **II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF. PARENTE, V.M.; OLIVEIRA. JR.A.R.; COSTA, A.M. **Projeto Potencialidades Regionais Estudo de Viabilidade Econômica – Cacau**. Disponível em: <http://www.suframa.gov.br>> Acesso em: 20 ago. 2013

SOUZA, M. M. de; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. (2002) Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.26, n.6, p.1209-1217.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos. Barueri, SP: Manole, p.612, 2006.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, I. C; PEDROZO, C. A.; PEREIRA, A.V. 2006 Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto) **Acta Sci. Biol. Sci.**, v.28, n. 1, p. 7-12.